

Angefertigt an den
naturwissenschaftlichen Fachbereichen
in Zusammenarbeit mit dem
Institut für Medizinische Virologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Molekulare Determinanten der Infektiosität von Hepatitis B Virus Partikeln

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

der naturwissenschaftlichen Fachbereiche

- Biologie -

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Stefanie Grün-Bernhard

aus Limburg an der Lahn

Gießen 2008

Dekan: Prof. Dr. Peter R. Schreiner

Gutachter:

Prof. Dr. Albrecht Bindereif

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

Tag der Disputation: 04.12.2008

Zusammenfassung

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die ersten Marker einer etablierten HBV Infektion in einer suszeptiblen Zellkultur nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die cccDNA und die mRNA einen Tag nach der Infektion mittels real-time LightCycler PCR (polymerase chain reaction) nachweisbar sind. An Tag 3 nach der Infektion sind die sekretierten Virusantigene, HBsAg und HBeAg, mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) nachweisbar. Behandelt man Hepatozyten mit dem reverse Transkriptase-Inhibitor Lamivudin, so ist die Sekretion von neusynthetisiertem HBV komplett inhibiert, nicht aber die Produktion und Sekretion der Virusproteine HBsAg und HBeAg.

Desweiteren konnte der Antikörper HB1 charakterisiert werden. Der Antikörper reagiert im ELISA nur mit HBsAg, nicht aber mit einem analogen Protein eines Nagetier HBV-ähnlichen Virus (WHsAg). Im Western Blot kann man mittels des Antikörper HB1 das SHBs (kleines Hepatitis B Virus Oberflächenprotein), MHBs (mittleres Hepatitis B Virus Oberflächenprotein) und LHBs (großes Hepatitis B Virus Oberflächenprotein) der hier untersuchten Genotypen A2, C und D nachweisen. Mit Hilfe des Antikörpers HB1 konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal eine relative Quantifizierung der Oberflächenproteine von HBV durchgeführt werden. Diese Quantifizierung mit dem LI-COR ODYSSEY® Infrared-Fluoreszenz Imaging System ergab, dass bei Genotyp A2 das LHBs 16 %, das MHBs 15 % und das SHBs 58 % der Gesamtoberflächenproteine ausmachen. Bei Genotyp D sieht die Verteilung ähnlich aus.

Das SHBs von HBV ist ein aus 226 Aminosäuren aufgebautes Membranprotein. Die Region der Aminosäuren 99 bis 170 der S-Domäne bildet die HBs-Antigenschleife mit 8 Cysteinen, die inter- und intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden können. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass in der HBs-Antigenschleife 4 freie Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) vorliegen und 4 Sulfhydrylgruppen miteinander verknüpft sind.

Durch Infektionsversuche an primären *Tupaia belangeri* Hepatozyten (PTHs) konnte weiterhin gezeigt werden, dass nach einer Vorbehandlung des HBV mit einer reduzierenden Chemikalie keine Infektion mehr etabliert werden kann. Blockiert man die freien Sulfhydrylgruppen mit Maleimid, so ist die Infektion nur teilweise inhibiert. Das zeigt die Bedeutung der Disulfidbrücken der HBs-

Antigenschleife des HBV für den Infektionsvorgang. Versuche mit oxidiertem Glutathion zeigten, dass eine Vorbehandlung des HBV mit einer oxidierenden Chemikalie die Infektion steigert. Eine Vorbehandlung des HBV mit der Protein Disulfid Isomerase (PDI) hatte keinen Einfluß auf die HBV Infektion, mutmaßlich deswegen, weil HBV selbst im HBsAg mit dem CXXC Motiv das aktive Zentrum einer PDI aufweist. Für die Zukunft wäre eine Aufklärung der Disulfidbrücken und ihrer Änderung während des Infektionsvorgangs wünschenswert.

Bis heute konnte für das Hepatitis B Virus noch kein Rezeptor und Eintrittsmechanismus in Hepatozyten identifiziert werden. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass HBV an Heparan-Sulfat-Proteoglykane bindet, die als eine Art „low-affinity“ Rezeptor im Dissé’schen Raum dienen. Anschließend wechselt das HBV mit seiner PräS1 Bindungsseite und der N-terminalen Myristinsäure an den „high-affinity“ Rezeptor. Dann erfolgt die Aufnahme von HBV in ein noch nicht bekanntes Kompartiment. Dazu konnte gezeigt werden, dass eine Infektion von HBV weder durch Chlorpromazin noch durch Bafilomycin inhibiert werden kann. Demnach benutzt HBV nicht die Clathrin-abhängige Endozytose für den Eintritt in Hepatozyten und ist auch nicht von einer anschließenden Ansäuerung im Endosom abhängig, um eine Infektion zu etablieren. Versuche mit einem Protein Kinase C Inhibitor zeigten, dass die Protein Kinase C ebenfalls keinen Einfluss auf den Eintrittsmechanismus des HBV hat.

Summary

In the beginning of the work the first markers for a successful HBV infection of a susceptible cell culture should be identified. On day 1 after HBV infection cccDNA and mRNA could be detected by real-time LightCycler PCR. On day 3 after infection the virus-antigens HBsAg and HBeAg were detected by immuno assay. Treatment of hepatocytes with the reverse-transcription inhibitor lamivudine led to inhibition of secretion from newly synthesized HBV, but could not inhibit the secretion of the virus-proteins HBeAg and HBsAg.

In addition, the monoclonal antibody HB1 was characterised. In immuno assay studies, HB1 reacted only with HBsAg but not with an analogous protein from a rodent HBV-like virus (WHsAg). In Western blot analysis, HB1 detected the SHBs, MHBs and LHBs of genotypes A2, C and D. With the help of this antibody a relative quantification of the HBV surface proteins could be done for the first time using filament-rich particles. The result of this quantification with the LI-COR ODYSSEY® Infrared-Fluoreszenz Imaging System for genotype A2 was as follows: LHBs contributes 16 %, MHBs 15 %, and SHBs 58 % of the whole surface proteins of HBV. For genotype D the distribution is similar.

The SHBs of HBV is a membrane-protein consisting of 226 amino acids. The region from aa 99 - 170 of the S-domain forms the antigenic loop and contains 8 cysteine residues, which can form inter- and intramolecular disulfide-bonds. In the present work, it could be shown for the first time that the antigenic loop has 4 free cysteines and 4 cysteines that are linked via disulfide-bonds.

Infection assays with primary *Tupaia belangeri* hepatocytes showed that a pretreatment of HBV with a reducing agent inhibits HBV infection completely. Blocking of free sulfhydryl-groups leads to an inhibition of HBV infection. This shows the importance of the disulfide-bonds of the antigenic loop from HBV for infection. Pretreatment of HBV with oxidised glutathione could increase the HBV infection. Pretreatment with a protein-disulfide-isomerase had no effect on HBV infection. Conjectural HBV has an own CXXC motif in the HBsAg itself, in which an active centre is present. For the future a clearing of the disulfide-bridges and their change during the infection-process would be desirable.

Until nowadays, no receptor or entry mechanism for HBV could be identified. In the present work it was shown for the first time that HBV binds in the space of

Dissé to heparan-sulfate-proteoglycans, which serve as low-affinity receptor. Subsequently HBV moves with its preS1 binding-site and the N-terminal myristic-acid to the yet unknown high-affinity receptor. Then, the HBV is taken up in a yet unknown compartment. Furthermore it could be shown that chlorpromazine and bafilomycin were not able to inhibit HBV infection suggesting that, HBV does not use clathrin-dependent endocytosis with following acidification in the endosome for entry. Moreover, experiments with an protein-kinase C inhibitor showed that the potein-kinase C has no effect on HBV infection.

Abkürzungen

A

Abb.	Abbildung
ad	auffüllen bis
Ag	Antigen
Ak, ab	Antikörper, antibody
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Aktivator Protein 1
ARP-1	Apolipoprotein A1 regulatorischen Protein 1
AS, aa	Aminosäure, aminoacid
ASGPR	Asialoglykoprotein-Rezeptor
ASHV	Arctic Squirrel Hepatitis Virus Arktisches Hörnchen Hepatitis Virus

B

b	Basen
bp	Basenpaare
BCP	basaler Core Promotor
BSA	Bovines (Rinder-) Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise

C

°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cccDNA	covalently closed circular DNA kovalent geschlossene zirkuläre DNA
C/EBP	CCAAT / Enhancer-bindende Protein
CHBV	Chimpanzee Hepatitis B Virus Schimpansen Hepatitis B Virus
ChHBV	Crane Hepatitis B Virus Kranich Hepatitis B Virus
CHO	chinese hamster ovary Eierstockzellen des chinesischen Goldhamsters
c-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
COUP-TF1	chicken ovalbumin upstream promotor transcription factor
Cp	Core-Promotor
CURS	core upstream regulating sequence Core stromaufwärts regulierende Sequenz

D

Da	Dalton
d. h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DHBV	Duck Hepatitis B Virus Enten Hepatitis B Virus
Diagr.	Diagramm
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonucleicacid Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DR	Direct Repeat
ds	double stranded doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E	
E	Enhancer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	
Fa.	Firma
FB	Fachbereich
FKS	Fötales Kälberserum
FTF	Fetoprotein-Transkriptionsfaktor
G	
g	Gravitationskraft, Gramm
GE	Genomäquivalente
GiHBV	Gibbon Hepatitis B Virus
GoHBV	Gorilla Hepatitis B Virus
GRE	Glucocorticoid Responsive Element
GSHsAg	Ground Squirrel Hepatitis B Surface Antigen Erdhörnchen Hepatitis B Oberflächenprotein
GSSG	oxidiertes Glutathion
GSH	reduziertes Glutathion
GSHV	Ground Squirrel Hepatitis Virus Erdhörnchen Hepatitis Virus
H	
h	Stunde
HBcAg	Hepatitis B Core Antigen
HBeAg	Hepatitis B e-Antigen
HBsAg	Hepatitis B Surface Antigen Hepatitis B Oberflächenprotein
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	hepatocellular carcinoma Hepatozelluläres Karzinom
HEPES	4-(2-Hydroxyetyl)-1-piperazin-ethan-sulfonsäure
HFL	Hepatozyten-Leukämiefaktor
HGM	Hepatocyte Growth Media
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HHBV	Heron Hepatitis B Virus Graureiher Hepatitis B Virus
HNF	hepatocyte nuclear factor Leberzellkernfaktor
hsp	Hitzeschock Protein

I	
ID	Identifikationsnummer
K	
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
L	
l	Liter
LDS	Lithiumdodecylsulfat
INO	Inokulum
LHBs	large hepatitis B surface protein großes Hepatitis B Virus Oberflächenprotein
M	
Maleimid	Maleimido-PEO3-Biotin
μ	mikro
m	milli
M	molar
mA	Milli-Ampère
mab	monoclonal antibody monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
MLV	Mäuse Leukämie Virus
MHBs	middle hepatitis B surface protein mittleres Hepatitis B Virus Oberflächenprotein
mRNA	messenger ribonucleic acid Boten Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
N	
NaPP	Natriumphosphat-Puffer
NF	Nuclear Factor
ng	Nanogramm
nl	nano Liter
nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
NPC	nuclear pore complex
NRE	Negativ Regulierendes Element
O	
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame offener Leserahmen
OuHBV	Orang Utan Hepatitis B Virus

P

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction Polymerase-Kettenreaktion
PDH	Primary Duck Hepatocytes Primäre Entenhepatozyten
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PEG	Polyethylenglykol
PHH	Primäre Humane Hepatozyten
pg-mRNA	Prägenomische mRNA
PKC	Protein Kinase C
POD	Peroxidase
Pol, P	HBV Polymerase
PPAR	Peroxisom-Proliferator-Aktivierter Rezeptor
präC-mRNA	PräCore-mRNA
Pr	Primer
PRE	Posttranskriptionales Regulatorisches Element
PTH	Primäre Tupaia Hepatozyten
PVDF	Polyvinylidenfluorid

R

RGHBV	Ross Goose Hepatitis B Virus Ross Gans Hepatitis B Virus
RNA	Ribonucleicacid Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkriptase, Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RXR	Retinoid-X-Rezeptor

S

SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SGHBV	Snow Goose Hepatitis B Virus Schneegans Hepatitis B Virus
SH-Gruppen	Sulfhydrylgruppe, Cysteinrest
SHBs	small hepatitis B surface protein kleines Hepatitis B Virus Oberflächenprotein
ss	single stranded einzelsträngig
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
STHBV	Storch Hepatitis B Virus
Sp1	SV40 promotor protein
SREBP1	sterol regulatory element binding protein
Sulfo-NHS	Sulfosuccinimidyl-6-biotin
SV40	Simian Virus 40

T

T	Tag
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBP	TATA-bindendes Protein
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid
TE	Tris-EDTA
TF	Transkriptionsfaktoren
TNE	Tris-Natrium-EDTA
TP	Terminales Protein
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

U

u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
ü. N.	über Nacht

V

V	Volt
---	------

W

WHsAg	Woodchuck Hepatitis B Surface Antigen Waldmurmeltier Hepatitis B Oberflächenprotein
WHO	World Health Organisation Weltgesundheitsorganisation
WHV	Woodchuck Hepatitis Virus Waldmurmeltier Hepatitis Virus
WMHBV	Wolly Monkey Hepatitis B Virus Wollaffen Hepatitis B Virus
w/v	weight per volume Gewicht pro Volumen
w/w	weight per weight Gewicht pro Gewicht

X

X-PBP	X-Promotor-Binde-Protein
-------	--------------------------

Z

z. B.	zum Beispiel
-------	--------------

Alle hier aufgeführten Einheiten sind SI- bzw. erweiterte SI-Einheiten.
Aminosäuren sind im Einbuchstabencode abgekürzt.
Die letzte Stelle aller angegebenen Werte ist gerundet.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Inhaltsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Geschichtliche Einleitung	1
1.2 <i>Hepadnaviridae</i>	2
1.3 Übertragung und klinischer Verlauf	4
1.4 Morphologie	5
1.5 Die S-Domäne von HBV	8
1.6 Genomorganisation	10
1.7 Der virale Lebenszyklus	12
1.7.1 Bindung und Aufnahme	12
1.7.2 Bildung der cccDNA	14
1.7.3 Bildung der prägenomischen mRNA	14
1.7.4 Reverse Transkription	15
1.7.5 Transkription und Expression der viralen Proteine	18
1.7.6 Verpackung und Freisetzung	24
1.8 Infektionssysteme	24
1.8.1 Hepatische Zelllinien	24
1.8.2 Primäre Zellkultursysteme	25
1.9 Struktur und Funktion der Leber	26
1.10 Zielsetzung und experimentelle Ansätze der Arbeit	28
2 Material	30
2.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	30
2.2 Chemikalien	32
2.3 Inhibitoren und Reagenzien	33
2.4 Enzyme	33
2.5 Antikörper und Seren	34
2.6 Primer und Hybridisierungssonden (Hybprobes)	35

2.6.1	für cccDNA-PCR	35
2.6.2	für X-PCR	36
2.6.3	für X-RT-PCR	36
2.6.4	für PG-RT-PCR	36
2.7	PCR-Standards	36
2.7.1	für cccDNA-PCR	36
2.7.2	für X-PCR	37
2.7.3	für RT-PCRs	37
2.8	DNA- und Protein- Längenstandards	37
2.9	Kommerzielle Reaktionssysteme	37
2.10	Puffer, Lösungen und Medien	38
3	Methoden	42
3.1	Aufreinigung von HBV aus dem Plasma chronisch infizierter Patienten mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation	42
3.2	Isolierung und Kultivierung primärer <i>Tupaia belangeri</i> Hepatozyten	43
3.3	Beschichtung der Zellkulturplatten	45
3.3.1	Matrigel	45
3.3.2	Kollagen	45
3.4	Kinetik der Infektion von primären <i>Tupaia</i> Hepatozyten mit HBV auf unterschiedlichen Zellkulturbeschichtungen	45
3.4.1	Zellviabilitäts-Test an primären <i>Tupaia belangeri</i> Hepatozyten	46
3.4.2	Quantitative Bestimmung der Hepatitis B Virus Menge mittels real-time LightCycler PCR	46
3.4.2.1	Prinzip der real-time LightCycler PCR	46
3.4.2.2	Isolierung von HBV DNA aus Überständen von Infektionsversuchen und Serum	48
3.4.2.3	Isolierung von cccDNA und mRNA aus infizierten primären Hepatozyten	49
3.4.2.3.1	cccDNA Isolierung	49
3.4.2.3.2	Gesamt-mRNA-Isolierung	50
3.4.2.4	Quantifizierung der cccDNA von HBV mittels	51

real-time LightCycler PCR	
3.4.2.5 Quantifizierung der X-Region von HBV DNA mittels real-time LightCycler PCR	52
3.4.2.6 Quantifizierung der mRNAs der X-Region von HBV DNA mittels real-time LightCycler PCR reverser Transkription	53
3.4.2.7 Quantifizierung der mRNAs der Prägenom-Region von HBV DNA mittels real-time LightCycler PCR reverser Transkription	54
3.4.2.8 Agarose-Gelelektrophorese der LightCycler PCR Produkte	55
3.4.3 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) zur Bestimmung des HBsAg aus Zellkulturüberständen	56
3.4.4 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) zur Bestimmung des HBeAg aus Zellkulturüberständen	57
3.5 Ansetzen der HBV Verdünnung für Infektionsversuche	58
3.5.1 Infektion primärer Hepatozyten mit HBV unter dem Einfluss von Glycosaminglykanen	58
3.5.2 Infektion primärer Hepatozyten mit HBV nach Behandlung mit unterschiedlichen Enzymen	59
3.5.3 Infektion primärer Hepatozyten mit HBV unter dem Einfluss unterschiedlicher Inhibitoren	60
3.6 In dieser Arbeit verwendetes HBsAg	61
3.6.1 Reduzierung von HBsAg	61
3.6.2 Biotinylierung von HBsAg	62
3.7 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	62
3.8 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	63
3.9 Detektion von Proteinen mittels Western Blot und Chemilumineszenz	64
3.10 Detektion von Proteinen mittels Western Blot und dem ODYSSEY® Infrared Imaging System	65
3.10.1 Prinzip des LI-COR ODYSSEY® Infrared Imaging System (Fluoreszenz Scanner)	65
3.10.2 Ein-Farben-Detektion mittels Western Blot und dem LI-COR ODYSSEY® Infrared Imaging System	66

3.10.3	Zwei-Farben-Detektion mittels Western Blot und LI-COR ODYSSEY® Infrared Imaging System	67
3.11	Quantifizierung der Anteile von freien Sulfhydrylgruppen und Disulfidbrücken in der HBs-Antigenschleife von HBV mittels dem LI-COR ODYSSEY® Infrared Imaging System	67
3.11.1	Erstellung der Standardreihe des biotinylierten BSA zur Quantifizierung	67
3.11.2	Quantifizierung der freien Sulfhydrylgruppen in der HBs-Antigenschleife von HBV	68
3.11.3	Quantifizierung der Disulfidbrücken in der HBs-Antigenschleife von HBV	69
3.12	Biotinylierung von HBV	69
3.12.1	Saccharose Dichtgradientenzentrifugation von biotinyliertem HBV	69
3.12.2	Beschichtung der Dynabeads® M-270 Epoxy	70
3.12.3	Immunpräzipitation mit beschichteten Dynabeads® M-270 Epoxy von biotinylierten und nicht biotinylierten HBV aus der Saccharose Dichtgradientenzentrifugation	71
3.13	Infektionsversuch an primären <i>Tupaia</i> Hepatozyten mit zu un- terschiedlichen Zeitpunkten des Infektionsversuches reduzier- ten und biotinylierten Hepatitis B Viren	71
3.14	Infektionsversuch von primären <i>Tupaia</i> Hepatozyten unter dem Einfluss der Protein-Disulfid-Isomerase vor, während und nach der Bindung von HBV	73
3.15	Infektion primärer <i>Tupaia</i> Hepatozyten mit HBV nach Behandlung mit reduziertem, oxidiertem Glutathion und TCEP	74
3.16	Infektion primärer <i>Tupaia</i> Hepatozyten mit in verschiedenen Konzentrationen biotinyliertem und reduziertem HBV	75
3.17	Biotinylierung und Reduzierung der Zelloberfläche von primären <i>Tupaia belangeri</i> Hepatozyten	76
3.17.1	Infektion mit in verschiedenen Konzentrationen biotinylierter und reduzierter primärer <i>Tupaia</i> Hepatozyten mit HBV	77
3.17.2	Kinetik der HBV Infektion von biotinylierten primären <i>Tupaia belangeri</i> Hepatozyten	78

4	Ergebnisse	79
4.1	Kinetik der Infektion von primären <i>Tupaia</i> Hepatozyten mit HBV auf unterschiedlichen Zellkulturbeschichtungen	79
4.2	Infektion primärer Hepatozyten mit HBV unter dem Einfluss von Glycosaminglykanen	84
4.3	Infektion primärer Hepatozyten mit HBV nach Behandlung mit unterschiedlichen Enzymen	86
4.4	Infektion primärer Hepatozyten mit HBV unter dem Einfluss der Inhibitoren Chlorpromazin und Bafilomycin	88
4.5	Infektion primärer Hepatozyten mit HBV unter dem Einfluss des myristylierten Protein Kinase C Inhibitor 20-28	91
4.6	Charakterisierung des Antikörpers HB1	92
4.6.1	Reaktion im ELISA	92
4.6.2	Reaktion im Western Blot	93
4.7	Quantifizierung der Anteile der Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs des HBV	95
4.8	Charakterisierung der inter- und intramolekularen Disulfidbrücken der HBs-Antigenschleife von HBV	98
4.8.1	Mittels Silbergel	98
4.8.2	Mittels LI-COR ODYSSEY® Infrared Imaging System	99
4.9	Quantifizierung der freien Sulfhydrylgruppen im HBsAg	101
4.9.1	Erstellen der Standardreihe	101
4.9.2	Quantifizierung der Proben	102
4.10	Einfluss einer Biotinylierung mit Maleimido-PEO3 auf das HBV	105
4.10.1	Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation	105
4.10.2	Immunpräzipitation	107
4.11	Einfluss der Disulfidbrücken und freien Sulfhydrylgruppen der HBs-Antigenschleife auf die HBV Infektion von primären <i>Tupaia</i> Hepatozyten	108
4.12	Einfluss der Protein-Disulfid-Isomerase vor, während und nach der Bindung von HBV	111
4.13	Einfluss von reduziertem, oxidiertem Glutathion und TCEP auf die HBV Infektion	114
4.14	Infektion primärer <i>Tupaia</i> Hepatozyten mit HBV, das in	117

verschiedenen Konzentrationen biotinyliert und reduziert war	
4.15 Infektion mit in verschiedenen Konzentrationen biotinylierten und reduzierten primären <i>Tupaia</i> Hepatozyten	119
4.16 Kinetik der HBV Infektion von biotinylierten primären <i>Tupaia belangeri</i> Hepatozyten	121
5 Diskussion	124
5.1 Kinetik der Infektion von primären <i>Tupaia</i> Hepatozyten mit HBV auf unterschiedlichen Zellkulturbeschichtungen	124
5.2 Einfluss von Glycosaminglykanen auf die HBV Infektion	126
5.3 Einfluss unterschiedlicher Inhibitoren auf die HBV Infektion	128
5.4 Charakterisierung des Antikörpers HB1	130
5.5 Charakterisierung der inter- und intramolekularen Disulfidbrücken der HBs-Antigenschleife von HBV	131
5.6 Einfluss der Disulfidbrücken und freien Sulfhydrylgruppen der HBs-Antigenschleife auf die HBV Infektion von primären <i>Tupaia</i> Hepatozyten	132
5.7 Blockierung von Aminogruppen der HBsAntigenschleife	135
5.8 Biotinylierung und Neusynthese des HBV Rezeptors	136
6 Literaturverzeichnis	138
7 Danksagung	157
8 Lebenslauf	158
9 Publikationen und Kongressbeiträge	159
10 Eidesstattliche Erklärung	162

1 Einleitung

1.1 Geschichtliche Einleitung

Die epidemische Gelbsucht ist eine Lebererkrankung, über die schon im Altertum berichtet wurde. Ihre infektiöse Natur wurde aber erst 1885 nachgewiesen (Lürmann et al., 1885). Die erste Spur eines Erregers von Typ B wurde 1963 von Baruch S. Blumberg in Verbindung mit einem ungewöhnlichen Serumprotein im Blut eines australischen Ureinwohners gefunden (Blumberg et al., 1967). In den Folgejahren wurde nach einigen Irrwegen die Verbindung zwischen dem sogenannten „Australia Antigen“ und der durch Serum übertragenen Hepatitis schrittweise entdeckt. Das „Australia Antigen“ besteht aus ca. 20 nm großen Partikeln, die keine Nukleinsäure enthalten (Abb. 1). Die Bedeutung des „Australia Antigen“ blieb daher zunächst verborgen. Im Blut von „Australia Antigen“ positiven Patienten wurden dann aber 1970 zusätzliche Partikel mit einer Größe von 45 nm von David Dane entdeckt. Aus diesen Partikeln konnte 1971 June Almeida mit Detergenzien sogenannte Core-Partikel freilegen (Almeida et al., 1971). Die sogenannten Dane Partikel enthielten das „Australia Antigen“ auf der Oberfläche, eine endogene DNA-Polymerase (Kaplan et al., 1973; Robinson et al., 1974) und die dazugehörige DNA (Robinson et al., 1974) innerhalb des Core-Partikels. Daraufhin wurde das Dane Partikel als Hepatitis B Virus (HBV) und das „Australia Antigen“ als Hepatitis B Surface Protein (HBsAg) bezeichnet. Das Core-Partikel wurde mit HBcAg abgekürzt. Neueste elektronenmikroskopische Aufnahmen des Hepatitis B Virus deuten auf eine Größe von 48 nm hin (Bremer et al., 2008).

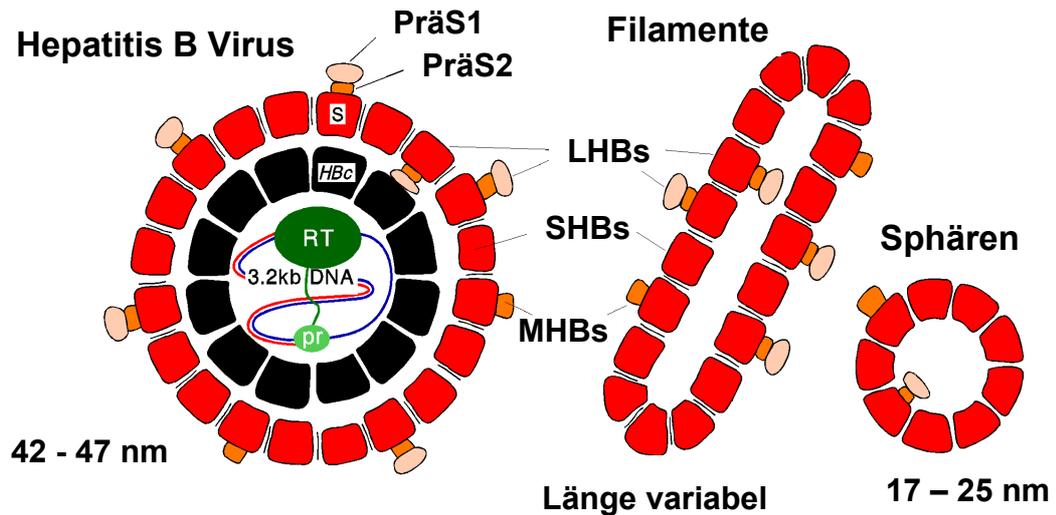


Abb. 1: Schematische Darstellung des Virions und der subvirealen Partikel (Filamente und Sphären) des Hepatitis B Virus.

Hülle (rot) mit dem kleinen (SHBs), mittleren (MHBs) und großen (LHBs) Oberflächenprotein; S (rot): S-Domäne; PräS2 (orange): PräS2-Domäne; PräS1 (rosa): PräS1-Domäne; Nukleokapsid (schwarz) bestehend aus den Core-Protein-Untereinheiten (HBc); RT (grün): Reverse Transkriptase; pr (hellgrün): Primer-Protein. (modifiziert nach Kann und Gerlich, 2005)

1.2 *Hepadnaviridae*

HBV gehört zu der Familie der *Hepadnaviridae* (Robinson et al., 1984; Mason et al., 2005), dabei steht „Hepa“ für Leber und „dna“ für Desoxyribonukleinsäure (DNA). *Hepadnaviridae* können akute und chronische Hepatitis verursachen (Feitelson et al., 1986; Robinson et al., 1991) und zeichnen sich durch einen strikten Lebertropismus und ein enges Wirtsspektrum aus. *Hepadnaviridae* zeigen keine direkte Zytotoxizität (Chisari und Ferrari, 1995) und vermehren sich nur in differenzierten Leberzellen. Bei allen *Hepadnaviridae* werden von infizierten Hepatozyten nicht nur infektiöse Virionen gebildet, sondern es kommt auch zu einer Produktion von nicht infektiösen subvirealen Partikeln, die ebenfalls im Blut nachzuweisen sind (Dane et al., 1970; Summers et al., 1978; Mason et al., 1980; Marion et al., 1980). Die *Hepadnaviridae* replizieren ihre DNA mittels einer reversen Transkriptase über ein RNA-Prägenom (Summers und Mason, 1982). Durch die Reverse Transkription weisen die *Hepadnaviridae* eine phylogenetische Verwandtschaft zu den Retroviren, Retrotransposons und zu einigen Pflanzenviren, z. B. dem Blumenkohlmosaikvirus (Familie: *Caulimoviridae*) auf (Toh et al., 1983; Miller und Robinson, 1986; Seeger et al., 1986; Fuetterer und Hohn, 1987). Dies führte zu ihrer Bezeichnung als *Pararetroviren*. Die Familie der *Hepadnaviridae* wird in zwei Genera unterteilt: die *Orthohepadnaviren* der Säugetiere (Abb. 2)

und die *Avihepadnaviren* der Vögel. Zu den *Orthohepadnaviren* gehört das Hepatitis B Virus der Altweltprimaten wie das des Menschen (HBV, Dane et al., 1970), des Schimpansen (ChHBV, Vaudin et al., 1988), des Orang-Utans (OuHBV, Warren et al., 1999), des Gorillas (GoHBV, Grethe et al., 2000) und des Gibbons (GiHBV, Norder et al., 1996). Außerdem gibt es das Wolly Monkey Virus (WMHBV) des Wollaffen (Lanford et al., 1998), das Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) des Amerikanischen Waldmurmeltiers (Summers et al., 1978), das Ground Squirrel Hepatitis Virus (GSHV) des Kalifornischen Erdhörnchens (Marion et al., 1980) und das Arctic Squirrel Hepatitis Virus (ASHV) des Arktischen Hörnchens (Testut et al., 1996). Zu den *Avihepadnaviren* zählen das Duck Hepatitis B Virus der Pekingente (Mason et al., 1980), das Heron Hepatitis B Virus (HHBV) des Graureihers (Sprengel et al., 1988), das Ross Goose Hepatitis B Virus (RGHBV) der Ross Gans (Chang et al., 1999), das Snow Goose Hepatitis B Virus (SGHBV) der Schneegans (Chang et al., 1999), das Storch Hepatitis B Virus (STHBV) der Weißstörche (Pult et al., 2001) sowie das Crane Hepatitis B Virus (CHBV) der Kraniche (Prassolov et al., 2003).

Das humane Hepatitis B Virus kann in 8 Genotypen, A bis H, unterteilt werden, die sich zwischen 8 und 15 % in ihrer DNA Sequenz unterscheiden (Norder et al., 2004). Die verschiedenen Genosubtypen reflektieren eine vorwiegend ethnische Verteilung:

- A1: in Afrika, Brasilien und Indien
- A2: in Europa und USA
- B1 und B2: in China und Japan
- B3: in Indonesien
- B4 : in Vietnam
- C1 und C2: in China, Japan und Korea
- C3: in Ozeanien
- C4: in australischen Ureinwohnern
- D1-3: in Europa, dem Mittelmeerraum, Mittlerer Osten und Zentralasien
- D4: in Ostasien
- E: in Westafrika und Madagaskar
- F1 und H: in Zentralamerika
- F2: in Südamerika und Polynesien
- G: ist selten und hat kein geographisches Muster

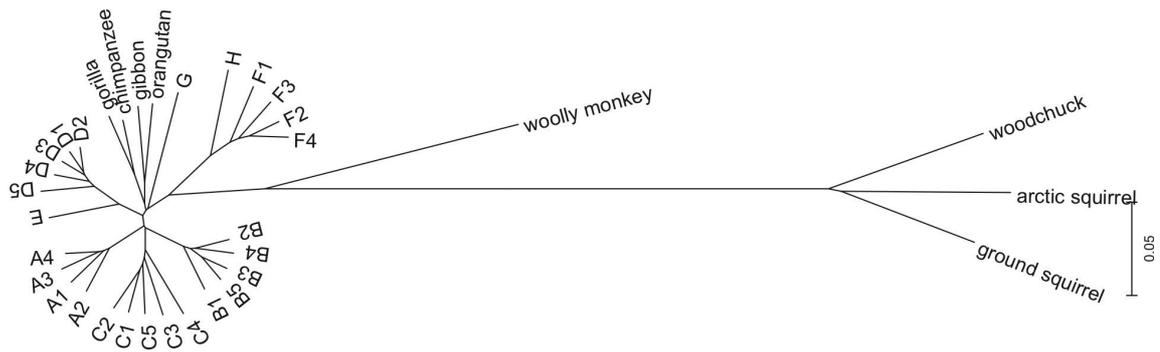


Abb. 2: Phylogenetischer Stammbaum der *Orthohepadnaviridae*.

Für die humanen Sequenzen sind nur die Genosubtypen, z.B. A1, angegeben. Für die hepadnaviralen Genome der Affen und Nagetiere ist der Name des Wirtes angegeben. Das Alignment der kompletten Sequenzen wurde mit Clustal W im Programm DNASTAR durchgeführt. (modifiziert nach Schaefer, 2007)

1.3 Übertragung und klinischer Verlauf

Nach Schätzungen der WHO (World Health Organization) sind ca. 350 Mio Menschen chronische Virusträger. Beinahe die Hälfte der Weltbevölkerung hatte schon einmal Kontakt mit HBV (Kann und Gerlich, 2005). In der Liste der häufigsten Todesursachen durch Infektionen weltweit steht das Hepatitis B Virus an fünfter Stelle (World Health Organization).

Das Hepatitis B Virus wird parenteral, perinatal und sexuell übertragen. Es wurde praktisch schon in allen Körperflüssigkeiten wie z. B. Blut, Speichel, Urin, Liquor, Tränen, Muttermilch und Magensaft nachgewiesen (Lavanchy, 2004). Schon eine geringe Menge von 0,1 nl Blut kann zu einer Ansteckung mit HBV führen. Der Verlauf einer Hepatitis B Virus Infektion kann sehr variabel sein und hängt neben der Replikationsstärke und Infektionsdosis des HBV auch von den körperlichen Parametern wie z. B. Alter, Geschlecht und Gesundheitszustand einer infizierten Person ab.

Bei Erwachsenen mit einem intakten Immunsystem führt eine Infektion mit einer geringen Dosis HBV oftmals zu einem inapparenten Verlauf, während dessen sich das Virus zunächst in geringerem Umfang vermehrt, dann aber eliminiert wird und sich eine Immunität anschließt. Tritt eine Infektion mit einer höheren Dosis auf, gibt es unterschiedlichen Möglichkeiten des Infektionsverlaufs. In 60 bis 65 % der Fälle kommt es zu einer akuten Hepatitis, die sich durch allgemeines Unwohlsein sowie Müdigkeit und Appetitlosigkeit äußert. Anschließend folgt meist ein ikterisches Stadium mit Gelbsucht. Die akute

Hepatitis B heilt meist vollständig aus und führt ebenfalls zur Immunität. In seltenen Fällen (ca. 1 %) kommt es zu einem fulminanten Verlauf. Dieser führt zur hepatischen Enzephalopathie sowie zum Versagen der Gerinnungssysteme und führt unbehandelt in 70 % der Fälle zum Tod. In 5 bis 10 % der Fälle kann es nach der akuten Phase zu einem chronischen Verlauf kommen. Im Kindesalter oder bei Immundefizienz kommt es sehr häufig zu einem primär chronischen Verlauf, der in 20 bis 30 % der Fälle in eine Leberzirrhose übergeht. Erwachsene mit einer chronischen Hepatitis B haben ein um den Faktor 100 bis 200 höheres Risiko an einem hepatozellulären Karzinom (HCC) zu erkranken als die HBsAg negative Bevölkerung (Beasley et al., 1981; Arbuthnot und Kew 2001; Block et al., 2003; Cougot et al., 2005; Chen et al., 2006). Das HCC tritt häufiger bei Männern als bei Frauen auf. Dabei beträgt das Verhältnis von erkrankten Männern zu erkrankten Frauen von 2:1 bis 11:1 (Yu und Chen, 1994).

Die Krankheitssymptome der akuten und chronischen Hepatitis werden durch die zellvermittelte Immunabwehr des Wirtes ausgelöst (Chisari und Ferrari, 1995), da das Hepatitis B Virus selbst nicht zytotoxisch ist. Es kann aber nach einer Infektion auch zu einer Art immuntoleranten Verlauf kommen, in der sich das Virus stark vermehrt und persistiert, ohne dass es zu einer Krankheit kommt. Solche symptomlosen Virusträger werden oft nur dadurch erkannt, dass bei ihren Kontaktpersonen eine akute Hepatitis B auftritt. Langfristig entwickeln aber auch diese „immuntoleranten“ Träger meistens Leberzirrhose oder HCC.

1.4 Morphologie

Das Hepatitis B Virus ist ein DNA-Virus mit einem Durchmesser von ca. 42 bis 47 nm (Dane et al., 1970). Das Virus besitzt eine Lipidhülle, in welcher die drei unterschiedlichen Hepatitis B Surface Proteine (HBs Proteine) verankert sind (Abb. 1): Das Large-(große-), Middle-(mittlere-) und Small-(kleine) Hepatitis B Surface Protein. Diese Proteine besitzen ein identisches carboxyterminales Ende, aber unterschiedliche N-Termini. Das SHBs wird nur aus der S-Domäne gebildet (Abb. 3a). Das MHBs umfasst die S- und PräS2 Domäne (Abb. 3b). Das LHBs Protein besteht aus der S-Domäne, PräS2- und PräS1-Domäne. In kompletten Virionen kann das LHBs unterschiedliche Topologien annehmen, indem seine PräS1 Domäne in das Lumen gerichtet oder auf der Virushülle

exponiert ist (Bruss et al., 1994). Intrazellulär liegt ko- und posttranslational die PräS-Domäne im Cytosol vor (Abb. 3c). Nach der Virusumhüllung wechselt ein Teil der ursprünglich nach innen weisenden PräS-Domäne durch die Virusmembran auf die Virusoberfläche (Abb. 3d). Da alle HBs Proteine ganz oder teilweise an einer oder zwei Stellen glykosyliert werden können, gibt es jeweils 2 Varianten der 3 Proteine: GP42, P39; GP36, GP33; GP27 und P24 (Abb. 4).

Das Innere des Virus wird durch das 36 nm große Core-Partikel gebildet (Almeida et al., 1971). Das Core-Partikel hat im Virion eine ikosaedrische T4 - Symmetrie und besteht aus 180 oder 240 Coreproteinen (Crowther et al., 1994; Kenney et al., 1995; Dryden et al., 2006; Seitz et al., 2007). Im Core-Partikel befindet sich die 3,2 Kilobasen (kb) große, partiell doppelsträngige DNA des Hepatitis B Virus. Am 5'- Ende des proteincodierenden DNA-Minusstranges befindet sich kovalent gebunden die virale DNA-Polymerase.

Im Serum von Hepatitis-B-infizierten Menschen kann man neben den HB-Virionen auch noch große Mengen subviraler Partikel finden. Diese Partikel sind nicht infektiös, da sie nur die Hüllproteine von HBV enthalten und keine Nukleinsäuren. Diese nicht infektiösen Partikel kommen in zwei verschiedenen Formen vor. Die sphärischen Partikel haben einen Durchmesser von 17 bis 25 nm und die Filamente bei gleichem Durchmesser eine variable Länge (Robinson et al., 1977). Im Blut infizierter Menschen, die gegen das HBV quasi immuntolerant sind, kommt das Hepatitis B Virus mit einer Konzentration von 10^9 bis 10^{11} Viruspartikel pro Milliliter Blut vor. Außerdem sind zusätzlich zwischen 10^{11} und 10^{12} Filamente und zwischen 10^{12} und 10^{14} sphärische Partikel / ml nachweisbar (Abb. 1 und 4).

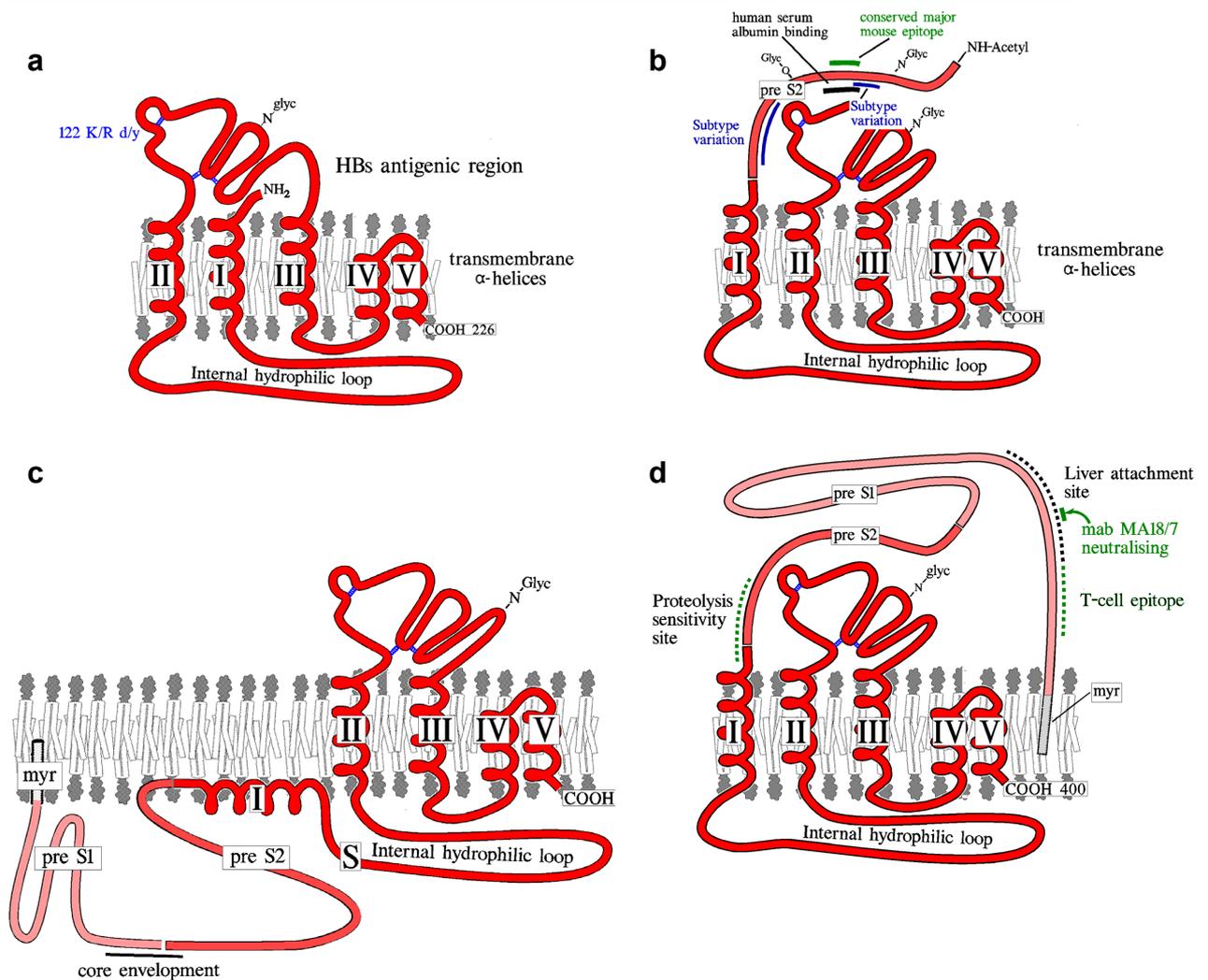


Abb. 3: Postulierte Topologien der HBV Oberflächenproteine.

(a) SHBs (b) MHBs (c) LHBs mit PräS im Cytosol (d) LHBs mit PräS an der Virusoberfläche. Die Membranproteine sind in grau und weiß dargestellt. Die vorausgesagten Transmembrandomänen sind mit I-V durchnummeriert, N-Glyc: N-Glykolysierung, O-Glyc: O-Glykolysierung, myr: Myristilierung, hellblau: postulierte Disulfidbrücken. (modifiziert nach Gerlich und Kann, 2005)

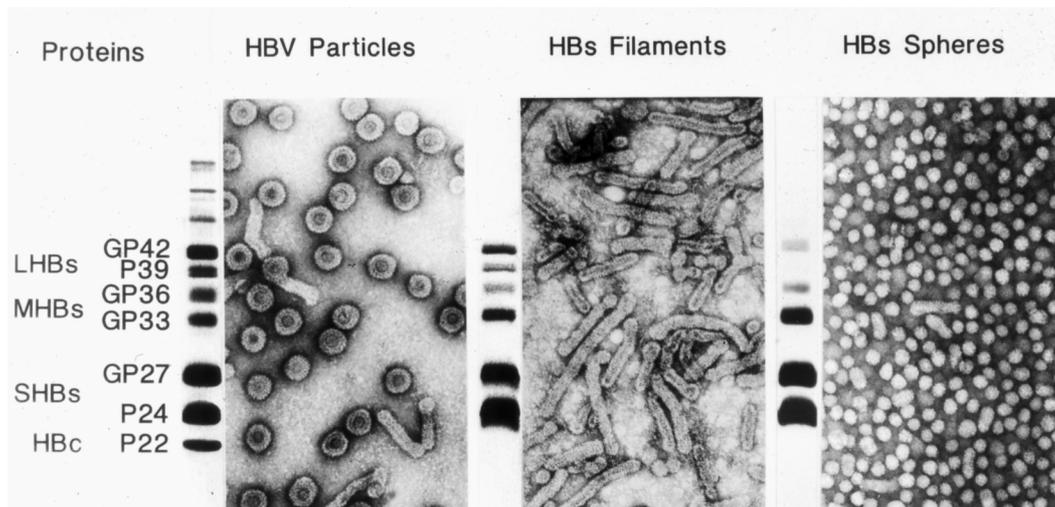


Abb. 4: HBV assoziierte Partikel im Blut eines hochtitrig chronisch infizierten Patienten.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen und Protein Muster nach einer SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung. (modifiziert nach Schaefer, 2008)

1.5 Die S-Domäne von HBV

Die S-Domäne von HBV ist ein aus 226 Aminosäuren aufgebautes Membranprotein (Abb. 3a). Es bildet mindestens zwei, möglicherweise bis zu fünf Transmembrandomänen mit zwei hydrophilen Schleifen, von denen eine nach außen (intrazellulär in das Lumen des ER) und die andere nach innen gerichtet ist. Das SHBs (small hepatitis B surface protein) ist notwendig für die Morphogenese von HBV und die Sekretion von 20 nm HBsAg (Hepatitis B Surface Antigen) Partikel (Bruss et al., 1994). Die Region der Aminosäuren 99 bis 170 der S-Domäne bildet die HBs-Antigenschleife (antigenic loop, Abb. 5) mit acht Cysteinen, die inter- und intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden können. Die Anzahl und Position der Cysteinreste ist streng konserviert und ebenfalls in den Antigenschleifen von WHsAg (Woodchuck Hepatitis B Surface Antigen) und GSHsAg (Ground Squirrel Hepatitis B Surface Antigen) zu finden. Die Aminosäuren 121 bis 124 (CRTC) der antigenen Region bilden ein CXXC Motiv, welches als aktives Zentrum der Proteindisulfidisomerase (PDI) und verwandter Proteine bekannt ist (Chivers et al., 1997). Dieses Motiv ist bei über 100 HBV-Subtypen und HBsAg-Mutanten konserviert (Qui et al., 1996).

Bis jetzt ist die Verknüpfung der acht Cysteine und die daraus resultierende Tertiärstruktur der Antigenschleife nicht geklärt. Die S-Domäne enthält offensichtlich Elemente, welche am Aufnahmemechanismus von HBV in die Hepatozyten beteiligt sind, da Antikörper gegen die S-Domäne eine HBV Infektion *in vivo* und *in vitro* neutralisieren können (Iwarson et al., 1985; Shearer et al., 1998; Ogata et al., 1999; Glebe et al., 2003). Außerdem enthält der zurzeit erhältliche rekombinante Hepatitis B-Impfstoff HBsAg des Genotypes A2 und schützt ebenfalls gegen die anderen Genotypen von HBV. Glebe et al. zeigten 2003, dass monoklonale Antikörper (z. B. C20/2), welche die Konformation der Antigenschleife erkennen, eine Infektion völlig inhibieren können. Antikörper, welche sequenzielle Epitope der Antigenschleife erkennen, können die Infektion nicht so gut inhibieren. Daher ist eine korrekt gefaltete Antigenschleife wichtig für die Aufnahme von HBV in die Hepatozyten und die Etablierung einer Infektion. Außerdem wird die Bedeutung der S-Domäne durch das Auftreten von „Escape“-Mutanten in der Antigenschleife (Aminosäuren 100 bis 170) des SHBs von anti-HBs positiven HBV infizierten Patienten (Carman et al., 1990; Nainan et al., 2002) deutlich.

Die PräS-Domäne enthält keine Cysteine und bildet daher vorwiegend sequentielle Epitope.

Die Determinante a des HBsAg gilt als die Epitop-Gesamtheit der HBs-Schleife, welche bei allen Genosubtypen vorkommt. Eine genaue Position bzw. eine Konsensus-Sequenz lässt sich nicht eindeutig ableiten. Viele Autoren lokalisieren die a-Determinante in der S-Domäne von AS 121 bis 147. Bekannt ist, dass die meisten Epitope der Determinante a Disulfidbrücken-abhängig sind, jedoch gibt es auch konservierte sequentielle Epitope oder Paratope, die nicht zwischen Arginin und Lysin unterscheiden. Schon früh wurden HBsAg Subtypen-Determinanten identifiziert, die einzelnen AS-Polymorphismen zugeordnet werden können. An Position 122 definiert ein Lysin (K) die HBs Subtyp-Determinante d, ein Arginin (R) y. An Position 160 definiert ein Lysin (K) die Determinante w, Arginin (R) die Determinante r. W kann je nach AS an Position 122 und 127, noch nach w1 (R122, P127), w2 (K122, P127), w3 (K122, T127) oder w4 (K122, I/L127) aufgegliedert werden. Eine feste Beziehung zwischen HBsAg Subtyp und HBV Geno(sub)typ besteht nicht (Norder et al., 2004).

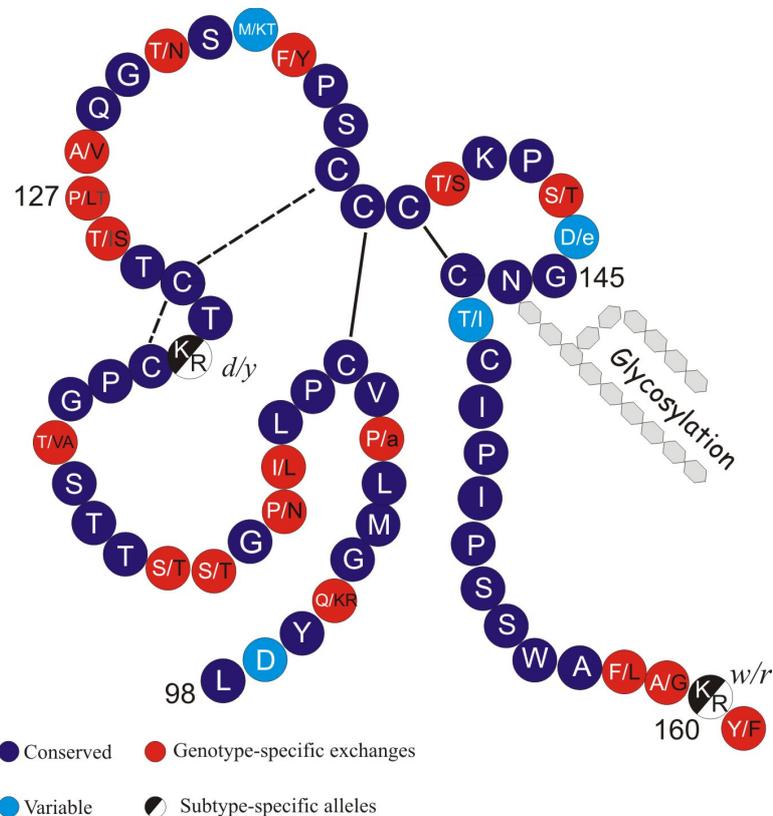


Abb. 5: Hypothetisches Modell der HBs-Antigenschleife (a-Determinante).

Die Aminosäurereste 122 und 160, welche Subtyp spezifische Änderungen von d/y bzw. w/r bezeichnen, sind in schwarz/weiß gekennzeichnet. w2 Reaktivität ist bestimmt durch P127, w3 durch T127, w4 durch L/I127. (modifiziert nach Schaefer, 2005)

1.6 Genomorganisation

Das Genom der unterschiedlichen Genotypen des Hepatitis B Virus variiert in seiner Länge. Das Genom der Genotypen B, C, F und H ist 3215 Nukleotide lang. Der HBV Genotyp D hat eine Deletion aus 33 Nukleotiden in der PräS1 Region (Spacer Region des Polymerase-Gens) und somit nur eine Länge von 3182 Nukleotiden. Bei Genotyp A hat das Genom im Bereich des Core-Proteins, überlappend mit der terminalen Protein-Region der Polymerase, eine Insertion von sechs Nukleotiden und somit eine Länge von 3221 Nukleotiden. Die HBV Genotypen E und G besitzen eine Deletion aus drei Nukleotiden in der Spacer Region des Polymerase-Gens und im PräS. Genotyp E hat eine Länge von 3212 Nukleotiden und das Genom von Genotyp G ist das größte mit einer Länge von 3248 Nukleotiden. Es hat eine 36 Nukleotid lange Insertion im N-Terminus des Core-Gens (Bartholomeusz und Schäfer, 2004).

Damit besitzt HBV eines der kleinsten Genome, die bei Viren gefunden wurden. Trotz seiner geringen Genomgröße besitzt HBV eine komplexe Struktur (Abb. 6). Das HBV Genom besteht aus einer partiell doppelsträngigen, zirkulären DNA (Summers et al., 1975). Der DNA-Minusstrang hat eine konstante Länge von ca. 3200 Nukleotiden (siehe oben) und besitzt ein definiertes 5'- und 3'- Ende. Die Enden des Minusstranges sind nicht kovalent verbunden. Die zirkuläre Struktur kommt durch die Basenpaarung des Minus- mit dem Plusstrang zustande. Der komplementäre Plusstrang hat ein definiertes 5'- Ende, aber ein variables 3'- Ende. Daher hat er eine variable Länge von 1100 bis 2600 Nukleotiden und ist damit nicht vollständig (Hruska et al., 1977; Landers et al., 1977). Dies kommt dadurch zustande, dass die Sekretion des Virus einsetzt, bevor die endogene DNA-Polymerase den Plusstrang komplementiert hat. Möglicherweise spielt auch die räumliche Enge innerhalb des Core-Partikels eine Rolle. Der Plusstrang kodiert nicht für virale Genprodukte und wird daher nicht transkribiert. Die beiden Enden des Minusstranges überlappen sich in einem Bereich von ca. 8 bis 10 Nukleotiden (terminale Redundanz). Diese beiden Enden werden von dem Plusstrang überspannt (Sattler und Robinson, 1979), was zur zirkulären Form des HBV Genoms führt. An dieser Stelle liegt das HBV Genom über acht bis zehn Nukleotide sogar dreisträngig vor (Will et al., 1987). Eine weitere Besonderheit des HBV Genoms sind die direkten Wiederholungsequenzen DR1 und DR2

(direct repeats, Dejean et al., 1984). Sie haben eine Länge von 11 Basenpaaren, liegen ungefähr 225 Basenpaare entfernt voneinander und spielen eine wichtige Rolle bei der Replikation des HBV Genoms (Siddiqui et al., 1979; Will et al., 1987). An das 5'- Ende des Minusstranges ist ein terminales Protein (TP-Protein) kovalent gebunden (Gerlich und Robinson, 1980), welches sich später als die virale DNA-Polymerase erwies (Bartenschlager und Schaller, 1988). Der Minusstrang beginnt mit der DR1 Sequenz. Am 3'- Ende des Minusstranges liegt wieder die DR1 Sequenz vor. Ungefähr 20 Basenpaare vor diesem DR1 gegen Ende der transkribierten RNAs liegt die einzige Konsensussequenz für die Polyadenylierung. Am 5'- Ende des unvollständigen Plusstranges findet man ein 18 Nukleotid langes RNA Stück mit einer Cap-Struktur (Seeger et al., 1986). Vor diesem RNA Stück liegt der DR2. Das 3'- Ende befindet sich mutmaßlich im aktiven Zentrum der DNA-Polymerase. Sie ist ein Multifunktionsenzym mit vier verschiedenen Funktionen: (1) Primerfunktion, (2) Spacer, (3) reverse Transkriptaseaktivität und (4) RNase-H Funktion.

Der Minusstrang kodiert vier konservierte, offene Leserahmen (ORFs = open reading frames, Abb. 6), welche sich in unterschiedlicher Länge überlappen (Tiollais et al., 1985). Diese vier offenen Leserahmen kodieren folgende Proteine: (1) Das Core Protein und die meistens vorhandene PräCore Region, (2) die DNA-Polymerase, (3) die co-carboxyterminalen Oberflächenproteine (LHBs, MHBs und SHBs) und (4) das X-Protein. Die Expression der ORFs wird durch vier Promotoren (core, präS1, präS2/S, X) kontrolliert, sowie durch den Enhancer 1 und 2 (Tang, 2001), das Glucocorticoid responsive Element (GRE) und das negativ regulierende Element (NRE). Die Terminierung der Transkription wird durch eine Polyadenylierungsstelle an Position 1921 kodiert, was dazu führt, dass alle viralen mRNAs das gleiche 3'- Ende besitzen (Ganem und Varmus, 1987). Die mRNAs für core/präCore überlesen beim ersten Durchgang das Transkriptions-Stoppsignal.

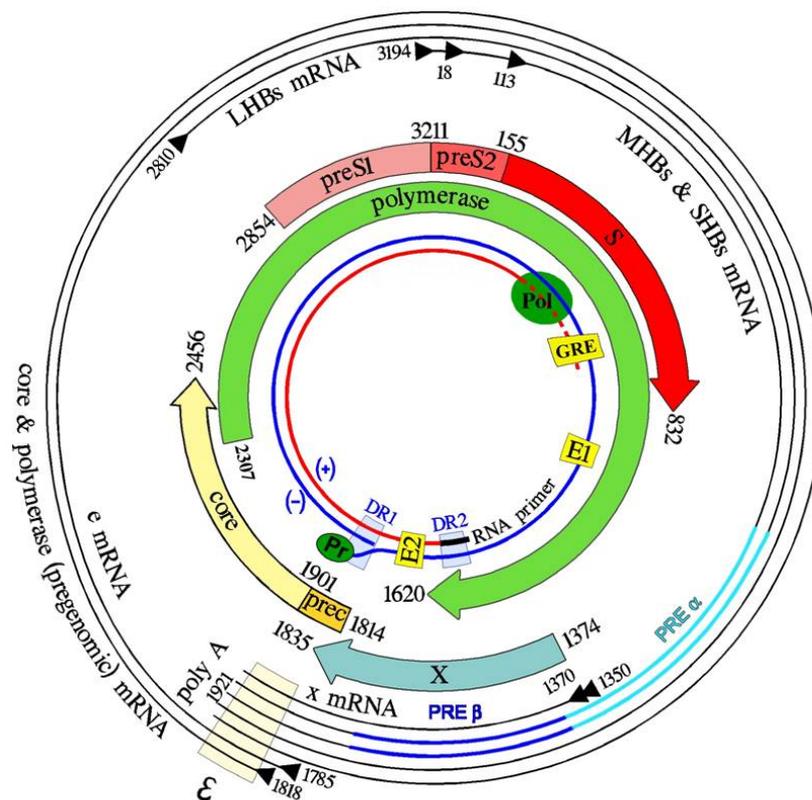


Abb. 6: Genomstruktur und Transkripte der Orthohepadnaviren mit vier konservierten ORFs (offene Leserahmen) am Beispiel des HBV Genotyps A.

Der S-ORF (rot, hellrot, rosa) kodiert für die drei Oberflächenproteine, wobei durch alternative Nutzung der jeweiligen Startcodons der S-, PräS2- und PräS1-Domäne das kleine, mittlere und große Oberflächenprotein translatiert werden. Der C-ORF (gelb) codiert für das Core-Protein. Die Funktion des X-ORF (blau) ist weitgehend unbekannt, Pol: Reverse Transkriptase Domäne der DNA-Polymerase; PR: Primase-Domäne der Polymerase; GRE: Glucocorticoid Response Element; E1, E2: Enhancer 1 und 2; DR1 und DR2: Direct Repeat 1 und 2; PRE α und PRE β : Post-translational Regulatory Elements; ϵ = Verpackungs- (encapsidation) Signal; (-) = DNA-Minusstrang; (+) = DNA-Plusstrang; ▲ = Transkriptionsstartpunkte. (modifiziert nach Kann und Gerlich, 2005)

1.7 Der virale Lebenszyklus

1.7.1 Bindung und Aufnahme

Der Infektions- und Replikationszyklus von HBV beginnt mit den bis jetzt noch weitgehend unbekanntenen Schritten von Bindung und Aufnahme von HBV in die Hepatozyten (Abb. 7). Man nimmt an, dass HBV im Dissé'schen Raum an Heparan-Sulfat-Proteoglykane bindet, die einen „low-affinity“ Rezeptor darstellen (Schulze et al., 2007; Leistner et al., 2008). Anschließend bindet HBV mit seiner PräS1 Binderegion und der N-terminalen Myristinsäure an einen bisher nicht identifizierten „high-affinity“ Rezeptor. Die Binderegion lässt sich in eine für die Bindung essentielle Sequenz von Aminosäure 9 bis 18 und in eine

akzessorische Sequenz von Aminosäure 28 bis 48 unterteilen (Glebe et al., 2005; Engelke et al., 2006). Nach der Bindung an den „high affinity“ Rezeptor wird das gebundene HBV mit Hilfe der S-Domäne in ein bis jetzt noch unbekanntes Kompartiment aufgenommen und das Nukleokapsid auf ebenfalls noch unbekanntem Weg ins Zytoplasma freigesetzt (Glebe und Urban, 2007). Dort wird das Kapsid mit Hilfe von Mikrotubuli und zellulären Transportproteinen in Richtung Zellkern transportiert (Rabe et al., 2006). Am Zellkern bindet das Capsid über sein NLS (nukleare Lokalisations-Sequenz) auf dem Importin α/β -vermittelten Weg an die Kernporen (Kann et al., 1999), wo es im nukleären Basket desintegriert und das Genom direkt in das Karyoplasma freigibt (Rabe et al., 2003).

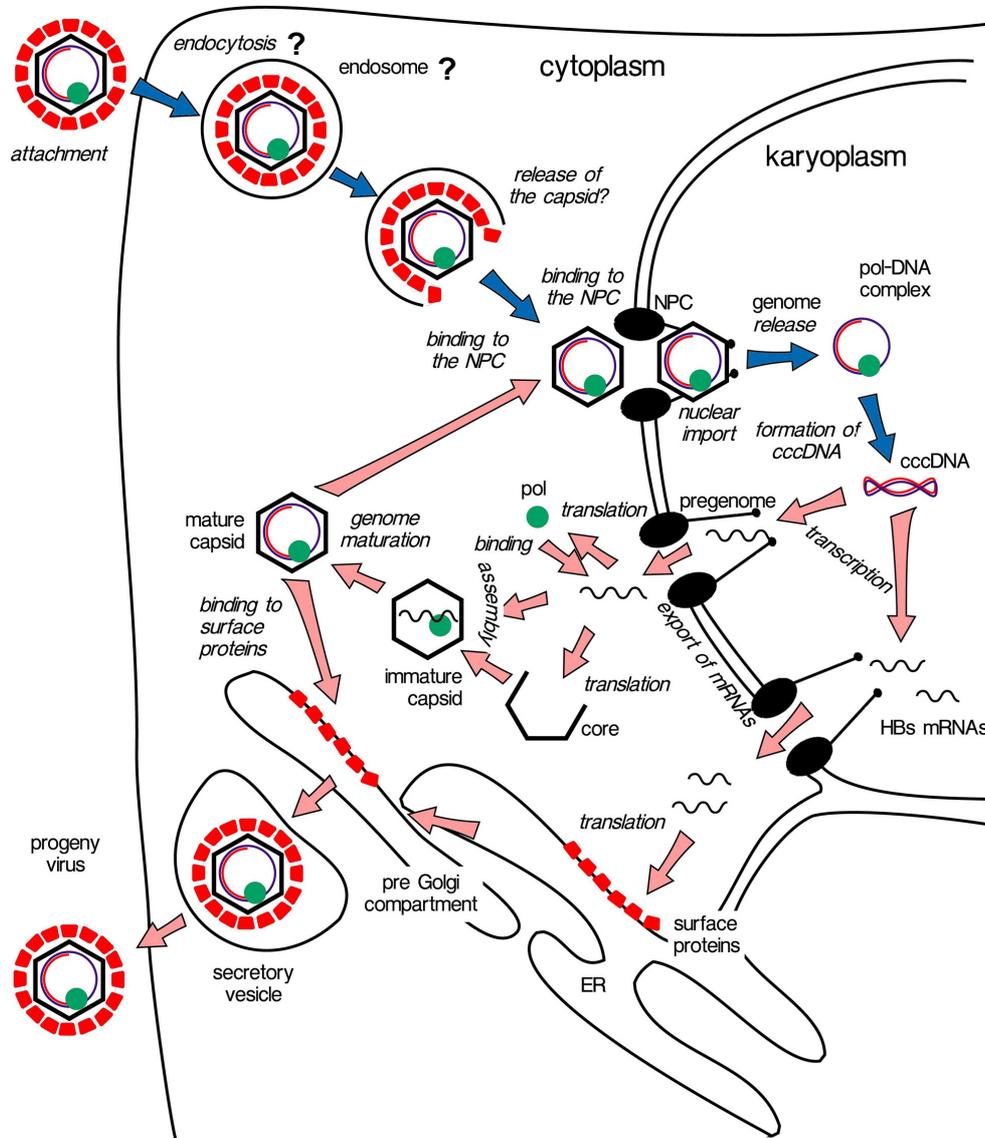


Abb. 7: Schematische Darstellung des intrazellulären HBV Lebenszyklus.

NPC bezeichnet den Nuclear Pore Complex, mRNAs sind geschlängelt dargestellt. Die Expression des X-Proteins, subviralen HBsAg und HBeAg wurde zur Vereinfachung der Abbildung weggelassen. (modifiziert nach Kann und Gerlich, 2005)

1.7.2 Bildung der cccDNA

Nach der Freisetzung des HBV Genoms in das Karyoplasma startet die Replikation von HBV. Dafür muß zuerst der Plusstrang des partiell doppelsträngigen Genoms in eine kovalent geschlossene zirkuläre Form (covalently closed circular = cccDNA) komplettiert werden. Zur Formierung der cccDNA muß die am 5'- Ende des Minusstrangs kovalent gebundene Polymerase durch die Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase entfernt werden (M. Nassal, persönliche Mitteilung) sowie der RNA Primer am 5'- Ende des Plusstranges. Ebenso die terminalen Redundanzen DR1 und DR2 an den Enden des Minusstranges. Die Komplettierung des Plusstranges erfolgt entweder durch zelluläre oder durch die virale Polymerase (Köck und Schlicht, 1993; Köck et al., 2003) und das Ligieren der glatten 5' und 3'- Enden der einzelnen Stränge durch die zelluläre DNA Ligase. Das entstandene kovalent geschlossene zirkuläre DNA Molekül (Tuttleman et al., 1986a) liegt mit Histonen assoziiert als extrachromosomales Minochromosom im Zellkern der infizierten Zelle vor (Bock et al., 1994; Newbold et al., 1995). Ein Einbau der viralen DNA in das Wirtsgenom ist im Gegensatz zu den Retroviren nicht Bestandteil des viralen Lebenszyklus von HBV, jedoch sind zufällige Integrationen von subgenomischen DNA-Fragmenten häufig.

1.7.3 Bildung der prägenomischen mRNA

Als nächstes wird der DNA-Minusstrang durch die zelluläre RNA-Polymerase II transkribiert. Ein Startpunkt liegt kurz oberhalb des Direct Repeats 1. Dadurch entsteht die prägenomische-mRNA (pg-mRNA) mit einem Poly-A-Schwanz am 3'- Ende und einem 5'- Cap. Da das Transkriptions-Stoppssignal beim ersten Durchgang überlesen wird, wird die Region zwischen dem DR1 und der Polyadenylierungsstelle ein zweites Mal transkribiert und somit ist die pg-mRNA länger als die DNA-Matrize. Nach dem Transport der ungespleißt bleibenden pg-mRNA ins Zytoplasma erfolgt die Translation der Polymerase und des Core Proteins. Die virale Polymerase bindet an das am 5'- Ende gelegene ϵ -Verpackungssignal (Junker-Niepmann et al., 1990; Bartenschlager und Schaller, 1992) der pg-mRNA. Die Bindung der viralen Polymerase erfordert die zellulären Hitzeschockproteine hsp90 und hsp23, wobei hsp23 nur transient gebunden wird (Hu und Seeger, 1996; Hu et al., 1997). Sobald genügend Core

Protein synthetisiert wurde, assembliert dieses spontan zu Core-Partikeln (Seifer et al., 1993), welche den Komplex aus pg-mRNA, viraler Polymerase und hsp90 einschließen (Bartenschlager und Schaller, 1992; Hu et al., 1997). Gleichzeitig wird auch eine zelluläre Protein Kinase mitverpackt (Albin und Robinson, 1980; Gerlich et al., 1982). Die Natur der Protein Kinase ist umstritten (Kann und Gerlich, 2005), jedoch spricht vieles dafür, dass es sich um Protein Kinase C alpha handelt (Wittkop et al., in Weiterbegutachtung).

1.7.4 Reverse Transkription

Die reverse Transkription der pg-mRNA in Minusstrang DNA und die folgende Plusstrang Synthese findet innerhalb des Core Partikels statt (Summers and Mason, 1982) und wird durch die virale DNA-Polymerase, mittels der Reversen Transkriptase-Domäne, durchgeführt (Abb. 8). Die Minusstrang Synthese startet an der Bulge-Region der ϵ -Struktur am 5'- Ende der pg-mRNA (Wang und Seeger, 1992 und 1993). Als Primer für die reverse Transkription dient die Hydroxylgruppe des Tyrosins 63 in der Primer-Domäne der HBV Polymerase (Weber et al., 1994; Zoulim und Seeger, 1994) (Abb. 8a). Während der gesamten DNA Synthese bleibt die DNA Polymerase über eine Phosphodiesterbrücke kovalent an das 5'- Ende des Minusstranges gebunden (Wang und Seeger, 1992).

Anschließend werden drei Nukleotide, die komplementär zum 3'- Ende der „bulge“-Region von ϵ sind, synthetisiert und diese springen zusammen mit der Polymerase zum 32 Nukleotid langen Sequenzelement Phi (Φ), welches sich am DR1 des 3'- Endes der pg-mRNA befindet (Tang und McLachlan, 2002; Oropeza und McLachlan, 2007; Abraham und Loeb, 2006 und 2007). Dieser erste Matrizensprung kommt wahrscheinlich durch die Basenpaarung von ϵ und Φ zustande (Oropeza und McLachlan, 2007) (Abb. 8b). Nach der Translokation der Polymerase wird die Minusstrang Synthese bis zum 5'- Ende der pg-mRNA durchgeführt (Abb. 8c). Parallel dazu baut die RNase-H Domäne der HBV Polymerase die pg-mRNA im DNA-RNA Hybrid ab (Abb. 8c). So entsteht ein einzelsträngiges DNA Molekül mit negativer Polarität, welches am 5'- Ende die HBV Polymerase gebunden hat und redundante Enden aus acht bis zehn Nukleotiden aufweist. Da die RNase-H Domäne dem katalytischen Zentrum der DNA Polymerase nachgeschaltet ist, kann die pg-mRNA nicht komplett

abgebaut werden. Dadurch bleiben am 5'- Ende des Prägenoms 17 bis 18 Nukleotide übrig, deren 3'- OH als Primer für die Plusstrang Synthese dient. Der Primer hat daher ein 5'- Cap und enthält die Sequenz des 3'- Endes des DR1, welches komplementär zum DR2 des Minusstrang ist. Dieses Oligonukleotid kann aber von DR1 nach DR2 verschoben werden und bildet so das 5'- Ende des nun synthetisierten Plusstranges (zweiter Matrizensprung, Abb. 8d). Diese Translokation benötigt eine Umfaltung des Minusstranges, welches durch ein Strukturelement im S-ORF, die M-Region, unterstützt wird (Liu et al., 2003). Die Plusstrang-Synthese wird durch die DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität der HBV Polymerase durchgeführt (Lien et al., 1986; Seeger und Maragos, 1989). Da der Minusstrang eine lineare Form aufweist, könnte die Plusstrang Synthese am 5'- Ende stoppen und es würde nicht zur zirkulären Form des HBV Genoms kommen (Abb. 8e). Jedoch kann die DNA Polymerase die Lücke zwischen dem 3'- und 5'- Ende des Minusstranges überbrücken. Dazu schmilzt sie das 3'- Ende des Plusstrangs und das 5'- Ende des Minusstranges auf. Nun kann die DR1 Sequenz am 3'- Ende des Plusstrangs mit der komplementären DR1 Sequenz am 3'- Ende des Minusstranges interagieren und binden (dritter Matrizensprung, Abbildung 8e). Für die Zirkularisierung sind neben den Direct Repeats auch noch zusätzliche benachbarte Regionen, 5E und 3E, nötig (Liu et al., 2003). Die Synthese des Plusstranges wird nun in Richtung des 5'- Minusstrang fortgesetzt aber nicht komplett ausgeführt, wodurch der Plusstrang eine variable Länge erhält (Kaplan et al., 1976; Hruska et al., 1977; Landers et al., 1977) und das HBV Genom nur partiell doppelsträngig ist (Abb. 8f).

Besonders zu Beginn einer HBV Infektion, wenn noch nicht genug Hüllproteine produziert worden sind, werden die Kapside wieder zum Zellkern der infizierten Zelle geleitet (Tuttleman et al., 1986b; Sells et al., 1988; Wu et al., 1990), was zu einem Anstieg der intranukleären cccDNA führt (Tuttleman et al., 1986a; Summers et al., 1990). Dadurch wird der cccDNA Pool ständig erneuert und ermöglicht so eine persistierende Infektion ohne Integration der viralen Nukleinsäure ins Wirtsgenom.

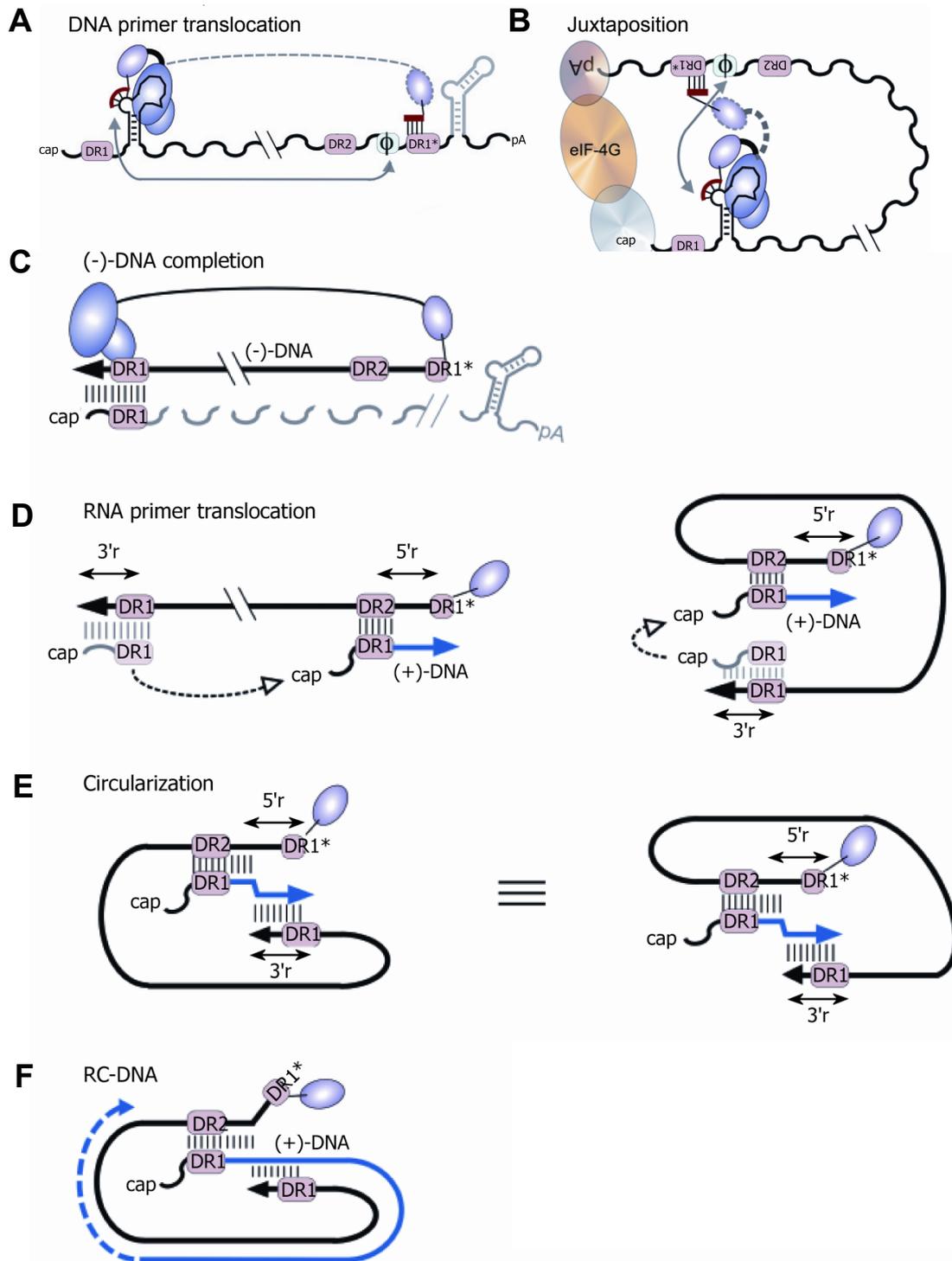


Abb. 8: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HBV.

A: DNA Primer Translokation (Erster Matrizenprung).

Nachdem die HBV-Polymerase an das Verpackungssignal ϵ am 5'-Ende der Prägenom-mRNA gebunden hat und die ersten drei bis vier Nukleotide am 5' ϵ „bulge“ der „stemloop“ Struktur synthetisiert wurden, wechselt der Polymerase-Nukleotid-Komplex vom DR1 am 5'-Ende zum DR1 am 3'-Ende und führt zur weiteren Minusstrang Synthese. DR1* ist 3 kb vom 5' ϵ entfernt. Φ bezeichnet eine neu entdecktes cis-Element mit partieller Sequenz-Komplementarität zur 5'- Hälfte von ϵ .

B: Model für die Juxtaposition von 5' ϵ und DR1.
Ein genereller Mechanismus wäre eine „closed loop“ Formation der pg-mRNA über cap-Bindung und poly-A Bindungsfaktoren, z. B. via Elongations-Initiations-Faktor eIF-4G. Außerdem geht ϵ eine Basenpaarung mit Φ ein. In dieser Anordnung ist nur eine kurze Bewegung für die TP Translokation zu DR1*, statt eines großen Sprunges, notwendig.

C: Minusstrang Komplementierung.

Der DNA-Primer, welcher immer noch an das Terminale Protein (TP) gebunden ist, wird vom DR1* bis zum 5'- Ende der pg-mRNA verlängert. Die RNA wird zeitgleich durch die RNaseH Domäne bis auf die 5'- terminale Region mit dem DR1 abgebaut. Das Schicksal des 3'- Endes ist unklar.

D: RNA Primer Translokation (Zweiter Matrzensprung).

Der RNA-Primer wechselt zum DR2 und wird bis zum 5'- Ende des DNA Minusstranges verlängert. 3'r und 5'r bezeichnen die ca. zehn Nukleotid lange Redundanz am DNA-Minusstrang. Einige cis-elemente vermitteln die Nähe zwischen dem DR1 Donor und dem DR2 Akzeptor (schematisch in der rechten Abb. gezeigt).

E: Zirkularisierung (Dritter Matrzensprung).

Nach der Kopierung des 5'r wechselt das wachsende 3'- Ende des Plusstranges zum 3'- Ende des Minusstranges, um eine weitere Elongation zu ermöglichen. Diese Reaktion muß eine Juxtaposition von 5'r und 3'r mit einschließen.

Zum besseren Verständnis ist der Wechsel auch in Abb. 8b rechts zu sehen, beide sind topologisch äquivalent.

F: RC-DNA.

Durch die Extension des Minusstrang DNA-templates entstehen mehrere Plusstränge mit unterschiedlicher Länge.

(modifiziert nach Beck und Nassal, 2007)

1.7.5 Transkription und Expression der viralen Proteine

Nachdem ein bestimmter Pool von 50 und mehr (Zhu et al., 2001) cccDNA Kopien im Zellkern vorhanden ist nimmt die Transkription weiterer mRNAs zu. Das Transkriptom von HBV besteht aus fünf funktionell verschiedenen mRNAs (Cattaneo et al., 1983 und 1984; Standing et al., 1984; Will et al., 1987) (Abb. 6). Die Synthese der viralen mRNAs wird durch die zelluläre RNA-Polymerase II durchgeführt. Die mRNAs von HBV besitzen genau wie andere eukaryotische mRNAs einen ca. 300 Basen langen 3'-Poly-A-Schwanz und eine 5'- Cap Struktur (Schaller und Fischer, 1991). Um die mRNAs von HBV ungespleißt ins Cytoplasma zu transportieren (Huang und Yen, 1995; Zang und Yen, 1999), besitzt HBV ein zweiteiliges posttranskriptionales Element (PRE), welches in der Funktion dem Rev-responsiblen Element von HIV homolog ist (Huang und Liang, 1993; Huang et al., 1996). Im Gegensatz zum PRE des HIV bindet das PRE des HBV nur zelluläre mRNA Transportfaktoren. Das PRE fördert als cis-aktives Element den Zellkernexport der mRNAs, die das PRE enthalten, und erleichtert die Akkumulation im Zytoplasma (Zhang et al., 1998). Dies geschieht wahrscheinlich durch die Bindung von zellulären Proteinen (Huang et al., 1994, 1995 und 1996). Die Bindung des Autoantigens La an das PRE ist entscheidend für die Stabilität der mRNAs (Ehlers et al., 2004; Heise et al., 2001). Außerdem verhindert es, dass die HBV mRNAs gespleißt werden. Die mRNAs haben alle dasselbe 3'- Ende, da im Genom nur eine Polyadenylierungsstelle vorliegt. Sie haben aber unterschiedliche

Initiationsstellen und somit verschiedene Längen. Dennoch wurden in der Literatur auch gespleißte mRNAs beschrieben, welche hauptsächlich in Leberzellkarzinomen und Lebern chronisch HBV infizierter Patienten gefunden wurden (Su et al., 1989; Rosmorduc et al., 1995; Günther et al., 1997; Soussan et al., 2003). Außerdem wurde in den Lebern chronisch HBV Infizierter ein Fusionsprotein (HBSP: HBV splice-generated protein) aus Polymerase-ORF und einem neuen ORF entdeckt, welches durch einen Spleißvorgang entstanden ist (Soussan et al., 2000). Dieses Fusionsprotein induziert die Bildung von anti-HBSP-Antikörpern und korreliert angeblich mit der Entstehung von Leberfibrosen (Soussan et al., 2000 und 2003).

Zelluläre Transkriptionsfaktoren (TF) wirken in sehr komplexer Form auf die Aktivität der hepadnaviralen Enhancer bzw. Promotoren. Es gibt fünf Familien leberspezifische Transkriptionsfaktoren (Abb. 9b), die für die Gewebespezifität des Hepatitis B Virus mitverantwortlich sind und eine Replikation in nicht-permissiven Zellen verhindern. Dazu gehören das CCAAT/Enhancer-bindende Protein (C/EBP) und die hepatocyte nuclear factors (HNF-1, 3, 4 und 6). Neben den leberspezifischen Transkriptionsfaktoren kommen auch noch ubiquitär vorhandene vor (Abb. 9b). Dazu gehören das SV40 promotor protein (Sp1), nuclear factor (NF-1) und das activator protein (AP-1). Die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren auf dem HBV Genom überlappen sich teilweise. Ein kontrolliertes Zusammenwirken aller Faktoren ist unter anderem für die abgestimmte Expression beim zeitlichen Ablauf der Infektion verantwortlich (Su und Yee, 1992).

Zwei mRNAs sind mit 3,5 kb etwas größer als das HBV Genom und werden deshalb als supergenomische RNAs bezeichnet. Die etwas längere der beiden kodiert für das HBeAg (präC-mRNA). Die andere ist die prägenomische-mRNA (pg-mRNA). Sie stellt einerseits die RNA-Matrize als Vorläufer des DNA-Genoms für den Replikationszyklus von HBV dar (Ganem und Varmus, 1987). Andererseits kodiert die pg-mRNA für das Core Protein sowie die virale DNA-Polymerase (Enders et al., 1987; Yaginuma et al., 1987). Die Transkription der beiden supergenomischen RNAs wird durch den Core-Promotor (Cp) reguliert (Abb. 9a). Damit spielt der Cp einerseits eine zentrale Rolle für die Steuerung der Virusreplikation sowie Translation von Core-Proteinen und Polymerase von der pg-mRNA und regelt andererseits die Synthese des HBeAg von der präC-

mRNA. Der Initiationsort der längeren präC-mRNA liegt ca. 30 Nukleotide stromaufwärts vom Startpunkt der kürzeren pg-mRNA. Beide mRNAs werden innerhalb des Cp von überlappenden, aber genetisch distinkten Promotorsequenzen getrennt reguliert (Yu et al., 1996 und 1997). Der Cp besteht aus dem basalen Core Promotor (BCP) und den Core stromaufwärts regulierenden Sequenzen (CURS). Der BCP ist für die Initiation der Transkription beider mRNAs ausreichend und liegt im Bereich der Nukleotide 1742 bis 1849 (gezählt von der einzigen EcoR1-Schnittstelle). Die CURS regulieren die Aktivität der Transkription beider mRNAs und besetzen die Nukleotide 1634 bis 1742 (Yuh et al., 1992). Die CURS können weiter in zwei Domänen unterteilt werden. Die CURS-A (nt 1636 bis 1703) und die CURS-B (nt 1702 bis 1713). Zur CURS-A gehören die Sequenzmotive α (nt 1644 bis 1666), γ (nt 1671 bis 1686) und δ (nt 1687 bis 1703), die einen positiven regulatorischen Effekt auf den BCP haben. Das CURS-B besteht aus der β -Box (nt 1702 bis 1713) und hat einen negativen regulatorischen Effekt auf den BCP (Abb 9a).

Außerdem kann ein negativ regulierendes Element (NRE, nt 1611 bis 1634, Lo et al., 1994) bzw. NRE γ (nt 1576 bis 1626) die Aktivität des Cp Zelltyp-abhängig unterdrücken (Chen et al., 1995). Die BCP Region enthält Bindungsorte für ubiquitäre Transkriptionsfaktoren, wie Sp1 und das TATA-bindende Protein (TBP) sowie für viele leberspezifische Transkriptionsfaktoren der Kernrezeptor-Superfamilie, wie z.B. die Leberzellkernfaktoren (HNF) 3 und 4, den chicken ovalbumin upstream promotor transcription factor 1 (COUP-TF1), dem Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor α (PPAR α), dem Apolipoprotein A1 regulatorischen Protein 1 (ARP1) und dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) (Raney et al., 1997) (Abb. 9). Diese Transkriptionsfaktoren sind wichtig für die leberspezifische Promotoraktivität (Zhang et al., 1994) sowie für die Feinabstimmung der Transkription der pg-mRNA und präC-mRNA, da sie diese durch Bindung sehr unterschiedlich beeinflussen (Raney et al., 1997; Yu et al., 1997 und 2003). An die aktivierende CURS-A Box binden zusätzlich z. B. das CCAAT/Enhancer-bindende Protein (C/EBP) oder verwandte Transkriptionsfaktoren (z. B. E4BP4, Lopez-Cabrera et al., 1990), den Hepatozyten-Leukämiefaktor (HFL, Moolla et al., 2002) und den Fetoprotein-Transkriptionsfaktor (FTF) (Abb. 9).

Zwei weitere mRNAs mit einer Länge von 2,1 bis 2,4 kb kodieren für die drei Oberflächenproteine von HBV (LHBs, MHBs und SHBs). Die Transkription der 2,4 kb langen präS1-mRNA kodiert für das LHBs-Protein von HBV und wird durch den S1-Promotor (Sp1, Genotyp A: nt 2716 bis 2806) reguliert. Er enthält als einziger HBV-Promotor eine klassische TATA-Box mit Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren TBP, Sp1, NF1, HNF1 und 3. Der S1-Promotor wird durch Sequenzen im stromabwärts liegenden S2/2-Promotor negativ reguliert (Moolla et al., 2002). Der S2/S-Promotor (S2/Sp, Genotyp A: nt 2989 bis 3216) reguliert die von allen am stärksten transkribierte präS2/S-mRNA, von der SHBs und MHBs translatiert werden. Er enthält ein CCAAT-Motiv, welches die Produktion der präS2/S-mRNA stimuliert und die der präS1-mRNA unterdrückt. Sieben transkriptionelle Elemente mit teilweise funktioneller Redundanz binden Transkriptionsfaktoren, wie z. B. Sp1 (Moolla et al., 2002). Außerdem wird der S2/S-Promotor durch Akkumulation von LHBs im ER und dem daraus resultierende ER-Stress stimuliert (Xu et al., 1997).

Die kleinste mRNA hat nur eine Länge von 0,9 kb und kodiert für das HBx-Protein (Kaneko und Miller, 1988). Die Transkription der X-mRNA wird durch den HBx-Promotor (nt 1171 bis 1361) reguliert, der mit dem 3'-Ende des Enhancers 1 (E1) überlappt (Zhang et al., 1992). Er enthält Bindungsorte für das regulatorische X-Promotor-Binde-Protein (X-PBP) und die Transkriptionsfaktoren C/EBP, NF1, ATF, AP1/Jun-Fos (Moolla et al., 2002). Das Tumorsuppressorprotein p53 kann ebenfalls an den HBx-Promotor binden und dessen Funktion unterdrücken (Takada et al., 1996). Das HBx Protein von HBV ist das mutmaßlich einzige nichtstrukturelle Gen, welches als multifunktionaler Regulator der Genexpression, Zellantwort, Proteinabbau, Apoptose, Genotoxizität und Signalkaskaden fungiert (Arbuthnot et al., 2000; Bouchard und Schneider 2004). Das X-Protein ist im Zytoplasma und Zellkern von infizierten Hepatozyten zu finden. Bei einer HBV Infektion wird das X-Protein nur in infizierten Zellen transient exprimiert, nicht aber in Krebszellen (Wu et al., 1991; Arbuthnot et al., 2000; Bouchard und Schneider 2004). Das X-Protein wirkt als indirekter Transkriptionsaktivator, der zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren über Protein-Protein-Wechselwirkungen interagiert und durch die Protein Kinase C die zelluläre Signaltransduktion aktiviert (Koike et al., 1989 und Kekule et al., 1993). Es wurde auch gezeigt, dass HBx

verschiedene zytoplasmatische Signalkaskaden stimulieren kann, wie: Ras/MEK/MAPK, JNK/JAK/STAT und Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt Signalwege (Arbuthnot et al., 2000; Bouchard und Schneider, 2004). Versuche mit Mutationen im HBx-Bereich legen nahe, dass das HBx-Protein nach der Transfektion permanenter Zellkulturen *in vitro* entbehrlich für die Virusproduktion ist (Blum et al., 1992). Dagegen ruft die Transfektion von WHV (woodchuck hepatitis virus) ohne funktionellen HBx-ORF in der Leber von Waldmurmeltieren keine Infektion hervor. Das X-Protein ist ein Substrat und zugleich ein potentieller Inhibitor des zellulären Proteasom-Komplexes (Hu et al., 1999). Eine Inhibition des Proteasom-Komplexes führt zu einer Steigerung der hepadnaviralen Replikation (Zhang et al., 2004). Das zeigt, dass das HBx-Protein für die Replikation *in vivo* notwendig ist (Chen et al., 1993 und Zoulim et al., 1994). Neuere Studien von Kim et al. (2007) zeigen, dass HBx in der Lage ist, die Genexpression und Transkriptionsaktivität von SREBP1 (sterol regulatory element binding protein) und PPAR γ (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor) zu erhöhen. Durch die gesteigerte Expression von fettbildenden Genen kommt es zu einer vermehrten Akkumulation von Lipiden in den Hepatozyten bis hin zur Verfettung der Leber. Im Gegensatz dazu hat das HBx keinen Einfluss auf PPAR α , welcher an der Fett-Oxidation beteiligt ist. Chiu et al. zeigten 2007, dass HBx in der Lage ist, die Androgen-Rezeptor Expression abhängig vom Androgengehalt der Zelle zu steigern. Dies wäre ein Erklärung für die erhöhte Inzidenz bei HBV infizierten Männern, an HCC zu erkranken.

Der Enhancer 1 (E1, nt 957 bis 1361) reguliert besonders den X- und Core-Promotor und wird durch die Bindung unterschiedlicher Transkriptionsaktivatoren reguliert (Bock et al., 2000). In geringem Maße stimuliert der E1 auch die Transkription der beiden mRNAs für die Oberflächenproteine (Moolla et al., 2002). Er besteht aus drei Domänen: dem 5' modulatorischen Element (nt 957 bis 1050), der zentralen Core-Domäne (nt 1050 bis 1171) und der 3' Domäne (nt 1171 bis 1361), die mit dem X-Promotor überlappt. Die Core-Domäne hat einen sehr starken Einfluss auf die HBV Replikation (Bock et al., 2000). In ihr befinden sich unter anderem die Bindestellen für die Transkriptionsaktivatoren HNF3, HNF4, NF1, RXR α , PPAR α , COUP-TF1 und STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3). Durch die Bindung

weiterer Faktoren, wie z. B. C/EBP und HNF1 an die 5' und 3' Elemente kann die Aktivität der Core-Domäne um das zehnfache gesteigert werden. Der Enhancer 2 (E2) überlappt stromaufwärts des BCP mit der CURS des Cp und hat einen stimulierenden Einfluss auf alle vier HBV Promotoren (Abb. 9a). Der E2 setzt sich aus der α - und β -Box der CURS zusammen und funktioniert nur, wenn beide Regionen zusammenarbeiten (Yuh et al., 1991). Auch die Funktion des E2 kann durch Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die an die CURS-Boxen binden, beeinflusst werden. Die Aktivität des E2 wird durch das NRE stark negativ reguliert (Lo et al., 1994). Neuere Daten von Doitsh et al. (2004) deuten darauf hin, dass den beiden Enhancern eine wichtige Rolle in der zeitlichen Regulation der HBV Transkription zukommt. Erst nach der Aktivierung des E1 und der dadurch regulierten frühen Genexpression des HBx beginnt die durch E2 regulierte späte Genexpression aller übrigen HBV Gene. Damit ist der E1 autonom und essentiell für die Aktivität von E2 notwendig (Doitsh et al., 2004).

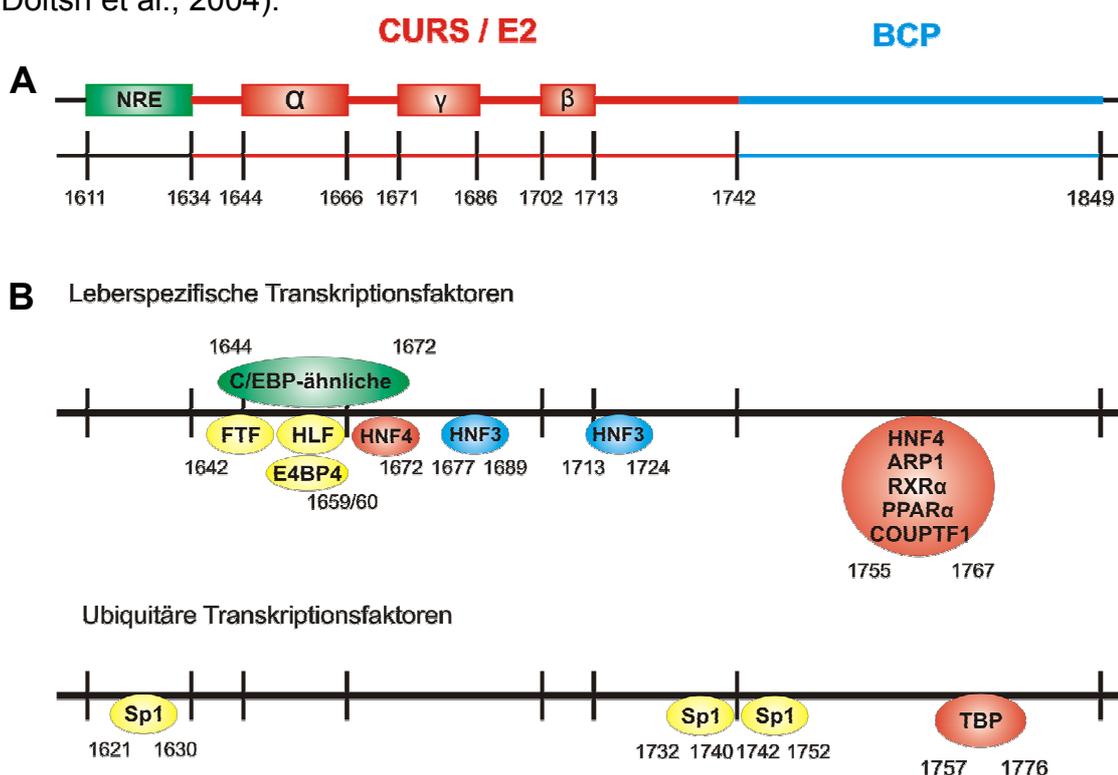


Abb. 9: Core-Promotor / Enhancer 2 (E2): Bindungsorte der Transkriptionsfaktoren.

A: Aufbau des Cp/E2 mit dem basalen Cp (BCP), den α - und β -Boxen der core upstream regulatory sequences (CURS) sowie dem negativ regulierenden Element (NRE).

B: Bindungsorte der leberspezifischen und ubiquitären Transkriptionsfaktoren sind mit ihren Positionen angegeben. (modifiziert nach Preikschat, 2000)

1.7.6 Verpackung und Freisetzung

Nachdem genügend mRNAs transkribiert und am ER zu Oberflächenproteinen translatiert wurden, können die gereiften Capside (Miller et al., 1984; Gerelsaikhan et al., 1996; Perlman und Hu, 2003) in die Hüllproteine verpackt und mutmaßlich über die multivesicular bodies exozytiert werden (Lambert et al., 2007; Watanabe et al., 2007). Die Virussekretion steht mit dem intranukleären cccDNA Gehalt in enger Verbindung. Die Expression von Oberflächenproteinen führt zu einer gesteigerten Verpackung von Core Partikeln und Sekretion von Viren, was zu einer Regulation der cccDNA Amplifikation führt (Summers et al., 1990). Die Sekretion von HBV benötigt SHBs und LHBs (Bruss und Ganem, 1991). Bruss et al. konnten 1997 zeigen, dass die PräS1-Region von Arginin 103 bis Serin 124 am Übergang zu PräS2 essentiell für die Sekretion ist. Diese Region interagiert mutmaßlich mit AS, die sich an der Basis der Spikes in den Core-Partikeln befinden (Ponsel und Bruss, 2003). An der Zusammenführung der PräS-Sequenz und der Core-Partikel sind γ 2-Adaptin und NEDD4 beteiligt (Rost et al., 2006).

1.8 Infektionssysteme

Aufgrund der hohen Wirts- und Organspezifität der *Hepadnaviridae* konnte bis vor wenigen Jahren kein zufriedenstellendes *in vitro* Infektionssystem für die Untersuchung der Bindung und Aufnahme von HBV etabliert werden.

1.8.1 Hepatische Zelllinien

Die HepG2 Zelllinie wurde erfolgreich für die Produktion von Virionen nach stabiler oder transients Transfektion benutzt (Sells et al., 1987 und Ladner et al., 1997). Einige Gruppen konnten zwar eine spezifische Bindung und Aufnahme von HBV von HepG2 Zellen zeigen, aber keine produktive Infektion nachweisen (z. B. Neurath et al., 1986; De Falco et al., 2001).

Die neue Hepatom-Zelllinie HepaRG ist erst nach einer vierwöchigen Vorbehandlung mit 1 % Dimethylsulfoxid und in Anwesenheit von Polyethylenglykol suszeptibel für HBV (Gripon et al., 2002) oder HDV (Jaoudé et al., 2005).

1.8.2 Primäre Zellkultursysteme

HBV-suszeptible primäre humane Hepatozyten (PHHs) können nur nach einer Leberresektion am lebenden Patienten in Kultur genommen werden (Gripon et al., 1988) und sind daher nicht einfach und regelmäßig zu erhalten. Sie sind schwierig zu handhaben und benötigen spezielle Wachstumsfaktoren und Behandlung, um in der ausdifferenzierten Phase zu verbleiben (Runge et al., 1999). In Kultur genommene PHHs lassen sich mit HBV *in vitro* nur geringfügig infizieren.

Primäre Enten Hepatozyten (PDHs) können von embryonalen sowie adulten Tieren isoliert und kultiviert werden. Zugabe von Dimethylsulfoxid und das Weglassen von Serum im Zellkulturmedium sind wichtige Bedingungen für eine Suszeptibilität der Zellen für DHBV. Unter diesen Konditionen sind die primären Enten Hepatozyten bis zu zwei Wochen nach ihrer Isolierung noch infizierbar mit DHBV (Pugh et al. 1989 und 1995).

Primäre *Tupaia* Hepatozyten (PTHs) stammen vom ostasiatischen Spitzhörnchen *Tupaia belangeri* (Abb. 10). Es gehört zur Ordnung der *Scandentia* und der Familie der *Tupaiaidae*. Su et al. entdeckten 1987, dass PTHs mit HBV infizierbar sind. Walter et al. zeigten 1996, dass sich *Tupaia*-Hepatozyten nicht nur *in vivo*, sondern auch *in vitro* mit HBV infizieren lassen. Außerdem können primäre *Tupaia* Hepatozyten auch mit Wollaffen HBV (WMHBV), nicht aber mit dem Murmeltier HBV (WHV) (Köck et al., 2001) infiziert werden. Glebe et al. zeigten 2003, dass eine Infektion von primären *Tupaia* Hepatozyten mit HBV spezifisch neutralisierbar und vergleichbar mit einer Infektion von primären humanen Hepatozyten ist. Da PTHs regelmäßig von gezüchteten adulten Tieren gewonnen und kultiviert werden können und auch ohne Zugabe von Dimethylsulfoxid oder Polyethylenglykol zum Kulturmedium suszeptibel für HBV sind, gelten sie als ein anerkanntes besonders geeignetes *in vitro* Infektionssystem.



Abb. 10: *Tupaia belangeri*

1.9 Struktur und Funktion der Leber

Die Leber (griech. *Hepar*) ist das zentrale Organ des gesamten Stoffwechsels im menschlichen Körper sowie bei den *Tupaia*s. Sie unterteilt sich in zwei unterschiedlich große Lappen. Den großen rechten Leberlappen (*Lobus dexter*) und den linken Leberlappen (*Lobus sinister*). An der Unterseite der Leber liegt die Leberpforte (*Porta hepatis*). Dort treten die Leberarterie (*Arterie hepatica*) und die Pfortader (*Vena portae*) in die Leber ein sowie die Lebergallengänge aus. Die Leberarterie transportiert sauerstoffreiches Blut vom Herzen und die Pfortader Nahrungsbestandteile aus dem Verdauungstrakt, Abbauprodukte aus der Milz und Hormone der Bauchspeicheldrüse zur Leber. Das Lebergewebe ist nochmals in kleine, hexagonale Leberläppchen (*Lobuli hepatica*) unterteilt, die überwiegend aus 20 bis 30 μm großen Hepatozyten bestehen. Diese sind oft polyploid und besitzen häufig zwei oder mehr Zellkerne und sind in Strängen angeordnet. An den Eckpunkten angrenzender Leberläppchen liegt das *Glisson'sche Dreieck*, an dem jeweils ein Ast der Leberarterie, der Pfortader und ein Gallengang verlaufen. Zwischen den Hepatozyten liegen sternförmig die gefensterten *Lebersinusoide*, welche von Endothel ausgekleidet sind und spezielle Makrophagen, die Kupffer-Zellen, enthalten. Die basolaterale Seite der Hepatozyten hat durch das gefensterte Endothel freien Kontakt mit dem Blut (Abb. 11). Der Spaltraum zwischen den Hepatozyten und den Lebersinusoide wird *Dissé'scher Raum* genannt. Hier findet die eigentliche Entgiftung statt, da zu ihm das Blutplasma mit Ausnahme großer Zellen freien Zugang hat. Außerdem findet man dort die *Ito-Zellen*, welche unter anderem der Fettspeicherung dienen und Vitamin A enthalten. Die Mikrovilli der

Hepatozyten reichen in den *Dissé'schen Raum* und werden vom Blutplasma umspült. Der *Dissé'sche* Raum besitzt statt einer basalen Lamina des Endothels nur ein Stützgerüst aus extrazellulärer Matrix und Kollagenfibrillen. Die apikale Seite der Hepatozyten wird durch die *Zonula occludens* (*Tight junctions*) von der basolateralen Seite abgegrenzt. Auf ihr liegen die mit Gallenflüssigkeit gefüllten Gallenkanälchen (*Canaliculi biliferi*) (Abb. 11).

Die Leber erfüllt wichtige Aufgaben im menschlichen Körper. Sie synthetisiert lebenswichtige Serumproteine (z. B. Gerinnungsfaktoren und Globuline) sowie Cholesterin. Sie dient als Speicher für Glucose, Fett und Vitamine. Die Leber produziert Galle und ist damit einhergehend am Abbau und der Ausscheidung von körpereigenen Stoffwechselprodukten (z. B. Erythrozyten) sowie körperfremden Stoffen (z. B. Medikamente und Giftstoffe) beteiligt.

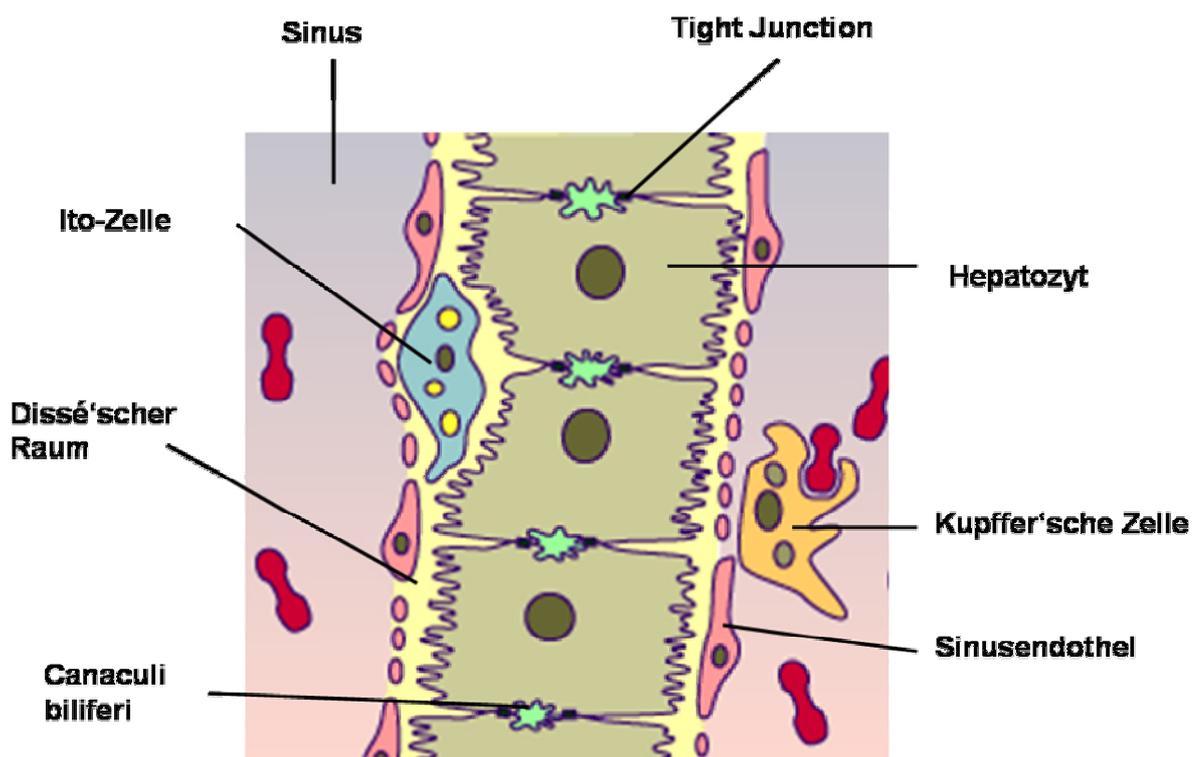


Abb. 11: Schematische Aufbau eines Leberzellbalkens.

Modifiziert nach:

<http://www.unifr.ch/histologie/elearningfree/allemand/biochemie/verdauung/leber/d-leber.php>

1.10 Zielsetzung und experimentelle Ansätze dieser Arbeit

Bis heute konnten für das Hepatitis B Virus weder spezifische Rezeptoren noch der genaue Eintrittsmechanismus in die Hepatozyten eindeutig identifiziert werden. Die Zahl von potentiellen Bindungspartnern von HBV in humanem Serum und Zellmembranen ist in den letzten zwei Jahrzehnten ständig angewachsen. Aber bis heute hat sich keiner davon als funktioneller HBV Rezeptor herausgestellt (Glebe und Urban, 2007). Über die Aufnahme von HBV in die Hepatozyten wurden ebenfalls gegensätzliche Ergebnisse publiziert. Die Veröffentlichungen über eine eventuelle Aufnahme von HBV über Endozytose und einer anschließenden pH-abhängigen Freisetzung in das Zytoplasma hängen von den verwendeten primären Zellkultursystemen (PHHs oder PDHs) und den Zelllinien (HepaRG) ab. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, den Rezeptor und den Aufnahmemechanismus des HBV in die Hepatozyten genauer zu untersuchen. Hierbei sollen eventuelle neue Bindungspartner identifiziert und erstmalig der Eintrittsmechanismus in primäre *Tupaia* Hepatozyten untersucht werden.

Die HBs-Antigenschleife der S-Domäne von HBV hat acht Cysteine, die inter- und intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden können. Bis jetzt konnte die Verknüpfung der acht Cysteine und die daraus resultierende Tertiärstruktur der Antigenschleife nicht geklärt werden. Neutralisierungsstudien von Glebe et al. (2003) und Mutationsstudien von Jaoudé und Sureau (2005) hatten gezeigt, dass nicht nur die N-terminale PräS1 Region des LHBs notwendig für die HBV Infektion ist, sondern auch die S-Domäne offensichtlich Elemente enthält, welche am Aufnahmemechanismus von HBV in die Hepatozyten beteiligt sind. Daher sollte zum einen der Anteil der freien bzw. verknüpften Cysteine der HBs-Antigenschleife bestimmt und zum anderen die Bedeutung der S-Domäne für die HBV Infektion untersucht werden.

Für diese Studien wurden primäre Hepatozyten des südostasiatischen Spitzhörnchens *Tupaia belangeri* (PTHs) verwendet. Um die Infektionsversuche mit den PTHs zu optimieren und die ersten Marker einer etablierten HBV Infektion zu bestimmen, wurde zuerst eine Kinetik auf unterschiedlichen Zellkulturmatrizes durchgeführt. Dafür wurden die cccDNA und mRNA mittels real-time LightCycler PCR bzw. RT-PCR bestimmt. Die Virusproteine HBeAg und HBsAg wurden mittels ELISA nachgewiesen.

Die Infektionsversuche wurden immer mit frisch isolierten *Tupaia* Hepatozyten durchgeführt. Zur Infektion wurde durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation gereinigtes HBV aus Plasma eines chronisch asymptomatischen HBV-Trägers verwendet. Die Quantifizierung der freien bzw. verknüpften Cysteine in der HBs-Antigenschleife wurden mit dem LI-COR ODYSSEY® Infrarot-Fluoreszenz Scanner durchgeführt. Dazu wurde HBsAg verwendet, welches ebenfalls durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation aus Plasma eines chronisch asymptomatischen HBV-Trägers konzentriert wurde. Durch die Methoden der Reduzierung und Biotinylierung von Zelloberflächen wurde die Bedeutung von Disulfidbrücken, freien SH-Gruppen und Aminogruppen in der HBs-Antigenschleife für die HBV Infektion untersucht.

2 Material

2.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Arterienklemme	MAGV, Rabenau-Londorf
Automatischer Filmentwickler CURIX 60	AGFA, Mortsel, Belgien
Autoradiographiefilme Hyperfilm MP	AMERSHAM Biosciences, Braunschweig
Autoradiographiekassetten	AMERSHAM Biosciences, Braunschweig
Blotkammer XCell II Blot™ Module	INVITROGEN, Karlsruhe
Brutschrank Steri-Cult 200	LABOTECT, Göttingen
Büchnertrichter (Durchmesser 10 cm)	MAGV, Rabenau-Londorf
Chirurgische Scheren und Pinzetten	MAGV, Rabenau-Londorf
DC Power Supply PS250/2.5 AMP	HSI Hoefer, San Francisco, USA
Deckgläser (26 x 24 mm), bekantet	MENZEL, Braunschweig
Dreiwegehahn	MAGV, Rabenau-Londorf
Durchlichtmikroskop DIAVERT	LEITZ, Wetzlar
Einmalskalpelle (11 pfm, 24 pfm)	MAGV, Rabenau-Londorf
Einmalpipetten (50 ml, 5 ml)	FALCON, New Jersey, USA
Elektrophoresekammer für Agarosegele Horizon® 11•14	GIBCO BRL, Life Technologies, INC, USA
Elektrophoresekammer XCell Sure- Lock™ Mini Cell für SDS-PAGE	INVITROGEN, Karlsruhe
ELISA-Shaker ZLI 164	AMERSHAM Biosciences, Braunschweig
ELISA-Washer COLUMBUS	TECAN Deutschland GmbH
Filterpapier WHATMAN (2 mm)	SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel
Gaze (Maschenweite 188 µm)	MAGV, Rabenau-Londorf
Kanüle (0,9 x 40 mm)	TERUMO, Belgien
KühlThermoMixer	HLC, Bovenden
Laborschüttler Swip KS 10 DIGI	EDMUND BÜHLER, Tübingen
LightCycler Kapillaren	ROCHE Diagnostics, Mannheim
Magnetrührer	MAGV, Rabenau-Londorf
Mikrotiterplatten MaxiSorb für ELISA	NUNC, Wiesbaden

Minishaker MS2	MAGV, Rabenau-Londorf
Mullkompressen (7,5 x 7,5 cm)	FUHRMANN, Much
Objekträger (76 x 26 mm)	MENZEL, Braunschweig
ODYSSEY® Infrared Imaging System (Fluoreszenz Scanner)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
real-time PCR LightCycler® Gerät	ROCHE Diagnostics, Mannheim
pH-Meter CG 822	SCHOTT, Mainz
PERFULINE® Infusionsleitung (1,5 x 2,8 mm)	DISPOMED, Gelnhausen
Photometer DU 70	BECKMANN, München
Pipetten	GILSON, Limburg EPPENDORF, Hamburg
Pipettierhilfen	INTEGRA Biosciences, Fernwald
Protein LoBind Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml	EPPENDORF, Hamburg
PVDF-Transfer Membran IMMOBILON- FL (Porengröße: 0,45 µm)	MILLIPORE, Eschborn
PVDF-Transfer Membran BioTrace™ (Porengröße: 0,45 µm)	PALL, Dreieich
v-förmige Reaktionsgefäße (Eppis) 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	EPPENDORF, Hamburg SARSTEDT, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (14 ml, 50 ml)	FALCON, New Jersey, USA
Refraktometer	CARL ZEISS, Wetzlar
Reinstwasseranlage	MILLIPORE, Eschborn
Rotilabo® Silikonschlauch	ROTH, Karlsruhe
Schlauchpumpe Masterflex® EASY LOAD® II Model 77201-60	NOVODIRECT, Kehl/Rhein
SDS-Gele NuPAGE™ 12% Bis-Tris (17 well-, 12 well-, 10 well/1 mm)	INVITROGEN, Karlsruhe
Spannungsquelle Model 200	GIBCO BRL, Life Technologies, INC, USA
Sterilbank	KENDRO, Langenselbold
Thermometer HI147-00	HANNA Instruments

Ultrazentrifugen-Rotoren:	BECKMANN, München
SW 28	
SW 41	
UV-Transluminator TFX-20M	VILBER-LOURMAT, Torcy, Frankreich
Vasocan® Braunüle® (0,9 x 25 mm)	BRAUN, Melsungen
Waage Typ 1413	SARTORIUS AG, Göttingen
Wasserbad	MEMMERT, Schwabach
Zentrifugen:	
Beckman Optima™ L-70K	BECKMANN, München
5810 R	EPPENDORF, Hamburg
5417 R	EPPENDORF, Hamburg
PicoFuge™	STRATAGENE, La Jolla, USA
Zellkulturplatten (12 well, 6 well, 6 cm)	FALCON, New Jersey, USA
Zellsieb (85 ml, 130 ml)	MERCK, Darmstadt
Zentrifugenröhrchen für UZ	BECKMANN, München

2.2 Chemikalien

SeaKem® LE Agarose	BIOZYM, Oldendorf
Antioxidans (für SDS-PAGE)	INVITROGEN, Karlsruhe
BSA Fraktion V	ROTH, Karlsruhe
Casein 1 % Lösung in PBS	PIERCE, Bonn
Cell Proliferation Reagent WST-1	ROCHE, Mannheim
Kollagen Typ I	BD Biosciences, Heidelberg
Dako OPD Tabletten für ELISA	DAKO, Glostrup, Dänemark
EDTA Lösung (0,5 M)	SIGMA, Taufkirchen
Ethidiumbromid	SERVA, Heidelberg
FKS	INVITROGEN, Karlsruhe
FKS plus	PAN, Aidenbach
Immobilon™ Western Chemilumineszenz AP Substrat	MILLIPORE, Eschborn
Magnesiumchlorid Lösung (1 M)	SIGMA, Taufkirchen
Matrigel™ Basement Membrane Matrix	BD Biosciences, Heidelberg
ODYSSEY® Blocking Buffer	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

Roti®-Block	ROTH, Karlsruhe
RNase Zap®	INVITROGEN, Karlsruhe
SDS Lösung (10 %)	SIGMA, Taufkirchen
Sigmacote	SIGMA, Taufkirchen
Tris Buffered Saline Tabletten	SIGMA, Taufkirchen
Triton® X-100	SIGMA, Taufkirchen
Trypan Blau Lösung (0,4 %)	SIGMA, Taufkirchen
TWEEN® 20	MERCK, Darmstadt
Perhydrol® 30 %	MERCK, Darmstadt

2.3 Inhibitoren und Reagenzien

Bafilomycin A1	SIGMA, Taufkirchen
BSA, Biotin markiert	SIGMA, Taufkirchen
Chlorpromazin-HCl	SIGMA, Taufkirchen
Chondroitin-Sulfat A	SIGMA, Taufkirchen
Dynabeads® M-270 Epoxy	DYNAL BIOTECH, Hamburg
Heparin	SIGMA, Taufkirchen
L-Glutathion reduziert	SIGMA, Taufkirchen
L-Glutathion oxidiert	SIGMA, Taufkirchen
Maleimido-PEO3-Biotin	UPTIMA, KMF, Leipzig
N-Ethylmaleimide (NEM)	PIERCE, Bonn
Protein Kinase C Inhibitor (20-28),	MERCK, Darmstadt
Sulfosuccinimidyl-6-biotin (sNHS-Biotin)	UPTIMA, KMF, Leipzig
Tris(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid (TCEP-HCl)	PIERCE, Bonn

2.4 Enzyme

DNase I, RNase-free	ROCHE, Mannheim
Heparinase III	SIGMA, Taufkirchen
Kollagenase Typ IV	SIGMA, Taufkirchen
A2-3,6,8,9-Neuraminidase (Sialidase)	MERCK, Darmstadt
Protein-Disulfid-Isomerase	SIGMA, Taufkirchen
PNGase F	New England Biolabs, Frankfurt/Main
TURBO™ DNase	AMBION, Austin, Texas, USA

2.5 Antikörper und Seren

Antikörper / -serum	Funktion	Konzentration
anti-HBs C20/2 (Maus) <i>monoklonal</i>	Affinitätsgereinigter monoklonaler Antikörper aus Maus-Hybridomaüberstand, der konformationsabhängig die gruppenspezifische HBs- Antigenschleife erkennt (persönliche Mitteilung W.H. Gerlich, Gießen).	Stock: 1 mg/ml
anti-HBs HB1 (Maus) <i>monoklonal</i>	Affinitätsgereinigter monoklonaler Antikörper aus Maus-Hybridomaüberstand (Dr. A. Zvirblienė, Vilnius), der sequenzabhängig ein gruppenspezifisches Epitop der HBs-Antigenschleife (AS 120 - 125) des Genotyps D erkennt (Dr. I. Sominskaja, Riga).	Stock: 0,5 mg/ml
anti-HBs/Biotin <i>monoklonal</i>	Monoklonaler anti-HBs Biotin konjugierter Antikörper (DADE BEHRING, Marburg)	keine Hersteller Angabe
anti-Maus-POD (Ziege) IgG + IgM (H+L)	Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper (DIANOVA, Hamburg)	Stock: 1 mg/ml
anti-Kaninchen-POD	Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper (DIANOVA, Hamburg)	Stock: 1 mg/ml
IRDye® 800CW anti-Kaninchen (Esel) IgG (H+L)	Infrarot-Farbstoff-konjugierter Sekundärantikörper (LI-COR Biosciences, Bad Homburg)	Stock: 1 mg/ml
IRDye® 800CW Streptavidin	Infrarot-Farbstoff-konjugiertes Streptavidin (LI-COR Biosciences, Bad Homburg)	Stock: 1 mg/ml

IRDye® 680 anti-Maus IgG(Ziege) <i>polyklonal</i>	Infrarot-Farbstoff-konjugierter Sekundärantikörper (LI-COR Biosciences, Bad Homburg)	Stock: 1 mg/ml
Kaninchen Antiserum frCP + 28aa preS1 20 – 47 (Genotyp A)	Antiserum aus Kaninchen gegen die AS 20 – 47 des Genotyp A (Dr. I. Sominskaja, Riga).	nicht bekannt
NeutrAvidin™-AP	Alkalische Phosphatase- konjugiertes NeutrAvidin™ (PIERCE, Bonn)	Stock: 1 mg/ml
Peptid 2 – 48, myr	Synthetisiertes myristoyliertes, Peptid aus den Aminosäuren 2 – 48 der PräS1 Region von HBV	Stock: 100 µM
Streptavidin-POD	Peroxidase–konjugiertes Streptavidin (DIANOVA, Hamburg)	Stock: 1 mg/ml
anti-PräS1 MA18/7 <i>monoklonal</i>	Affinitätsgereinigter monoklonaler Antikörper der die AS 20 – 23 von PräS1 des LHBs von HBV erkennt.	Stock: 1 mg/ml

2.6 Primer und Hybridisierungssonden (Hybprobes)

Alle Primer und Hybprobes wurden bei TIB MOLBIOL (Berlin) bestellt und beziehen sich auf Genotyp A des Hepatitis B Virus.

2.6.1 für cccDNA-PCR

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

2.6.2 für X-PCR

X2 sense Primer	5'- gacgtcctttg ^y acgtcccgtc	(Nukleotide 1413 bis 1436)
	^y = C / T	
X2 antisense Primer	5'- tgcagagtgaagcgaagtgcaca	(Nukleotide 1579 bis 1601)
3FL XB Hybprobe	5'- acggggcgcacctctctttacgcgg—FL	(Nukleotide 1519 bis 1543)
5LC XB Hybprobe	5'- LC Red 640- ctccccgtctgtgccttctcatctgc—PH	(Nukleotide 1545 bis 1570)

2.6.3 für X-RT-PCR

X2 sense Primer	5'- gacgtcctttg ^y acgtcccgtc	(Nukleotide 1413 bis 1436)
	^y = C / T	
X2 antisense Primer	5'- tgcagagtgaagcgaagtgcaca	(Nukleotide 1579 bis 1601)
3FL XB Hybprobe	5'- acggggcgcacctctctttacgcgg—FL	(Nukleotide 1519 bis 1543)
5LC XB Hybprobe	5'- LC Red 640- ctccccgtctgtgccttctcatctgc—PH	(Nukleotide 1545 bis 1570)

2.6.4 für PG-RT-PCR

PG2 sense Primer	5'- accataccgcactcaggcaagc	(Nukleotide 2052 bis 2073)
PG2 antisense Primer	5'- ctgcgaggcgcaggaggattct	(Nukleotide 2380 bis 2400)
PG3FL Hybprobe	5'- cccctatcttatcaacacttccg—FL	(Nukleotide 2310 bis 2332)
PG3LC640 Hybprobe	5'- LC Red 640- gactactgtttagacgacgagg—PH	(Nukleotide 2335 bis 2358)

2.7 PCR Standards

2.7.1 cccDNA-PCR

pBs HBV 991 T7 Dimer

In den 2,7 kb großen prokaryotischen Vektor pBlueskript II SK der Firma Stratagene (USA) wurde ein Dimer des Hepatitis B Virus Gesamtgenoms aus aus pUC991 (HBV Genotyp A2, Gen Bank X51970) einkloniert. Das Genomdimer steht unter der regulatorischen Kontrolle des T7-Promotors. Das Plasmid wurde als Standard für die cccDNA LightCycler PCR verwendet.

2.7.2 X-PCR

Als Standard wurde das Serum eines chronisch asymptomatischen HBV Trägers (Genotyp D) mit der internen Identifikationsnummer ID259 des Instituts für Medizinische Virologie der Universität Gießen (U. Wend persönliche Mitteilung) verwendet.

2.7.3 RT-PCRs

Als Standards für die RT-PCRs dienten *in vitro* transkribierte HBV-RNA Fragmente der X- und Prägenom (pg)-Region von HBV, welche freundlicherweise von Daniel Bock, Institut für Medizinische Virologie, Gießen, zur Verfügung gestellt wurden.

2.8 DNA- und Protein- Längenstandards

pUC Mix Marker, 8	MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot
SeeBlue Plus2™ Prestained	INVITROGEN, Karlsruhe
Mark12 Protein Marker	INVITROGEN, Karlsruhe

2.9 Kommerzielle Reaktionssysteme

Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Kat. Nr. 610.21)	DYNAL BIOTECH, Hamburg
HBe 2.0 Reagent Pack (Ref 7D52-20)	ABBOTT, Wiesbaden
HBe 2.0 Kontrollen (Ref 7D52-10)	ABBOTT, Wiesbaden
High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Kat.Nr.: 11 858 874 001)	ROCHE, Mannheim
illustra™ MicroSpin™ S-400 HR Columns (Kat.Nr.: 27-5140-01)	GE Healthcare, München
LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit (Kat.Nr.: 12 239 272 001)	ROCHE, Mannheim
LightCycler® FastStart DNA Master ^{PLUS} Hybridization Probes Kit (Kat.Nr.: 03 515 567 001)	ROCHE, Mannheim

LightCycler® RNA Amplification Kit	ROCHE, Mannheim
Hybridization Probes Kit	
(Kat.Nr.: 12 015 145)	
Enzygnost® HBsAg 5.0	DADE BEHRING, Marburg
(REF OQPW11)	

2.10 Puffer, Lösungen und Medien

Agarose-Probenpuffer (6 x)

Glycerin	60 ml
Bromphenolblau	0,1 g
ad TAE	100 ml

Blocking Puffer

PBS
1x Roti®-Block
10 % BSA

Blot Waschpuffer

PBS
1 % TWEEN 20
0,5 % BSA

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

INVITROGEN (Kat.Nr.: 21063-029)

HBSS

INVITROGEN (Kat.Nr.: 14175-053)

HBSS⁺⁺

INVITROGEN (Kat.Nr.: 14175-053)

MgCl ₂	1 g
CaCl ₂	1,32 g

HGM (Hepatocyte Growth Media)

DMEM	1 l
ITS Mix (INVITROGEN, Kat.Nr.: 41400-045)	10 ml
BSA (SIGMA, Kat.Nr.: A-4378)	2 g
D(+)-Glukose (MERCK, Kat.Nr.: 104074)	2 g
D(+)-Galaktose (MERCK, Kat.Nr.: 104058)	2 g
Ornithin (SIGMA, Kat.Nr.: O-6503)	100 mg

MATERIAL

Prolin (SIGMA, Kat.Nr.: P-4655)	30 mg
Nikotinamid (Sigma, Kat.Nr.: N-0636)	610 mg
ZnCl ₂ (1000 x Stock) (FLUKA, Kat.Nr.: 96469)	1 ml
ZnSO ₄ x 7H ₂ O (1000 x Stock) (SIGMA, Kat.Nr.: Z-0251)	1 ml
CuSO ₄ x 5H ₂ O (1000 x Stock) (SIGMA, Kat.Nr.: C-8027)	1 ml
MnSO ₄ (1000 x Stock) (SIGMA, Kat.Nr.: M-1144)	1 ml
Glutamax I (5M) (INVITROGEN, Kat.Nr.: 35050-038)	10 ml
Dexamethason (SIGMA, Kat.Nr.: D-4902)	100 µl
Gentamycin (50mg/ml) (INVITROGEN, Kat.Nr.: 15750-045)	2 ml
Amphotericin B (250µg/ml) (INVITROGEN, Kat.Nr.: 15290-018)	1 ml
ELISA-Beschichtungspuffer (NaPP)	
NaCl	83 mM
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	8,6 mM
KH ₂ PO ₄	2,2 mM
auf pH 7,4 einstellen	
Fixierer (für Silberfärbung)	
Fotofixierer	120 ml
ad dH ₂ O	500 ml
Lysis-Puffer für cccDNA Isolierung	
dH ₂ O	15 ml
Triton-X-100	750 µl
MgCl ₂	75 µl
1 Tablette Tris Buffered Saline	
MOPS / SDS-Puffer	
Tris	1M
MOPS	1M
EDTA	20,5 mM
SDS	69,3 mM
NuPAGE™ LDS Probenpuffer (4x)	INVITROGEN (Kat.Nr.: NP0007)
PBS	
NaCl	136 mM
KCl	3 mM
Na ₂ HPO ₄	9 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM

PBS⁺⁺

NaCl	136 mM
KCl	3 mM
Na ₂ HPO ₄	9 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
MgCl ₂	1 g
CaCl ₂	1,32 g

mit HCl auf pH 7,4 einstellen

Reducer (für Silberfärbung)

Zitronensäure	50 mg
Formalin 37%	0,7 ml
ad dH ₂ O	1000 ml

Silbernitratlösung

Lösung A:

AgNO ₃	1,55 g
dH ₂ O	8 ml

Lösung B:

NaOH, 1M	3,8 ml
Ammoniak, 25 %	2,8 ml
dH ₂ O	38,2 ml

Lösung A tropfenweise in Lösung B überführen.

ad dH ₂ O	200 ml
----------------------	--------

TAE-Puffer (50 x)

Tris	242 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA (0,5M)	100 ml

pH 8,0 mit Essigsäure einstellen

TNE (pH 7,4)

NaCl	140 mM
EDTA	1 mM
Tris-HCl	20 mM

Transferpuffer (1 x) für Western Blot

Glycin	14,4 g
Tris	3 g
Methanol	150 ml
ad dH ₂ O	1000 ml

Waschmedium für Infektionsversuche

DMEM
0,1 % BSA
20 mM HEPES

Sonstige, nicht aufgeführte Chemikalien wurden über die Firma SIGMA, Taufkirchen, bezogen.

3 Methoden

3.1 Aufreinigung von HBV aus dem Plasma chronisch infizierter Patienten mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Das Hepatitis B Virus kann mittels einer Ultrazentrifugation (SW 28.38 Rotor, Fa. Beckmann) durch einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten aufgrund seiner Dichte und Größe von den subviralen Partikeln (Sphären und Filamenten) und Plasmaproteinen getrennt und zusätzlich konzentriert werden. Das Plasma eines chronisch asymptomatischen HBV Trägers (Genotyp D) mit der internen Identifikationsnummer 326 des Instituts für Medizinische Virologie der Universität Gießen (U. Wend persönliche Mitteilung) wurde über Nacht im Kühlschrank aufgetaut. Da das Plasma sehr flockig war, wurde es zur Klärung von Proteinaggregaten 20 min bei 3860 rpm und 4 °C abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5810R). In jedem Falcon-Röhrchen befanden sich ca. 35 bis 45 ml Plasma. Das geklärte Plasma wurde im folgenden zur Vorreinigung von Plasmaproteinen durch ein Saccharosekissen aus 6 ml 15 % Saccharose und 2 ml 10 % Saccharose zentrifugiert. Dazu wurden 30 ml des Plasmas pro Röhrchen auf das Saccharosekissen geschichtet und die silikonisierten SW 28 Röhrchen (38,5 ml) mit TNE-Puffer austariert und für 18 h bei 25.000 rpm und 10 °C im SW 28.38 Rotor zentrifugiert. Die entstandenen Pellets enthielten die Viren, subvirale Partikel und partikuläre Plasmaproteine (z.B. High Density Lipoprotein = HDL und Low Density Lipoprotein = LDL). Die Pellets wurden in 1 ml eiskaltem TNE Puffer resuspendiert und gepoolt. Anschließend wurde in einem diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten aus folgenden Konzentrationen: 2 ml 60 %, 4 ml 45 %, 4 ml 35 %, 5 ml 25 %, 5 ml 15 % und 5 ml 5 % Saccharose bei 25.000 rpm für 15 h und bei 10 °C in einem SW 28.38 Schwingbecherrotor zentrifugiert. Der durch die Zentrifugation entstandene Gradient wurde in 1 ml Fraktionen ausgetropft. Dazu wurde eine Stahlkanüle vorsichtig von oben bis zum Becherboden in den Gradienten eingeführt. Dann wurde der Gradient von unten her mit einer Schlauchpumpe in 1 ml Fraktionen in silikonisierte Eppendorfgefäße ausgetropft.

Von jeder Fraktion wurden Aliquots genommen und die Saccharose Dichte per Refraktometer bestimmt. Außerdem wurde der Proteingehalt der Fraktionen durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm im Photometer bestimmt und

von jedem Aliquot die HBV Genomäquivalente in der real-time LightCycler PCR der X-Region bestimmt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese weiter analysiert.

3.2 Isolierung und Kultivierung primärer *Tupaia belangeri* Hepatozyten

Die *Tupaia belangeri* (Südostasiatisches Spitzhörnchen) Kolonie wird im Tierstall des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten.

Die Isolierung der primären *Tupaia* Hepatozyten wurden nach der modifizierten Zwei-Stufen-Kollagenase-Methode nach Seglen (Seglen et al., 1976) durchgeführt. Das Tier wurde entsprechend den Tierschutzrichtlinien 10 min mit CO₂ begast. Danach wurde der Augenreflextest durchgeführt und dem Tier zusätzlich noch das Genick ausluxiert. Als nächstes wurde das gesamte Tier für ein bis zwei min in ein Bad mit 70-%igem Ethanol gelegt, um das Fell des Tieres von mikrobiellen Kontaminationen und groben Schmutzpartikeln zu befreien. Anschließend wurde der Tupaia mit dem Rücken auf eine Styroporunterlage gelegt und an jeder Pfote mit einer Nadel fixiert. Jetzt wurde vorsichtig das Fell vom Abdomen abgezogen und mit einer Knieschere in der *Linea alba* geöffnet. Der Brustkorb wurde entfernt und die Leber sowie die *Vena portae* freigelegt. Die *Vena portae* wurde mit einer Braunüle punktiert. Sobald die Venenwand durchstoßen war, wurde die Nadel entfernt, während der Plastikanteil der Braunüle in der *Vena portae* verblieb und mit einer Arterienklemme fixiert wurde. Jetzt wurde die Leber 15 min mit raumtemperierten HBSS / 5 mM EGTA perfundiert. Das HBSS enthielt kein CaCl₂ und MgCl₂, um die Thrombosierung der Leberkapillaren zu verhindern und eine Zerstörung der Zell-Zellkontakte zu ermöglichen. Während der Perfusion wurde die Leber vorsichtig aus dem Körper entnommen und auf einen Büchner Trichter gelegt. Dort wurde sie mit einer Rotlichtlampe auf einer Temperatur von ca. 37 bis 38 °C gehalten. Danach wurde die Leber 15 min mit raumtemperierten HBSS perfundiert. Die Durchflussrate durfte dabei nicht höher als 8 ml / min sein, um die Leberzellen nicht mechanisch zu belasten. Beim Perfundieren verfärbte sich die Leber von dunkelrot zu hellbraun und zeigte so die gut perfundierten Bereiche an. Das ablaufende HBSS wurde verworfen. Als nächstes folgte die Kollagenasebehandlung der Leber. Dazu

wurden 250 mg Kollagenase IV (Endkonzentration 0,125 %) in 200 ml DMEM (ohne Bicarbonat und ohne Phenolrot) gelöst, sterilfiltriert und auf 37 °C erwärmt. Damit wurde die Leber im rezirkulierenden System perfundiert, wobei die ersten Milliliter verworfen wurden, bis das restliche HBSS aus der Leber gespült war. Die Kollagenasebehandlung wurde für ca. 15 bis 20 min durchgeführt. Die Perfusion wurde beendet, als abzusehen war, dass die Leberkapseln rissig wurden. Alle folgenden Schritte fanden unter der Sterilbank statt. Die Leber wurde in einer 15 cm Zellkulturschale nach der Entfernung der Galle mit Hilfe von zwei Einmalskalpellen zerkleinert. Die kleingeschnittenen Leberstücke wurden zusammen mit der Kollagenase / DMEM-Lösung in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und bei 37 °C und ca. 80 rpm auf einem Schüttler für maximal 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Leberzellen von nicht perfundierten Leberstücken durch ein Zellsieb mit einer Siebdruckgaze mit einem Porendurchmesser von 210 µm abgetrennt, das Filtrat gleichmäßig auf vorgekühlte 50 ml Falcon-Röhrchen verteilt und auf Eis gestellt. Die Falcon-Röhrchen wurden bei 4 °C und 40 g für 6 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befanden sich die Hepatozyten im Pellet und alle restlichen Zellen (nichtparenchymatische Zellen und Blutzellen) sowie die Kollagenase im Überstand. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Hepatozyten wurden vorsichtig mit einer 50 ml Einmalpipette in 20 ml eiskaltem DMEM resuspendiert. Dann wurden die Hepatozyten wieder für 6 min bei 4 °C und 40 g zentrifugiert, wobei der Überstand wieder verworfen wurde. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Danach wurde der Viabilitätstest mit den frisch isolierten Hepatozyten durchgeführt (Trypanblauprobe). Dazu wurden ca. 10 µl der Zellsuspension auf einen Objektträger getropft, mit der doppelten Menge an isoosmotischem Trypanblau-Lösung gemischt und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Auf dem Durchlichtmikroskop wurden nun die Zellausbeute und der Anteil an lebenden Zellen beurteilt. Die Zellkerne toter Zellen färbten sich blau. Bei einer erfolgreichen Isolierung betrug der Anteil an toten Zellen weniger als 5 %. Die so gewonnene Suspension wurde umgehend auf geeignete vorbeschichtete Hepatozyten-Zellkulturschalen ausplattiert. Dazu wurde in die Vertiefungen 10 % FKS / HGM vorgelegt und die gewünschte Anzahl an primären Hepatozyten hineingetroffen. Anschließend wurde die Zellkulturschale 4 h bei

37 °C inkubiert, dann ein Mediumwechsel mit HGM durchgeführt und die Zellen weiter bei 37 °C und 0,75 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

3.3 Beschichtung von Zellkulturplatten

3.3.1 Matrigel

Die Zellkulturplatten wurden mit einer 1:20 Verdünnung von Matrigel™ Basement Membrane Matrix beschichtet. Beim Ansetzen der Verdünnung ist darauf zu achten, dass die Stammlösung, auf Eis auftaut und mit auf 4 °C vorgekühltem sterilem dH₂O und Materialien angesetzt wird. Die Verdünnung wurde unter der Sterilbank so auf die Zellkulturplatte gegeben, dass der Boden bedeckt war, und anschließend wieder abgenommen. Die Zellkulturplatten waren nun fertig für den Gebrauch.

3.3.2 Kollagen

Die Zellkulturplatten wurden mit Kollagen Typ I mit einer Konzentration von 0,8 mg/ml in sterilem dH₂O beschichtet. Die Kollagenlösung wurde unter der Sterilbank so auf die Zellkulturplatte gegeben, dass der Boden bedeckt war und anschließend wieder abgenommen. Um Kollagenfibrillen vorzubeugen, wurde die Platte 1 x mit sterilem PBS gewaschen. Die Zellkulturplatten waren nun fertig für den Gebrauch.

3.4 Kinetik der Infektion von primären *Tupaia* Hepatozyten mit HBV auf unterschiedlichen Zellkulturbeschichtungen

Die primären *Tupaia belangeri* Hepatozyten wurden wie beschrieben nach der modifizierten Zwei-Stufen-Kollagenase-Methode nach Seglen isoliert und auf 6 cm Zellkulturschalen, die entweder mit Kollagen Typ I (0,8 mg/ml) oder einer 1:20 Verdünnung von Matrigel™ Basement Membrane Matrix beschichtet waren, mit 10 % FKS / HGM ausgesät. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel mit 3 ml HGM durchgeführt und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am Tag 3 nach der Isolierung wurde die Kinetik des Infektionsversuches durchgeführt.

Das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit 1x10⁹ GE/ml HGM für 8 h bei 37 °C im Brutschrank infiziert. Das verwendete aufgereinigte Hepatitis B Virus war von einem chronisch infizierten Patienten mit der ID-Nummer 304

(Gradient 2, Fraktion 6). Außerdem wurden noch Platten mit HBV infiziert, die gleichzeitig mit 100 µM Lamivudin behandelt wurden. Am selben Tag wurde das Inokulum (INO) der Zellen gesammelt, sowie an den Tagen 1 bis 10 (T1-T10). Jeden Tag wurde das Medium abgenommen und gesammelt. Anschließend der Zellviabilitätstest WST-1 durchgeführt und wieder 3 ml HGM auf die Hepatozyten gegeben. Bei den Platten, die mit Lamivudin behandelt wurden, wurde bei jedem Mediumwechsel frisches Lamivudin dem Medium zugesetzt. Außerdem wurden von je zwei Platten, die mit Kollagen bzw. Matrigel beschichtet waren, die cccDNA und mRNA isoliert.

Am Ende des Infektionsversuches wurde der Gehalt an cccDNA sowie Gesamt- und Prägenom-mRNA mittels real-time LightCycler PCR sowie HBsAg und HBeAg per ELISA für jeden Tag bestimmt. Die Produktion von neusynthetisiertem HBV wurde ebenfalls durch eine real-time LightCycler PCR ermittelt.

3.4.1 Zellviabilitäts-Test an primären *Tupaia belangeri* Hepatozyten

Grundprinzip des Testes ist die Spaltung des Tetrazolium Salzes WST-1 in Formazan durch zelluläre Enzyme. Die Anzahl metabolisch aktiver Zellen in der Zellkulturplatte korreliert mit der Menge des gelben Formazan im Überstand. Dieses kann im ELISA Messgerät quantifiziert werden.

Am letzten Tag des Infektionsversuches wurde der Überstand gesammelt und 300 µl einer 1:50 Verdünnung der WST-1 Reagenz in DMEM auf die primären Hepatozyten gegeben. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C. Danach wurden 100 µl der mittlerweile gelblich gefärbten Überstände auf eine 96 well Zellkulturplatte gegeben und im ELISA Messgerät bei 450 nm, Referenzwellenlänge 620 nm, gemessen.

3.4.2 Quantitative Bestimmung der Hepatitis B Virus Menge mittels real-time LightCycler PCR

3.4.2.1 Prinzip der real-time LightCycler PCR

Bei einer Polymerasekettenreaktion wird ein definierter Abschnitt einer DNA in mehreren Zyklen von Denaturierung, Annealing der Primer und Amplifizierung vervielfältigt. Bei einer herkömmlichen PCR kann der synthetisierte DNA-Abschnitt nur mit Hilfe der Endpunkttitration quantifiziert werden. Mit Hilfe der

real-time PCR ist die Quantifizierung des amplifizierten Nukleinsäureabschnitts *in situ* möglich. Während jeder PCR gibt es eine Phase, in der der Gehalt an amplifizierter DNA logarithmisch ansteigt, bevor er ein Plateau erreicht. Diese Phase macht sich die real-time PCR zu Nutze. Sie misst kontinuierlich nach jedem Zyklus und kann so die exponentielle Phase identifizieren. Für die Messung der Amplifikation werden während jedes Zyklus die Proben mit einem Lichtstrahl angeregt und die emittierte Fluoreszenz wird gemessen. Diese Fluoreszenz ist proportional der amplifizierten Menge. Als Fluoreszenzfarbstoff kommen markierte Hybridisierungssonden (Hybprobes) zum Einsatz. Dies sind zwei sequenz-spezifische Oligonukleotide, die sich in einem definierten Abstand von ein bis fünf Nukleotiden an die neu amplifizierte DNA anlagern. Hybridisierungssonde 1 ist am 3'- Ende mit einem Fluoresceinmolekül (FC, Donor) gekoppelt und Hybridisierungssonde 2 hat am 5'- Ende ein LC-Rot 640 Molekül (Akzeptor). Um zu verhindern, dass die Hybridisierungssonde 2 ebenfalls als Primer wirken kann, ist sie am 3'- Ende methyliert. Bei einem PCR Zyklus lagern sich die Hybprobes in einem Abstand von ein bis fünf Basen an die neusynthetisierte DNA in einem „head to tail-arrangement“ an. Wird das Fluorescein der Hybprobe 1 (Donor) mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, kann seine Energie mittels FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) wegen des geringen Abstands beider Moleküle auf die Hybprobe 2 (Akzeptor) übertragen werden. Diese emittiert dann rotes Licht, welches über eine Photozelle des LightCyclers gemessen wird. Für die Quantifizierung wird in jedem Zyklus der PCR nach der Annealing-Phase die Fluoreszenz gemessen. Eine Erhöhung der Spezifität ist möglich, wenn die Temperatur vor der Messung gerade so hoch gewählt wird, dass die Hybprobes, die trotz einzelner Fehlpaarungen an die cDNA gebunden haben, wieder abfallen.

Von Anfang der PCR an ist eine Grundfluoreszenz vorhanden, welche bei allen Proben relativ einheitlich ist. Zu Beginn der PCR ist noch wenig PCR-Produkt im Ansatz und eine Zunahme der Fluoreszenz ist praktisch nicht messbar. Ab einem bestimmten Punkt ist genug PCR Produkt im Ansatz vorhanden, um zwischen zwei Messungen unterscheiden zu können. Während späterer Zyklen steigt auch die Zunahme der Fluoreszenz exponentiell an, bis sie in eine Plateauphase übergeht. Die Plateauphase wird erreicht, wenn gegen Ende des

Laufes alle Hybprobes an das neue Amplifikat gebunden sind und die freien Desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTPs) in ihrer Konzentration sinken.

Nach dem PCR Lauf werden die Fluoreszenzen (y-Achse) logarithmisch in Bezug zu den vergangenen Zyklen (x-Achse) aufgetragen. Der Zeitpunkt der maximalen Fluoreszenzzunahme wird vom Rechner des LightCyclers ermittelt, indem eine Regressionsgerade durch die Punkte auf der Fluoreszenzfunktion gelegt und ihr Schnittpunkt (Crossing Point) mit der Zahl der Zyklen (Baseline) errechnet wird. Der Schnittpunkt mit der Zyklusachse ist umso früher, desto mehr cDNA in der ursprünglichen Probe vorhanden war. Die Anzahl der Punkte (Fit Points), durch welche die Regressionsgerade bestimmt wird, legt der Benutzer fest. Diese Fit Points dürfen nur im exponentiellen Bereich der Fluoreszenzzunahme liegen, sonst verschiebt sich der Crossing Point in Richtung kleinerer Zyklenzahlen.

Eine Quantifizierung der unbekanntenen Proben wird dadurch erreicht, dass eine Standard-Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration bei jeder PCR ebenfalls amplifiziert wird. Die bekannten Konzentrationen werden in halblogarithmischer Darstellung gegen die Schnittpunkte der Zeitachse aufgetragen und eine Regressionsgerade eingetragen. Die unbekanntenen Konzentrationen werden anhand ihres Schnittpunktes mit der Baseline bestimmt. Diese Berechnungen werden alle automatisch durch die LightCycler Software gemacht. Die berechnete Menge wird vom LightCycler als Zahl der DNA-Kopien angegeben. Die Ergebnisse müssen in Genomäquivalente pro ml umgerechnet werden.

3.4.2.2 Isolierung von HBV DNA aus Überständen von Infektionsversuchen und Serum

Um eine PCR der HBV DNA durchführen zu können, musste diese vorher aufgereinigt werden. Dazu wurde das High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Fa. Roche) verwendet. Das Standardaufreinigungsvolumen dieses Kits beträgt 200 µl. Hatte man weniger als dieses Volumen zum Aufreinigen zur Verfügung, wurden die Proben mit dH₂O auf 200 µl aufgefüllt und dann aufgereinigt. Am Ende der Aufreinigung wurde die extrahierte DNA in 50 µl Elutionspuffer aufgenommen. Von den 50 µl isolierten DNA-Extrakts wurden 10 µl direkt in die PCR eingesetzt.

3.4.2.3 Isolierung von cccDNA und mRNA aus infizierten primären Hepatozyten

War der Infektionsversuch beendet, wurde aus den infizierten primären *Tupaia* Hepatozyten die cccDNA und die gesamte mRNA isoliert. Dabei liefen alle Schritte auf Eis und mit eiskühlten Materialien ab. Alle Platten wurden nacheinander bearbeitet.

Zuerst wurde das Medium abgenommen und für eventuelle weitere Versuche eingefroren. Dann wurde eine 6 cm Zellkulturplatte 2 x mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Mit Hilfe eines Zellkulturschabers (Fischer Brand) wurden die infizierten Zellen mit 1 ml PBS abgeschabt. Das PBS-Zell-Gemisch wurde in ein v-förmiges Reaktionsgefäß (Eppi) überführt und die Zellen in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge bei 2000 rpm für 2 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und zu dem Pellet wurden 200 µl Zell-Lysat Puffer gegeben. Der Lysat-Puffer enthielt ein nichtionisches Detergenz (0,5 % Triton-X-100) zur Lyse der Zellmembran sowie Mg^{2+} -Ionen zur Stabilisierung der Zellkernintegrität. Es wurde nur durch leichtes Vortexen gemischt. Anschließend wurde wieder bei 2000 rpm für 2 min in der 4 °C kalten Zentrifuge zentrifugiert. Nach der Zentrifugation erhält man somit im Pellet die Zellkerne (cccDNA) und im Überstand das Zytoplasma (mRNA) sowie gelöste Membrananteile. Der Überstand wurde zu je 100 µl auf 2 Eppis verteilt und für die mRNA Isolierung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert. Die Kerne mit der cccDNA wurden ebenso gelagert.

3.4.2.3.1 cccDNA Isolierung

Die eingefrorenen Kernpellets wurden auf Eis aufgetaut und einer DNA-Fällung nach Hirth unterzogen (Hirth et al., 1969). Der „Hirth-Extrakt“ isoliert nur episomale DNA, da die chromosomale DNA durch die hohe Salzkonzentration ausgefällt wird.

Zu dem Pellet gab man 400 µl SDS / EDTA (0,6 % (w/v) / 10 mM EDTA), mischte vorsichtig durch invertieren und ließ das ganze 20 min bei RT stehen. Danach gab man 100 µl 5 M NaCl dazu und die chromosomale DNA fiel sofort aus. Die Ansätze ließ man ü. N. bei 4 °C stehen. Am nächsten Tag wurden die Ansätze in der auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge für 4 min bei 14.000 rpm pelletiert. Aus dem Überstand wurde die cccDNA mit dem High Pure Viral

Nucleic Acid Kit (Fa. Roche) aufgereinigt und konnte direkt in die PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden.

3.4.2.3.2 Gesamt-mRNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-mRNA erfolgte mit dem Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Fa. Dynal). Das Prinzip der Isolierung beruht darauf, dass die Poly-A-Schwänze der mRNAs an die oligo-dT's der Dynabeads binden. Die Dynabeads wiederum sind magnetisch und mit Hilfe der Magnetständer gut zu bearbeiten und zu isolieren.

Die eingeforenen Überstände (100 µl) der Proben wurden auf Eis aufgetaut. Das Tris-HCl des Kits wurde auf Eis gestellt und alle übrigen Lösungen des Kits auf RT gebracht. Der Heizblock wurde auf 90 °C vorgeheizt. Zuerst folgte die Oligo-Vorbereitung. Dazu wurden die Oligos kräftig gevortext. Für jeden Ansatz benötigte man 20 µl Oligos. Diese wurden für alle Ansätze zusammen in ein Eppi pipettiert. Das Eppi wurde für 30 sek auf den Magnetständer gestellt. Hatten sich die Oligos am Rand abgesetzt, wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit der entsprechenden Menge, also pro Ansatz 20 µl Lysis / Bindepuffer, resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde noch 1 x wiederholt. Anschließend wurden die Oligos in 20 µl Aliquots in Eppis aufgeteilt.

Nun folgte die mRNA Isolierung. Zu jedem Oligo-Aliquot wurden je 100 µl des aufgetauten Zytoplasmas pipettiert und die Proben für 5 min bei RT auf dem Schüttler bei 60 % gleichmäßig gevortext, um eine Hybridisierung der mRNA an die oligo-dT's zu erlauben. Danach wurden die Proben für 30 sek auf den Magnetständer gestellt und der Überstand verworfen. Es wurde mit 100 µl Waschpuffer A resuspendiert und die Proben in ein frisches Eppi überführt. Der Waschschrift wurde noch 2 x mit Waschpuffer B durchgeführt. Beim letzten Waschen wurde der Waschpuffer nicht abgezogen und die Proben 5 sek in der Tischzentrifuge pelletiert, dann schnell in den Magnetständer gestellt, der Überstand abgezogen und 20 µl Tris / HCl dazugefügt. Anschließend wurden die Proben für 2 min in den auf 90 °C vorgeheizten Heizblock gestellt, um die mRNA von den oligo-dT's zu trennen. Danach wurden die Proben schnell in den Magnetständer gestellt und der Überstand, der die mRNA enthält, in ein frisches Eppi überführt und auf Eis gestellt.

Um die isolierte mRNA von DNA Verunreinigungen zu befreien, wurde sofort ein Turbo DNase Verdau durchgeführt. Dazu gab man zu den 20 µl isolierte RNA 7,5 µl Turbo DNase (1:10 verdünnt) und 3 µl Turbo DNase Puffer (10 x). Die Ansätze wurden 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde 3 µl EDTA (50 mM) zu den Proben gegeben und 10 min bei 75 °C die Turbo DNase inaktiviert. Zum Schluss wurden die Proben kurz in der Tischzentrifuge herunterzentrifugiert und konnten direkt in der RT-PCR eingesetzt oder bei -70 °C gelagert werden.

3.4.2.4 Quantifizierung der cccDNA von HBV mittels real-time LightCycler PCR

Die isolierte cccDNA wurde mit Hilfe des LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit (Fa. Roche) amplifiziert. Als Standard wurde das Plasmid pBs HBV 991 T7 Dimer verwendet. Bei jedem LightCycler Lauf wurde davon eine Verdünnungsreihe von 10^7 bis 10 Genomäquivalenten jeweils in 10 µl PCR Ansatz eingesetzt. Als Negativkontrollen dienten dH₂O und eine Verdünnungsreihe des Serum Standards ID259 von 10^5 bis 10^3 Genomäquivalenten jeweils in 10 µl PCR Ansatz. Jede LightCycler Kapillare enthielt insgesamt 20 µl Reaktionsvolumen, die sich aus 10 µl Probe plus 10 µl Mastermix zusammensetzte.

Die Primer für die cccDNA PCR (siehe 2.6.1) sind vor und nach der „nick-gap“-Struktur der cccDNA lokalisiert. Daher wird nur eine Amplifizierung der cccDNA durchgeführt und nicht der genomischen HBV DNA. Bei der genomischen DNA kann die Polymerase nicht amplifizieren, da die Lücke nicht geschlossen ist.

Der Mastermix enthielt folgende Bestandteile:

3,4 µl	dH ₂ O
1,6 µl (3 mM)	MgCl ₂
1 µl (10 pmol)	Sense Primer (C1 sense)
1 µl (10 pmol)	Antisense Primer (C1 antisense)
0,5 µl (4 pmol)	3FL CB Hybprobe
0,5 µl (4 pmol)	5LC CB Hybprobe
2 µl	Fast Start Taq

Zu jeweils 10 µl Mastermix wurden 10 µl Probe pipettiert und das Reaktionsvolumen in den Kapillaren ca. 15 sek bei 2500 rpm herunterzentrifugiert. Anschließend wurden die Kapillaren in das LightCycler Rondell eingesetzt und folgendes Programm gestartet:

	Aktivierung	Amplifikation			Schmelzkurve			Kühlen
Cycles	1	45			1			1
Type	Regular	Quantification			Melting Curve			Regular
Target Temp. [°C]	95	95	57	72	95	50	95	40
Incubation Time	10 min	10''	20''	32''	10''	20''	0''	30''
Temp. Transition Rate [°C]	20	20	20	5	20	20	0,1	20
Second Target Temp. [°C]			50					
Step Size			1					
Step Delay			1					
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Cont	

War der Lauf beendet, wurde der Inhalt der Kapillaren in ein Eppi zentrifugiert und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.4.2.5 Quantifizierung der X-Region von HBV DNA mittels real-time LightCycler PCR

Die aufgereinigte HBV DNA in den Überständen der infizierten Zellen wurde mit Hilfe des LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit (Fa. Roche) amplifiziert.

Als Standard wurde das aufgereinigte Serum von ID295 verwendet. Bei jedem LightCycler Lauf wurde davon eine Verdünnungsreihe von 10⁵ bis 10 Genomäquivalenten jeweils in 10 µl PCR Ansatz eingesetzt. Als Negativkontrolle diente dH₂O. Jede LightCycler Kapillare enthielt insgesamt 20 µl Reaktionsvolumen, die sich aus 10 µl Probe plus 10 µl Mastermix zusammensetzte.

Der Mastermix enthielt folgende Bestandteile (Jursch et al., 2002):

2,6 µl	dH ₂ O
2,4 µl (4 mM)	MgCl ₂
1 µl (10 pmol)	Sense Primer (X2 sense)
1 µl (10 pmol)	Antisense Primer (X2 antisense)
0,5 µl (4 pmol)	3FL XB Hybprobe
0,5 µl (4 pmol)	5LC XB Hybprobe
2 µl	Fast Start Taq

Zu jeweils 10 µl Mastermix wurden 10 µl Probe pipettiert und das Reaktionsvolumen in den Kapillaren ca. 15 sek bei 2500 rpm herunterzentrifugiert. Anschließend wurden die Kapillaren in das LightCycler Rondell eingesetzt und folgendes Programm gestartet:

	Aktivierung	Amplifikation				Schmelzkurve			Kühlen
Cycles	1	45				1			1
Type	Regular	Quantification				Melting Curve			Regular
Target Temp. [°C]	95	95	64	64	72	95	50	95	40
Incubation Time	10 min	10''	15''	1''	13''	10''	15''	0''	30''
Temp. Transition Rate [°C]	20	20	20	5	5	20	20	0,1	20
Second Target Temp. [°C]			50						
Step Size			1						
Step Delay			1						
Acquisition Mode	None	None	None	Single	None	None	None	Cont	

War der Lauf beendet, wurde der Inhalt der Kapillaren in ein Eppi zentrifugiert und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.4.2.6 Quantifizierung der mRNAs der X-Region von HBV DNA mittels real-time LightCycler PCR reverser Transkription

Die aufgereinigte mRNA aus den infizierten Hepatozyten wurde mit Hilfe des LightCycler® RNA Amplification Hybridization Kit (Fa. Roche) revers transkribiert und anschließend amplifiziert.

Als Standard für die RT-PCR diente ein *in vitro* transkribiertes HBV-RNA Fragment der X-Region, welches freundlicherweise von Daniel Bock, Institut für Medizinische Virologie, Gießen, zur Verfügung gestellt wurde. Es wurde in den Verdünnungen von 10⁸ bis 10 Genomäquivalenten jeweils in 5 µl PCR Ansatz eingesetzt. Als Negativkontrolle diente dH₂O. Zusätzlich wurde von einer höheren Standardkonzentration zusätzlich noch ein RNase-, DNase- und RNase-/ DNase-Verdau in die PCR eingesetzt. Jede LightCycler Kapillare enthielt insgesamt 20 µl Reaktionsvolumen, die sich aus 5 µl Probe plus 15 µl Mastermix zusammensetzte.

Der Mastermix enthielt folgende Bestandteile:

4,5 µl	dH ₂ O
3,0 µl (6,75 mM)	MgCl ₂
1 µl (10 pmol)	Sense Primer (X2 sense)
1 µl (10 pmol)	Antisense Primer (X2 antisense)
0,5 µl (4 pmol)	3FL XB Hybprobe
0,5 µl (4 pmol)	5LC XB Hybprobe
0,5 µl	RT-PCR-Enzyme Mix
4 µl	RT-PCR-Reaction Mix

Zu jeweils 15 µl Mastermix wurden 5 µl Probe pipettiert und das Reaktionsvolumen in den Kapillaren ca. 15 sek bei 2500 rpm herunterzentrifugiert. Anschließend wurden die Kapillaren in das LightCycler Rondell eingesetzt und folgendes Programm gestartet:

	RT	Aktiv	Amplifikation				Schmelzkurve			Kühlen
Cycles	1	1	45				1			1
Type	Regular		Quantification				Melting Curve			Regular
Target Temp. [°C]	55	95	95	64	64	72	95	50	80	40
Incubation Time	12'	10"	10"	15"	1"	13"	0"	15"	0"	30"
Temp. Transition Rate [°C]	20	20	20	20	5	5	20	15	0,1	20
Second Target Temp. [°C]				52						
Step Size				1						
Step Delay				1						
AcquisitionMode	None		None		Single	None	None		Cont	

War der Lauf beendet, wurde der Inhalt der Kapillaren in ein Eppi zentrifugiert und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.4.2.7 Quantifizierung der mRNAs der Prägenom-Region von HBV DNA mittels real-time LightCycler PCR reverser Transkription

Die aufgereinigte mRNA aus den infizierten Hepatozyten wurde mit Hilfe des LightCycler® RNA Amplification Hybridization Kit (Fa. Roche) revers transkribiert und anschließend amplifiziert.

Als Standard für die RT-PCR diente ein *in vitro* transkribiertes HBV-RNA Fragment der Prägenom-Region, welches freundlicherweise von Daniel Bock, Institut für Medizinische Virologie, Gießen, zur Verfügung gestellt wurde. Es wurde in den Verdünnungen von 10⁸ bis 10 Genomäquivalenten jeweils in 5 µl PCR Ansatz eingesetzt. Als Negativkontrolle diente dH₂O. Zusätzlich wurde von

einer höheren Standardkonzentration noch ein RNase-, DNase- und RNase- / DNase-Verdau in die PCR eingesetzt. Jede LightCycler Kapillare enthielt insgesamt 20 µl Reaktionsvolumen, die sich aus 5 µl Probe plus 15 µl Mastermix zusammensetzte.

Der Mastermix enthielt folgende Bestandteile:

4,5 µl	dH ₂ O
3,0 µl (6,75 mM)	MgCl ₂
1 µl (10 pmol)	Sense Primer (PG2 sense)
1 µl (10 pmol)	Antisense Primer (PG2 antisense)
0,5 µl (4 pmol)	PG 3FL Hybprobe
0,5 µl (4 pmol)	5LC Hybprobe
0,5 µl	RT-PCR-Enzyme Mix
4 µl	RT-PCR-Reaction Mix

Zu jeweils 15 µl Mastermix wurden 5 µl Probe pipettiert und das Reaktionsvolumen in den Kapillaren ca. 15 sek bei 2500 rpm herunterzentrifugiert. Anschließend wurden die Kapillaren in das LightCycler Rondell eingesetzt und folgendes Programm gestartet:

	RT	Aktiv	Amplifikation				Schmelzkurve			Kühlen
Cycles	1	1	45				1			1
Type	Regular		Quantification				Melting Curve			Regular
Target Temp. [°C]	55	95	95	59	59	72	95	50	80	40
Incubation Time	12'	10''	10''	12''	1''	13''	0''	15''	0''	30''
Temp.Transition Rate [°C]	20	20	20	20	5	5	20	15	0,1	20
Second Target Temp. [°C]				50						
Step Size				1						
Step Delay				1						
Acquisition Mode	None		None		Single	None	None		Cont	

War der Lauf beendet, wurde der Inhalt der Kapillaren in ein Eppi zentrifugiert und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.4.2.8 Agarose-Gelelektrophorese der LightCycler PCR Produkte

Die Agarosegel-Elektrophorese ermöglicht die Analyse von DNA Fragmenten mit einer Größe von 0,1 bis 20 kb. Sie stellt eine Spezifitätskontrolle der LightCycler PCR dar. Denn zum einen kann es vorkommen, dass der LightCycler keine Quantifizierung einer Probe vornimmt, obwohl DNA amplifiziert wurde. Das geschieht z. B. bei der cccDNA, wo nur sehr wenig

Kopien in den infizierten Hepatozyten vorhanden sind, welche amplifiziert werden können. Zum anderen kann anhand der Größe des Amplifikates gezeigt werden, dass es wahrscheinlich spezifisch amplifiziert wurde.

Dazu wurde in eine horizontale Elektrophoresekammer (Horizon 11-14, BRL) ein passender Gelschlitten eingelegt und ein Teflonkamm mit der entsprechenden Anzahl an Taschen für die Proben ebenfalls eingesteckt. Dann wurde die 2 %-ige Agarose (Seakem LE Agarose, Biozym) in 1 x TAE in der Mikrowelle erhitzt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Die Agaroselösung wurde abgekühlt, bis sie handwarm war (ca. 50 °C) und die verdunstete Flüssigkeit mit dH₂O ausgeglichen. Dann wurde sie in den Gelschlitten gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde die Kammer mit 1 x TAE befüllt und der Kamm vorsichtig herausgezogen. Jeweils 10 µl der Proben wurden mit 2 µl 6 x Agarose-Probenpuffer gemischt und in die durch den Teflonkamm entstandenen Taschen aufgetragen. Als DNA-Marker wurde pUC Mix 8 (MBI Fermentas) verwendet. Dann wurde die Elektrophoresekammer geschlossen und an eine Spannungsquelle (Model 200, BRL) angeschlossen. Die Auftrennung erfolgt bei 100 V. War der Lauf beendet, wurde das Agarosegel für 30 min in Ethidiumbromid gefärbt und anschließend unter UV-Licht in einem Transilluminator fotografiert.

3.4.3 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) zur Bestimmung des HBsAg aus Zellkulturüberständen

Der ELISA dient der quantitativen Bestimmung von gelösten Proteinen. Der hier verwendete „Sandwich“-ELISA basiert darauf, dass ein immobilisierter primärer Antikörper das zu bestimmende Protein spezifisch bindet. An dieses Protein bindet dann spezifisch ein zweiter Antikörper, der wiederum von einem dritten Antikörper erkannt wird, welcher mit einem Enzym konjugiert ist, welches seine Detektion durch chromogene Substrate ermöglicht.

Zuerst wurde eine 96 well Zellkulturplatte mit dem Antikörper C20/2 beschichtet. Dazu wurde der gereinigte Antikörper (1 mg/ml) 1:1000 in Beschichtungspuffer verdünnt und je 100 µl pro Vertiefung in die Platte pipettiert. Die Inkubation erfolgte ü. N. bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Platte 2 x mit 200 µl 0,1 % Tween 20 / PBS und 2 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Proteinbindungsstellen mit je 200 µl 10 % FKS / TNE geblockt

und die Platte ü. N. bei 4 °C inkubiert. Danach wurde erneut 2 x mit 200 µl 0,1 % Tween 20 / PBS und 2 x mit PBS gewaschen. Jetzt erfolgte der Auftrag von je 100 µl Proben pro well. Zur Quantifizierung des HBsAg in den zu bestimmenden Überständen wurde eine Standardreihe mit definierten Mengen an gereinigtem HBsAg aus Plasma erstellt. Die Standardreihe bestand aus dem HBsAg-Referenzserum ID1 KG Genotyp D mit 1 ng/100 µl und wurde in folgenden Konzentrationen eingesetzt [ng pro 100 µl]: 0,5; 0,25; 0,125; 0,063; 0,031; 0,016; 0,008 und 0,004. Die Inkubation erfolgte ü. N. bei 4 °C. Am folgenden Tag wurden die Proben entfernt und die Platte wieder 2 x mit 200 µl 0,1 % Tween 20 / PBS und 2 x mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Konjugat 1 Anti-HBs/Biotin (Dade Behring). Es wurde 1:40 in 0,1 % Casein / PBS verdünnt und mit 100 µl pro well eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37 °C auf dem Plattenschüttler. Anschließend wurde der Antikörper 2 x mit 200 µl 0,1 % Tween 20 / PBS und 2 x mit PBS abgewaschen. Jetzt erfolgte die Inkubation mit dem Detektionsmolekül Streptavidin-POD (Dianova). Dieses wurde 1:500 in 0,1 % Casein / PBS verdünnt und ebenfalls mit 100 µl pro well eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C auf dem Schüttler. Folgend wurde die Platte erneut 2 x mit 200 µl 0,1 % Tween 20 / PBS und 2 x mit PBS gewaschen. Dann wurden pro Platte 4 OPD Tabletten und 5 µl Perhydrol in 12 ml dH₂O gelöst und lichtgeschützt aufbewahrt. Von dem OPD-Substrat wurden pro well 100 µl dosiert und 15 min bei RT und im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation im Dunkeln wurde die Reaktion mit 50 µl 0,5 M Schwefelsäure (1N) gestoppt und die Extinktion des umgesetzten OPD-Substrates im Photometer (Microplate Reader) bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Die Referenzwellenlänge betrug 620 nm.

3.4.4 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) zur Bestimmung des HBeAg aus Zellkulturüberständen

Das HBeAg in den Zellkulturüberständen wurde mittels des AxSym Systems (Fa. Abbott) nachgewiesen. Dazu wurde das Programm AxSym HBe 2.0 verwendet. Das Prinzip der Messung beruht auf einem Mikropartikel-Enzymimmunoassay (MEIA). Dabei bindet das HBeAg in der Probe an Mikropartikel, die mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen das HBeAg beschichtet sind. Der daraus resultierende Mikropartikel-Antikörper-Antigen-

Komplex wird in eine Matrixzelle überführt, wo er irreversibel an die Glasfibrermatrix bindet. Im nächsten Schritt wird ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen das HBeAg, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist, hinzugefügt. Dieser bindet ebenfalls an das HBeAg und es entsteht ein Mikropartikel-Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Zu diesem wird als Substrat für die Alkalische Phosphatase 4-Methylumbelliferyl-Phosphat (MUP) gegeben. Dieses wird durch die Abspaltung einer Phosphatgruppe in fluoreszierendes Methylumbelliferon (MU) umgesetzt. Gemessen wird die MUBildungsrate und in der Einheit S/CO (Signal to cut off) angegeben. Ist der gemessene Wert größer als 1,0 S/CO, wird die Probe als positiv, ist sie kleiner als 1,0 S/CO, als negativ bewertet.

Von den zu analysierenden Zellkulturüberständen wurden je 300 µl luftblasenfrei in ein Röhrchen überführt und in den AxSym eingesetzt. Dazu kamen das Reaktionsgemisch, eine positiv und eine negativ Kontrolle. Dann konnte das vollautomatische Programm zum semiquantitativen Nachweis des HBeAg gestartet werden.

3.5 Ansetzen der HBV Verdünnung für Infektionsversuche

Für die Infektionsversuche an primären Hepatozyten wurde das mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation gereinigte Virus eines chronisch asymptomatischen HBV Trägers (Genotyp D) mit der internen Identifikationsnummer 326 des Instituts für Medizinische Virologie der Universität Gießen (U. Wend persönliche Mitteilung) verwendet. Da dieses Virus hochinfektiös war, wurden für die Infektionsversuche pro well der 12 well Zellkulturplatte nur 0,25 µl aufgereinigtes HBV eingesetzt, welches in 20 µl HGM aufgenommen wurde. Eingesetzt wurde immer die Fraktion 5 des 2. Gradienten der Saccharose-Dichtegradienten Zentrifugation. Mittels real-time LightCycler PCR wurden für diese Fraktion $4,4 \times 10^9$ GE / ml bestimmt.

3.5.1 Infektion primärer Hepatozyten mit HBV unter dem Einfluss von Glycosaminglykanen

Die primären *Tupaia belangeri* Hepatozyten wurden wie beschrieben nach der modifizierten Zwei-Stufen-Kollagenase-Methode nach Seglen isoliert und auf 12 well Zellkulturplatten, die mit einer 1:20 Verdünnung von Matrigel

beschichtet waren, mit 10 % FKS / HGM ausgesät. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel mit 600 µl HGM durchgeführt und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die verwendeten sulfatierten Polymere waren Heparin und Chondroitin-Sulfat. Beide wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt: 1000 µg/ml, 100 µg/ml, 10 µg/ml und 1 µg/ml.

Am dritten Tag nach der Hepatozyten Isolierung wurden 300 µl der entsprechenden Heparin bzw. Chondroitin-Sulfat Verdünnungen mit HBV für 1 h bei RT leicht schüttelnd inkubiert, um eine Interaktion von HBV mit den sulfatierten Polymeren zu erlauben. Danach wurde das alte Medium von den Hepatozyten genommen und durch die jeweiligen Ansätze ersetzt. Die Zellen wurden 4 h bei 16 °C inkubiert, um eine Bindung, aber keine Aufnahme des HBV zu erlauben. Danach wurde der Überstand abgenommen, gesammelt und die Hepatozyten einmal mit 600 µl Waschmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 600 µl frischem HGM ü. N. bei 37 °C inkubiert, um eine HBV Infektion zu erlauben. Am nächsten Tag wurde das Medium erneut gewechselt sowie an den Tagen 4, 7, 11 und 15. Am letzten Tag wurden die Zellen wie beschrieben einem Zellviabilitäts Test unterzogen. In den gesammelten Überständen wurde mittels ELISA das HBeAg bestimmt.

3.5.2 Infektion primärer Hepatozyten mit HBV nach Behandlung mit unterschiedlichen Enzymen

Die primären *Tupaia belangeri* Hepatozyten wurden wie beschrieben nach der modifizierten Zwei-Stufen-Kollagenase-Methode nach Seglen isoliert und auf 12 well Zellkulturplatten, die mit einer 1:20 Verdünnung von Matrigel beschichtet waren, mit 10 % FKS / HGM ausgesät. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel mit 600 µl HGM durchgeführt und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Für den Versuch wurden folgende Enzyme in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt: Heparinase III mit 6 U/ml, 3 U/ml, 1,5 U/ml und 0,7 U/ml, PNGaseF mit 3000 mU/ml, 1500 mU/ml, 750 mU/ml und 375 mU/ml sowie Sialidase mit 15 mU/ml, 7,5 mU/ml, 3,8 mU/ml und 1,9 mU/ml.

An Tag 3 nach der Isolierung wurde das alte Medium von den primären Hepatozyten abgenommen und mit 300 µl der entsprechenden Enzymverdünnung ersetzt. Die Zellen wurden 2 h bei 16 °C inkubiert. Diese Temperatur erlaubt eine Modifizierung der Glykane der Zelloberfläche, aber

keine Aufnahme und Neusynthese von Plasmamembran-Proteinen. Danach wurden die Enzymverdünnungen abgenommen und die Hepatozyten einmal mit 600 µl Waschmedium gewaschen. Anschließend wurden 300 µl Virusverdünnung zu den Zellen gegeben und die Ansätze 4 h bei 16 °C inkubiert, um eine Bindung von HBV zu erlauben. Nachfolgend wurde die Virusverdünnung abgenommen, die Hepatozyten noch einmal mit 600 µl Waschmedium gewaschen und mit 600 µl HGM ü. N. bei 37 °C inkubiert, um eine HBV Infektion zu erlauben. Am nächsten Tag wurde das Medium erneut gewechselt sowie an den Tagen 4, 7, 11 und 15. Am letzten Tag wurden die Zellen wie beschrieben einem Zellviabilitäts Test unterzogen. In den gesammelten Überständen wurde mittels ELISA das HBeAg bestimmt.

3.5.3 Infektion primärer Hepatozyten mit HBV unter dem Einfluss unterschiedlicher Inhibitoren

Die primären *Tupaia belangeri* Hepatozyten wurden wie beschrieben nach der modifizierten Zwei-Stufen-Kollagenase-Methode nach Seglen isoliert und auf 12 well Zellkulturplatten, die mit einer 1:20 Verdünnung von Matrigel beschichtet waren, mit 10 % FKS / HGM ausgesät. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel mit 600 µl HGM durchgeführt und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am dritten Tag nach der Isolierung wurde der Infektionsversuch durchgeführt, wobei die Hepatozyten jeweils mit den Inhibitoren Bafilomycin A1 (100 nM), Chlorpromazin (15 µg) und dem myristyliertem Protein Kinase C Inhibitor 20 bis 28 (8 µM) vor, während und nach der HBV Infektion behandelt wurden.

Bei dem Versuchsteil „vor“ wurde am zweiten Tag nach der Isolierung das Medium von den Zellen genommen und durch 300 µl Medium ersetzt, welches die Inhibitoren in den oben genannten Konzentrationen enthielt. Damit wurden die Hepatozyten ü. N. im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium mit dem Inhibitor entfernt und durch Medium mit HBV ersetzt. Die Ansätze wurde ü. N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, damit eine Infektion der Zellen stattfinden konnte. Am folgenden Tag wurde der Überstand, auch als Inokulum bezeichnet, abgenommen und durch 600 µl HGM ersetzt.

Bei dem Versuchsteil „während“ wurde am dritten Tag nach der Aussaat das Medium durch 300 µl HGM ersetzt, welches die jeweiligen Inhibitoren plus HBV enthielt. Die Ansätze wurden ü. N. bei 37 °C im Brutschrank infiziert. Am

nächsten Tag wurde ebenfalls das Inokulum abgenommen und durch 600 µl neues HGM ausgetauscht.

Bei dem Versuchsteil „nach“ wurden das HGM am dritten Tag nach der Isolierung durch 300 µl HGM plus HBV ausgetauscht und die Hepatozyten ü. N. bei 37 °C im Brutschrank infiziert. Am nächsten Tag wurde das Inokulum gesammelt und durch 600 µl Medium mit dem jeweiligen Inhibitor bis zum nächsten Mediumwechsel ersetzt.

Bei jedem Versuchsteil wurde zusätzlich zum Inokulum an den Tagen 3, 6, 10 und 14 ein Mediumwechsel mit 600 µl frischem HGM durchgeführt. Am letzten Tag wurden die Zellen wie beschrieben einem Zellviabilitäts Test unterzogen. In den gesammelten Überständen wurde mittels Sandwich-ELISA das HBsAg bestimmt.

3.6 In dieser Arbeit verwendetes HBsAg

In den diversen SDS Gelen und Blots wurden immer dieselben HBsAg Proben von chronisch infizierten Patienten eingesetzt. Alle Proben wurden mittels Saccharose Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt.

Genotyp A mit der internen Identifikationsnummer 221 (Stock: 1,73 µg / µl)

Genotyp C mit der internen Identifikationsnummer 159 (Stock: 2 µg / µl)

Genotyp D mit der internen Identifikationsnummer 326 (Stock: 5 µg / µl)

3.6.1 Reduzierung von HBsAg

Die bestehenden Disulfidbrücken im HBsAg wurden durch eine Reduzierung mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid (TCEP) aufgebrochen. Trialkylphosphin Derivate sind stabil in wässriger Lösung und reduzieren selektiv und komplett Disulfidbrücken, ohne mit anderen funktionellen Gruppen von Proteinen zu reagieren. Die Reaktionen können über einen weiten pH-Wert Bereich stattfinden.

Dazu wurde die gewünschte Menge HBsAg in PBS⁺⁺ für 15 min mit 2 mM TCEP bei RT leicht schüttelnd inkubiert.

3.6.2 Biotinylierung von HBsAg

Biotin ist ein Vitamin mit 227 Da, welches an Proteine konjugiert werden kann, ohne ihre biologische Aktivität zu beeinflussen. Biotin bindet mit sehr hoher Affinität an Avidin und Streptavidin und kann so gut detektiert werden.

Die freien Cysteinreste des mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen HBsAg eines chronisch asymptomatischen HBV Trägers (Genotyp D) mit der internen Identifikationsnummer 326 des Instituts für Medizinische Virologie der Universität Gießen wurde mit Maleimido-PEO3-Biotin (Maleimid) biotinyliert. Die Maleimid-Gruppe reagiert sehr spezifisch mit Sulfhydrylgruppen (-SH) bei einem pH-Wert von 6 bis 7. Die Reaktion läuft schnell ab und ist nicht reversibel. Dazu wurde die gewünschte Menge an HBsAg mit einer Konzentration von 2 mM Maleimido-PEO3-Biotin in PBS⁺⁺ bei einem pH-Wert von 6,3 in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 2 h bei RT leicht schüttelnd inkubiert.

Die freien Aminogruppen des HBsAg wurden mit Sulfosuccinimidyl-6-biotin (Sulfo-NHS) biotinyliert. Die chemische Gruppe N-hydroxysuccinimydyl (NHS) reagiert in wässriger Phase bei einem pH-Wert von 7 bis 8 mit primären Aminen (-NH₂) und sekundären Aminen (=NH). Die Reaktion läuft schnell ab und ist nicht reversibel. Hierzu wurde die gewünschte Menge HBsAg in PBS⁺⁺ mit pH 8 mit einer Konzentration von 2 mM Sulfosuccinimidyl-6-biotin bei RT für 30 min leicht schüttelnd inkubiert.

3.7 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (nach Laemmli, 1970) dient zur Auftrennung und Größenbestimmung von Proteinen. Die zu analysierenden Proteine werden durch die Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat), das Reduktionsmittel DTT (Dithiothreitol) und hohe Temperaturen denaturiert. Dadurch ist gewährleistet, dass das Laufverhalten nicht durch die Tertiärstruktur der Proteine beeinflusst wird. Ein SDS-Anion bindet zwei Aminosäurereste, so dass ein Komplex aus Protein und SDS entsteht, der stark negativ geladen ist. Diese negative Ladung ist zu der Masse des Proteins ungefähr proportional. Schließt man das Gel an eine Stromquelle an, wandert der negativ geladene SDS-Protein-Komplex zum Pluspol, wobei die Proteine sich in der siebartigen Struktur der Polyacrylamidmatrix ihrem Molekulargewicht entsprechend

auftrennen. Mit Hilfe eines Größenmarkers kann das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine bestimmt werden.

Die Elektrophorese wurde in XCell SureLock™ Mini Cell Kammern und fertigen NuPAGE™ 12 % Bis-Tris Gelen (Fa. Invitrogen) durchgeführt. Das Gel wurde ausgepackt, der weiße Streifen am unteren Ende abgezogen und mit dH₂O abgespült. Danach wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und das Gel in die Kammer eingespannt und befestigt. Die vordere Hälfte der Kammer wurde mit 1 x MOPS-Puffer befüllt und 500 µl Antioxidans (Fa. Invitrogen) hinzugefügt. Jetzt wurde die Kammer vollständig mit MOPS-Puffer aufgefüllt und alle Taschen gespült. Anschließend wurde in jede Tasche 16 µl Probe gegeben. Die Ansätze setzten sich zusammen aus: 10 µl der Probe, 4 µl Lithiumdodecylsulfat (LDS), Probenpuffer (4 x) und 2 µl DTT (1 M). Als Marker diente der Proteinmarker Mark12 (Fa. Invitrogen). Jetzt wurde der Deckel auf die Kammer gesetzt und die Kabel an eine Spannungsquelle angeschlossen. Die Auftrennung erfolgte kontinuierlich bei 200 V und dauerte ungefähr 1 h.

3.8 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung ist eine hochempfindliche Methode, um Proteine nach einer elektrophoretischen Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel sichtbar zu machen. Durch die funktionellen Gruppen (Glu-, Asp- und Cys-Reste) der Proteine im Gel werden Silberionen gebunden und durch Zugabe von Formaldehyd zu metallischem Silber reduziert. Durch eine Änderung des pH-Wertes kann die Reaktion gestoppt werden. Diese Methode ist sehr empfindlich, da schon 0,1 ng eines Proteins eine sichtbare Bande im Gel ergibt. Nach der SDS-Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig aus der Apparatur geholt und ü. N. in ca. 100 ml 50 % Methanol / dH₂O fixiert. Am nächsten Tag wurde es für 15 min mit dH₂O gewaschen, wobei das Wasser mehrmals gewechselt wurde. Danach wurde das Gel 20 min bei RT in der Silbernitratlösung auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das Gel 15 min in dH₂O gewaschen, wobei das Wasser ebenfalls mehrmals gewechselt wurde. Als nächstes wurde das Gel solange in Reducer geschwenkt, bis die gewünschte Bandstärke erreicht war. Zum Schluß wurde das Gel 5 min in Fixierer geschwenkt. Dann wurde das Gel eingescannt und elektronisch dokumentiert.

3.9 Detektion von Proteinen mittels Western Blot und Chemilumineszenz

Die Chemilumineszenz-Detektion von Proteinen im Western Blot ist wegen ihrer Sensitivität die am meisten verwendete Methode. Sie beruht auf einer enzymatischen Reaktion, welche Licht produziert, das dann detektiert und dokumentiert werden kann. Die durch das Enzym produzierte Lichtintensität verändert sich mit der Zeit. Daher müssen die Aufnahmen an einem optimierten Zeitpunkt stattfinden.

Beim Western Blot werden die negativ geladenen Proteine elektrophoretisch vom SDS-Gel auf eine Membran transferiert. Die Inkubation mit spezifischen Antikörpern ermöglicht den Nachweis und die Charakterisierung der Proteine. Bevor jedoch die Membran mit den Antikörpern inkubiert wird, werden freie Proteinbindungsstellen mit einer Blocklösung abgesättigt. Bei der Detektion gibt es 2 unterschiedliche Methoden. Bei der ersten Möglichkeit ist der Primärantikörper, welcher gegen das gesuchte Protein gerichtet ist, mit einer Alkalischen Phosphatase (AP) konjugiert, welche einen direkten Nachweis des gesuchten Proteins ermöglicht. Bei der zweiten Methode gibt man einen Primärantikörper, der gegen das Zielprotein gerichtet ist, auf die Membran, danach einen Sekundärantikörper, welcher mit einer Alkalischen Phosphatase konjugiert ist und den ersten Antikörper detektiert. Durch Zugabe eines Substrats welches von dem Enzym zu einem farbigen Produkt umgesetzt wird, werden die Proteine visualisiert. Bei der Chemilumineszenz katalysiert das Enzym eine Lichtreaktion, die auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wird.

Vor dem Proteintransfer wurde die PVDF-Transfer Membran (Biotrace™, Fa. Pall) für jeweils 15 min in Methanol inkubiert und anschließend mit 1 x Transferpuffer equilibriert. Es folgte der Aufbau der Blot-Apparatur, die sich wie folgt zusammensetzte: 2 Schwämmchen, 2 Filterpapiere, das SDS-Gel, die PVDF-Membran, 2 Filterpapiere und 2 Schwämmchen. Die Schwämmchen und Filterpapiere wurden zuvor 1 x mit Transferpuffer durchfeuchtet. Der Aufbau wurde so in der Blot-Kammer positioniert, dass der Stromfluss von der Kathode (Minus-Pol) zur Anode (Plus-Pol) gerichtet war. Nach dem Zusammenbau der Kammer wurde in den inneren Bereich 1 x Transferpuffer und in den äußeren Bereich dH₂O gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 250 mA für 1 h und 30 min durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran in 50 ml Blocking Puffer gelegt

und ü. N. bei 4 °C geblockt. Nach dem Blocken wurde die Membran 2 x für 5 min in dH₂O gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper in 20 ml 0,1 % FKS / TNE in einer kleinen Schale für 1 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln. Nicht gebundene Antikörper wurden nach der Antikörperinkubation nach folgendem Schema mit mindestens 150 ml der Lösungen abgewaschen: 1 x 5 min mit PBS, 3 x 5 min mit Blot Waschpuffer und noch 1 x 5 min mit PBS. Anschließend folgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper, an den eine Alkalische-Phosphatase gebunden ist, in 20 ml 0,1 % FKS / TNE in einer kleinen Schüssel für 1 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln. Danach wurde wieder 5 x 5 min nach dem vorhergehenden Schema gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Membran mit 1 ml Chemilumineszenz-Substrat (Fa. Millipore) in Folie eingeschweißt und für 2 min zusammen inkubiert. Dann wurde die Folie aufgeschnitten und das Substrat durch leichtes darüber Streichen mit einer Glaspipette entfernt und die Folie wieder verschlossen. Das Signal wurde in der Dunkelkammer auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.10 Detektion von Proteinen mittels Western Blot und dem ODYSSEY® Infrared Imaging System

3.10.1 Prinzip des LI-COR ODYSSEY® Infrared Imaging System (Fluoreszenz Scanner)

Die Fluoreszenz-Detektion von Proteinen im Western Blot ist eine relativ neue Methode. Bei ihr wird ein Fluoreszenzfarbstoff, der an einen Antikörper oder an ein anderes Detektionsmolekül gebunden ist, mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt und die Fluoreszenz detektiert. Bei dieser Fluoreszenz Detektion bleibt das Licht, welches durch die Excitation des Fluoreszenzfarbstoffes abgegeben wird, konstant. Dadurch können die Unterschiede in der Fluoreszenz zwei verschiedener Proben präzise gemessen werden. Proteine können akkurat quantifiziert werden, da die Signale, welche durch die unterschiedlichen Mengen an Protein auf der Membran entstehen, sich nicht verändern.

3.10.2 Ein-Farben-Detektion mittels Western Blot und dem LI-COR ODYSSEY® Infrared Imaging System

Beim Western Blot, welcher die Proteine mittels Infrarot-Fluoreszenz detektiert, werden diese ebenfalls elektrophoretisch von einem SDS-Gel auf eine Membran transferiert. Die Membran wird anschließend geblockt, um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen. Daran schließt sich die Antikörperinkubation an. Hier gibt es zwei unterschiedliche Methoden. Bei der ersten Möglichkeit ist der Primärantikörper, welcher gegen das gesuchte Protein gerichtet ist, mit einem Infrarot-Farbstoff konjugiert. Dies ermöglicht einen direkten Nachweis des gesuchten Proteins. Bei der zweiten Methode gibt man einen Primärantikörper, der gegen das Protein gerichtet ist, auf die Membran. Dann einen Sekundärantikörper, welcher mit einem Infrarot-Farbstoff konjugiert ist und den Primärantikörper erkennt. Diese Antikörper können durch Anregung mit unterschiedlichen Wellenlängen sichtbar gemacht und mit Hilfe des LI-COR ODYSSEY® Fluoreszenz Scanners dokumentiert und quantifiziert werden.

Vor dem Proteintransfer wurde die PVDF-Transfer Membran (IMMOBILON-FL, Fa. Millipore) für jeweils 15 min in Methanol inkubiert und anschließend mit 1 x Transferpuffer equilibriert. Es folgte der Aufbau der Blot-Apparatur, die sich wie folgt zusammensetzte: 2 Schwämmchen, 2 Filterpapiere, das SDS-Gel, die PVDF-Membran, 2 Filterpapiere und 2 Schwämmchen. Die Schwämmchen und Filterpapiere wurden zuvor 1 x mit Transferpuffer durchfeuchtet. Der Aufbau wurde so in der Blot-Kammer positioniert, dass der Stromfluss von der Kathode (Minus-Pol) zur Anode (Plus-Pol) gerichtet war. Nach dem Zusammenbau der Kammer wurde in den inneren Bereich 1 x Transferpuffer und in den äußeren dH₂O gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 250 mA für 1 h und 30 min durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran in 50 ml ODYSSEY® Blocking Buffer/PBS gelegt und ü. N. bei 4 °C geblockt. Nach dem Blocken wurde die Membran 2 x für 5 min in dH₂O gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper in 20 ml 0,1 % FKS / 0,1 % TWEEN / TNE in einer kleinen Schale für 1 h bei RT im Dunkeln unter leichtem Schütteln. Nicht gebundene Antikörper wurden nach der Antikörperinkubation ebenfalls im Dunkeln nach folgendem Schema mit mindestens 150 ml der Lösungen abgewaschen: 1 x 5 min mit PBS, 3 x 5 min mit Blot Waschpuffer und noch 1 x 5 min mit PBS.

Anschließend wurde das Signal mittels dem LI-COR ODYSSEY® Fluoreszenz Scanner dokumentiert und quantifiziert.

3.10.3 Zwei-Farben-Detektion mittels Western Blot und LI-COR ODYSSEY® Infrared Imaging System

Zwei unterschiedliche Proteine können gleichzeitig auf demselben Blot detektiert werden, indem man Antikörper verwendet, welche mit Infrarot-Farbstoffen konjugiert sind, die in verschiedenen Fluoreszenzkanälen sichtbar gemacht werden. Bei der Auswahl der Primärantikörper ist darauf zu achten, dass sie aus unterschiedlichen Wirtsspezies stammen, damit sie von den Sekundärantikörpern, die ebenfalls unterschiedliche Spezifitäten aufweisen, auseinander gehalten werden können.

Der Blot wird genauso durchgeführt wie in Punkt 3.10.2 beschrieben. Nach der Inkubation mit zwei unterschiedlichen Primärantikörpern und dem anschließenden Waschen wird die Blotmembran mit den zwei unterschiedlichen Sekundärantikörpern, welche mit verschiedenen Infrarot-Farbstoffen konjugiert sind, inkubiert. Die Inkubation erfolgt in 20 ml 0,1 % FKS / 0,1 % TWEEN / TNE in einer kleinen Schale für 1 h bei RT im Dunkeln unter leichtem Schütteln. Nicht gebundene Antikörper wurden nach der Antikörperinkubation ebenfalls im Dunkeln nach folgendem Schema mit mindestens 150 ml der Lösungen abgewaschen: 1 x 5 min mit PBS, 3 x 5 min mit Blot Waschpuffer und noch 1 x 5 min mit PBS. Anschließend wurde das Signal mittels dem LI-COR ODYSSEY® Fluoreszenz Scanner dokumentiert und quantifiziert.

3.11 Quantifizierung der Anteile von freien Sulfhydrylgruppen und Disulfidbrücken in der HBs-Antigenschleife von HBV mittels dem LI-COR ODYSSEY® Infrared Imaging System

3.11.1 Erstellung der Standardreihe des biotinylierten BSA zur Quantifizierung

Zur Quantifizierung wurde eine Standardreihe von biotinyliertem BSA (Fa. Sigma) mit 16; 8; 4; 2; 1 und 0,5 ng pro 5 µl verwendet. Diese Proben wurden im SDS Gel aufgetragen, auf eine PVDF Membran durch Blotten übertragen und mit Streptavidin CW800 sichtbar gemacht. An 1 mol BSA sind im Mittel 12 mol Biotin gekoppelt. Das BSA hat eine Größe von 66,43 kDa. Die

gemessene Fluoreszenz der Proben wird von dem ODYSSEY® Fluoreszenz Scanner als Messwert (integrierte Intensität) angegeben. Zuerst wurde der Biotinylierungsgrad der Proben berechnet, um eine Standardreihe erstellen zu können. Dazu wurde mit den Angaben per Dreisatz berechnet, wieviel fmol BSA Moleküle in den einzelnen Verdünnungen der Standardreihe waren. Der berechnete Wert wurde mit 12 multipliziert, um die Menge an fmol Biotin in den einzelnen Verdünnungen der Standardreihe zu erhalten. Die integrierte Intensität wurde gegen die Menge an fmol Biotin der jeweiligen Verdünnungen in einem Diagramm aufgetragen und eine Standardreihe erstellt, aus der die unbekanntes Werte berechnet werden konnten.

3.11.2 Quantifizierung der freien Sulfhydrylgruppen in der HBs-Antigenschleife von HBV

Zur Bestimmung der freien Sulfhydrylgruppen wurde eine filamentreiche HBsAg Fraktion von Genotyp D (ID326) in den Konzentrationen 63; 32; 16 und 8 ng pro 5 µl mit Maleimido-PEO3 biotinyliert, dann in einem SDS Gel aufgetrennt, auf eine PVDF Membran geblottet, mit Streptavidin CW800 sichtbar gemacht und die integrierte Intensität gemessen. Anschließend wurde der Wert, dessen integrierte Intensität im linearen Bereich der Standardreihe des biotinyliertem BSA lag genommen, um die Anzahl der freien Sulfhydrylgruppen zu berechnen. Durch die Standardreihe konnte berechnet werden, wieviel fmol Biotin an die unbekanntes Probe gebunden hatte. Da das SHBs, welches für die Quantifizierung wichtig war, nur ca. 54 % des Gesamtproteingehalts der HBV Oberflächenproteine ausmacht, wurde vorher noch durch Dreisatz berechnet, wie viel ng SHBs die zu quantifizierende Probe enthält. Mit diesem Wert wurde weiter gerechnet. Anschließend wurde per Dreisatz, ausgehend von einem Molekulargewicht von 25,5 kDa für das SHBs, berechnet, wieviel pmol SHBs im Ansatz waren. Nun konnte man das durch die Standardreihe errechnete pmol gebundenes Biotin durch die berechnete pmol SHBs dividieren und erhielt die Anzahl der biotinylierten, also freien, Sulfhydrylgruppen.

3.11.3 Quantifizierung der Disulfidbrücken in der HBs-Antigenschleife von HBV

Zur Bestimmung der Anzahl der Sulfhydrylgruppen, welche durch Disulfidbrücken verbunden sind, wurde eine filamentreiche Fraktion von HBsAg Genotyp D (ID326) in den Konzentrationen 63; 32; 16 und 8 ng pro 5 µl mit TCEP reduziert und anschließend mit Maleimido-PEO3 biotinyliert, dann in einem SDS Gel aufgetrennt, auf eine PVDF Membran geblottet, mit Streptavidin CW800 sichtbar gemacht und die Intensität gemessen. Anschließend wurde der Wert, dessen Intensität im linearen Bereich der Standardreihe des biotinyliertem BSA lag, genommen, um die Anzahl der freien Sulfhydrylgruppen des SHBs zu berechnen. Durch die Standardreihe konnte berechnet werden, wieviel fmol Biotin an die unbekanntes Probe gebunden hatte.

Die Berechnung der freien Sulfhydrylgruppen nach Reduktion erfolgte nach dem gleichen Schema, welches in Punkt 3.11.2 beschrieben wurde. Durch einen Vergleich der freien Sulfhydrylgruppen mit und ohne Reduktion konnte man schließen, wieviele Sulfhydrylgruppen durch Disulfidbrücken verbunden waren.

3.12 Biotinylierung von HBV

Die freien Cysteinreste des mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Virus eines chronisch asymptomatischen HBV Trägers (Genotyp D) mit der internen Identifikationsnummer 326 des Instituts für Medizinische Virologie der Universität Gießen wurde mit Maleimido-PEO3-Biotin biotinyliert.

Dazu wurden 2 µl Viruspräparation mit einer Konzentration von 2 mM Maleimido-PEO3-Biotin in PBS⁺⁺ bei einem pH-Wert von 6,3 in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 2 h leicht schüttelnd inkubiert.

3.12.1 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation von biotinyliertem HBV

Um die Eigenschaften von biotinyliertem und unbehandeltem HBV zu vergleichen, wurde eine Zentrifugation durch einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten durchgeführt.

Es wurde ein Gradient mit dem unbehandelten und ein Gradient mit dem biotinylierten HBV gefahren. Die Gradienten bestanden aus folgenden Sucrose-Konzentrationen: 1 ml 60 % + 10 % KBr, 1 ml 60 %, 1 ml 50 %, 2 ml 40 %, 1 ml 30 %, 1,5 ml 20 %, 1,5 ml 10 % und 1 ml 5 % Saccharose (w/w) und wurden in silikonisierten SW41 Röhrchen geschichtet. Darauf wurden jeweils 50 µl der Proben gegeben und mit staubfreiem TNE aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgte für 6 h bei 10 °C und 30.000 rpm in einem SW 41 Schwingbecherrotor. Der durch die Zentrifugation entstandene Gradient wurde in 1 ml Fraktionen ausgetropft. Dazu wurde eine Stahlkanüle vorsichtig von oben bis zum Becherboden in den Gradienten eingeführt. Dann wurde der Gradient von unten her mit einer Schlauchpumpe in 0,5 ml Fraktionen in silikonisierte Eppendorfgefäße ausgetropft. Von jeder Fraktion wurde die Saccharosedichte per Refraktometer bestimmt und eine Immunpräzipitation mit anschließender LightCycler PCR der X-Region von HBV durchgeführt.

3.12.2 Beschichtung der Dynabeads® M-270 Epoxy

Um per Immunpräzipitation das HBV detektieren zu können, wurden Dynabeads® M-270 Epoxy mit den entsprechenden Antikörpern beschichtet. Die Beads sind hydrophil und besitzen Glycidyl-Ether-Gruppen. Diese Oberfläche erlaubt eine direkte kovalente Bindung der Proteine über primäre Amino- oder Sulfhydrylgruppen. Eine weitere Aktivierung wird nicht benötigt. Die hydrophile Oberfläche und der neutrale pH der Beads minimiert nicht-spezifische Bindungen. Die Beschichtung der Beads erfolgt bei neutralem pH und unter Hochsalzbedingungen.

Zuerst wurden die Beads vorbereitet. Dazu wurden 3 mg (entspricht 1×10^9 Beads) in 200 µl 0,1 M PBS suspendiert, 30 sek. gevortext und anschließend 10 min auf dem Schüttler bei 60 % inkubiert. Danach wurde das Eppi 4 min auf den Magnetständer inkubiert, der Überstand vorsichtig abgenommen. Die Beads wurden in 200 µl 0,1 M PBS resuspendiert, in ein neues Eppi überführt und gevortext. Dann wurden sie erneut für 4 min auf dem Magnetständer inkubiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Beads in 60 µl 0,1 M PBS resuspendiert.

Nachfolgend wurden die Beads mit den gewünschten Antikörpern beschichtet. Die Antikörper müssen in einer Konzentration von 1 mg/ml vorliegen. Zu den

60 µl vorbereiteter Beads wurden 60 µl des gewünschten Antikörpers gegeben und durch vortexen gut gemischt. Anschließend wurden zu dem Ansatz 60 µl $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Endkonzentration 1 M) gegeben und gut gemischt, um die Bindung des Antikörpers an die Beads zu erhöhen. Die Beschichtung erfolgte über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler. Am nächsten Tag wurden die Ansätze für 4 min auf dem Magnetständer inkubiert und der Überstand abgenommen. Danach wurden die beschichteten Beads 1 x 10 min mit 1 ml 0,1 % TWEEN / PBS und 4 x 10 min mit 1 ml 1 % BSA / PBS gewaschen und jedesmal in ein neues Eppi überführt, um nicht kovalent gebundene Antikörper zu entfernen. Zum Schluß wurden die beschichteten Beads in 180 µl 1 % BSA / 0,02 % NaN_3 / PBS aufgenommen.

3.12.3 Immunpräzipitation mit beschichteten Dynabeads® M-270 Epoxy von biotinyliertem und nicht biotinyliertem HBV aus der Saccharose-Dichtgradientenzentrifugation

Um zu zeigen, dass eine Biotinylierung der Hepatitis B Viren stattgefunden hat, wurden die behandelten Viren mit NeutrAvidin, MA18/7 und BSA beschichteten Beads immunpräzipitiert, ebenso wie die nicht biotinylierten.

Pro Ansatz wurden 20 µl beschichtete Beads dem Eppendorfgefäß entnommen und 1 x mit 1 ml 1 % BSA / PBS gewaschen, um das NaN_3 von den Beads zu entfernen. Danach wurden pro Ansatz 20 µl beschichtete Beads, 10 µl der Probe und 170 µl 1 % BSA / PBS in einem Eppi für 1 h bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 3 x 10 min mit 1 % BSA / 1 % TWEEN / PBS und 3 x 10 min mit 1 % BSA / PBS gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Ansätze in neue Eppis überführt. Zum Schluß wurden die Proben mit dem High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Fa. Roche) aufgereinigt und eine real-time LightCycler PCR der X-Region von HBV DNA durchgeführt.

3.13 Infektionsversuch an primären *Tupaia* Hepatozyten mit zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Infektionsversuches reduzierten und biotinylierten Hepatitis B Viren

Die primären *Tupaia belangeri* Hepatozyten wurden wie beschrieben nach der modifizierten Zwei-Stufen-Kollagenase-Methode nach Seglen isoliert und auf 12 well Zellkulturplatten, die mit einer 1:20 Verdünnung von Matrigel

beschichtet waren, mit 10 % FKS / HGM ausgesät. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel mit 600 µl HGM durchgeführt und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am dritten Tag nach der Isolierung wurde der Infektionsversuch durchgeführt.

HBV vor Bindung an die Zellen behandelt:

Das HBV wurde in einem Eppi mit 2 mM TCEP für 15 min reduziert. In einem zweiten Eppi wurde das HBV mit 2 mM Maleimido-PEO3-Biotin für 2 h bei pH 6,3 biotinyliert. Im dritten Eppi wurde das HBV erst für 15 min reduziert und dann für 2 h bei pH 6,3 biotinyliert. Die Reaktionen wurden alle bei 16 °C durchgeführt. Dann wurde das HBV zum Binden für 4 h bei 16 °C auf den Zellen inkubiert. Danach wurde nicht gebundenes Virus mit Waschmedium von den Zellen gewaschen und die Zellen ü. N. mit 600 µl HGM bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, um eine Infektion durch gebundenes HBV zu ermöglichen.

Zellen vor Bindung von HBV behandelt:

Im ersten Ansatz wurden die primären *Tupaia* Hepatozyten mit 2 mM TCEP für 15 min reduziert. Im zweiten wurden sie mit 2 mM Maleimido-PEO3-Biotin bei pH 6,3 für 2 h biotinyliert. Im dritten Ansatz wurden die Zellen zuerst für 15 min reduziert und dann für 2 h bei pH 6,3 biotinyliert. Danach wurden die Hepatozyten einmal mit Waschmedium gewaschen und das HBV zum Binden für 4 h bei 16 °C zu den Zellen gegeben. Nach der Inkubation wurde nicht gebundenes Virus mit Waschmedium von den Zellen gewaschen und die Zellen ü. N. mit 600 µl HGM bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, um eine Infektion durch gebundenes HBV zu ermöglichen.

HBV nach Bindung zusammen mit Zellen behandelt:

Das HBV wurde für 4 h bei 16 °C in PBS⁺⁺ auf die Hepatozyten gegeben, um eine Bindung zu erlauben. Danach wurde nicht gebundenes HBV mit Waschmedium entfernt. Anschließend wurden die Zellen in einem Ansatz für 15 min mit 2 mM TCEP reduziert. Im zweiten Ansatz für 2 h mit 2 mM Maleimido-PEO3-Biotin bei pH 6,3 biotinyliert und im letzten Ansatz erst für 15 min reduziert und anschließend für 2 h bei pH 6,3 biotinyliert. Danach

wurden die Hepatozyten einmal mit Waschmedium gewaschen und mit 600 µl HGM ü. N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, um eine Infektion des gebundenen HBV zu erlauben.

Am nächsten Tag (T1) wurde bei allen Ansätzen das Medium mit 600 µl HGM gewechselt, genau wie an den Tagen 4, 7, 11 und 15. Am letzten Tag wurden die Zellen wie beschrieben einem Zellviabilitäts Test unterzogen. In den gesammelten Überständen wurden die Virusproteine HBsAg und HBeAg bestimmt.

3.14 Infektionsversuch von primären *Tupaia* Hepatozyten unter dem Einfluss der Protein-Disulfid-Isomerase vor, während und nach der Bindung von HBV

Die primären *Tupaia belangeri* Hepatozyten wurden wie beschrieben nach der modifizierten Zwei-Stufen-Kollagenase-Methode nach Seglen isoliert und auf 12 well Zellkulturplatten, die mit einer 1:20 Verdünnung von Matrigel beschichtet waren, mit 10 % FKS / HGM ausgesät. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel mit 600 µl HGM durchgeführt und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am dritten Tag nach der Isolierung wurde der Infektionsversuch durchgeführt.

Die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) wurde in einer Titrationsreihe mit 1000 ng, 500 ng, 250 ng und 125 ng / 300 µl im Versuch eingesetzt.

Zugabe der PDI vor Bindung von HBV

Das HGM wurde von den Hepatozyten genommen, die PDI Verdünnungen in die entsprechenden wells gegeben und die Platte 4 h bei 16 °C inkubiert. Danach wurden die PDI Verdünnungen abgenommen und die vorbereiteten HBV Verdünnungen auf die Zellen gegeben. Nun wurde wieder für 4 h bei 16 °C inkubiert, um eine Bindung, aber keine Aufnahme des HBV zu erreichen. Nach der Inkubation wurde das Inokulum mit dem HBV abgenommen und die Zellen 1 x mit Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundenes HBV zu entfernen. Anschließend wurde in jedes well 600 µl HGM gegeben und die Zellen ü. N. bei 37 °C inkubiert, damit gebundene Hepatitis B Viren infizieren konnten.

Zugabe der PDI während Bindung von HBV

Die PDI Verdünnung wurde zusammen mit der HBV Verdünnung und dem Glutathion (GSH) im Eppi für 4 h bei 16 °C inkubiert. Das GSH wurde bei diesem Ansatz in das Eppi zugefügt, weil man das entsprechende reduzierende Umgebungsmillieu für die PDI herstellen wollte. Bei den Versuchsteilen vor und nach wurde die PDI direkt auf die Hepatozyten gegeben, welche ein natürliches reduzierendes Millieu aufweisen. Dies sollte bei dem Versuchsteil „während Bindung“ durch das GSH im Eppi nachgestellt werden. Als Kontrolle wurde das GSH auch alleine mit dem HBV für 4 h bei 16 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das HGM von den Hepatozyten genommen und die Ansätze auf die Zellen gegeben. Es folgte für 4 h bei 16 °C eine Bindung von HBV. Danach wurden die Inokula abgenommen und die Zellen 1 x mit Waschmedium gewaschen, um nicht gebundenes HBV zu entfernen. Anschließend wurde 600 µl HGM auf die Zellen gegeben und ü. N. bei 37 °C inkubiert, um eine Infektion zu erlauben.

Zugabe der PDI nach Bindung von HBV

Das HGM wurde von den Hepatozyten genommen und durch die HBV Verdünnungen ersetzt. Es folgte eine Bindung von HBV für 4 h bei 16 °C. Danach wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen 1 x mit Waschmedium gewaschen, um nicht gebundenes HBV zu entfernen. Dann wurden die PDI Verdünnungen auf die Hepatozyten gegeben und für 4 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde die PDI Verdünnung von den Zellen genommen, durch 600 µl HGM ersetzt und die Zellen ü. N. bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag (T1) wurde bei allen Ansätzen das Medium mit 600 µl HGM gewechselt, genau wie an den Tagen 4, 7, 11 und 15. Am letzten Tag wurden die Zellen wie beschrieben einem Zellviabilitäts Test unterzogen. In den gesammelten Überständen wurde das HBsAg bestimmt.

3.15 Infektion primärer *Tupaia* Hepatozyten mit HBV nach Behandlung mit reduziertem, oxidiertem Glutathion und TCEP

Die primären *Tupaia belangeri* Hepatozyten wurden wie beschrieben nach der modifizierten Zwei-Stufen-Kollagenase-Methode nach Seglen isoliert und auf 12 well Zellkulturplatten, die mit einer 1:20 Verdünnung von Matrigel

beschichtet waren, mit 10 % FKS / HGM ausgesät. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel mit 600 µl HGM durchgeführt und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am dritten Tag nach der Isolierung wurde der Infektionsversuch durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien waren reduziertes L-Glutathion (GSH), oxidiertes L-Glutathion (GSSG) und TCEP. Alle drei wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 10 mM, 1 mM, 0,1 mM, 0,01 mM. Die Stammlösungen wurden in HBSS⁺⁺ angesetzt und der pH-Wert von reduziertem und oxidiertem Glutathion wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt und die Lösungen sterilfiltriert.

Das HBV wurde zusammen mit den entsprechenden Konzentrationen in einem Gesamtansatz von 20 µl für 1 h bei RT schüttelnd inkubiert. Danach wurde das Medium von den Zellen genommen und pro well 300 µl HBSS⁺⁺ vorgelegt. Anschließend wurden jeweils 10 µl vorbehandelte Virusverdünnung pro well hinein pipettiert. Dann wurden die Platten 4 h bei 16 °C inkubiert, um eine Bindung, aber keine Aufnahme des HBV zu gewährleisten. Danach wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen 1 x mit Waschmedium gewaschen. Schließlich wurden 600 µl HGM in die Platten gegeben und die Zellen ü. N. bei 37 °C inkubiert, um eine Infektion zu erlauben. Am nächsten Tag wurde das Medium erneut gewechselt sowie an den Tagen 4, 7, 11 und 15. Am letzten Tag wurden die Zellen wie beschrieben einem Zellviabilitäts Test unterzogen. In den gesammelten Überständen wurde das HBsAg bestimmt.

3.16 Infektion primärer *Tupaia* Hepatozyten mit in verschiedenen Konzentrationen biotinyliertem und reduziertem HBV

Die primären *Tupaia belangeri* Hepatozyten wurden wie beschrieben nach der modifizierten Zwei-Stufen-Kollagenase-Methode nach Seglen isoliert und auf 12 well Zellkulturplatten, die mit einer 1:20 Verdünnung von Matrigel beschichtet waren, mit 10 % FKS / HGM ausgesät. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel mit 600 µl HGM durchgeführt und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am dritten Tag nach der Isolierung wurde der Infektionsversuch durchgeführt.

Die verwendeten Reagenzien waren TCEP, Sulfosuccinimidyl-6-biotin (Sulfo-NHS) und Maleimido-PEO3-Biotin (Maleimid). Alle drei wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 2 mM, 0,2 mM, 0,02 mM, 0,002 mM. Die

Stocklösungen wurden in PBS⁺⁺ mit den entsprechenden pH-Werten angesetzt (Sulfo-NHS: pH 8 und Maleimid: pH 6,3). Zuerst wurden die Viren in einem 25 µl Ansatz mit den unterschiedlichen Konzentrationen bei 16 °C inkubiert (TCEP: 15 min, Sulfo-NHS: 30 min und Maleimid: 2 h). Anschließend wurde zu den Ansätzen 10 % Rabbit Serum gegeben und die Ansätze über die illustra™ MicroSpin™ S-400 HR Columns (Fa. GE Healthcare) von den überschüssigen Reagenzien gereinigt. Bei diesem System gehen durch die Abtrennung über die Silica Säulchen die Hälfte des HBV verloren. Deswegen wurde die doppelte Menge an HBV in diesem Versuch eingesetzt.

Danach wurde das Medium von den Hepatozyten genommen, jeweils 300 µl PBS⁺⁺ in die wells vorgelegt und die entsprechende Menge Virusverdünnung hinein pipettiert. Nun wurden die Platten 4 h bei 16 °C inkubiert, um eine Bindung, aber keine Aufnahme von HBV zu gewährleisten. Danach wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen 1 x mit Waschmedium gewaschen. Schließlich wurden 600 µl HGM in die Platten gegeben und die Zellen ü. N. bei 37 °C inkubiert, um eine Infektion zu erlauben. Am nächsten Tag wurde das Medium erneut gewechselt sowie an den Tagen 4, 7, 11 und 15. Am letzten Tag wurden die Zellen wie beschrieben einem Zellviabilitäts Test unterzogen. In den gesammelten Überständen wurde das HBsAg bestimmt.

3.17 Biotinylierung und Reduzierung der Zelloberfläche von primären *Tupaia belangeri* Hepatozyten

Die Biotinylierungssubstanzen Maleimido-PEO3-Biotin für Sulfhydrylgruppen und Sulfosuccinimidyl-6-biotin für Aminogruppen biotinylieren nur die Oberflächenproteine der primären Hepatozyten. Sie können nicht in die Zellen hinein diffundieren.

Um die Oberflächenproteine der primären Hepatozyten zu biotinylieren, wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS⁺⁺ mit dem für die Biotinylierung entsprechenden pH-Wert gewaschen (Sulfo-NHS: pH 8 und Maleimid: pH 6,3). Danach wurden pro well 400 µl Biotinylierungslösung hinein gegeben und die Zellen mit Maleimid für 2 h und mit Sulfo-NHS für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Lösungen abgenommen und die Zellen 1 x mit dem entsprechenden PBS⁺⁺ gewaschen um, überschüssige Biotinylierungsreagenzien zu entfernen.

Zur Reduktion der Zelloberfläche wurde TCEP verwendet. Die Zellen wurden einmal mit PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend mit 400 µl TCEP mit einer Konzentration von 2 mM für 15 min inkubiert. Danach wurde die Lösung abgenommen und die Zellen einmal mit PBS⁺⁺ gewaschen.

3.17.1 Infektion mit in verschiedenen Konzentrationen biotinylierter und reduzierter primärer *Tupaia* Hepatozyten mit HBV

Die primären *Tupaia belangeri* Hepatozyten wurden wie beschrieben nach der modifizierten Zwei-Stufen-Kollagenase-Methode nach Seglen isoliert und auf 12 well Zellkulturplatten, die mit einer 1:20 Verdünnung von Matrigel beschichtet waren, mit 10 % FKS / HGM ausgesät. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel mit 600 µl HGM durchgeführt und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am dritten Tag nach der Isolierung wurde der Infektionsversuch durchgeführt.

Die verwendeten Reagenzien waren TCEP, Sulfo-NHS und Maleimid. Alle drei wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 2 mM, 0,2 mM, 0,02 mM, 0,002 mM. Die Stocklösungen wurden in PBS⁺⁺ mit den für die Reagenzien entsprechenden pH-Werten angesetzt (Sulfo-NHS: pH 8 und Maleimid: pH 6,3). Das Medium wurde von den Zellen genommen, jeweils 300 µl der entsprechenden Verdünnung auf die Hepatozyten gegeben und bei 16 °C inkubiert (TCEP: 15 min, Sulfo-NHS: 30 min und Maleimid: 2 h). Anschließend wurden die Reagenzienverdünnungen abgenommen und die Zellen 1 x mit Waschmedium gewaschen. Dann wurden 300 µl PBS⁺⁺ in die Vertiefungen vorgelegt und 10 µl Virusverdünnung dazu pipettiert. Nun wurden die Platten 4 h bei 16 °C inkubiert, um eine Bindung, aber keine Aufnahme von HBV zu erlauben. Danach wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen 1 x mit Waschmedium gewaschen. Schließlich wurden 600 µl HGM in die Platten gegeben und die Zellen ü. N. bei 37 °C inkubiert, um eine Infektion zu erlauben. Am nächsten Tag wurde das Medium erneut gewechselt sowie an den Tagen 4, 7, 11 und 15. Am letzten Tag wurden die Zellen wie beschrieben einem Zellviabilitäts Test unterzogen. In den gesammelten Überständen wurde das HBsAg bestimmt.

3.17.2 Kinetik der HBV Infektion von biotinylierten primären *Tupaia* Hepatozyten

Die primären *Tupaia belangeri* Hepatozyten wurden wie beschrieben nach der modifizierten Zwei-Stufen-Kollagenase-Methode nach Seglen isoliert und auf 12 well Zellkulturplatten, die mit einer 1:20 Verdünnung von Matrigel beschichtet waren, mit 10 % FKS / HGM ausgesät. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel mit 600 µl HGM durchgeführt und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am dritten Tag nach der Isolierung wurde die Kinetik des Infektionsversuches an biotinylierten *Tupaia* Hepatozyten durchgeführt.

Das HGM wurde abgenommen und die Zellen 1 x mit PBS⁺⁺ mit pH 8 gewaschen. Dann wurden die primären Hepatozyten mit 400 µl 5 mM Sulfo-NHS biotinyliert. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 16 °C, damit der biotinylierte Rezeptor nicht endozytiert werden konnte. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und die Zellen auf Eis einmal mit PBS⁺⁺ mit pH 8 gewaschen. Danach wurden 300 µl HGM auf die Zellen gegeben. Jetzt wurden an definierten Zeitpunkten die Zellen mit 20 µl Virusverdünnung infiziert und 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der zweistündigen Inkubationszeit wurden 100 mM des Peptid 2 bis 48 myr zu den Ansätzen pipettiert, um zu verhindern, dass noch nicht gebundene Hepatitis B Viren noch infizieren konnten. Danach wurden die Ansätze ü. N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Inokulum abgenommen und durch 600 µl frisches HGM ersetzt. An den Tagen 3, 6, 10 und 14 wurde ebenfalls ein Mediumwechsel mit 600 µl HGM durchgeführt. Die Medienwechsel fanden ebenfalls wie der Infektionsversuch zeitversetzt statt. Am letzten Tag wurden die Zellen wie beschrieben einem Zellviabilitäts Test unterzogen. In den gesammelten Überständen wurde mittels Sandwich-ELISA das HBsAg bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Kinetik der Infektion von primären *Tupaia* Hepatozyten mit HBV auf unterschiedlichen Zellkulturbeschichtungen

Zu Anfang der Doktorarbeit sollte zuerst der zeitliche Verlauf einer HBV Infektion in der PTH-Kultur untersucht werden. Zum einen sollten die am frühesten auftretenden Marker einer HBV Infektion identifiziert werden und zum anderen sollte getestet werden, welche Zellkulturbeschichtung für eine Infektion am besten geeignet ist.

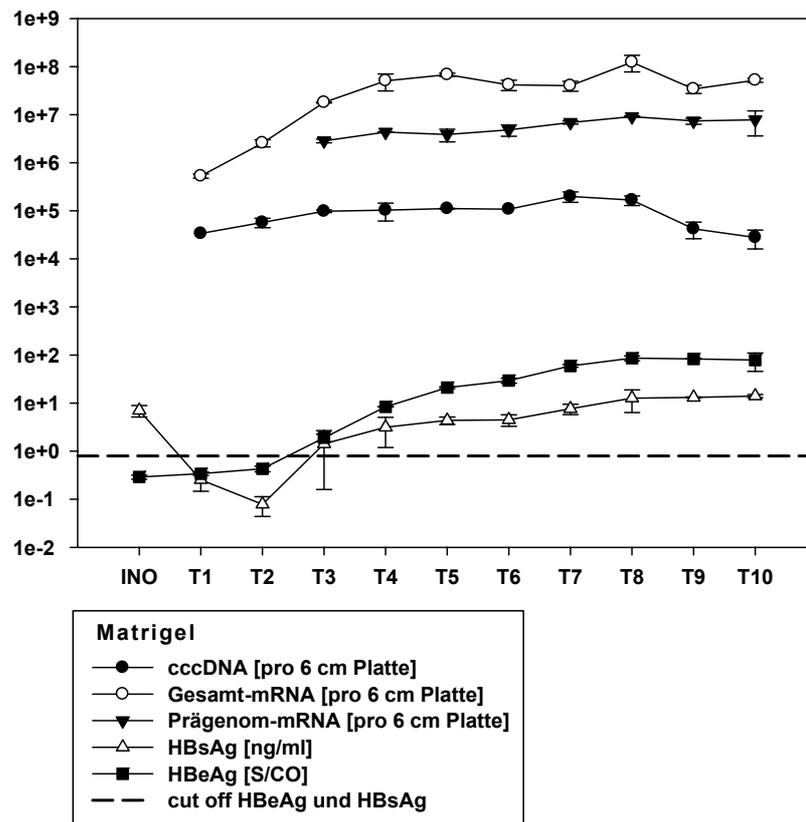
Dazu wurden primäre *Tupaia belangeri* Hepatozyten isoliert und auf 6 cm Zellkulturschalen, die entweder mit Kollagen Typ I (0,8 mg/ml) oder einer 1:20 Verdünnung von Matrigel™ Basement Membrane Matrix beschichtet waren; ausgesät. An Tag 3 (T3) nach der Isolierung wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 1×10^9 GE/ml HBV für 8 h bei 37 °C im Brutschrank infiziert. Außerdem wurden noch Platten mit HBV infiziert, die gleichzeitig mit dem reverse Transkriptase-Inhibitor Lamivudin behandelt wurden. Am selben Tag wurde das Inokulum der Zellen gesammelt sowie jeweils an den Tagen 1 bis 10 der Überstand. Bei den Platten, die mit Lamivudin behandelt wurden, wurde bei jedem Mediumwechsel frisches Lamivudin dem Medium zugesetzt. Außerdem wurden von je zwei Platten, die mit Kollagen bzw. Matrigel beschichtet waren, die cccDNA und mRNA isoliert. Am Ende des Infektionsversuches wurde der Gehalt an cccDNA, Gesamt- und Prägenom mRNA mittels LightCycler PCR sowie HBsAg und HBeAg per ELISA für jeden Tag bestimmt. Die Produktion von neusynthetisiertem HBV wurde ebenfalls durch eine LightCycler PCR ermittelt. Bei den Lamivudin-behandelten Platten konnte die cccDNA und die mRNA nur an Tag 10 isoliert werden.

Bei den Hepatozyten, die auf Matrigel kultiviert wurden, konnten als erste Marker einer etablierten Infektion an T1 die cccDNA und die Gesamt-mRNA nachgewiesen werden (Diagr. 1a). An T3 war die Prägenom-mRNA sowie das HBsAg und HBeAg detektierbar (Diagr. 1a). Die cccDNA von Hepatozyten auf Matrigel steigt von Tag 1 bis Tag 6 langsam an, mit der höchsten Menge an Tag 7 und 8. Danach fällt sie wieder auf die Anfangswerte ab. Die Gesamt-mRNA steigt bis T5 an und bleibt dann mit einer Ausnahme an T8 konstant (Diagr 1a). Die Prägenom-mRNA wurde auf einem konstanten Level exprimiert,

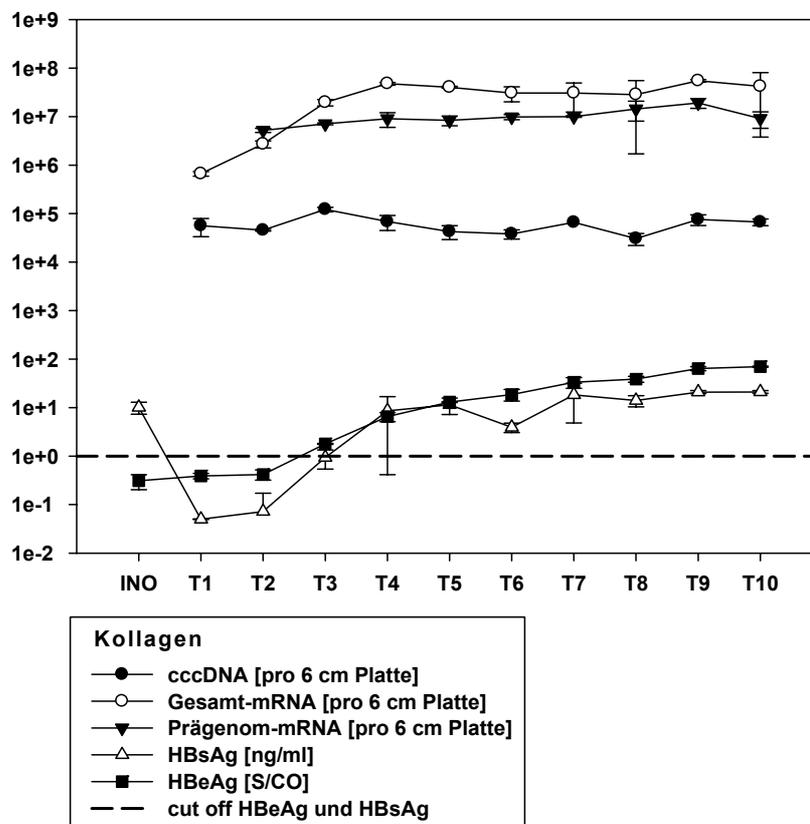
wobei die Menge eine Zehnerpotenz geringer als die Gesamt-mRNA war. Die HBsAg-Werte des Inokulums waren positiv, da das SHBs, welches in diesem ELISA nachgewiesen wurde, das häufigste Hüllprotein von HBV ist und erst im Laufe des Infektionsversuches gewaschen wird, sofern es nicht gebunden hat (Diagr. 1a). Ab T2 steigt die Kurve wieder und die Neusynthese von HBsAg setzt ein, welches dann an T3 nachweisbar ist. Die HBeAg Werte des Inokulats waren negativ, da HBeAg nicht Bestandteil des gereinigten HBV ist und somit im gereinigten Virus nicht vorkommt. Es wurde erst im Lauf der Infektion neu gebildet (Diagr. 1a). HBeAg konnte ab T3 nachgewiesen werden.

Bei den Hepatozyten, die auf Kollagen kultiviert wurden, konnten ebenfalls als erste Marker einer etablierten Infektion an T1 die cccDNA und die Gesamt-mRNA nachgewiesen werden (Diagr. 1b). Bei diesen Zellen konnte schon an T2 Prägenom-mRNA detektiert werden (Diagr. 1b). Das HBsAg und HBeAg waren an T3 nachweisbar (Diagr. 1b). Bei Zellen auf Kollagen konnte die meiste cccDNA an Tag 3 detektiert werden. Die Gesamt-mRNA steigt bis T4 an und bleibt dann konstant (Diagr. 1b). Auch bei Hepatozyten auf Kollagen wurde eine Zehnerpotenz weniger Prägenom-mRNA als Gesamt-mRNA gebildet. Bei Hepatozyten auf Kollagen sind die HBsAg-Werte des Inokulums auch positiv, da das Hüllprotein von HBV erst im Laufe des Infektionsversuches gewaschen und anschließend neusynthetisiert wird (Diagr. 1b). Ab T2 steigt die Kurve wieder und die Neusynthese von HBsAg setzt ein, welches dann an T3 nachweisbar ist. Die HBeAg Werte des Inokulats waren negativ, da es erst im Lauf der Infektion neu gebildet wird (Diagr. 1b). HBeAg konnte auch hier ab T3 nachgewiesen werden.

Im Vergleich produzieren Hepatozyten auf Matrigel mehr cccDNA als auf Kollagen. Die größte Menge an cccDNA auf Matrigel betrug 2×10^5 Kopien cccDNA pro 6 cm Platte im Gegensatz zu $1,3 \times 10^5$ cccDNA pro 6 cm Platte. Es gibt keine signifikanten Unterschiede an der Menge von Gesamt und pg-mRNA zwischen Matrigel und Kollagen. Hepatozyten, die auf Kollagen ausplattiert wurden, produzierten mehr HBsAg als Zellen auf Matrigel. Bei Kollagen wurden bis zu 20 ng/ml und auf Matrigel nur bis zu 15 ng/ml synthetisiert. Im Gegensatz dazu wird von Hepatozyten auf Matrigel mehr HBeAg als HBsAg gebildet.

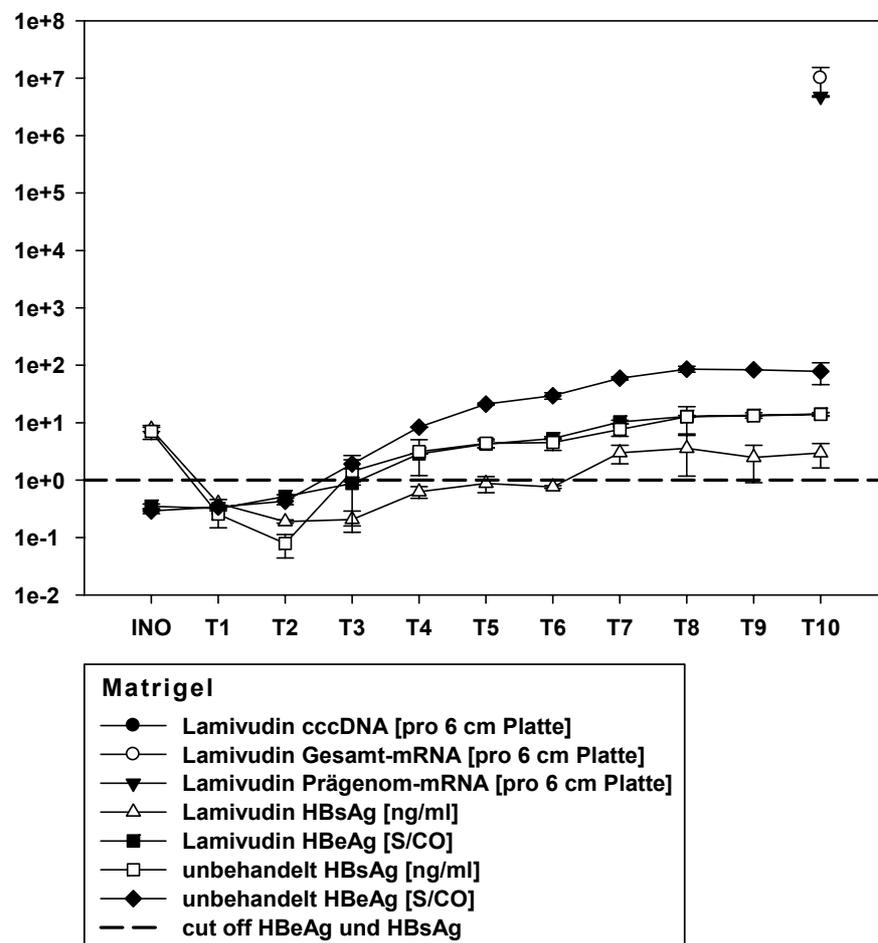


Diagr. 1a: Nachweis der replikativen Intermediate und viralen Proteine mit HBV infizierten Hepatozyten auf Matrigel in 6 cm Platten über 10 Tage (INO – T10).

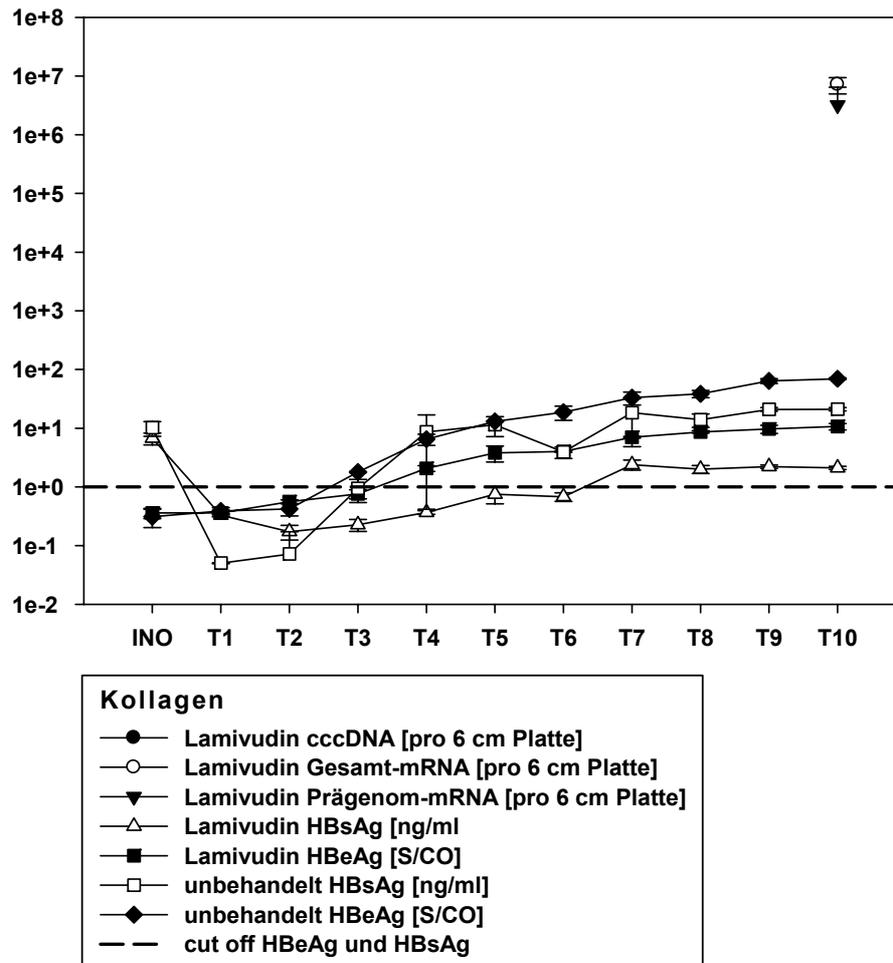


Diagr. 1b: Nachweis der replikativen Intermediate und viralen Proteine in HBV infizierten Hepatozyten auf Kollagen in 6 cm Platten über 10 Tage (INO – T10).

Bei Hepatozyten, die mit Lamivudin behandelt wurden, gibt es keine Unterschiede von Zellen auf Matrigel (Diagr. 1c) bzw. Kollagen (Diagr. 1d). Bei Zellen auf beiden Beschichtungen konnte keine neugebildete cccDNA nachgewiesen werden, da Lamivudin die reverse Transkription inhibiert. Gesamt- und Prägenom-mRNA konnten nachgewiesen werden (Diagr. 1c und 1d). Im Gegensatz zu unbehandelten Hepatozyten sind die Menge der Gesamt- und Prägenom-mRNA bei Lamivudin behandelten Zellen um eine Zehnerpotenz geringer. Lamivudin konnte aber die Sekretion der Virusproteine HBsAg und HBeAg nicht wesentlich reduzieren (Diagr. 1c und 1d).

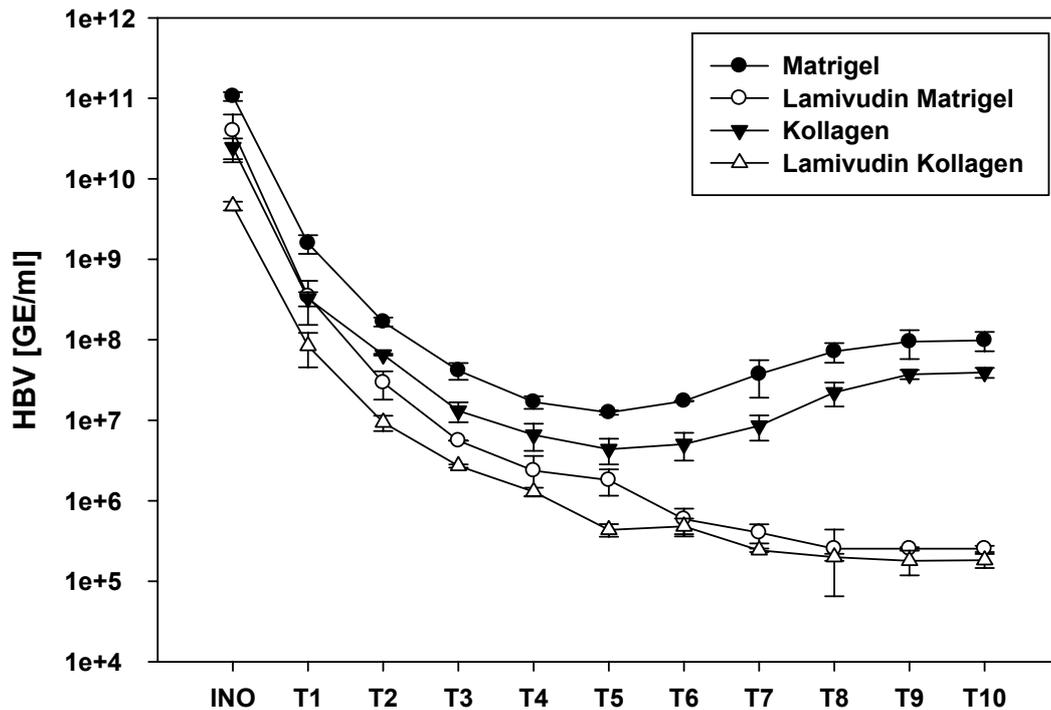


Diagr. 1c: Nachweis der replikativen Intermediate und viralen Proteine in HBV infizierten Hepatozyten auf Matrigel in 6 cm Platten über 10 Tage (INO – T10), die mit Lamivudin behandelt wurden.



Diagr. 1d: Nachweis der replikativen Intermediate und viralen Proteine in HBV infizierten Hepatozyten auf Kollagen in 6 cm Platten über 10 Tage (INO – T10), die mit Lamivudin behandelt wurden.

Die Kinetik der HBV-DNA-Moleküle im Kulturüberstand ist in Diagramm 1e dargestellt. Bei den Hepatozyten auf Matrigel und Kollagen fällt die HBV-DNA vom Inokulum bis Tag 5 ab, da bis dahin das nicht gebundene HBV abgewaschen wurde. Ab Tag 6 setzte erkennbar die Neusynthese von HBV ein, was durch einen leichten Anstieg der Werte gekennzeichnet ist. Allerdings erreicht die Neusynthese mit ca. 5×10^7 GE/ml von HBV nicht die Ausgangswerte von $> 1 \times 10^{10}$ GE/ml. Bei den mit Lamivudin behandelten Zellen fand keine Neusynthese von HBV statt.



Diagr. 1e: Kinetik der HBV-DNA-Moleküle im Überstand von Hepatozyten auf Matrigel und Kollagen in 6 cm Platten über 10 Tage (INO – T10).

4.2 Infektion primärer Hepatozyten mit HBV unter dem Einfluss von Glycosaminglykanen

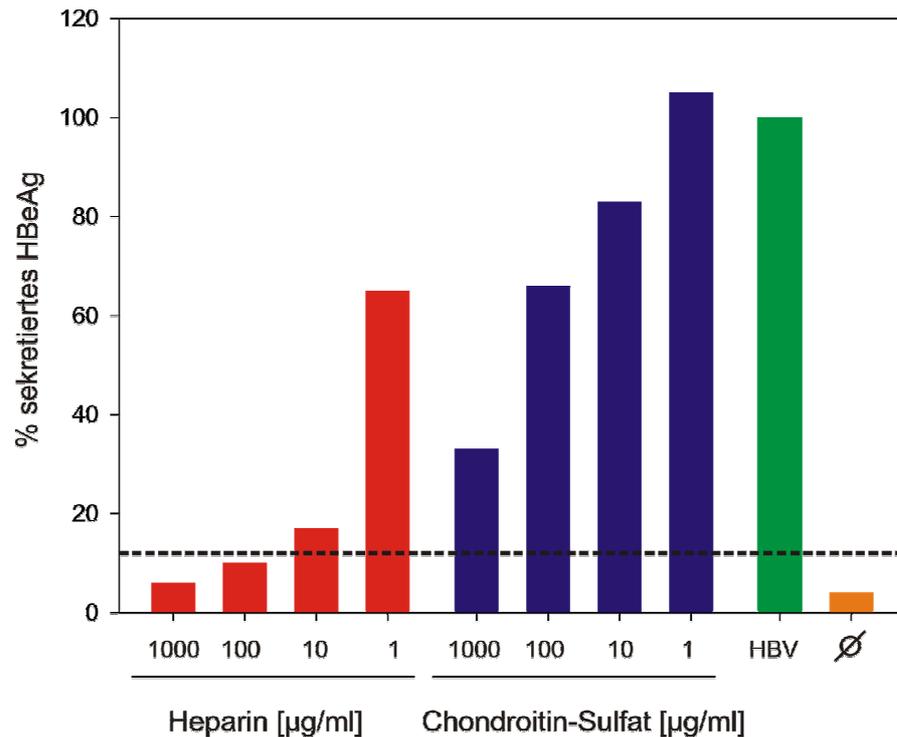
Die viralen und zellulären Determinanten der HBV Bindung und Aufnahme in Hepatozyten sind noch ungeklärt (Glebe und Urban, 2007). Es gibt eine ständig wachsende Liste von potentiellen Bindungspartnern von HBV in humanem Serum und Zellmembranen. Aber bis heute hat sich keiner davon als funktioneller HBV Rezeptor herausgestellt (Glebe und Urban, 2007). Die Arbeitsgruppe von Zahn und Allain konnte 2005 zeigen, dass HBV an Heparin bindet und so durch eine Heparin-Chromatographie aufgereinigt werden kann. Daraus resultierte die Frage, ob HBV sulfatierte Glycosaminglykane (GAGs) für die Bindung an Hepatozyten benutzt werden können und ob diese für den Infektionsvorgang nötig sind.

Um dies zu untersuchen, wurden primäre *Tupaia belangeri* Hepatozyten nach der modifizierten Zwei-Stufen-Kollagenase-Methode nach Seglen isoliert und auf 12 well Zellkulturplatten, die mit einer 1:20 Verdünnung von Matrigel beschichtet waren, mit 10 % FKS / HGM ausgesät. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel mit 600 µl HGM durchgeführt und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die verwendeten sulfatierten Polymere waren Heparin und

Chondroitin-Sulfat. Beide wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt: 1000 µg/ml, 100 µg/ml, 10 µg/ml und 1 µg/ml.

Am dritten Tag nach der Hepatozyten Isolierung wurden 300 µl der entsprechenden Heparin bzw. Chondroitin-Sulfat Verdünnungen mit HBV für 1 h bei RT leicht schüttelnd inkubiert, um eine Interaktion von HBV mit den sulfatierten Polymeren zu erlauben. Danach wurde das alte Medium von den Hepatozyten genommen und durch die jeweiligen Ansätze ersetzt. Die Zellen wurden 4 h bei 16 °C inkubiert, um eine Bindung, aber keine Aufnahme des HBV zu erlauben. Danach wurde der Überstand abgenommen, gesammelt und die Hepatozyten einmal mit 600 µl Waschmedium gewaschen, um nicht gebundenes HBV zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 600 µl frischem HGM ü. N. bei 37 °C inkubiert, um die HBV Infektion zu erlauben. Am nächsten Tag wurde das Medium erneut gewechselt sowie an den Tagen 4, 7, 11 und 15. Am letzten Tag wurden die Zellen wie beschrieben einem Zellviabilitäts Test unterzogen. In den gesammelten Überständen wurde mittels immun assay das HBeAg bestimmt.

Der Infektionsversuch zeigte eindeutig, dass die GAGs inhibieren und Heparin ein stärkerer Inhibitor der HBV Infektion ist als Chondroitin-Sulfat (Diagr. 2). Bei Heparin lag eine dosisabhängige Inhibition der Infektion für HBV vor. Bei einer Konzentration von 1000 mg/ml und 100 mg/ml Heparin konnte eine HBV Infektion vollständig und bei einer Konzentration von 10 mg/ml noch zu 80 % inhibiert werden. Die niedrigste Konzentration konnte zu fast 40 % eine HBV Infektion inhibieren. Bei Chondroitin-Sulfat konnte die höchste Konzentration von 1000 mg/ml nur zu 60 % eine Infektion inhibieren.



Diagr. 2: Infektion primärer Hepatozyten mit HBV unter dem Einfluss von sulfatierten Polymeren.

Nachweis des HBeAg an Tag 15 nach der Infektion. Die gestrichelte Linie bezeichnet den cut off des Versuches.

4.3 Infektion primärer Hepatozyten mit HBV nach Behandlung mit unterschiedlichen Enzymen

Durch die Beobachtung, dass Heparin ein möglicher Bindungspartner für HBV ist, wurde anschließend getestet, ob eine Vorbehandlung der Hepatozyten mit Heparinase einen Einfluss auf die HBV Infektion hat. Heparinasen schneiden spezifisch Heparan-Sulfat-Proteoglykane von Zelloberflächen und extrazellulären Matrices. Zur Kontrolle wurden die Hepatozyten auch mit PNGase F und Sialidase vorbehandelt. PNGase F schneidet spezifisch zwischen dem innersten N-Acetylglucosamin und dem Asparaginrest von komplexen Oligosacchariden in Glykoproteinen. Die Sialidase schneidet spezifisch terminale Sialinsäure-Resten von komplexen Carbohydraten und Glycoproteinen.

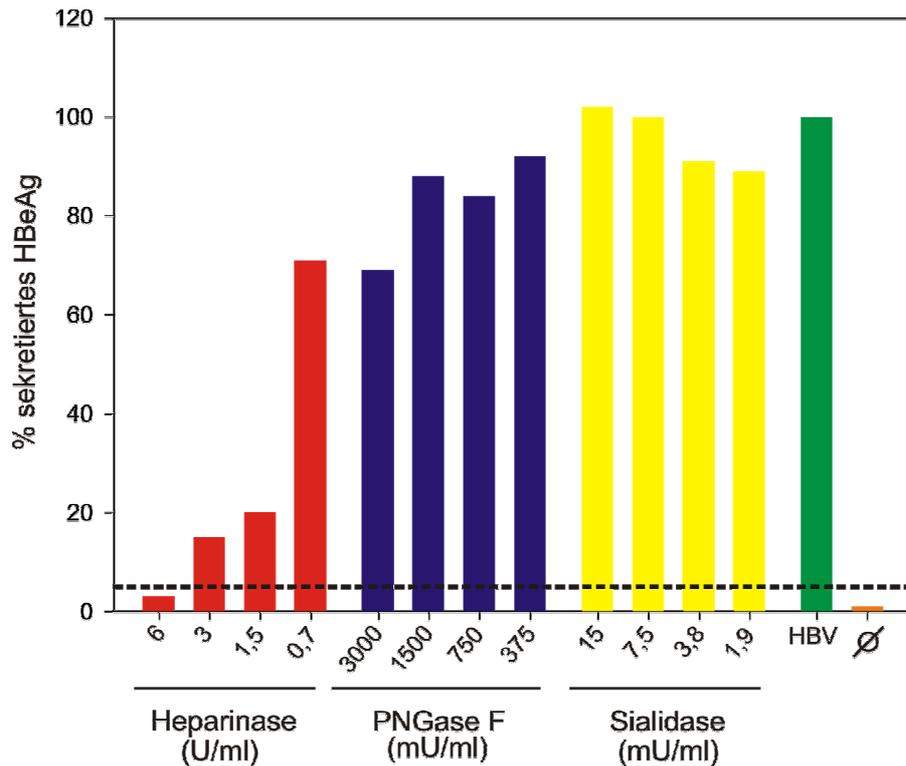
Um dies zu untersuchen, wurden die primären *Tupaia belangeri* Hepatozyten wie beschrieben nach der modifizierten Zwei-Stufen-Kollagenase-Methode nach Seglen isoliert und auf 12 well Zellkulturplatten, die mit einer 1:20 Verdünnung von Matrigel beschichtet waren, mit 10 % FKS / HGM ausgesät. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel mit 600 µl HGM durchgeführt und die

Zellen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Für den Versuch wurden folgende Enzyme mit angegebenen Konzentrationen eingesetzt: Heparinase III mit 6 U/ml, 3 U/ml, 1,5 U/ml und 0,7 U/ml, PNGase F mit 3000 mU/ml, 1500 mU/ml, 750 mU/ml und 375 mU/ml sowie Sialidase mit 15 mU/ml, 7,5 mU/ml, 3,8 mU/ml und 1,9 mU/ml.

An Tag 3 nach der Isolierung wurde das alte Medium von den primären Hepatozyten abgenommen und mit 300 µl der entsprechenden Enzymverdünnung ersetzt. Die Zellen wurden 2 h bei 16 °C inkubiert. Diese Temperatur erlaubt eine Modifizierung der Glykane der Zelloberfläche, aber keine Aufnahme und Neusynthese von Plasmamembran-Proteinen. Danach wurde die Enzymverdünnung abgenommen und die Hepatozyten einmal mit 600 µl Waschmedium gewaschen, um die Enzyme vollständig zu entfernen. Anschließend wurden 300 µl Virusverdünnung zu den Zellen gegeben und die Ansätze 4 h bei 16 °C inkubiert, um eine Bindung von HBV zu erlauben. Nachfolgend wurde die Virusverdünnung abgenommen, die Hepatozyten noch einmal mit 600 µl Waschmedium gewaschen, um nicht gebundenes HBV zu entfernen und mit 600 µl HGM ü. N. bei 37 °C inkubiert, um eine HBV Infektion zu erlauben. Am nächsten Tag wurde das Medium erneut gewechselt sowie an den Tagen 4, 7, 11 und 15. Am letzten Tag wurden die Zellen wie beschrieben einem Zellviabilitäts Test unterzogen. In den gesammelten Überständen wurde mittels ELISA das HBeAg bestimmt.

Der Versuch zeigte, dass eine Vorbehandlung der Hepatozyten mit Heparinase zu einer dosis-abhängigen Inhibition der HBV Infektion führt (Diagr. 3). Dagegen hatte eine Vorbehandlung mit PNGase F und Sialidase keinen signifikanten Effekt auf die HBV Infektion. In der höchsten Konzentration kann die Heparinase komplett die HBV Infektion verhindern. In den Konzentrationen 3 U/ml und 1,5 u/ml kann eine HBV Infektion noch um 80 % inhibiert werden.

Der Zellviabilitätstest (WST-1) zeigte nach dem Infektionsversuch, dass die Hepatozyten noch eine Viabilität von über 90 % aufwiesen.



Diagr. 3: Infektion primärer Hepatozyten mit HBV nach Behandlung mit unterschiedlichen Enzymen.

Nachweis des HBeAg an Tag 15 nach der Infektion. Die gestrichelte Linie bezeichnet den cut off des Versuches.

4.4 Infektion primärer Hepatozyten mit HBV unter dem Einfluss der Inhibitoren Chlorpromazin und Bafilomycin

Der genaue Eintrittsmechanismus von HBV in Hepatozyten ist immer noch unbekannt. Bis jetzt sind 5 Aufnahme-mechanismen in Zellen bekannt: (1) Clathrin-abhängige Endozytose, (2) Caveolin-abhängige Endozytose, (3) Makropinozytose, (4) Clathrin- und Caveolin unabhängige Endozytose und (5) Transzytose. Offensperger et al. berichteten 1991 eine pH-abhängige Aufnahme von DHBV in die Hepatozyten. Dies deutete auf einen endozytotischen Aufnahmemechanismus mit anschließender pH-abhängiger Fusion der Virushülle mit dem Endosom hin. Dahingegen zeigten andere Autoren ein pH-unabhängige, aber trotzdem energieabhängige Endozytose des HBV (Hagelstein et al., 1997) sowie des DHBV in die Zelle (Rigg und Schaller, 1992; Köck et al., 1996; Breiner und Schaller, 2000; Funk et al., 2006).

Am dritten Tag nach der Isolierung wurde der Infektionsversuch durchgeführt, wobei die Hepatozyten jeweils mit den Inhibitoren Bafilomycin A1 (100 nM) und Chlorpromazin (15 µg) vor, während und nach der HBV Infektion behandelt wurden. Chlorpromazin verhindert die Formierung von clathrin-coated pits und

inhibiert dadurch die Clathrin-abhängige Endozytose (Wang et al., 1993; Subtil et al., 1994). Bafilomycin ist ein spezifischer Inhibitor der vakuolaren H^+ -ATPase (V-ATPase) in Zellen. Wird die V-ATPase blockiert, kann keine Ansäuerung im Endosom entstehen und kein Membranpotential aufgebaut werden (Funk et al., 2006).

Bei dem Versuchsteil „vor“ wurde am zweiten Tag nach der Isolierung das Medium von den Zellen genommen und durch 300 μ l Medium ersetzt, welches die Inhibitoren in den oben genannten Konzentrationen enthielt. Damit wurden die Hepatozyten ü. N. im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium mit dem Inhibitor entfernt und durch Medium mit HBV ersetzt. Die Ansätze wurde ü. N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, damit eine Infektion der Hepatozyten stattfinden konnte. Am folgenden Tag wurde der Überstand, auch als Inokulum bezeichnet, abgenommen und durch 600 μ l HGM ersetzt.

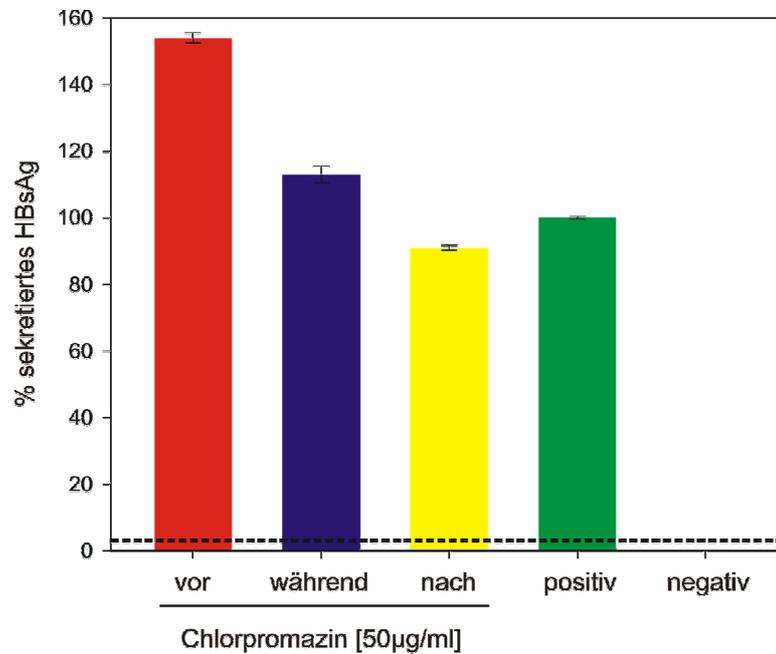
Bei dem Versuchsteil „während“ wurde am dritten Tag nach der Aussaat das Medium durch 300 μ l HGM ersetzt, welches die jeweiligen Inhibitoren plus HBV enthielt. Die Ansätze wurden ü. N. bei 37 °C im Brutschrank infiziert. Am nächsten Tag wurde ebenfalls das Inokulum abgenommen und durch 600 μ l neues HGM ausgetauscht.

Bei dem Versuchsteil „nach“ wurden das HGM am dritten Tag nach der Isolierung durch 300 μ l HGM plus HBV ausgetauscht und die Hepatozyten ü. N. bei 37 °C im Brutschrank infiziert. Am nächsten Tag wurde das Inokulum gesammelt und durch 600 μ l Medium mit dem jeweiligen Inhibitor bis zum nächsten Mediumwechsel ersetzt.

Bei jedem Versuchsteil wurde zusätzlich zum Inokulum an den Tagen 3, 6, 10 und 14 ein Mediumwechsel mit 600 μ l frischem HGM durchgeführt. Am letzten Tag wurden die Zellen wie beschrieben einem Zellviabilitäts Test unterzogen. In den gesammelten Überständen wurde mittels Sandwich-ELISA das HBsAg bestimmt.

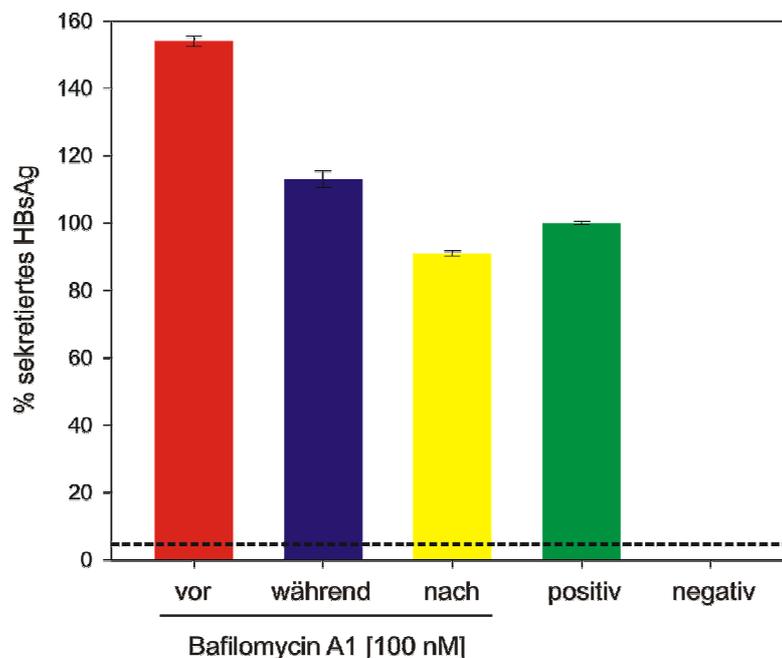
Im Diagramm 4 ist zu erkennen, dass Chlorpromazin während und nach der Infektion keinen Einfluss auf die Infektiosität von HBV hatte, da kein signifikanter Unterschied zur Positivkontrolle zu erkennen war. Eine Vorbehandlung der Hepatozyten mit Chlorpromazin hatte überraschenderweise eine leichte Zunahme der HBV Infektion zur Folge.

Dasselbe Ergebnis zeigte sich für Bafilomycin (Diagr. 5). Eine Behandlung der Hepatozyten mit Bafilomycin vor der HBV Infektion führte zu einer leichten Steigerung der Infektion. Eine Zugabe von Bafilomycin während oder nach der Infektion hatte keinen signifikanten Effekt auf der HBV Infektion.



Diagr. 4: Infektion primärer Hepatozyten mit HBV unter dem Einfluss von Chlorpromazin.

Nachweis des HBsAg an Tag 14 nach der Infektion. Die gestrichelte Linie bezeichnet den cut off des Versuches.



Diagr. 5: Abb. 5.: Infektion primärer Hepatozyten mit HBV unter dem Einfluss von Bafilomycin.

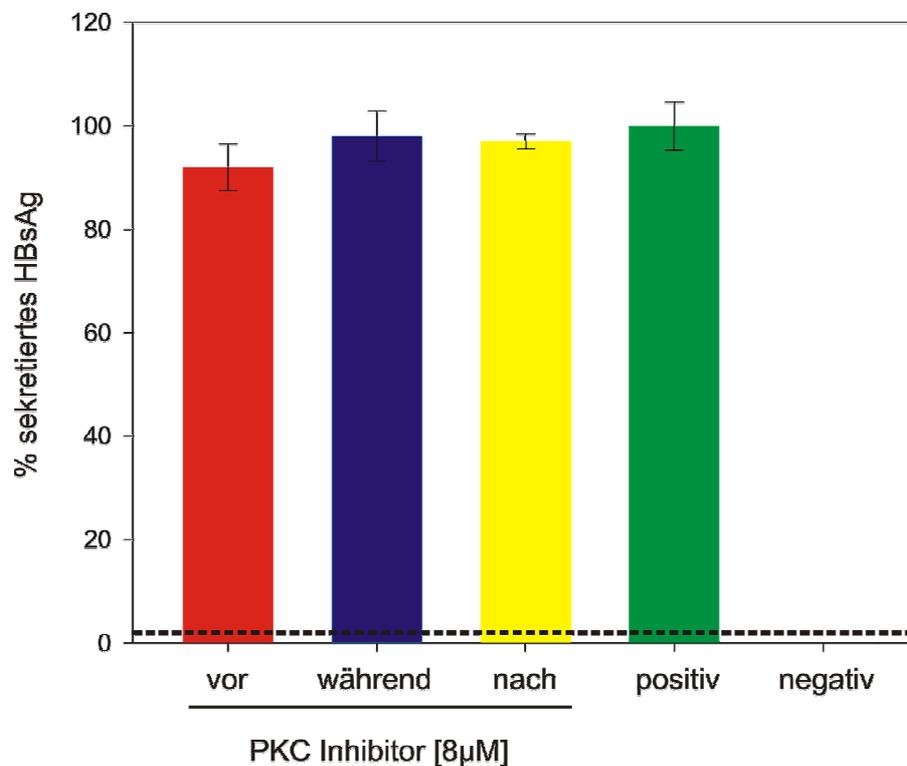
Nachweis des HBsAg an Tag 14 nach der Infektion. Die gestrichelte Linie bezeichnet den cut off des Versuches.

4.5 Infektion primärer Hepatozyten mit HBV unter dem Einfluss des myristylierten Protein Kinase C Inhibitor 20 - 28

Unabhängig von den Aufnahmemechanismen von HBV sollte ebenfalls getestet werden, ob eine Inhibition der Protein Kinase C eine Auswirkung auf die HBV Infektion hat.

Der Versuch wurde genauso durchgeführt wie die Infektionsversuche mit Chlorpromazin und Bafilomycin. Statt der Inhibitoren wurde der myristylierte Protein Kinase C Inhibitor 20-28 (8 μ M) eingesetzt. Er ist durch die Myristylierung zellgängig und inhibiert die Protein Kinase C.

Der Versuch zeigte, dass der PKC Inhibitor keinen Einfluss auf die HBV Infektion hatte, egal zu welchem Zeitpunkt er im Versuch eingesetzt wurde (Diagr. 6).



Diagr. 6: Infektion primärer Hepatozyten mit HBV unter dem Einfluss von PKC Inhibitor.

Nachweis des HBsAg an Tag 14 nach der Infektion. Die gestrichelte Linie bezeichnet den cut off des Versuches.

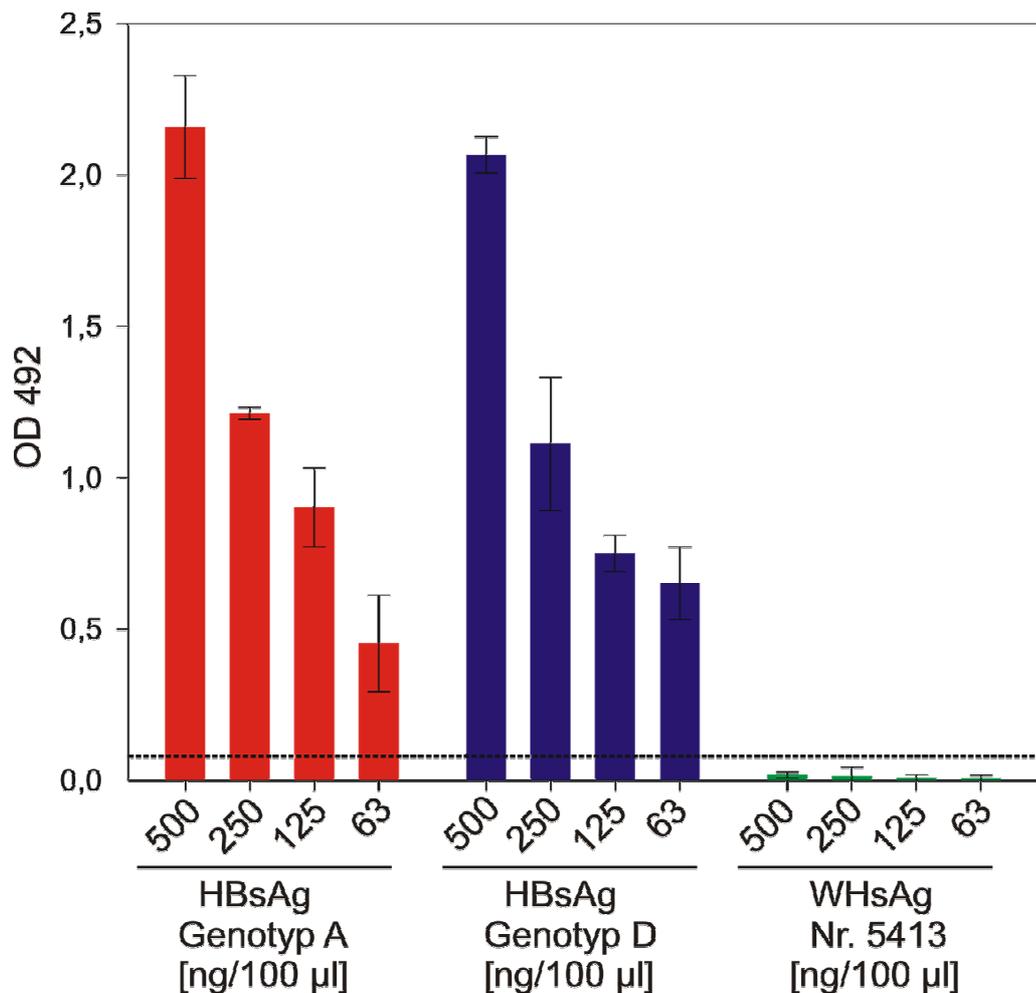
4.6 Charakterisierung des Antikörpers HB1

4.6.1 Reaktion im ELISA

Der monoklonale Antikörper HB1 aus der Maus wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Kestutis Sasnauskas und Frau Dr. Aurelia Zvirblienė (Institute for Biotechnology, Laboratory of Eukaryote Genetic Engineering, Vilnius, Litauen) zur Verfügung gestellt. Er reagiert mit einem gruppenspezifischen Epitop der HBs-Antigenschleife, AS 120 bis 125 im Genotyp D (persönliche Mitteilung Dr. Irina Sominskaja, Riga, Lettland). Es sollte nun getestet werden, ob der Antikörper HB1 auch mit der HBs-Antigenschleife des Genotyps A und C sowie der des amerikanischen Waldmurmeltiers in seiner nativen Form reagiert.

Dazu wurde ein ELISA durchgeführt, bei dem mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigtes HBsAg von chronisch infizierten Patienten der Genotypen A und D sowie WHsAg des Tieres mit der Nummer 5413 (zur Verfügung gestellt von Dr. Stephan Menne, Cornell University, USA) eingesetzt wurde. Die ELISA Platte wurde mit jeweils 100 µl der folgenden HBsAg bzw. WHsAg Verdünnungsreihe 500 ng, 250 ng, 125 ng und 63 ng ü. N. bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurde die ELISA Platte gewaschen und ü. N. geblockt. Nach dem Blocken wurde die Platte erneut gewaschen und 100 µl des Primärantikörpers HB1 (1:1000) pro well dosiert und ü. N. inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper durch Waschen entfernt und durch 100 µl des Sekundärantikörpers anti-Maus-AP (1:5000) ersetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein letztes Mal gewaschen. Zum Schluss wurden 100 µl OPD-Substrat in die wells gegeben und 15 min inkubiert. Die entstandene Farbreaktion wurde im Photometer bei 492 nm, Referenzwellenlänge 620 nm, gemessen.

Das Diagramm 7 zeigt deutlich, dass der Antikörper HB1 nur mit dem HBsAg Genotypen A2 und D, jedoch aber nicht mit dem WHsAg im ELISA reagiert. Man sieht bei den Genotypen A2 und D eine sehr ähnliche konzentrationsabhängige Bindung des HB1 an das HBsAg.



Diagr. 7: ELISA mit dem Antikörper HB1 gegen HBsAg der Genotypen A2 und D, sowie WHsAg Nr. 5413.

Die gestrichelte Linie bezeichnet den cut off des Versuches.

4.6.2 Reaktion im Western Blot

Als nächstes sollte untersucht werden, ob der Antikörper HB1 die HBs-Antigenschleife auch noch unter denaturierten Bedingungen erkennt.

Dazu wurden zwei SDS Gele, in die filamentreiches, aufgereinigtes HBsAg von chronisch infizierten Patienten mit den HBV Genotypen A, C und D in den Konzentrationen 250 ng und 125 ng / 10 µl eingesetzt wurde, durchgeführt. Danach wurden die Gele in die Blot Apparatur gelegt und die Proteine von den SDS Gelen auf die entsprechenden PVDF-Transfer Membranen übertragen. Nach dem Blotten wurden die Blots unterschiedlich weiterbehandelt.

Die Membran für den Chemilumineszenz Blot wurde ü. N. bei 4 °C in Blocking Puffer inkubiert. Nach dem Blocken wurde die Membran gewaschen, die Inkubation mit dem Antikörper HB1 (1:5000) erfolgte für 1 h bei 37 °C. Nicht gebundener Antikörper wurden nach der Antikörperinkubation abgewaschen.

Anschließend folgte die Inkubation mit dem Antikörper Donkey-Anti-Maus-AP (1:10.000) für 1 h bei 37 °C. Danach wurde die Membran erneut gewaschen und mit 1 ml Chemilumineszenz Substrat in Folie eingeschweißt und für 2 min zusammen inkubiert. Dann wurde die Folie aufgeschnitten, das Substrat entfernt und die Folie wieder verschlossen. Das Signal wurde in der Dunkelkammer mittels einem Röntgenfilm sichtbar gemacht und dokumentiert.

Die Membran für den Fluoreszenz Blot wurde ü. N. bei 4 °C in ODYSSEY® Blocking Buffer / PBS gelegt und geblockt. Nach dem Blocken wurde die Membran gewaschen und mit dem Antikörper HB1 (1:1000) für 1 h bei RT inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden nach der Inkubation abgewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper Goat-Anti-Maus 680 (1:10.000) für 1 h bei RT im Dunkeln. Danach wurde die Membran im Dunkeln gewaschen und anschließend das Signal mittels dem LI-COR ODYSSEY® Fluoreszenz Scanner dokumentiert und quantifiziert.

Das Ergebnis des Chemilumineszenz Blot sieht man in Abb. 12a. Der Antikörper HB1 erkennt beide Formen des SHBs der Genotypen A2, C und D auch unter denaturierten Bedingungen. Die stärksten Signale für P24 und GP27 erhält man bei Genotyp A2 und D. Bei Genotyp C wird das P24 besser als das GP27 vom HB1 erkannt. Bei Genotyp A2 werden das GP33 sowie das GP36 des MHBs beide vom HB1 detektiert. Bei Genotyp C erkennt der HB1 nur das GP33 und sehr schwach bei einer Konzentration von 250 ng das GP36. Bei Genotyp D erkennt der HB1 bei 250 ng das MHBs sehr gut, bei 125 ng allerdings nur das GP33 und das GP 36 sehr schwach. Die schwächere Reaktion des HB1 mit Genotyp C ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Konzentration für Genotyp C geringer war als angegeben.

Das Bild des Fluoreszenz Blot (Abb. 12b) zeigt dasselbe Bindungsmuster von HB1. Allerdings sind die Banden bei dem Odyssey Scan schärfer.

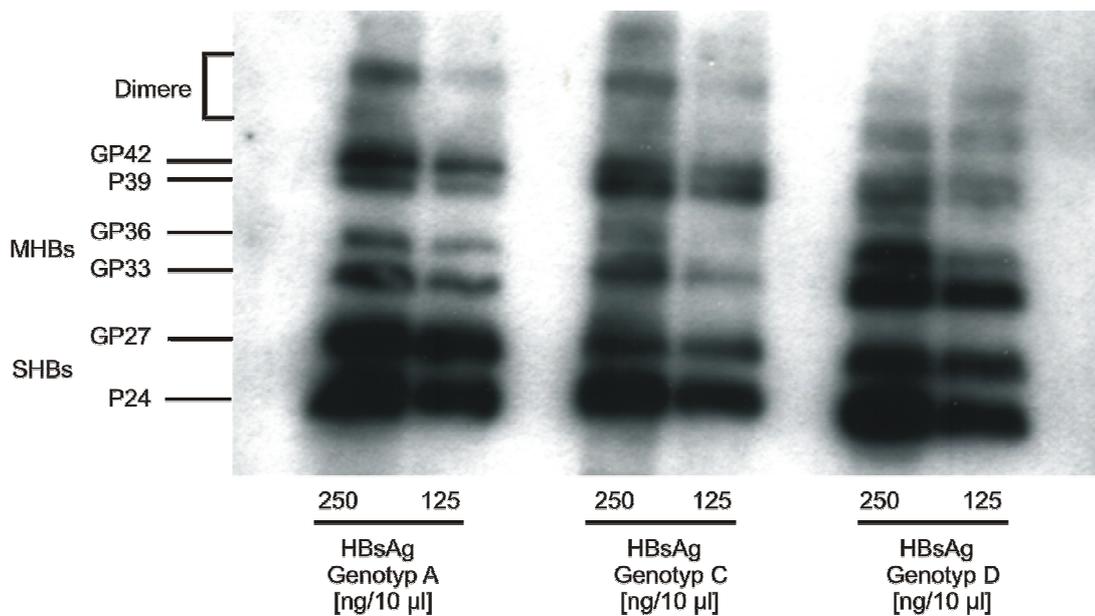


Abb. 12a: Chemilumineszenz Blot der HBV Genotypen A2, C und D.

Detektiert mit HB1 und Anti-Maus-AP.

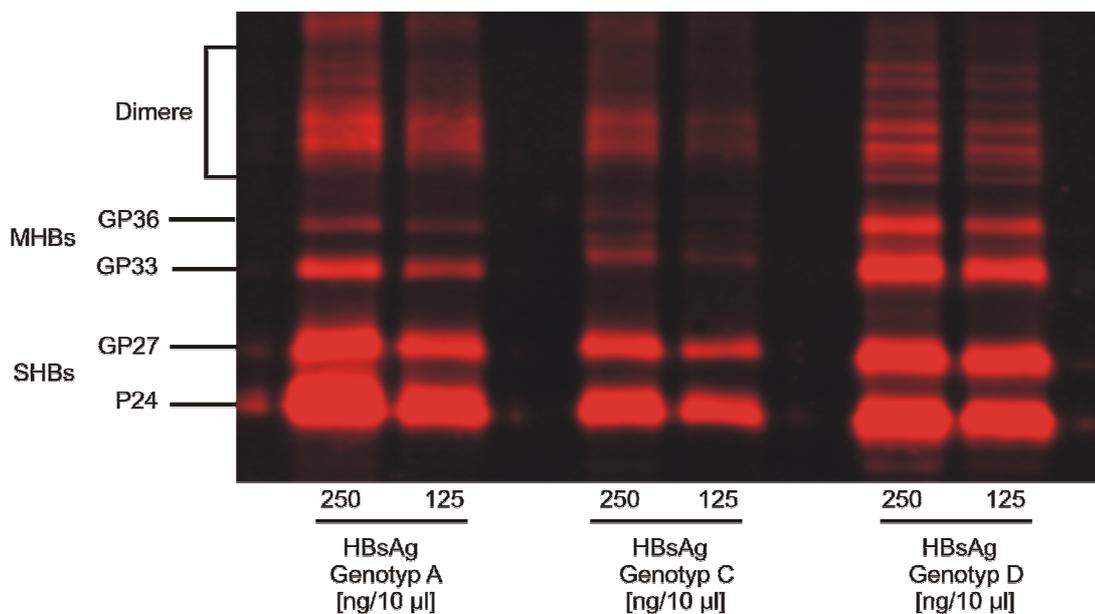


Abb. 12b: Fluoreszenz Blot mit dem Odyssey System der HBsAg Genotypen A2, C und D.

Detektiert mit HB1 und Anti-Maus 680.

4.7 Quantifizierung der Anteile der Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs des HBV

Nachdem gezeigt wurde, dass man mit dem Antikörper HB1 die Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs im Blot nachweisen kann, sollte mittels dem LI-COR ODYSSEY® Infrared Imaging System eine relative Quantifizierung der Anteile dieser Oberflächenproteine von filamentreichen

Fraktionen von HBsAg untersucht werden. Das konnte vorher noch nicht genau untersucht werden.

Dazu wurde HBsAg der Genotypen A2 und D im SDS Gel aufgetrennt und auf eine PVDF Membran durch Blotten übertragen und ü. N. geblockt. Am nächsten Tag wurde die Membran mit HB1 und mit Kaninchen Antiserum frCP + 28aa preS1 20 bis 47 (Genotyp A) als Primärantikörper inkubiert. Der HB1-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 für den Nachweis des SHBs und MHBs eingesetzt. Für eine Darstellung des LHBs wurde eine 1:10.000 Verdünnung des Kaninchen Serums verwendet. Nach der Inkubation wurde die Membran gewaschen und mit den Sekundärantikörpern inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe des Odyssey Programms eine Quantifizierung durchgeführt.

In der Abbildung 13 ist die Quantifizierung visuell dargestellt. Das Bild zeigt links die Oberflächenproteine des Genotyps A2 und rechts die des Genotyps D. Das SHBs und MHBs sind in rot und das LHBs in grün angefärbt. Das MHBs wird bei Genotyp D durch HB1 stärker angefärbt als bei Genotyp A2. Die Banden des LHBs sind bei Genotyp D etwas weniger als bei Genotyp A2 gewandert, da Genotyp D eine Deletion aus 11 Aminosäuren in der PräS1 Region hat. Dagegen wandert MHBs bei Genotyp D langsamer, da es zusätzlich O-Glykan enthält.

Die Quantifizierung mit dem Odyssey System ergab, dass bei Genotyp A2 das LHBs 16 %, das MHBs 15 % und das SHBs 58 % der Gesamtoberflächenproteine ausmachen. Der Rest ließ sich nicht eindeutig zuordnen. Das GP42 macht 46 % und das P39 47 % von LHBs aus. Das MHBs ist aufgeteilt in 27 % GP36 und 63 % GP33. Das SHBs besteht aus 37 % GP27 und 62 % P24 (Tabelle 1).

Bei Genotyp D ist die Verteilung ähnlich. Das LHBs macht 10 %, das MHBs 22 % und das SHBs 54 % der Gesamtoberflächenproteine aus. Das LHBs kommt zu 45 % in der GP42 Form und zu 33 % in der P39 Form vor. Das MHBs teilt sich auf in 34 % GP 36 und 62 % GP33. Das SHBs besteht aus 35 % aus GP27 und 58 % aus P24 (Tabelle 2).

Bei beiden Genotypen macht das SHBs den Großteil der Oberflächenproteine aus. Das SHBs liegt vorwiegend in der nicht glykosylierten Form vor.

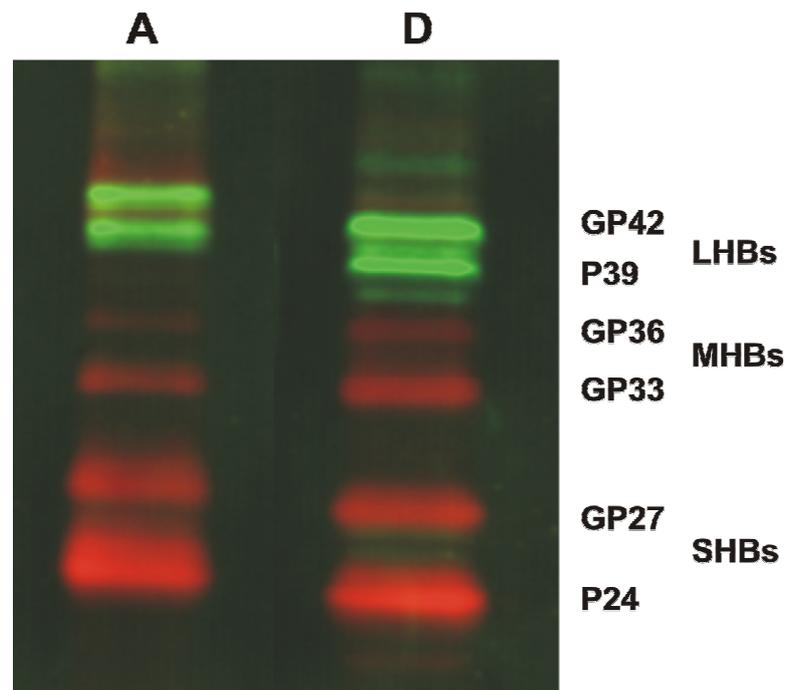


Abb. 13: Fluoreszenz Blot mit dem Odyssey System der HBV Genotypen A2 und D. 250 ng HBsAg pro Spur. Rot: HB1 Färbung, Grün: Kaninchen Antiserum.

Tabelle 1: Relative Quantifizierung der Oberflächenproteine von HBV von Genotyp A2

Genotyp A	Anteil am Gesamt- oberflächenprotein in %	Anteil am jeweiligen Oberflächenprotein in %
Oberflächenproteine (gesamt)	100	
LHBs (gesamt)	16	100
GP42	7	46
P39	7	47
MHBs (gesamt)	15	100
GP36	4	27
GP33	9	63
SHBs (gesamt)	58	100
GP27	21	37
P24	36	62

Tabelle 2: Relative Quantifizierung der Oberflächenproteine von HBV von Genotyp D

Genotyp D	Anteil am Gesamt- oberflächenprotein in %	Anteil am jeweiligen Oberflächenprotein in %
Oberflächenproteine (gesamt)	100	
LHBs (gesamt)	10	100
GP42	4	45
P39	3	33
MHBs (gesamt)	22	100
GP36	7	34
GP33	14	62
SHBs (gesamt)	54	100
GP27	19	35
P24	31	58

4.8 Charakterisierung der inter- und intramolekularen Disulfidbrücken der HBs-Antigenschleife von HBV

4.8.1 Mittels Silbergel

Die S-Domäne von HBV ist ein aus 226 Aminosäuren aufgebautes Membranprotein. Insgesamt kommen in dem Protein 14 Cysteine vor, wobei sechs Cysteine konformationell bedingt auf der zytosolischen Seite des HBV liegen. Die restliche acht Cysteine sind in der Region der HBs-Antigenschleife des SHBs auf der Oberfläche des HBV zu finden. Dort können sie inter- und intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden und somit auch biotinyliert werden. Die Anzahl und Position der Cysteinreste ist streng konserviert und ebenfalls in den Antigenschleifen von WHsAg und GSHsAg zu finden.

Bis jetzt ist die Verknüpfung der acht Cysteine und die daraus resultierende Tertiärstruktur der Antigenschleife nicht geklärt. Mit den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob alle Cysteine miteinander verbunden sind oder ob es auch freie Sulfhydrylgruppen in der HBV Antigenschleife gibt.

Dazu wurde zuerst ein SDS Gel mit anschließender Silberfärbung unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Pro Spur wurde 1 µg/µl HBsAg eines chronisch infizierten Patienten mit der Identifikationsnummer 325 eingesetzt. Das HBsAg wurde im ersten Gel nur mit SDS und dem Reduktionsmittel TCEP sowie mit SDS, TCEP und Erhitzen behandelt. Im zweiten Gel wurde das HBsAg genauso behandelt, nur wurde das TCEP durch

DTT ersetzt. Im letzten Gel wurde das HBsAg nur mit SDS sowie SDS und erhitzen behandelt. Die eingesetzten Konzentrationen betragen jeweils 2 mM und erhitzt wurde 10 min bei 70 °C.

Alle drei Gele zeigen deutlich die Oberflächenproteine LHBs, MHBs und SHBs in ihren glykosylierten und nicht glykosylierten Formen (Abb. 14). Die Banden erscheinen in unterschiedlichen Farben, wobei die nicht glykosylierte S-Domäne eine rötliche Farbe erzeugt, während die glykosylierte S-Domäne zu einer grauen Farbe führt. In den letzten beiden Spuren wurde kein Reduktionsmittel (TCEP, DTT) zum Ansatz gegeben, sondern nur SDS und Wärme. Trotzdem sieht man eine deutliche Auftrennung der Proteine, d. h. sie waren nicht durch Disulfidbrücken vernetzt.

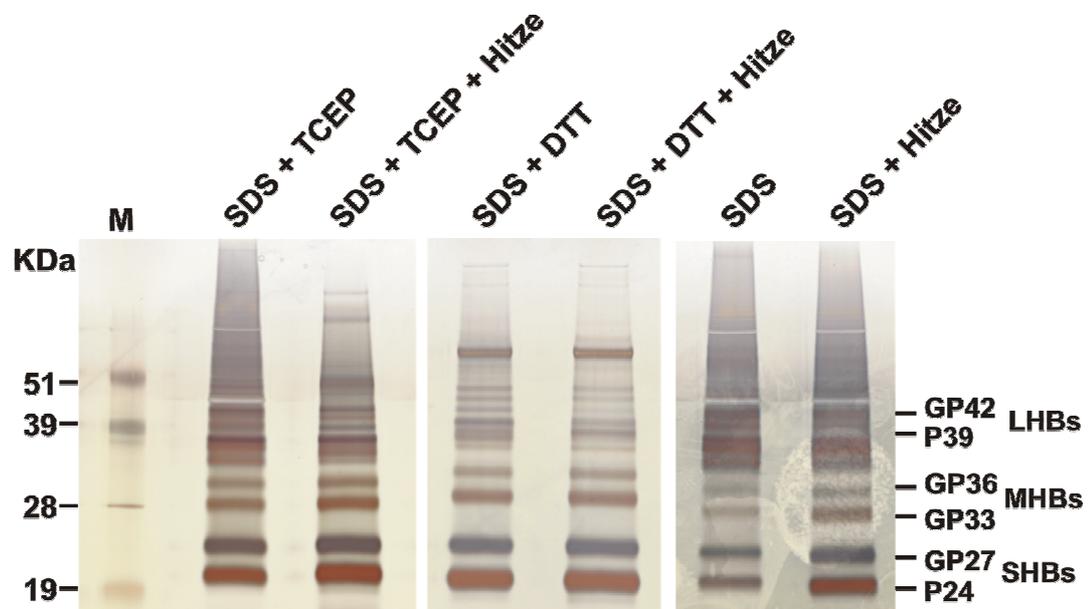


Abb. 14: SDS Gel mit anschließender Silberfärbung von HBsAg Genotyp D.

Behandlung mit SDS und einem reduzierenden Reagens, entweder DTT oder TCEP (2 mM), sowie erhitzen für 10 min bei 70 °C.

4.8.2 Mittels LI-COR ODYSSEY® Infrared Imaging System

Im folgenden Versuch sollten die freien Cysteinreste mit Maleimido-PEO3 biotinyliert und bestehende Disulfidbrücken mit TCEP und anschließend mit Maleimido-PEO3 biotinyliert werden. Das Biotin konnte dann mit markiertem Streptavidin detektiert werden. Als Negativkontrolle diente Sulfo-NHS-Biotin, welches nur mit Aminogruppen reagiert. Es wurde eine Doppeldetektion mit dem Odyssey System durchgeführt, damit man als Kontrolle nicht biotinyliertes HBsAg detektieren konnte.

Dazu wurde das HBsAg nur in PBS verdünnt sowie nur für 15 min mit 2 mM TCEP reduziert. In den nächsten Ansätzen wurde das HBsAg für 2 h mit 2 mM Maleimido-PEO3 biotinyliert sowie zuerst 15 min mit 2 mM TCEP reduziert und dann mit Maleimido-PEO3 biotinyliert. Als Kontrolle wurde HBsAg für 30 min mit Sulfo-NHS biotinyliert sowie erst reduziert und dann mit Sulfo-NHS biotinyliert. Danach wurden die Ansätze in einem SDS Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Transfer Membran übertragen. Es wurden jeweils 250 ng HBsAg pro Spur eingesetzt. Im Anschluss wurde die Membran ü. N. bei 4 °C geblockt. Nach dem Blocken wurde die Membran gewaschen und mit dem Antikörper HB1 (1:5000) für 1 h bei RT inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde nach der Antikörperinkubation abgewaschen. Anschließend wurde die Blotmembran mit Streptavidin CW800 (1:10.000) für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde nach der Antikörperinkubation ebenfalls im Dunkeln abgewaschen. Anschließend wurde das Signal mittels dem LI-COR ODYSSEY® Fluoreszenz Scanner dokumentiert und quantifiziert.

Das Ergebnis sieht man in Abbildung 15. In den ersten beiden Spuren erkennt man in rot die Färbung des gebundenen HB1 an das HBsAg. In den anderen vier Spuren sieht man in grün das markierte Streptavidin, welches an das biotinylierte HBsAg gebunden hat. Ein leichter Gelbschimmer kommt durch die Überlagerung mit dem roten Kanal zustande. In Spur drei sieht man, dass nicht reduziertes HBsAg biotinyliert wurde. Dies indiziert freie Sulfhydrylgruppen im Protein. In Spur vier sieht man das vorher reduzierte und dann biotinylierte HBsAg. Das Signal ist wesentlich stärker. Das heißt, es gibt nach der Reduzierung mehr freie SH-Gruppen, die biotinyliert werden können. Als Kontrolle diente eine Biotinylierung der Aminogruppen (Spur fünf und sechs). Diese können nicht reduziert werden. Daher ist das Signal der Biotinylierung mit oder ohne TCEP gleich und zeigt damit eine Spezifität der Reduzierung der Disulfidbrücken durch TCEP.

Ebenfalls in Abbildung 15 ist zu erkennen, dass das Signal des MHBs nach einer Reduzierung auch stärker ist (Spur vier). Das würde im nativen Zustand des HBsAg auf eine Blockierung der SH-Gruppen im MHBs durch Präs2 sprechen.

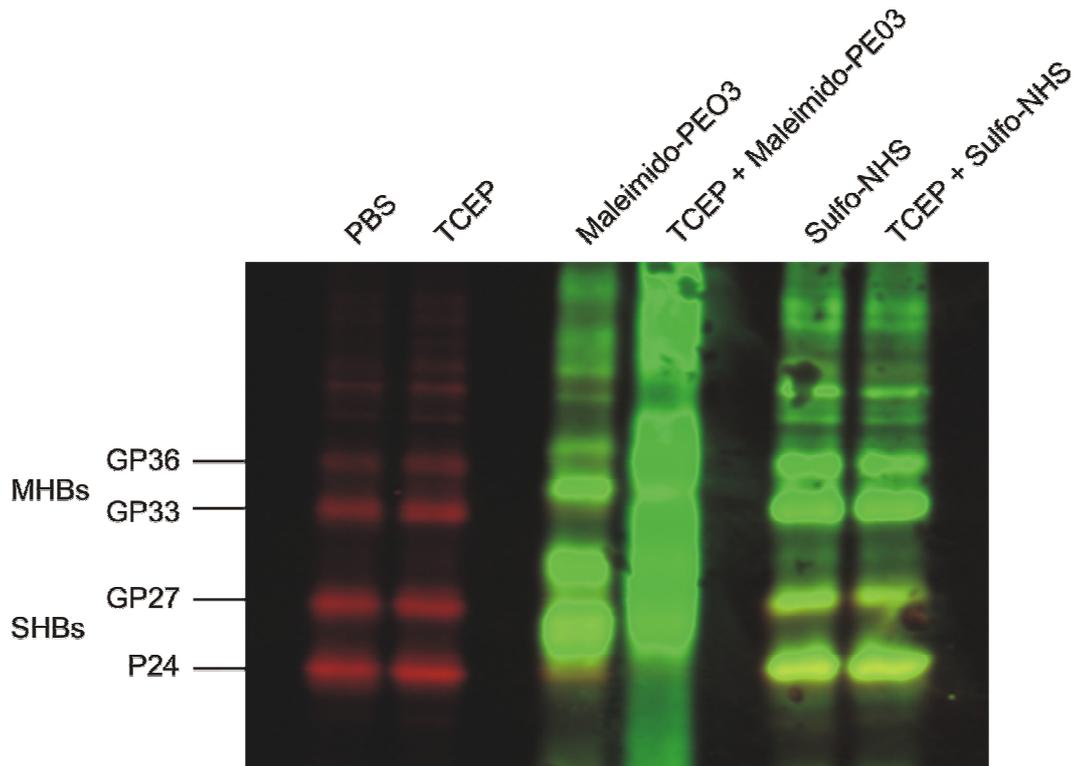


Abb. 15: Blot mit anschließender Odyssey Fluoreszenz Färbung.

250 ng / 10 µl HBsAg Genotyp D mit HB1 (1:5000, in rot) und Biotinylierung mit Streptavidin CW800 (1:10.000, in grün) detektiert. Die gelben Banden kommen durch die Überlagerung des roten und grünen Kanals zustande.

4.9 Quantifizierung der freien Sulfhydrylgruppen im HBsAg

4.9.1 Erstellen der Standardreihe

Nachdem gezeigt wurde, dass die freien Sulfhydrylgruppen im HBsAg biotinyliert und die bestehenden Disulfidbrücken reduziert und dann biotinyliert werden können, sollte im nächsten Schritt eine Quantifizierung stattfinden. Es sollte ermittelt werden, wie viele freie SH-Gruppen vorliegen und wieviele durch Disulfidbrücken verbunden sind.

Dazu wurde zuerst eine Standardreihe zur Quantifizierung der Biotinylierung etabliert. Sie bestand aus biotinyliertem BSA. Dafür wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe von 500 ng bis 0,5 ng pro Spur auf ein SDS Gel aufgetragen und durch Blotten auf eine PVDF Membran übertragen. Anschließend wurde der Blot mit einer 1:10.000 Verdünnung von Streptavidin CW800 angefärbt und mit dem Odyssey System sichtbar gemacht (Abb. 16). Als linearer Bereich der Standardreihe, in dem eine Quantifizierung möglich ist, wurden die Konzentrationen von 16 ng bis 0,5 ng pro Spur festgelegt (Abb. 17).

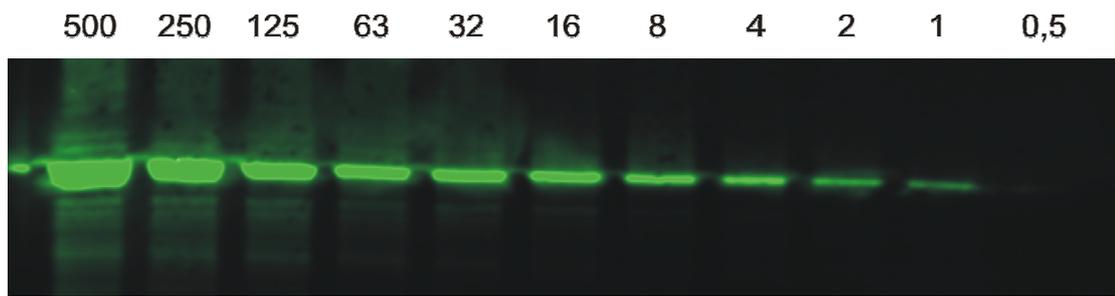


Abb. 16: Blot mit anschließender Odyssey Färbung der Standardreihe von biotinyliertem BSA.

500 ng bis 0,5 ng biotinyliertes BSA pro Spur mit Streptavidin CW800 (1:10.000) detektiert.

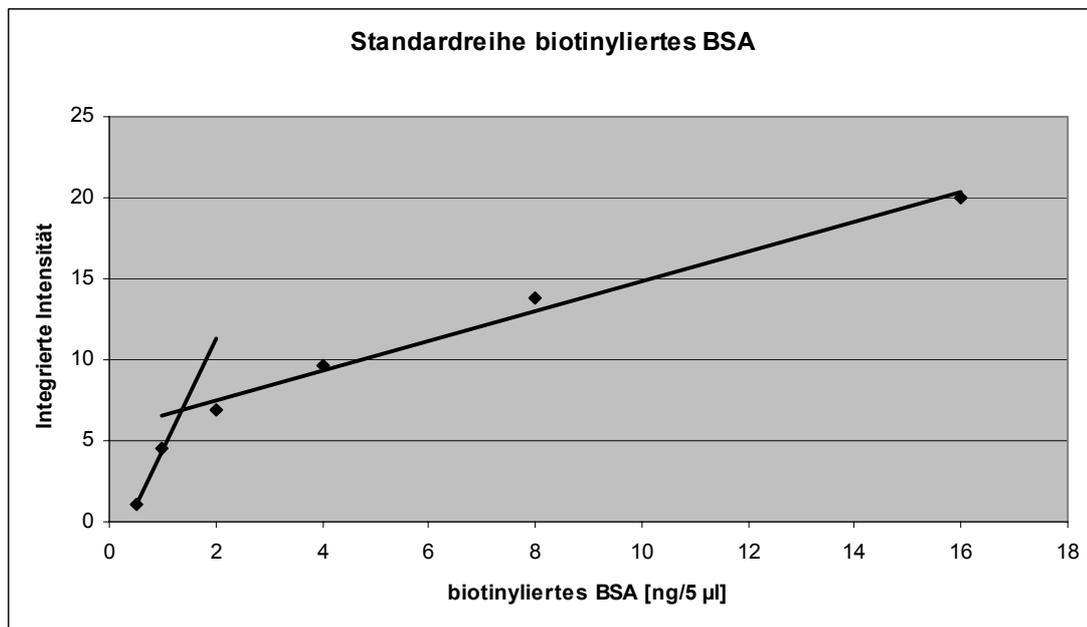


Abb. 17: Linearer Bereich der Standardreihe des biotinylierten BSA.

4.9.2 Quantifizierung der Proben

Nachdem der lineare Bereich der Standardreihe für die Quantifizierung der Biotinylierung des HBsAg etabliert war, konnten nun die Proben quantifiziert werden.

Für eine Quantifizierung mussten die HBsAg Proben im linearen Bereich liegen und wurden deshalb in unterschiedlichen Konzentrationen (63 ng, 32 ng, 16 ng und 8 ng / 5µl) eingesetzt. Zuerst wurde ein Streptavidin Blot durchgeführt, um die Anzahl der freien Sulfhydrylgruppen zu bestimmen. Dazu wurde die Standardreihe aus biotinyliertem BSA, unbehandeltem und biotinyliertem HBsAg auf ein SDS Gel aufgetragen und anschließend geblottet. Danach mit dem Antikörper HB1 und Streptavidin CW800 inkubiert und mit dem Odyssey

System die Fluoreszenzen detektiert. Der Blot ist in Abbildung 18a zu sehen. Man sieht in den Spuren eins bis sechs die Standardreihe und in den folgenden Spuren die Proben in abnehmender Konzentration. In den Konzentrationen 63 ng, 32 ng und 16 ng ist das biotinylierte HBsAg (grün) deutlich zu erkennen. Die zweite Verdünnung (32 ng) lag im linearen Bereich und wurde als Grundlage für die Quantifizierung der freien SH-Gruppen benutzt. Außerdem erkennt man auf dem Blot das unbehandelte HBsAg (PBS) in rot. Vergleicht man die Höhen des P24 und GP27 eines unbehandelten und einer biotinylierten Probe, so sieht man bei der biotinylierten Probe einen deutlichen Shift nach oben. Dies spricht für das Vorhandensein von freien Sulfhydrylgruppen, die durch das Maleimid biotinyliert werden und dadurch ein höheres Molekulargewicht bekommen.

Als nächstes wurde die Anzahl der gesamten Sulfhydrylgruppen bestimmt. Denn durch einen Vergleich der freien Sulfhydrylgruppen mit und ohne Reduktion konnte man schließen, wieviele Sulfhydrylgruppen durch Disulfidbrücken verbunden sind. Dazu wurde die Standardreihe aus biotinyliertem BSA, biotinyliertes und zuerst reduziertes und anschließend biotinyliertes HBsAg auf ein SDS Gel aufgetragen und geblottet. Danach wurde mit dem Antikörper HB1 und Streptavidin CW800 inkubiert und mit dem ODYSSEY® Fluoreszenz Scanner die Fluoreszenzen detektiert. Der Blot ist in Abb. 18b zu sehen. Man sieht in den Spuren eins bis sechs die Standardreihe und in den folgenden Spuren die Proben in abnehmender Konzentration. In den Konzentrationen 63 ng, 32 ng und 16 ng ist das biotinylierte HBsAg (grün) deutlich zu erkennen, allerdings nicht als zwei scharfe Banden für P24 und GP27, sondern als ineinander übergehender Bereich. Die dritte Verdünnung (16 ng) lag im linearen Bereich und wurde als Grundlage für die Quantifizierung der freien SH-Gruppen benutzt. Außerdem erkennt man auf dem Blot das unbehandelte HBsAg (PBS) in rot. In diesem Blot ist ebenfalls deutlich der sehr starke Shift des biotinylierten HBsAg zu erkennen.

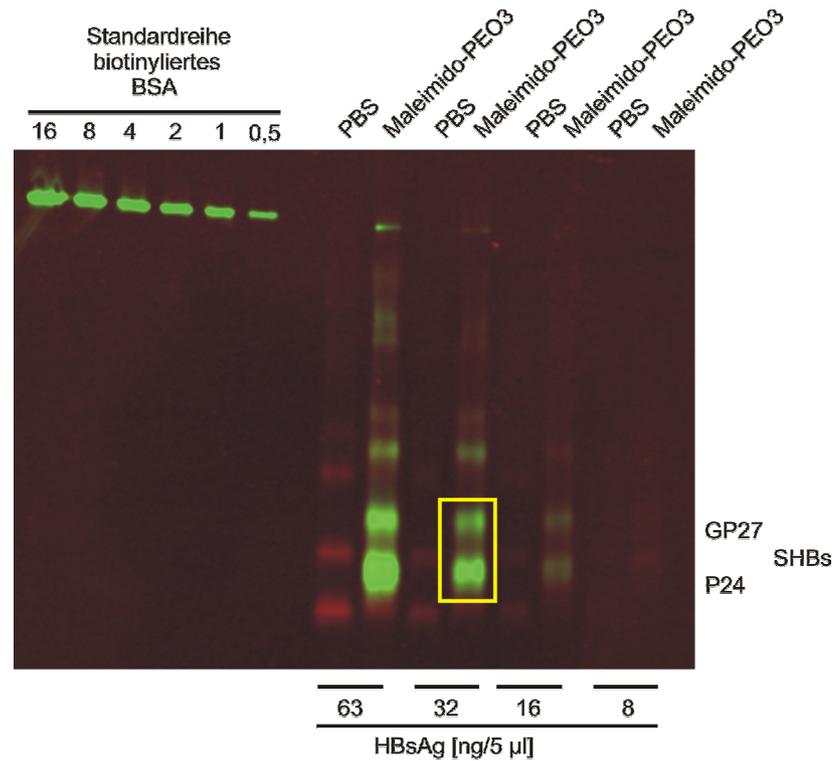


Abb. 18a: Quantifizierung der freien Sulfhydrylgruppen in der nativen HBs-Antigenschleife.

Spur 1-6: biotinyliertes BSA Standardreihe, Spur 8-15 Verdünnungen der Proben.

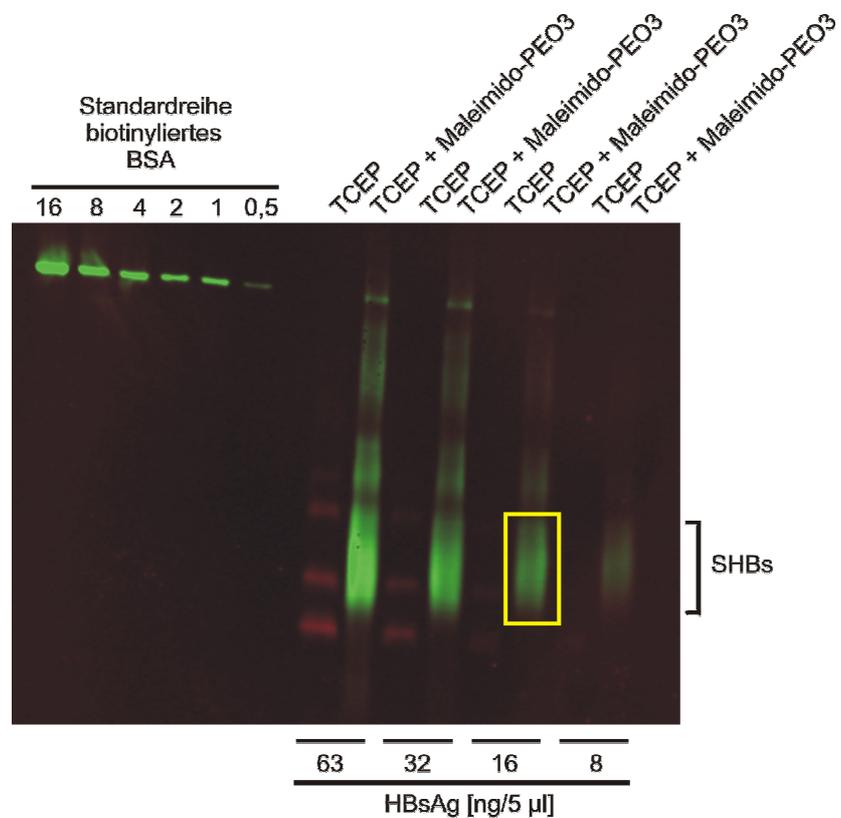


Abb. 18b: Quantifizierung der freien Sulfhydrylgruppen der reduzierten HBs-Antigenschleife.

Spur 1-6: biotinyliertes BSA Standardreihe, Spur 8-15 Verdünnungen der Proben.

Nachdem mittels dem ODYSSEY® Fluoreszenz Scanners die Fluoreszenzen der zwei Blots detektiert wurden, konnten die Standardreihen für die Grundlage der Quantifizierung erstellt und die Anzahl der freien Sulfhydrylgruppen sowie der Disulfidbrücken berechnet werden. Das Ergebnis der Berechnung (siehe 3.11.1 bis 3.11.3) konnte auch durch das veränderte Molekulargewicht der Proben und den daraus resultierenden Shift belegt werden.

Der Versuch zeigte, dass die native (unreduzierte) HBs-Antigenschleife des HBV vier Maleimid-Biotin Moleküle binden kann und damit über vier freie Sulfhydrylgruppen verfügt. Da ein Maleimid-Biotin Molekül ein Molekulargewicht von 0,5 kDa hat, würde das zu einer Verschiebung von 2 kDa des HBsAg im SDS Gel führen: P24 → 26 und GP27 → 29. Dies kann man in Abb. 13a ebenfalls erkennen.

Der Versuch zeigte ebenfalls, dass die reduzierte HBs-Antigenschleife des HBV acht Maleimid-Biotin Moleküle binden kann. Das bedeutet eine Verschiebung des behandelten HBsAg um 4 kDa, also: P24 → 28 und GP27 → 31. Dies ist ebenfalls in Abb. 13b zu erkennen.

Das heißt, in einer nativen HBs-Antigenschleife kommen vier freie SH-Gruppen vor. Die restlichen vier Sulfhydrylgruppen sind über Disulfidbrücken verbunden. Allerdings kann keine Aussage darüber getroffen werden, welche Sulfhydrylgruppen frei und welche verbunden sind.

4.10 Einfluss einer Biotinylierung mit Maleimido-PEO3 auf das HBV

4.10.1 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

In den vorherigen Versuchen wurde gezeigt, dass die freien SH-Gruppen der HBs-Antigenschleife von HBsAg mit Maleimid-Biotin markiert und blockiert werden können. In weiterführenden Versuchen sollte biotinyliertes HBV für Infektionen von primären *Tupaia* Hepatozyten eingesetzt werden. Deswegen musste zuvor getestet werden, ob die Biotinylierung einen Einfluss auf die Eigenschaften des HBV hat. Um die Eigenschaften von biotinyliertem und unbehandeltem HBV zu vergleichen, wurde eine Zentrifugation durch einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten durchgeführt.

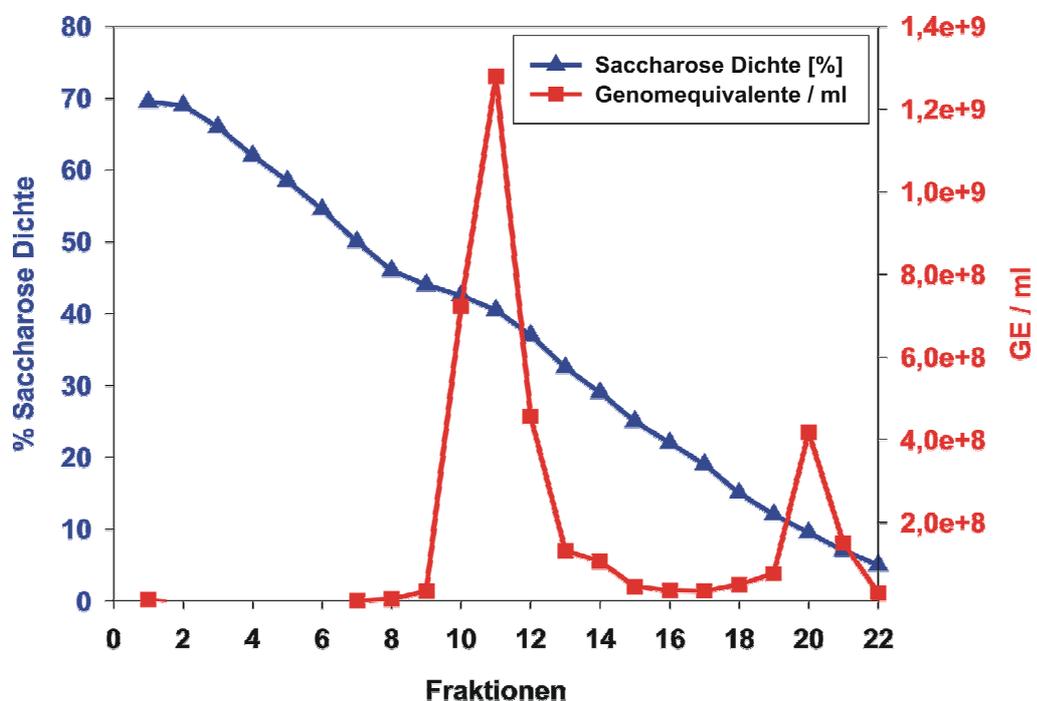
Es wurde ein Gradient mit dem unbehandelten und ein Gradient mit an SH-Gruppen-biotinylierten HBV Genotyp D ID326 gefahren. Der durch die

Zentrifugation entstandene Gradient wurde in 1 ml Fraktionen ausgetropft. Von jeder Fraktion wurde die Saccharose Dichte per Refraktometer und die enthaltenen Genomäquivalente mittels LightCycler PCR der X-Region von HBV bestimmt.

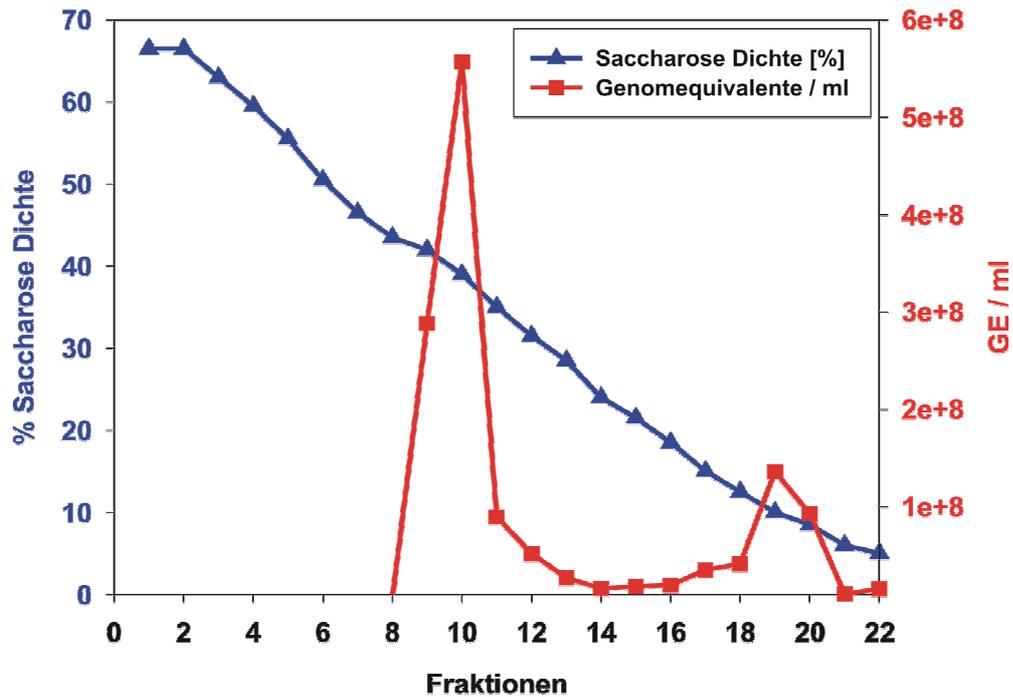
Das Ergebnis des Gradienten, auf dem das unbehandelte HBV aufgetragen wurde, sieht man im Diagramm 8a. Da der Gradient vom Boden her entnommen wurde, nimmt die Saccharose Dichte stetig ab. Ein eindeutiger Peak bei den Genomäquivalenten ist in Fraktion 11 mit 40 % Saccharose (w/w) zu sehen.

Das Diagramm 8b zeigt das Ergebnis des Gradienten, auf dem das biotinylierte HBV aufgetragen wurde. Das HBV und damit der Peak für die Genomäquivalente ist in Fraktion 10 und ebenfalls einer Saccharose Dichte von ca. 40 % zu finden.

Diese beiden Gradienten zeigen, dass eine Biotinylierung keinen Einfluß auf die partikulären Eigenschaften des HBV hat. In beiden Fällen bandiert das HBV bei derselben Saccharose Dichte und ist fast in den gleichen Fraktionen (10 und 11) zu finden.



Diagr. 8a: Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation von unbehandeltem HBV.
 x-Achse: Fraktionen, y-Achse (links): Saccharose Dichte [%] und y-Achse (rechts): GE/ml.



Diagr. 8b: Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation von HBV biotinyliert mit Maleimido-PEO3.

x-Achse: Fraktionen, y-Achse (links): Saccharose Dichte [%] und y-Achse (rechts): GE/ml.

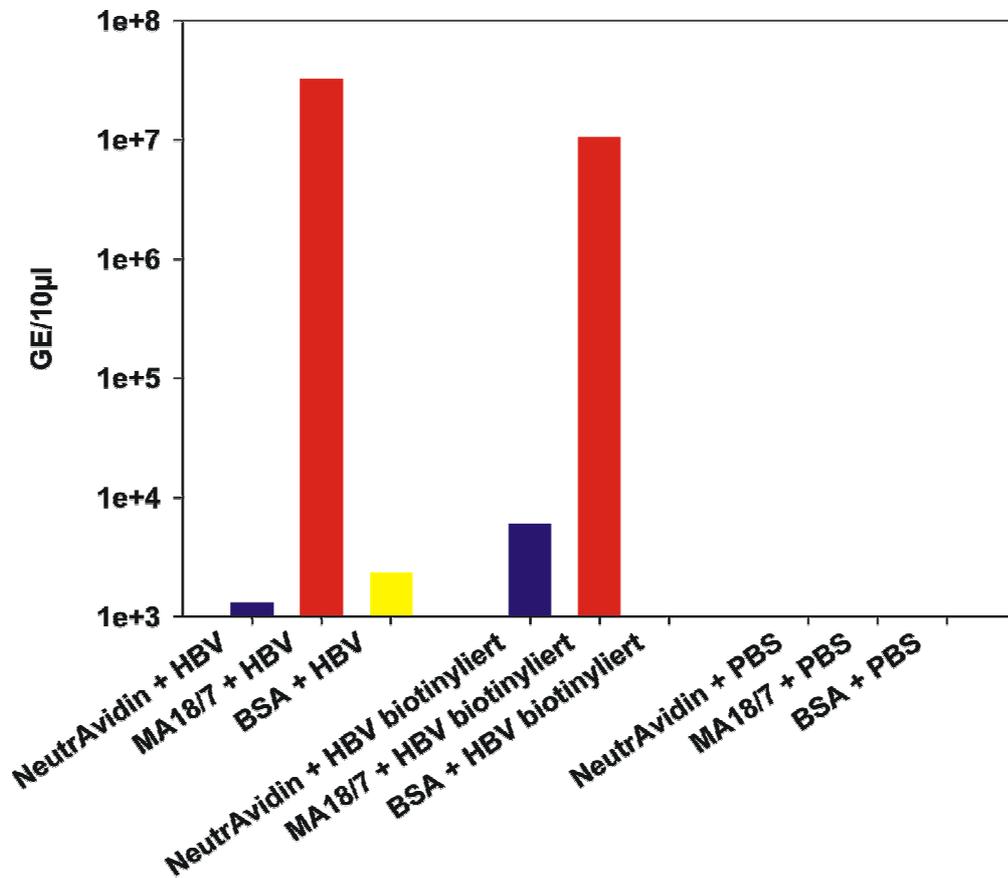
4.10.2 Immunpräzipitation

Um zu zeigen, dass eine Biotinylierung nicht nur des überschüssigen HBsAg, sondern auch der Hepatitis B Viren stattgefunden hat, wurden die behandelten Viren mit NeutrAvidin, MA18/7 und BSA beschichteten Beads immunpräzipitiert, ebenso wie die nicht biotinylierten Viren.

Pro Ansatz wurden 20 µl beschichtete Beads mit 10 µl der Probe für 1 h bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze gewaschen und mit dem High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Fa. Roche) aufgereinigt und eine real-time LightCycler PCR der X-Region von HBV DNA durchgeführt.

Die Immunpräzipitation (Diagr. 9) ergab, dass nicht biotinyliertes HBV nur ganz schwach und unspezifisch an NeutrAvidin Beads bindet (erster blauer Balken). Dagegen bindet HBV sehr stark an MA18/7 beschichtete Beads, da der monoklonale Antikörper spezifisch die AS 20 bis 23 des PräS1 von LHBs erkennt (erster roter Balken). Außerdem bindet HBV nur schwach an BSA beschichtete Beads (erster gelber Balken). Das biotinylierte HBV bindet stärker und spezifisch an NeutrAvidin Beads (zweiter blauer Balken) und weiterhin sehr stark an die MA18/7 Beads (zweiter roter Balken). Eine Bindung von biotinyliertem HBV an BSA beschichtete Beads konnte nicht gezeigt werden, da

wahrscheinlich die Bindungsstellen mit Biotin blockiert sind. Bei den letzten drei Ansätzen handelte es sich um Negativkontrollen zu Bestimmung des Hintergrundes.



Diagr 9: Immunpräzipitation von unbehandeltem und biotinyliertem HBV.

4.11 Einfluss der Disulfidbrücken und freien Sulfhydrylgruppen der HBs-Antigenschleife auf die HBV Infektion von primären *Tupaia* Hepatozyten

Nachdem gezeigt wurde, dass es möglich ist, Hepatitis B Viren mit Maleimid-Biotin zu biotinylieren und dies keinen Einfluss auf die partikuläre Struktur des HBV hat, konnten Infektionsversuche an primären Hepatozyten durchgeführt werden. Mit den weiteren Versuchen sollte geklärt werden, welche Rolle die freien Sulfhydrylgruppen beim Bindungs- und Infektionsvorgang von HBV in Hepatozyten spielen.

Dazu wurden primäre *Tupaia belangeri* Hepatozyten isoliert. Am dritten Tag nach der Isolierung wurde der Infektionsversuch durchgeführt. Das HBV wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Infektionsversuches reduziert, biotinyliert und reduziert mit anschließender Biotinylierung.

HBV vor Bindung an die Zellen behandelt:

Im ersten Eppi wurde das HBV reduziert. In einem zweiten Eppi wurde das HBV biotinyliert. Im dritten Eppi wurde das HBV erst reduziert und dann biotinyliert. Dann wurde das HBV zum Binden für 4 h bei 16 °C auf den Zellen inkubiert. Danach wurde nicht gebundenes Virus mit Waschmedium von den Zellen gewaschen und die Zellen ü. N. im Brutschrank infiziert.

Zellen vor Bindung von HBV behandelt:

Im ersten Ansatz wurden die primären *Tupaia* Hepatozyten reduziert. Im zweiten wurden sie biotinyliert. Im dritten Ansatz wurden die Zellen zuerst reduziert und dann biotinyliert. Danach wurden die Hepatozyten einmal mit Waschmedium gewaschen und das HBV zum Binden für 4 h bei 16 °C zu den Zellen gegeben. Nach der Inkubation wurde nicht gebundenes Virus mit Waschmedium von den Zellen gewaschen und die Zellen ü. N. bei 37 °C infiziert.

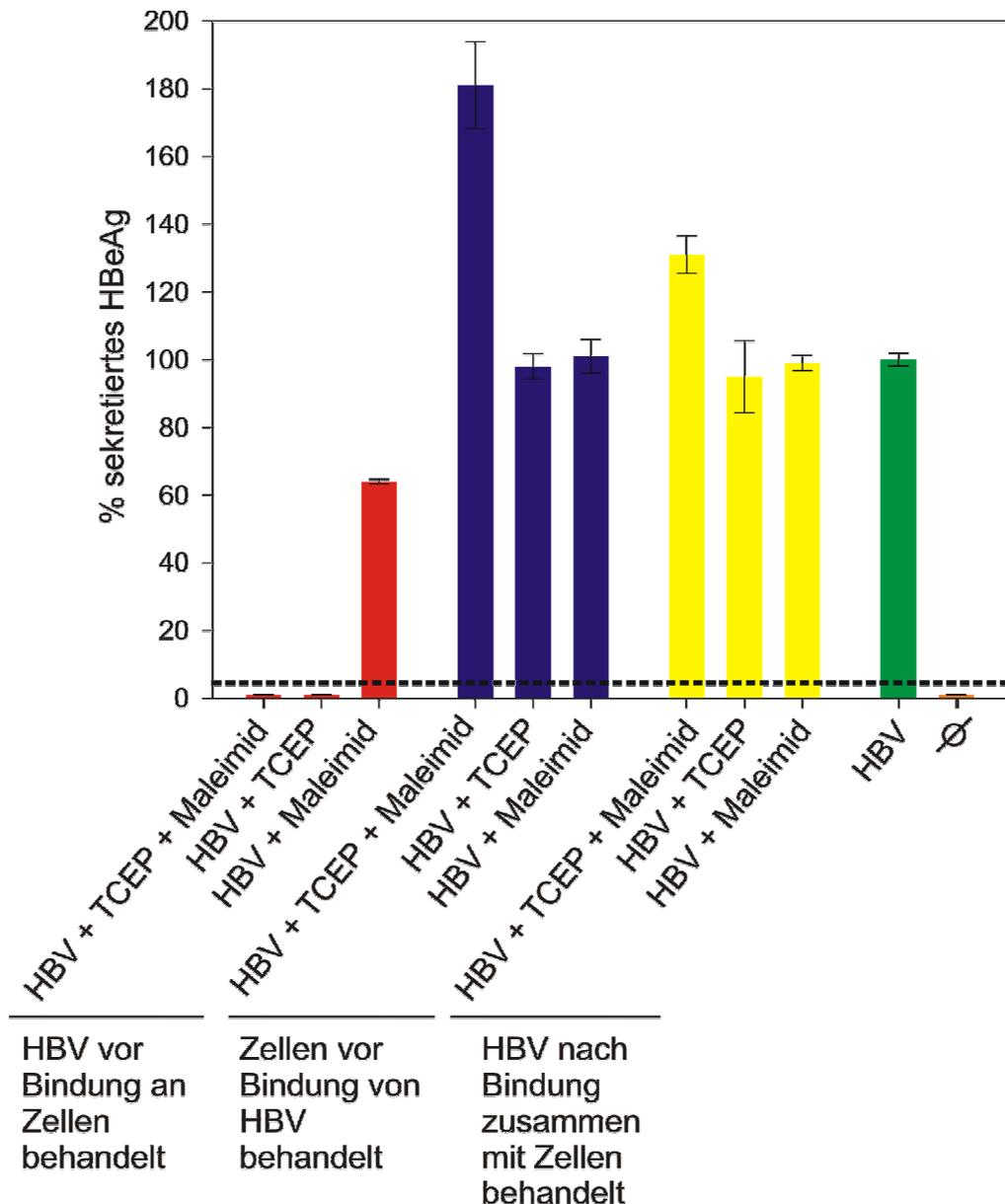
HBV nach Bindung zusammen mit Zellen behandelt:

Das HBV wurde für 4 h bei 16 °C in PBS⁺⁺ auf die Hepatozyten gegeben, um eine Bindung zu erlauben. Danach wurde nicht gebundenes HBV mit Waschmedium entfernt. Anschließend wurden die Zellen in einem Ansatz reduziert. Im zweiten Ansatz biotinyliert und im letzten Ansatz erst reduziert und anschließend biotinyliert. Danach wurden die Hepatozyten einmal mit Waschmedium gewaschen ü. N. bei 37 °C infiziert.

Am nächsten Tag (T1) wurde bei allen Ansätzen das Medium mit 600 µl HGM gewechselt, ebenso an den Tagen 4, 7, 11 und 15. Am letzten Tag wurden die Zellen wie beschrieben einem Zellviabilitäts Test unterzogen.

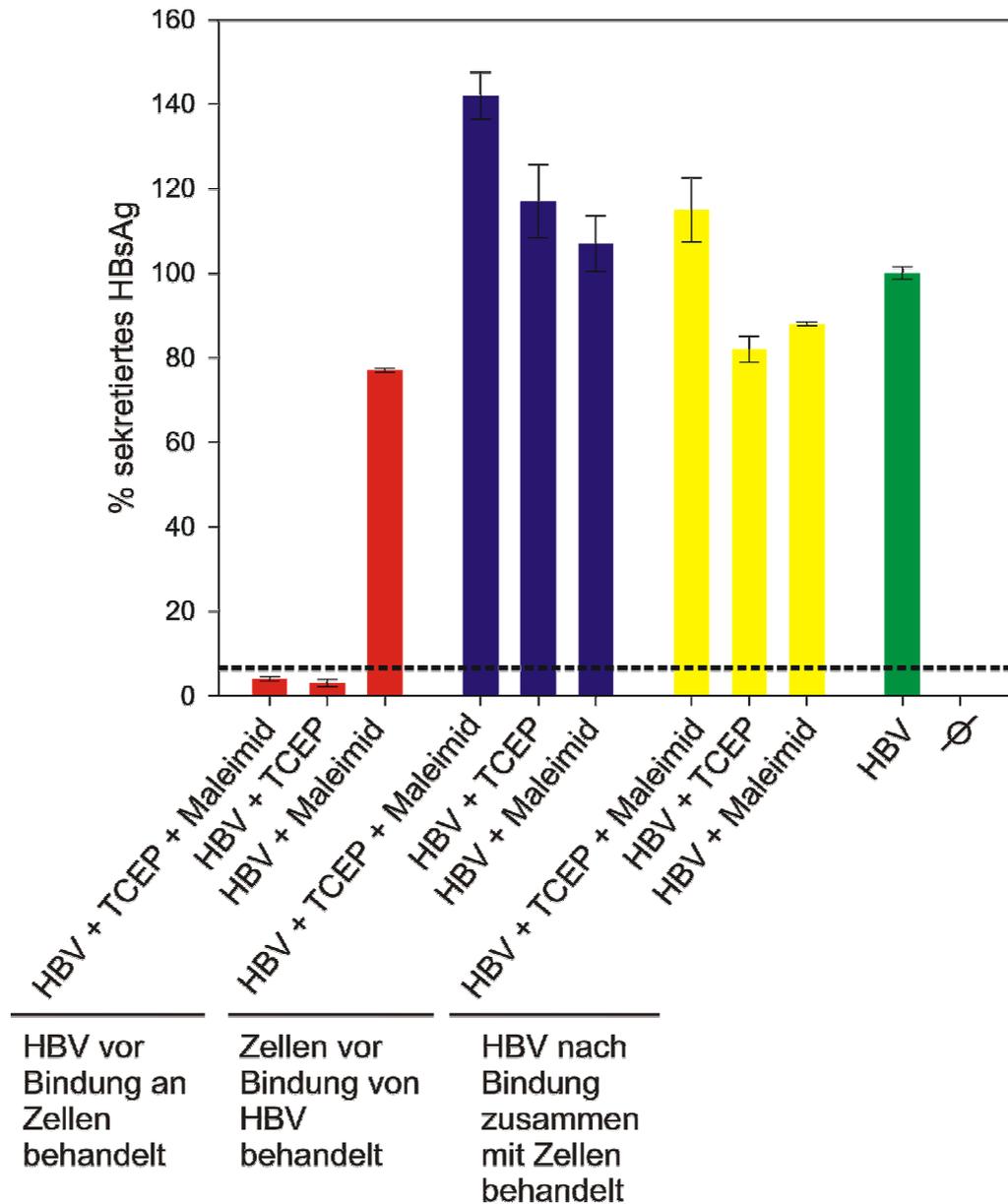
Der Infektionserfolg wurde anhand der sekretierten viralen Proteine HBeAg (Diagr. 10a) und HBsAg (Diagr. 10b) dargestellt. Beide Diagramme zeigen deutlich, dass HBV nicht mehr in der Lage ist, eine Infektion zu etablieren, wenn man das Virus vor der Bindung mit TCEP reduziert oder zuerst reduziert und dann biotinyliert. Wurde das HBV vorher nur biotinyliert und damit die freien SH-Gruppen blockiert, so ist die Infektion um ca. 40 % reduziert. Werden die Zellen vor der HBV Bindung reduziert und biotinyliert, so führt das zu einer Steigerung der Infektion um ca. 60 %. Eine Reduzierung oder Biotinylierung der Zellen

alleine hat keinen Einfluss auf die Infektion. Eine Reduzierung mit anschließender Biotinylierung nach der Bindung von HBV zeigt eine leichte Steigerung der Infektion um ca. 40 %. Eine Behandlung nur mit TCEP oder Maleimid-Biotin ändert nichts an der Infektionseffizienz von HBV.



Diagr. 10a: Infektionsversuch an primären *Tupaia* Hepatozyten mit zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Infektionsversuches reduzierten und biotinylierten Hepatitis B Viren.

Nachweis des sezernierten HBsAg an Tag 15. Die gestrichelte Linie bezeichnet den cut off des Versuches.



Diagr. 10b: Infektionsversuch an primären *Tupaia* Hepatozyten mit zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Infektionsversuches reduzierten und biotinylierten Hepatitis B Viren.

Nachweis des sezernierten HBsAg an Tag 15. Die gestrichelte Linie bezeichnet den cut off des Versuches.

4.12 Einfluss der Protein-Disulfid-Isomerase vor, während und nach der Bindung von HBV

Nachdem gezeigt wurde, dass eine Reduktion von HBV mit TCEP vor der Bindung die Infektion von primären *Tupaia* Hepatozyten inhibiert, sollte nun getestet werden, welchen Einfluss die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) auf die HBV Infektion hat. Die PDI reduziert, isomerisiert und formiert Disulfidbindungen. Sie ist bei allen lebenden Zellen zu finden. Innerhalb der Zellen formiert sie Disulfidbrücken. Auf der Zelloberfläche werden dagegen

Disulfidbrücken gespalten. Andere Viren, wie z. B. HIV (Fenouillet et al., 2001; Ryser et al., 2005) oder SV40 (Schelhaas et al., 2007) benötigen die PDI auf der Wirtszelloberfläche, um eine Infektion zu etablieren. Ob dies auch für HBV zutrifft, sollte getestet werden.

Dazu wurden primäre *Tupaia belangeri* Hepatozyten isoliert und auf 12 well Zellkulturplatten, die mit einer 1:20 Verdünnung von Matrigel beschichtet waren, mit 10 % FKS / HGM ausgesät. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel mit 600 µl HGM durchgeführt und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am dritten Tag nach der Isolierung wurde der Infektionsversuch durchgeführt.

Die PDI wurde in einer Titrationsreihe mit 1000 ng, 500 ng, 250 ng und 125 ng / 300 µl im Versuch eingesetzt. Zusätzlich wurde GSH in einer Konzentration von 1 mM verwendet.

Versuchsteil: Vor Bindung

Das HGM wurde von den Hepatozyten genommen, die PDI Verdünnungen in die entsprechenden wells gegeben und die Platte 4 h bei 16 °C inkubiert. Danach wurden die PDI Verdünnungen abgenommen und die vorbereiteten HBV Verdünnungen auf die Zellen gegeben. Nun wurde wieder für 4 h bei 16 °C inkubiert, um eine Bindung, aber keine Aufnahme des HBV zu erreichen. Nach der Inkubation wurde das Inokulum mit dem HBV abgenommen und die Zellen 1 x mit Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundenes HBV zu entfernen. Anschließend wurde in jedes well 600 µl HGM gegeben und die Zellen ü. N. bei 37 °C inkubiert, damit gebundene Hepatitis B Viren infizieren konnten.

Versuchsteil: Während Bindung

Die PDI Verdünnung wurde zusammen mit der HBV Verdünnung und dem GSH im Eppi für 4 h bei 16 °C inkubiert. Das GSH wurde bei diesem Ansatz in das Eppi zugefügt, weil man das entsprechende reduzierende Umgebungsmillieu für die PDI herstellen wollte. Bei den Versuchsteilen vor und nach wurde die PDI direkt auf die Hepatozyten gegeben, welche ein natürliches reduzierendes Millieu aufweisen. Dies sollte bei dem Versuchsteil „während Bindung“ durch das GSH im Eppi nachgestellt werden. Als Kontrolle wurde das GSH auch alleine mit dem HBV für 4 h bei 16 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das

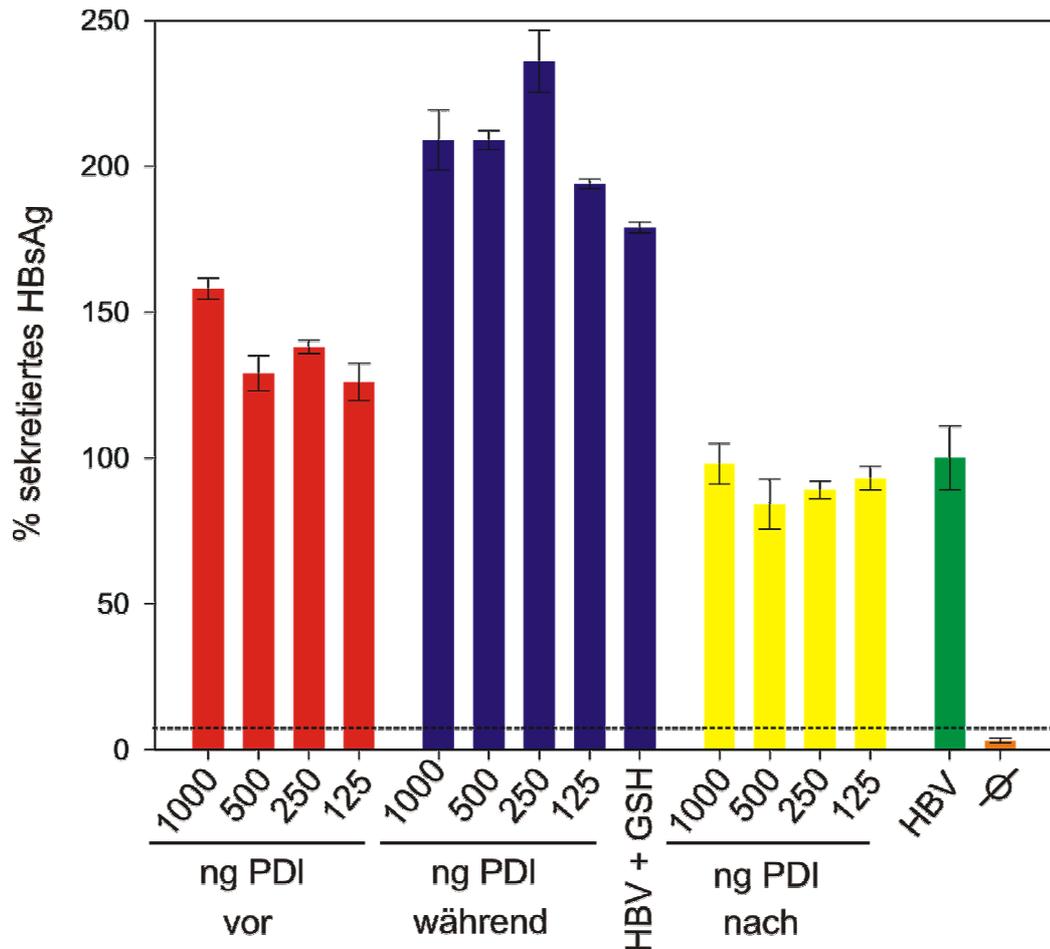
HGM von den Hepatozyten genommen und die Ansätze auf die Zellen gegeben. Es folgte für 4 h bei 16 °C eine Bindung von HBV. Danach wurden die Inokula abgenommen und die Zellen 1 x mit Waschmedium gewaschen, um nicht gebundenes HBV zu entfernen. Anschließend wurde 600 µl HGM auf die Zellen gegeben und ü. N. bei 37 °C inkubiert, um eine Infektion zu erlauben.

Versuchsteil: Nach Bindung

Das HGM wurde von den Hepatozyten genommen und durch die HBV Verdünnungen ersetzt. Es folgte eine Bindung von HBV für 4 h bei 16 °C. Danach wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen 1 x mit Waschmedium gewaschen, um nicht gebundenes HBV zu entfernen. Dann wurden die PDI Verdünnungen auf die Hepatozyten gegeben und für 4 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde die PDI Verdünnung von den Zellen genommen, durch 600 µl HGM ersetzt und die Zellen ü. N. bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag (T1) wurde bei allen Ansätzen das Medium mit 600 µl HGM gewechselt, genau wie an den Tagen 4, 7, 11 und 15. Am letzten Tag wurden die Zellen wie beschrieben einem Zellviabilitäts Test unterzogen. In den gesammelten Überständen wurde das HBsAg bestimmt.

Das Ergebnis des Versuches ist in Diagramm 11 zu sehen. Es zeigt, dass eine Vorbehandlung der Hepatozyten mit der PDI zu einer leichten Steigerung der HBV Infektion führt. Allerdings ist diese Erhöhung nicht dosisabhängig (rote Balken). Sind die PDI und das GSH während des Infektionsvorganges anwesend, so verdoppelt sich der Infektionserfolg des HBV (blaue Balken). Allerdings ist gut zu erkennen, dass die Erhöhung der Infektionseffizienz nicht primär durch die PDI ausgelöst wird, sondern durch das GSH im Ansatz (letzter blauer Balken). Eine Inkubation der Zellen nach der Bindung von HBV hat keinen Einfluss auf die Infektion (gelbe Balken).



Diagr. 11: Infektionsversuch von HBV unter dem Einfluss der PDI und GSH.

HBsAg mittels ELISA nachgewiesen. Die gestrichelte Linie bezeichnet den cut off des Versuches.

4.13 Einfluss von reduziertem, oxidiertem Glutathion und TCEP auf die HBV Infektion

Der vorherige Versuch zeigte, dass GSH eine Steigerung der Infektion erzeugen kann. Jede Zelle besitzt ein hohes Reduktionspotential in Form von reduziertem Glutathion (GSH). GSH ist die Grundlage vieler biologischen Oxidationsreaktionen in der Zelle. Durch die Oxidation zweier GSH Moleküle entsteht ein Molekül oxidiertes Glutathion (GSSG). Das Verhältnis der beiden Formen in lebenden Zellen ist GSH:GSSG = 400:1. Um den Einfluss von Glutathion auf die Infektion zu untersuchen, wurde ein Infektionsversuch an Hepatozyten durchgeführt. Außerdem wurden mit denselben Glutathion- und TCEP-Verdünnungen HBsAg behandelt und im Western Blot untersucht.

Die primären *Tupaia belangeri* Hepatozyten wurden isoliert und am dritten Tag nach der Isolierung der Infektionsversuch durchgeführt. Die verwendeten

Reagenzien waren reduziertes L-Glutathion, oxidiertes L-Glutathion und TCEP. Alle drei wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 10 mM, 1 mM, 0,1 mM, 0,01 mM. Die Stammlösungen wurden in HBSS⁺⁺ angesetzt und der pH-Wert von reduziertem und oxidiertem Glutathion wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt und die Lösungen sterilfiltriert.

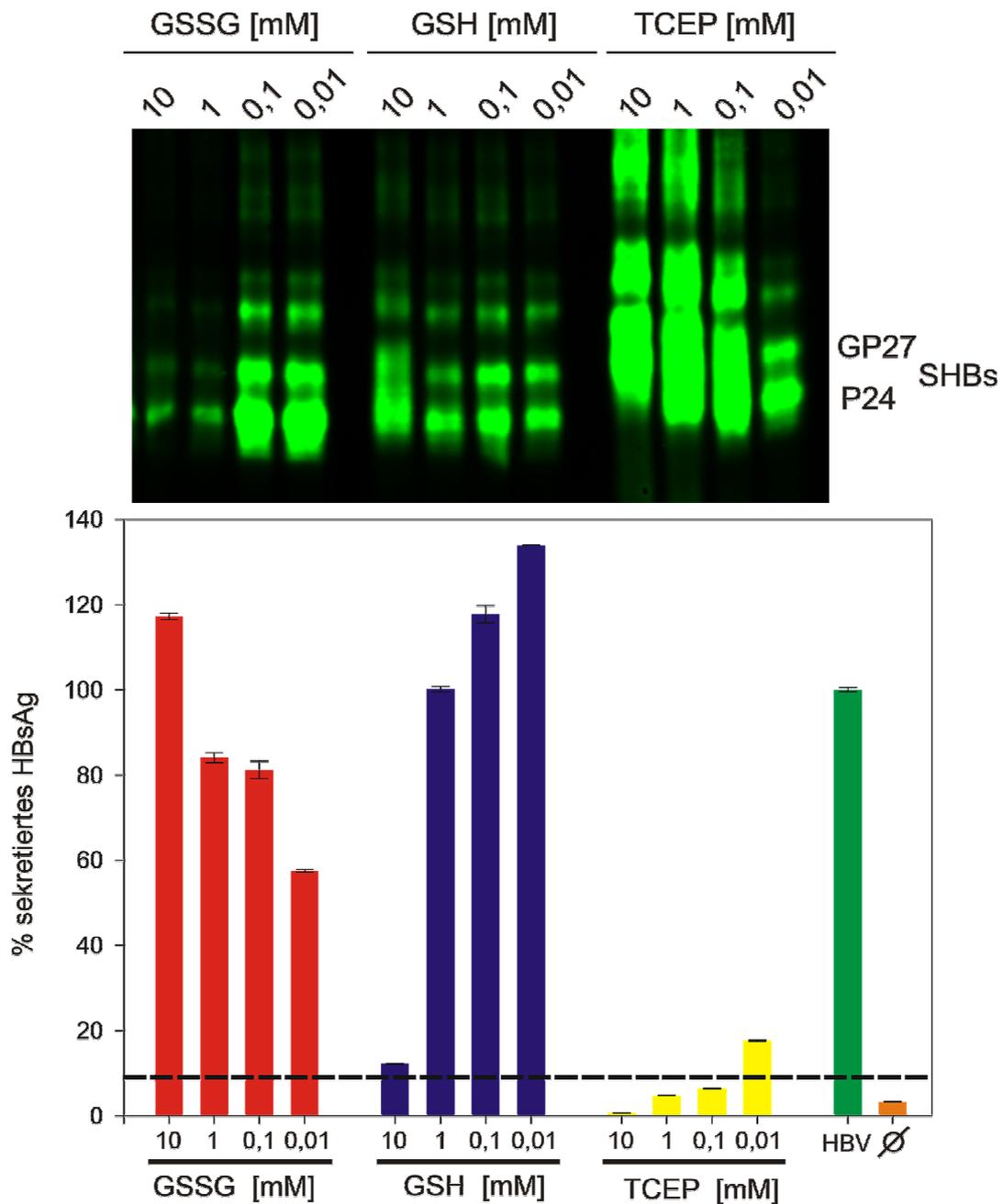
Das HBV wurde zusammen mit den entsprechenden Konzentrationen in einem Gesamtansatz von 20 µl für 1 h bei RT schüttelnd inkubiert. Danach wurde das Medium von den Zellen genommen und pro well 300 µl HBSS⁺⁺ vorgelegt. Anschließend wurden jeweils 10 µl vorbehandelte Virusverdünnung pro well hinein pipettiert. Dann wurden die Platten 4 h bei 16 °C inkubiert, um eine Bindung, aber keine Aufnahme des HBV zu gewährleisten. Danach wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen 1 x mit Waschmedium gewaschen. Schließlich wurden 600 µl HGM in die Platten gegeben und die Zellen ü. N. bei 37 °C inkubiert, um eine Infektion zu erlauben. Am nächsten Tag wurde das Medium erneut gewechselt sowie an den Tagen 4, 7, 11 und 15. Am letzten Tag wurden die Zellen wie beschrieben einem Zellviabilitäts Test unterzogen. In den gesammelten Überständen wurde das HBsAg bestimmt.

Außerdem wurde HBsAg desselben Spenders, mit dessen Virus auch infiziert wurde, mit denselben Verdünnungen von oxidiertem, reduziertem Glutathion und TCEP für 1 h bei 16 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde zu den Ansätzen jeweils 10 % Kaninchen Serum gegeben und die Ansätze über die illustraTM MicroSpinTM S-400 HR Columns (Fa. GE Healthcare) von dem überschüssigen reduziertem, oxidiertem GSH sowie dem TCEP gereinigt. Bei diesem System geht durch die Abtrennung über die Silica-Säulchen die Hälfte des HBsAg verloren. Deswegen wurde die doppelte Menge an HBsAg eingesetzt. Danach wurde das behandelte HBsAg für 2 h bei RT auf dem Schüttler mit Maleimid-Biotin biotinyliert. Dann wurden die Proben in einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Blot wurde mit Streptavidin CW800 inkubiert und die Fluoreszenz mit dem ODYSSEY® Fluoreszenz Scanner detektiert.

Das Diagramm 12 zeigt oben das Ergebnis des Odyssey Blots des behandelten HBsAg und unten das sekretierte HBsAg der infizierten Hepatozyten. Bei einer Konzentration von 10 mM des oxidierten GSSG wird die HBV Infektion um 20 % gesteigert. Niedrigere Konzentrationen führen zu einer verringerten Infektion.

Reduziertes GSH kann mit einer Konzentration von 10 mM eine HBV Infektion fast komplett inhibieren. Niedrigere Konzentrationen zeigen keinen oder einen leicht steigernden Effekt. Dies spiegelt sich auch im Blot wieder. Bei einer Konzentration von 10 mM sind keine deutlich getrennten Banden für P24 und GP27 zu erkennen. Diese sind nur bei den anderen Verdünnungen, die keinen inhibierenden Effekt auf die HBV Infektion hatten, deutlich zu erkennen. TCEP konnte in den ersten drei Verdünnungen eine komplette und in der geringsten Verdünnung auch noch eine Inhibition um 80 % etablieren. Auch dieses Ergebnis wird durch den Blot bestätigt, da bei den ersten drei Verdünnungen keine deutlichen Banden für P24 und GP27 zu erkennen sind. Die letzte Konzentration von 0,01 mM konnte eine Infektion nicht komplett inhibieren. Dort sind zwei Banden für das SHBs zu sehen.

Der Versuch zeigt, dass ein zu stark reduktives Millieu, gleichgültig ob natürlich wie durch das GSH oder chemisch durch das TCEP erzeugt, die Infektion von HBV inhibieren kann. Der Effekt von 10 mM GSH entspricht dabei dem von ungefähr 0,01 mM TCEP. Dies entspricht auch dem Ausmaß der SH-Biotinylierung durch die jeweiligen Konzentrationen des Reduktionsmittels. Ein natürlicher Regulator des Reduktionspotentials der Zellen wie das oxidierte Gluthation kann eine HBV Infektion steigern, wenn er ein oxidierendes Millieu erzeugt.



Diagr. 12: Einfluss von oxidiertem Gluthation (GSSG), reduziertem Gluthation (GSH) und TCEP auf die Infektion von HBV.

Oben: Blot von mit GSSG, GSH und TCEP behandeltem HBsAg. Detektion mit Streptavidin CW800 mit dem Odyssey System.

Unten: Infektionsversuch von mit GSSG, GSH und TCEP behandeltem HBV. Die gestrichelte Linie bezeichnet den cut off des Versuches.

4.14 Infektion primärer *Tupaia* Hepatozyten mit HBV, das in verschiedenen Konzentrationen biotinyliert und reduziert war

Wenn man HBV vor der Bindung reduziert, kommt es zu einer kompletten Inhibition der Infektion. Biotinyliert man das HBV vor der Infektion, so kommt es zu einer gewissen Inhibition der Infektion. Dies sollte nochmals überprüft und

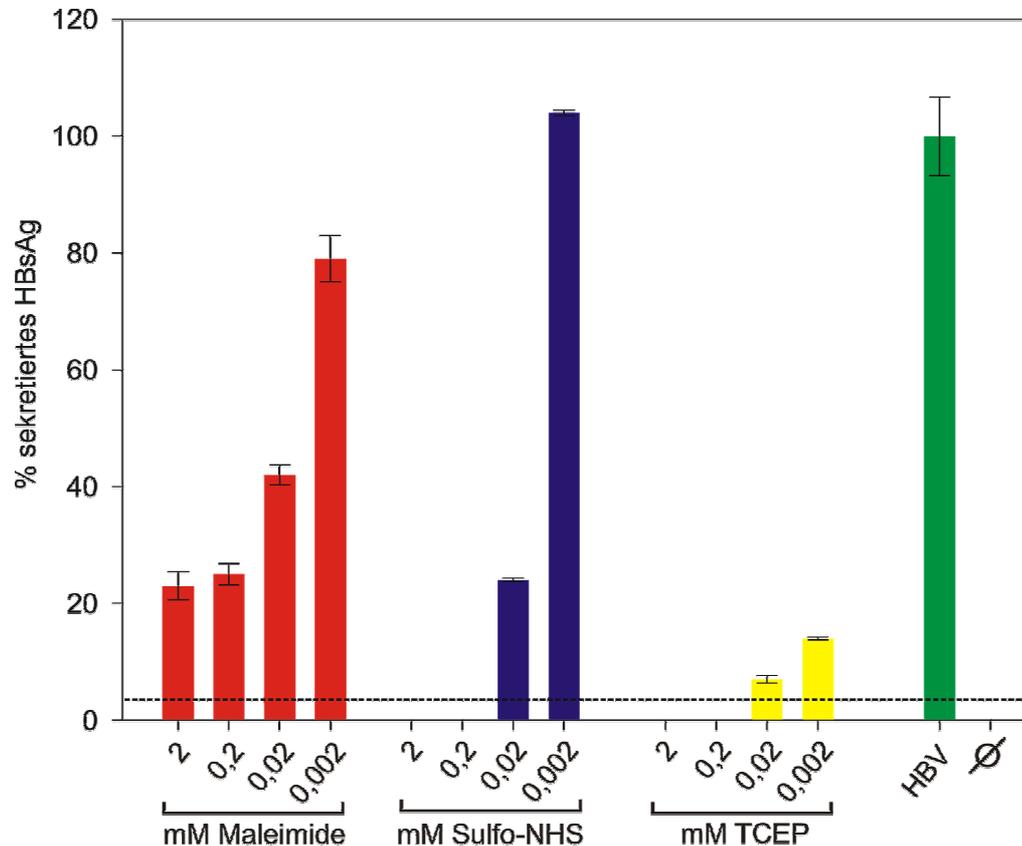
zusätzlich der Einfluss einer Biotinylierung der Aminogruppen auf der Oberfläche von HBV für die Infektion getestet werden.

Für den Versuch wurden primäre *Tupaia belangeri* Hepatozyten isoliert und auf 12 well Zellkulturplatten mit 10 % FKS / HGM ausgesät. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel mit 600 µl HGM durchgeführt und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am dritten Tag nach der Isolierung wurde der Infektionsversuch durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien waren reduzierendes TCEP, Sulfo-NHS-Biotin und Maleimido-PEO3-Biotin. Alle drei wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 2 mM, 0,2 mM, 0,02 mM, 0,002 mM. Die Stammlösungen wurden in PBS⁺⁺ mit den entsprechenden pH-Werten angesetzt.

Zuerst wurden die Viren von Genotyp D in einem 25 µl Ansatz mit den unterschiedlichen Konzentrationen bei 16 °C inkubiert (TCEP: 15 min, Sulfo-NHS-Biotin: 30 min und Maleimido-PEO3-Biotin: 2 h). Anschließend wurde zu den Ansätzen 10 % Kaninchen Serum gegeben und die Ansätze über die illustra™ MicroSpin™ S-400 HR Columns (Fa. GE Healthcare) von den überschüssigen Reagenzien gereinigt. Bei diesem System geht durch die Abtrennung über die Silica-Säulchen die Hälfte des HBV verloren. Deswegen wurde die doppelte Menge an HBV in diesem Versuch eingesetzt. Danach wurde das Medium von den Hepatozyten genommen, jeweils 300 µl PBS⁺⁺ in die wells vorgelegt und die entsprechende Menge Virusverdünnung hinein pipettiert. Nun wurden die Platten 4 h bei 16 °C inkubiert, um eine Bindung, aber keine Aufnahme von HBV zu gewährleisten. Danach wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen 1 x mit Waschmedium gewaschen. Schließlich wurden 600 µl HGM in die Platten gegeben und die Zellen ü. N. bei 37 °C inkubiert, um eine Infektion zu erlauben. Am nächsten Tag wurde das Medium erneut gewechselt sowie an den Tagen 4, 7, 11 und 15. Am letzten Tag wurden die Zellen wie beschrieben einem Zellviabilitäts Test unterzogen. In den gesammelten Überständen wurde mittels Sandwich-ELISA das HBsAg bestimmt.

Im Diagramm 13 ist das sekretierte HBsAg der infizierten Hepatozyten dargestellt. Das Diagramm bestätigt vorherige Ergebnisse. Eine Biotinylierung der freien SH-Gruppen auf der HBV Oberfläche mit Maleimid inhibiert eine Infektion dosisabhängig (rote Balken). Eine Vorbehandlung von HBV mit Sulfo-

NHS, welches die Aminogruppen blockiert, inhibiert ebenfalls dosisabhängig eine HBV Infektion bis zu einer Konzentration von 0,02 mM. Eine Konzentration von 0,002 mM hat keinen Effekt mehr (blaue Balken). Die größte inhibitorische Wirkung hat eine Vorbehandlung des HBV mit TCEP. Eine Konzentration von 0,002 mM TCEP führt noch zu einer 80 %-igen Inhibition der Infektion.



Diagr. 13: Einfluss einer Vorbehandlung von HBV Genotyp D mit Maleimid, Sulfo-NHS und TCEP auf die Infektion.

Nachweis des HBsAg. Die gestrichelte Linie bezeichnet den cut off des Versuches.

4.15 Infektion mit in verschiedenen Konzentrationen biotinylierten und reduzierten primären *Tupaia* Hepatozyten

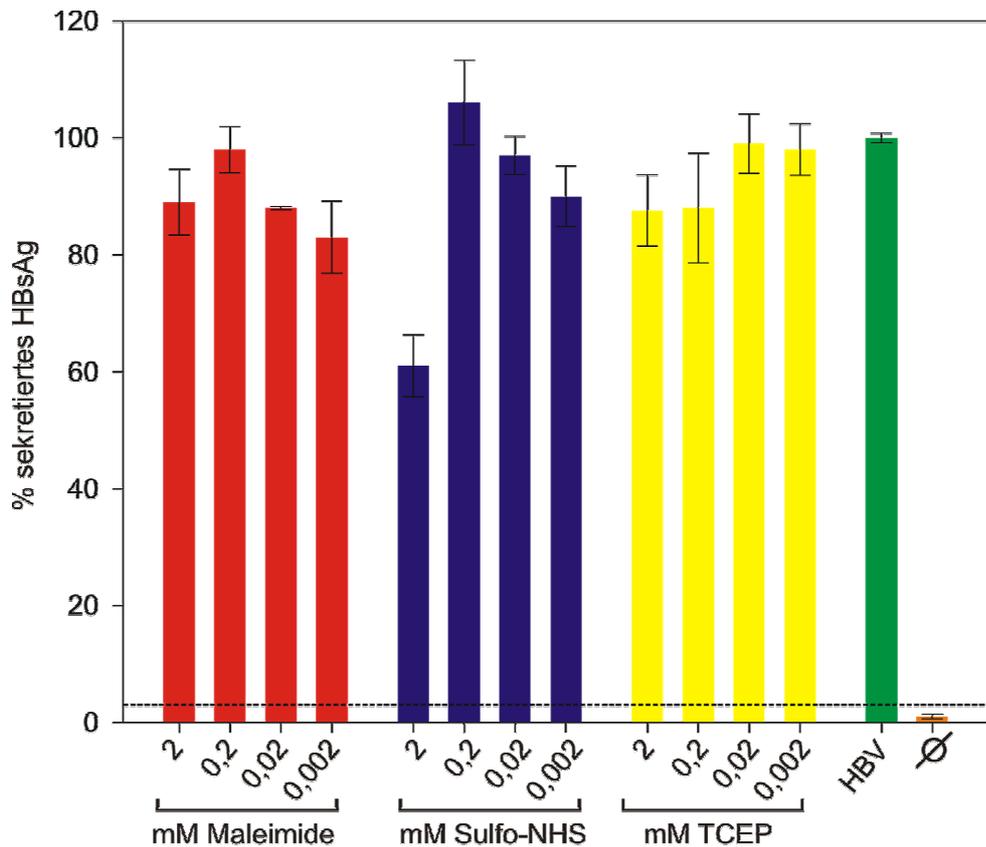
Als nächstes sollte getestet werden, wie sich eine Vorbehandlung der Zellen mit Maleimid, Sulfo-NHS und TCEP auf eine Infektion von HBV auswirkt.

Dazu wurden primäre *Tupaia belangeri* Hepatozyten isoliert und auf 12 well Zellkulturplatten ausgesät. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel mit 600 µl HGM durchgeführt und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am dritten Tag nach der Isolierung wurde der Infektionsversuch durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien waren reduziertes TCEP, Sulfo-NHS und Maleimid. Alle drei wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 2 mM, 0,2 mM, 0,02 mM,

0,002 mM. Die Stammlösungen wurden in PBS⁺⁺ mit den für die Reagenzien entsprechenden pH-Werten angesetzt.

Das Medium wurde von den Zellen genommen, jeweils 300 µl der entsprechenden Verdünnung auf die Hepatozyten gegeben und bei 16 °C inkubiert (TCEP: 15 min, Sulfo-NHS: 30 min und Maleimid: 2 h). Anschließend wurden die Reagenzienverdünnungen abgenommen und die Zellen 1 x mit Waschmedium gewaschen. Dann wurden 300 µl PBS⁺⁺ in die Vertiefungen vorgelegt und 10 µl Virusverdünnung dazu pipettiert. Nun wurden die Platten 4 h bei 16 °C inkubiert, um eine Bindung, aber keine Aufnahme von HBV zu erlauben. Danach wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen 1 x mit Waschmedium gewaschen. Schließlich wurden 600 µl HGM in die Platten gegeben und die Zellen ü. N. bei 37 °C inkubiert, um eine Infektion zu erlauben. Am nächsten Tag wurde das Medium erneut gewechselt sowie an den Tagen 4, 7, 11 und 15. Am letzten Tag wurden die Zellen wie beschrieben einem Zellviabilitäts Test unterzogen. In den gesammelten Überständen wurde das HBsAg bestimmt.

Das Diagramm 14 zeigt das sekretierte HBsAg des Infektionsversuches. Eine Biotinylierung der Sulfhydrylgruppen der Zelloberfläche beeinflusst eine HBV nicht (rote Balken). Eine Biotinylierung der Aminogruppen der Zelloberfläche mit Sulfo-NHS mit einer Konzentration von 2 mM inhibiert die HBV Infektion um 40 %. Niedrigere Konzentrationen haben keinen Effekt auf die HBV Infektion (blaue Balken). Wird die Oberfläche der Hepatozyten vorher mit TCEP reduziert, zeigt sich kein Effekt auf die HBV Infektion (gelbe Balken).



Diagr. 14: Einfluss einer Vorbehandlung der Hepatozyten mit Maleimid, Sulfo-NHS und TCEP auf die HBV Infektion.

Nachweis des HBsAg. Die gestrichelte Linie bezeichnet den cut off des Versuches.

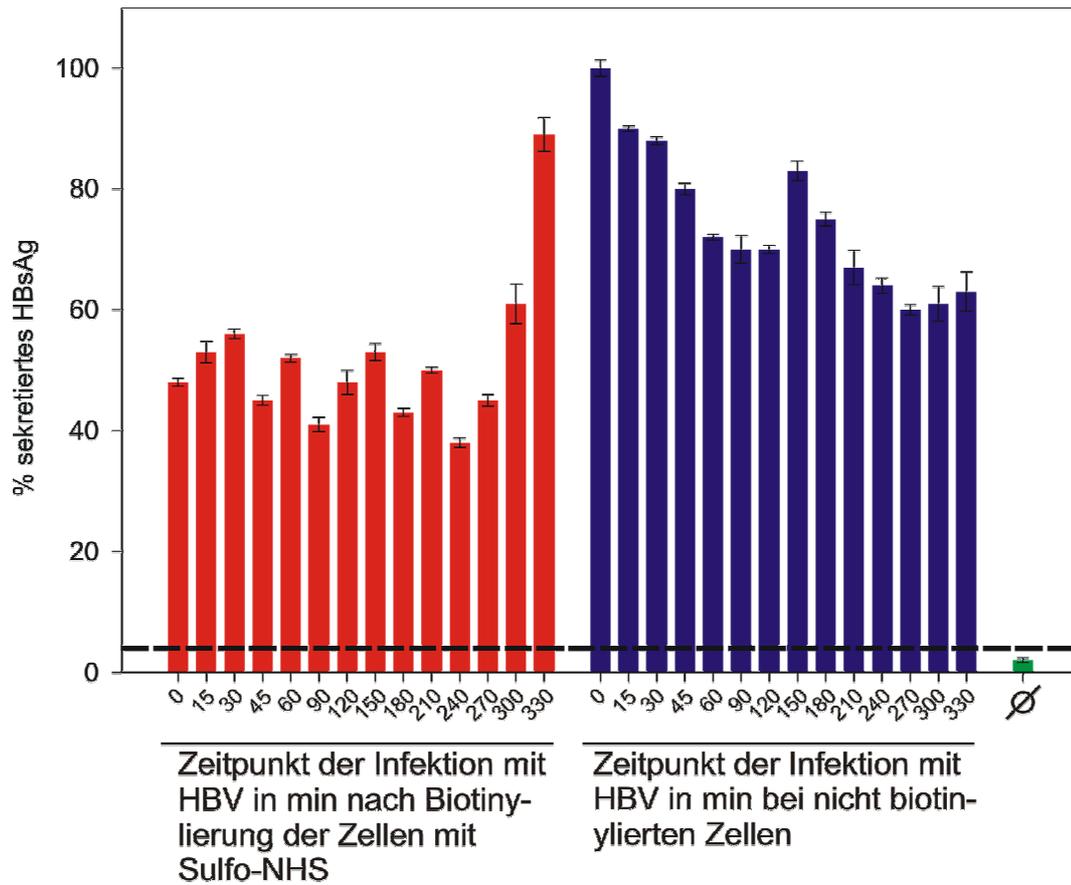
4.16 Kinetik der HBV Infektion von biotinylierten primären *Tupaia* Hepatozyten

Der zuvor durchgeführte Infektionsversuch zeigte, dass eine Biotinylierung der Aminogruppen der Hepatozytenoberfläche mit Sulfo-NHS zu einer Inhibition der HBV Infektion führt. Somit könnte man den HBV Rezeptor auf der Zelloberfläche markiert haben. Um genauer zu testen, ob der HBV Rezeptor auf der Zelloberfläche markiert und neusynthetisiert wird, wurde ein Infektionsversuch durchgeführt, bei dem die gesamte Hepatozytenoberfläche mit Sulfo-NHS markiert bzw. der Rezeptor blockiert wurde. An bestimmten Zeitpunkten nach der Biotinylierung wurden die Zellen mit HBV infiziert, um zu sehen, ab welchem Zeitpunkt sich der der HBV Rezeptor neu gebildet hat. Eine HBV Infektion kann nur an einem nicht biotinylierten Rezeptor stattfinden, der erst wieder neu synthetisiert werden musste.

Dazu wurden primäre *Tupaia belangeri* Hepatozyten isoliert und ausgesät. Am dritten Tag nach der Isolierung wurde die Kinetik des Infektionsversuches an biotinylierten *Tupaia* Hepatozyten durchgeführt. Das HGM wurde abgenommen

und die Zellen 1 x mit PBS⁺⁺ mit pH 8 gewaschen. Dann wurden die primären Hepatozyten mit 400 µl 5 mM Sulfo-NHS biotinyliert. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 16 °C, damit der biotinylierte Rezeptor nicht endozytiert werden konnte. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und die Zellen auf Eis 1 x mit PBS⁺⁺ mit pH 8 gewaschen. Danach wurden 300 µl HGM auf die Zellen gegeben. Jetzt wurden an definierten Zeitpunkten die Zellen mit 20 µl Virusverdünnung infiziert und 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der zweistündigen Inkubationszeit wurden 100 mM des Peptid 2 bis 48 myr zu den Ansätzen pipettiert, um zu verhindern, dass noch nicht gebundene Hepatitis B Viren infizieren konnten. Danach wurden die Ansätze ü. N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Inokulum abgenommen und durch 600 µl frisches HGM ersetzt. An den Tagen 3, 6, 10 und 14 wurde ebenfalls ein Mediumwechsel mit 600 µl HGM durchgeführt. Die Medienwechsel fanden ebenfalls wie der Infektionsversuch zeitversetzt statt. Am letzten Tag wurden die Zellen wie beschrieben einem Zellviabilitäts Test unterzogen. In den gesammelten Überständen wurde das HBsAg bestimmt.

Das Diagramm 15 zeigt das sekretierte HBsAg der mit HBV infizierten Hepatozyten. Die mit Sulfo-NHS biotinylierten Hepatozyten (rote Balken), die an den Zeitpunkten 0 min bis 270 min nach dem Biotinylieren infiziert wurden, zeigen eine verminderte Infektion von mehr als 40 %. Bei einer HBV Infektion 300 min nach der Biotinylierung ist die Inhibition nicht mehr ganz so stark und eine steigende Tendenz der Infektion ist zu erkennen. Bei 330 min beträgt die Infektionseffizienz fast 100 %, was bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt der HBV Rezeptor wieder neusynthetisiert wurde und für eine Bindung von HBV zur Verfügung steht. Die blauen Balken stellen die negativ Kontrollen da. Es wurden zu denselben Zeiten auch nicht biotinylierte Hepatozyten mit HBV infiziert (blaue Balken). Diese zeigen auch eine geringe Inhibition der Infektion. Diese kam vermutlich dadurch zustande, dass die Zellen es nicht so gut vertragen haben, in den angegebenen Zeitabständen ständig aus dem Brutschrank genommen und kurzfristig bei 4 °C für die Infektion gelagert worden zu sein. Dies führte wahrscheinlich zu einem Verlust des HBV Rezeptors.



Diagr 15: Kinetik der HBV Infektion von biotinylierten primären *Tupaia* Hepatozyten.

Nachweis des HBsAg. Die gestrichelte Linie bezeichnet den cut off des Versuches.

5 Diskussion

5.1 Kinetik der Infektion von primären *Tupaia* Hepatozyten mit HBV auf unterschiedlichen Zellkulturbeschichtungen

Die Kinetik des Infektionsversuches zeigte erwartungsgemäß, dass die ersten nachweisbaren Marker einer etablierten HBV Infektion die cccDNA und die mRNA sind. Beide waren einen Tag nach der Infektion nachweisbar. An Tag 3 nach der Infektion ist das HBsAg und das HBeAg nachweisbar. Hepatozyten auf Matrigel produzierten mehr cccDNA als Zellen auf Kollagen. Es gibt keine signifikanten Unterschiede an der Menge von Gesamt- und pg-mRNA zwischen Matrigel und Kollagen. Die pg-mRNA macht nur 1/10 des Gesamt-mRNA Pools einer infizierten Zelle aus. Hepatozyten, die auf Kollagen ausplattiert wurden, produzierten mehr HBsAg als Zellen auf Matrigel. Hepatozyten auf Matrigel produzierten mehr HBeAg als Zellen auf Kollagen.

Matrigel ist eine lösliche Basalmembran-Präparation, welche aus dem Endelbreth-Holm-Swarm (EHS) Mäuse Sarkom extrahiert wurde. Matrigel fördert die Anheftung von Zellen und unterdrückt das Wachstum von Hepatozyten. Dies wurde durch die Abnahmen der für das Wachstum benötigten Transkriptionsfaktoren wie c-jun, junB und c-myc gezeigt (Buchner et al., 1990; Rana et al., 1994). Durch die Abnahme der Transkriptionsfaktoren bleiben die Hepatozyten in der G0-Phase arretiert. Dadurch wird die Differenzierung der Hepatozyten gefördert (Bissell et al., 1987; Ben-Ze've et al., 1988; Di Persio et al., 1991; Schuetz et al., 1993; Block et al., 1996). Diese Matrixlösung wurde als 20fache Verdünnung eingesetzt. Die Bedingungen auf Matrigel entsprechen daher denen einer gesunden Leber. Kollagen I wird von parenchymalen Hepatozyten gebildet (Geerts et al., 1993) und bildet Fibrillen aus. *In vitro* hat Kollagen I einen Effekt auf die Anheftung, Morphologie, Wachstum und Differenzierung von Zellen (Kleinman et al., 1987). Die Kulturbedingungen auf reiner Kollagen I Matrix entsprechen eher denen einer zirrhotischen Leber. Das Hepatocyte Growth Media (HGM) enthält als Grundmedium DMEM und zusätzlich einen hohen Anteil an Spurenelementen wie Kupfer, Zink und Mangan. HGM induziert bei dedifferenzierten Hepatozyten phänotypische Eigenschaften von reifen Hepatozyten.

In einer gesunden Leber sind alle Hepatozyten in der G₀-Phase arretiert. Unter diesen Bedingungen sind die Zellen hoch differenziert und können *in vivo* sehr wahrscheinlich HBV sehr effizient aufnehmen und zeigen eine optimale transkriptionelle Aktivität zur Produktion von Nachkommenviren. Dadurch sind *in vivo* hohe Virusmengen im Serum nachzuweisen. Bei Hepatom-Zelllinien, bei denen das HBV Genom als Plasmid in die Zelle eingeschleust wurde, wird zwar die Replikation von Hepatitis B Viren und subviralen Partikeln unterstützt, diese Zellen sind aber nicht soweit differenziert, dass sie mit HBV infizierbar wären. Ein Beispiel dafür sind HepG2-Zellen (Sells et al., 1987). Das heißt, dass der Differenzierungszustand, der eine Replikation des Genoms erlaubt, noch nicht ausreicht, dass eine Zelle auch infizierbar ist. Damit eine effiziente Infektion mit HBV stattfinden kann, sind sehr wahrscheinlich andere Transkriptionsfaktoren aktiv, die dazu führen, dass leberspezifische Rezeptoren und Corezeptoren exprimiert werden, die für eine HBV Infektion notwendig sind.

Hepatozyten auf Matrigel produzierten mehr cccDNA als Zellen auf Kollagen. Geht man davon aus, dass die cccDNA Menge nur durch die Infektion von HBV bedingt ist, so müsste auf Matrigel auch eine erhöhte Transkriptionsaktivität vorliegen. Dies ist aber nicht der Fall, da der Gehalt an Gesamt- und Prägenom-mRNA bei beiden Matrices gleich ist. Daraus kann geschlossen werden, dass die Differenzierung, die durch das Matrigel in Verbindung mit dem HGM möglicherweise eher zur Synthese von HBV spezifischen Rezeptoren und Corezeptoren geführt hat. Dadurch kam es zu einer höheren Suszeptibilität und somit zu einer gesteigerten Infektionsrate der Hepatozyten. Dies wiederum führte zu den erhöhten Mengen an cccDNA. Es erscheint plausibel, dass die Kultivierung auf Kollagen eine Differenzierung ausgelöst hat, die eher zur Induktion von leberspezifischen Transkriptionsfaktoren führte als zur Expression von HBV Rezeptoren. Dadurch wurde eine verstärkte Transkription des HBV Genoms induziert, die jedoch nicht die Suszeptibilität der Hepatozyten gegenüber HBV verstärkte. Das würde die signifikant höheren Mengen von HBsAg von Hepatozyten auf Kollagen erklären. Die höheren Mengen von HBeAg von Hepatozyten auf Matrigel könnten an der Induktion von Transkriptionsfaktoren liegen, die den Core/Prägenom Promotor (Cp) stimulieren, der die Expression von HBcAg, HBeAg- und die prägenomische-mRNAs reguliert. Zusätzlich zu dem Cp wird die Expression dieser Transkripte

von beiden Enhancern (E1 und E2) von HBV sowie von einem negativ regulierenden Element (NRE) reguliert (Kosovsky et al., 1998). Es wird angenommen, dass die Funktionen von Cp abhängig von den leberspezifischen Eigenschaften der Enhancer 1 und 2 von HBV ist (Honigwachs et al., 1989; Lopez-Cabrera et al., 1990; Su und Yee, 1992; Zhang et al., 1992; Yuh und Ting, 1993; Zhang und McLachlan, 1994). Diese These wird durch die Analyse an transgenen Mäusen unterstützt, die den *in vivo* Hinweis lieferte, dass die leberspezifische Expression von Cp von den kombinierten Aktivitäten der Enhancer 1 und 2 abhängig ist (Billet et al., 1995). Durch diese Aktivität wird die Transkription von HBeAg sowie prägenomischer-mRNA gesteigert. Allerdings beträgt die Menge der pg-mRNA nur 1/10 des Gesamt-mRNA Pools einer infizierten Zelle, unabhängig von der Matrix. Dies könnte man dadurch erklären, dass bei der Synthese von neuen Hepatitis B Viren eine große Menge an Oberflächenproteinen benötigt wird, welche die Hauptmasse der Gesamt-mRNA ausmachen. Ebenso werden das HBeAg und das X-Protein gebildet. Man darf auch nicht vergessen, dass bei der Gesamt-mRNA ebenfalls die pg-mRNA mit nachgewiesen wurde.

Lamivudin ist ein Nukleosidanalogen, welches die reverse Transkription inhibiert und somit den Reimport von HBV DNA in den Zellkern. Daher konnte keine neu gebildete cccDNA bei den infizierten Hepatozyten nachgewiesen werden. Lamivudin konnte die Sekretion von neusynthetisiertem HBV komplett inhibieren, nicht aber die Sekretion der Virusproteine HBsAg und HBeAg. Lamivudin und andere Inhibitoren der reversen Transkription können nicht die Expression der viralen Proteine und der pg-mRNA inhibieren. Außerdem kann die existierende cccDNA nicht eliminiert werden.

5.2 Einfluss von Glycosaminglykanen auf die HBV Infektion

Glycosaminglykane sind lange unverzweigte Polysaccharide, die aus polymeren Disaccharid-Einheiten eines Aminozuckers und einer Uronsäure aufgebaut sind. Das Grundgerüst der Heparan-Sulfate besteht aus N-Acetylglucosamin und Glucuronsäure, während das von Chondroitin-Sulfat aus N-Acetylgalaktosamin und Glucuronsäure besteht (Esko und Selleck, 2002). Heparan-Sulfate werden vornehmlich auf Membran-Proteoglykanen wie Glypikanen und Syndekanen gefunden. Heparin ist ein höher-sulfatierter

löslicher Subtyp der Heparan-Sulfate. Diese sind auf jeder Zelle zu finden. Die höher-sulfatierten Heparansulfate sind Bindungspartner für diverse Liganden und Rezeptoren zur Regulation der Wachstumskontrolle, Fettstoffwechsel, Hämostase, Signaltransduktion und Zelladhäsion (Esko und Lindahl, 2001; Kreuger et al., 2006).

Der Infektionsversuch zeigte eindeutig, dass Heparin ein weitaus stärkerer Inhibitor der HBV Infektion ist als Chondroitin-Sulfat. Bei Heparin lag eine dosisabhängige Inhibition der Infektion für HBV vor. Bei einer Konzentration von 1000 und 100 µg/ml Heparin konnte eine HBV Infektion vollständig und bei einer Konzentration von 10 µg/ml noch zu 80 % inhibiert werden. Die niedrigste getestete Konzentration (1 µg/ml) konnte zu fast 40 % eine HBV Infektion inhibieren. Bei Chondroitin-Sulfat konnte die höchste Konzentration von 1000 µg/ml nur zu 60 % eine Infektion inhibieren.

Heparinasen schneiden spezifisch Heparan-Sulfat-Proteoglykane von Zelloberflächen und extrazellulären Matrices. PNGase F schneidet spezifisch zwischen dem innersten N-Acetylglucosamin und dem Asparaginrest von komplexen Oligosacchariden. Die Sialidase schneidet spezifisch terminale Sialinsäure-Reste von komplexen Carbohydraten und Glycoproteinen.

Eine Vorbehandlung der Hepatozyten mit Heparinase führte zu einer dosisabhängigen Inhibition der HBV Infektion. Dagegen hatte eine Vorbehandlung mit PNGase F und Sialidase keinen signifikanten Effekt auf die HBV Infektion. In der höchsten Konzentration kann die Heparinase komplett die HBV Infektion verhindern. In den Konzentrationen 3 U/ml und 1,5 U/ml kann eine HBV Infektion noch um 80 % inhibiert werden.

Bis heute sind die viralen und zellulären Determinanten der HBV Bindung und Aufnahme in Hepatozyten noch ungeklärt (Glebe und Urban, 2007). Unter der ständig wachsenden Anzahl von potentiellen Bindungspartnern für das HBV hat sich bis heute noch keiner als funktioneller HBV Rezeptor herausgestellt (Glebe und Urban, 2007). Die Arbeitsgruppe von Zahn und Allain konnte 2005 zeigen, dass HBV an Heparin bindet und so durch eine Heparin-Chromatographie aufgereinigt werden kann. Außerdem konnte gezeigt werden, dass aufgereinigte subvirale Partikel von HBV mit sehr hoher Affinität an Heparin beschichtete wells binden. Diese spezifische Bindung konnte nur mit Heparin komplett inhibiert werden (Leistner et al., 2008). Diese Ergebnisse bestätigen

damit vorherige Veröffentlichungen von Einarsson et al., 1978, und Tajima et al., 1992, in denen beschrieben wird, dass man für die Aufreinigung von HBsAg ebenfalls eine Heparin-Affinitäts-Chromatographie benutzen kann. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung des HBV mit Heparin die Infektion inhibiert, nicht aber eine Vorbehandlung mit Chondroitin-Sulfat. Dieses Ergebnis ging in die Veröffentlichung von Leistner et al., 2008 ein, die zeigten, dass eine HBV Infektion durch höher-sulfatierte Polymere (z. B. Heparin), nicht aber durch niedrig-sulfatierte Glycosaminoglykane (z. B. Chondroitin-Sulfat) inhibiert werden kann. Heparin kann auch die HIV Infektion *in vitro* inhibieren (Mitsuya et al., 1988). Daher wurden Versuche durchgeführt, höher-sulfatierte Polymere und ähnliche Substanzen als potentielle antivirale Therapie bei HIV infizierten Patienten einzusetzen (McClure et al., 1992).

Ein anderes Ergebnis, welches für die Wichtigkeit von Heparin für die Bindung von HBV an die Hepatozyten spricht, ist, dass eine Vorbehandlung der Zellen mit Heparinase zu einer Inhibition der HBV Infektion führte. Interessanterweise haben höher-sulfatierte Polymere keinen Effekt auf die DHBV Infektion *in vivo* und *in vitro* (Offensperger et al., 1991). Obwohl HBV und DHBV viele molekulare Gemeinsamkeiten haben, scheint das DHBV andere Rezeptoren als Glycosaminoglykane für die primäre Bindung zu benutzen. Daher steht das DHBV auch im Gegensatz zum Dengue- und Herpes simplex Virus, die beide Heparan-Sulfat-Proteoglykane auf der Wirtszelloberfläche zur Bindung benötigen (Chen et al., 1997 und Spear et al., 1992).

Daher kann man zusammenfassend annehmen, dass HBV, nachdem es in den Blutkreislauf gelangt ist, im Dissé'schen Raum an Heparan-Sulfat-Proteoglykane bindet. Diese würden als eine Art „low-affinity“ Rezeptor dienen. Anschließend würde HBV mit seiner PräS1 Bindungsseite und der N-terminalen Myristinsäure an den „high-affinity“ Rezeptor wechseln. Dann würde die Aufnahme von HBV in ein noch nicht bekanntes Kompartiment erfolgen.

5.3 Einfluss unterschiedlicher Inhibitoren auf die HBV Infektion

Der genaue Eintrittsmechanismus von HBV in Hepatozyten ist immer noch unbekannt. Bis jetzt sind fünf Aufnahme-mechanismen in Hepatozyten bekannt: (1) Clathrin-abhängige Endozytose, (2) Caveolin-abhängige Endozytose,

(3) Macropinozytose, (4) Clathrin- und Caveolin unabhängige Endozytose und (5) Transzytose. Die Clathrin-abhängige Endozytose ist ein schneller und effizienter Weg für Viren in ihre Zielzelle (Marsh und Helenius, 2006). Das eintretende Virus wird oft innerhalb von Minuten nach der Aufnahme dem sauren Milieu des Endosoms ausgesetzt. Dort führt der niedrige pH-Wert des Endosoms meist zu Konformationsänderungen in der Virushülle und somit zur Freisetzung der Viren in das Cytoplasma. In der vorliegenden Arbeit wurden Chlorpromazin und Bafilomycin eingesetzt, um den Eintrittsmechanismus von HBV in die Hepatozyten zu untersuchen. Chlorpromazin verhindert die Formierung von Clathrin-coated pits und inhibiert dadurch die Clathrin-abhängige Endozytose (Wang et al., 1993; Subtil et al., 1994). Bafilomycin ist ein spezifischer Inhibitor der vakuolären H⁺-ATPase (V-ATPase) in Zellen. Wird die V-ATPase blockiert, kann keine Ansäuerung im Endosom entstehen und kein Membranpotential aufgebaut werden (Funk et al., 2006). Die Versuche zeigten, dass eine Inkubation mit Chlorpromazin und Bafilomycin während und nach der HBV Infektion keinen Einfluss auf diese hat. Es kam zu keiner Inhibition der Infektion. Demnach benutzt HBV nicht die Clathrin-abhängige Endozytose für den Eintritt in die Hepatozyten. Eine anschließende Ansäuerung im Endosom ist ebenfalls nicht notwendig für die Etablierung einer HBV Infektion. Dies steht teilweise im Einklang mit den Ergebnissen von anderen Autoren, die eine pH-unabhängige, aber trotzdem energieabhängige Endozytose des HBV (Hagelstein et al., 1997) sowie des DHBV in die Zelle (Rigg und Schaller, 1992; Köck et al., 1996; Breiner und Schaller, 2000; Funk et al., 2006) nachweisen konnten. Allerdings fanden andere Autoren eine pH-abhängige Aufnahme von DHBV in Hepatozyten (Offensperger et al., 1991; Chojnacki et al., 2005). Da DHBV zu den Avihepadnaviren und HBV zu den Orthohepadnaviren gehört, könnten beide Viren unterschiedliche Eintrittsmechanismen in die Hepatozyten benutzen. Die Ergebnisse einer pH-unabhängigen Aufnahme von HBV werden auch durch noch nicht veröffentlichte Ergebnisse an der HepaRG Zelllinie bestätigt.

Der myristylierte Protein Kinase C Inhibitor ist zellgängig und inhibiert die Protein Kinase C (PKC). Sie gehört zur Familie der Serin/Threonin Protein Kinasen. Für das HBV wurde zum ersten Mal von Albin und Robinson (1980) eine

Proteinkinaseaktivität beschrieben. Zwei Jahre später konnten Gerlich et al. (1982) in Capsiden aus HBV infizierten Lebern eine Protein Kinase nachweisen. Diese Protein Kinase phosphorylierte das HBV Core Protein an Serin 162. Gazina et al. konnten 2000 zeigen, dass diese Phosphorylierung essentiell für die Verpackung der prägenomischen-mRNA und somit eng mit der Genomreifung verknüpft ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation des HBV mit einem PKC Inhibitor vor, während und nach der Infektion keinen Einfluss auf die HBV Infektion hat. Die unveränderte Menge an HBsAg im Überstand der HBV infizierten Hepatozyten bestätigt, dass der Sekretionspfad unbeeinträchtigt war. Dies spricht dafür, dass die Proteinkinase C keinen Einfluss auf den Eintrittmechanismus des HBV hat. Wittkop et al. (2008) konnten jedoch zeigen, dass in Hepatomzellen die Reifung der Core- Partikel behindert war.

5.4 Charakterisierung des Antikörpers HB1

Der monoklonale Antikörper HB1 reagierte im ELISA nur mit HBsAg; nicht aber mit WHsAg. Im Blot konnte man mit dem HB1 HBsAg Genotypen A2, C und D detektieren.

Der Antikörper HB1 aus Maus wurde von Herrn Prof. Dr. K. Sasnauskas und Frau Dr. A. Zvirblienė (Institute for Biotechnology, Laboratory of Eukaryote Genetic Engineering, Vilnius, Litauen) zur Verfügung gestellt. Er reagiert mit der gruppenspezifischen HBs-Antigenschleife, AS 120 bis 125 (persönliche Mitteilung Dr. I. Sominskaja, Riga).

Die Versuche zeigten, dass der monoklonale Antikörper HB1 seine Bindestelle im nativen und denaturierten Zustand des HBsAg erkennt. Er bindet also sequentiell an seine Bindestelle. Die Wichtigkeit des Epitops von HB1 zeigt sich darin, dass dieser Antikörper die Infektiosität des HBV neutralisieren kann (Untersuchung von C. Bremer, Institut für Medizinische Virologie, Gießen): Der Grund, warum HB1 nicht mit WHsAg reagiert, könnte an den unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der Bindungsstelle liegen. Die HBsAg Genotypen A2 und C haben an der Position 122 ein K und Genotyp D ein R. Es erfolgte also nur ein Austausch von einer basischen Aminosäure gegen eine andere. Bei WHsAg ist an Position 120 statt eines P ein N und an Position 123 ein Q anstelle eines T zu finden. Das bedeutet jeweils einen Austausch innerhalb der

Gruppe der neutralen Aminosäuren. Anscheinend sind zwei Austauschere innerhalb der Bindestelle genug, damit der HB1 sie nicht mehr erkennen kann.

HB1 Bindestelle
aa 120-125

A2 (ID221) : QGMLPVCPLIPGSTTTTSTG**PCKTCT**TPAQGNSMFPSCCCTKPTD
C (ID159) : QGMLPVCPLLPGTSTTTSTG**PCKTCT**IIPAQGTSMFPSCCCTKPSD
D (ID326) : QGMLPVCPLIPGSSTTTSTG**PCRTCT**TPAHGTSMYPSCCCTKPSD
W (#5413) : DWKGLIPVCPLQPTTETTV**NCRQCT**ISAQDMYTPPYCCCLKPTA

5.5. Charakterisierung der inter- und intramolekularen Disulfidbrücken der HBs-Antigenschleife von HBV

Das SHBs des HBV ist ein aus 226 Aminosäuren aufgebautes Membranprotein. Es enthält 14 Cysteine, von denen sechs auf der zytosolischen Seite des HBV liegen. Die restlichen acht Cysteine liegen außerhalb des HBV in der HBs-Antigenschleife. Die Anzahl und Position der Cysteinreste ist streng konserviert und ebenfalls in den Antigenschleifen von WHsAg und GSHsAg zu finden. Bis jetzt ist die Verknüpfung der acht Cysteine und die daraus resultierende Tertiärstruktur der Antigenschleife nicht geklärt.

In dieser Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die native (unreduzierte) HBs-Antigenschleife des HBV vier Maleimid-Biotin Moleküle binden kann und damit über vier freie Sulfhydrylgruppen verfügt. Die reduzierte HBs-Antigenschleife des HBV kann acht Maleimid-Biotin Moleküle binden. Das heißt, in einer nativen HBs-Antigenschleife kommen vier freie SH-Gruppen vor. Die restlichen vier Sulfhydrylgruppen sind über Disulfidbrücken verbunden. Allerdings kann keine Aussage darüber getroffen werden, welche Sulfhydrylgruppen frei und welche verbunden sind.

Die Ergebnisse stehen in einem erheblichen Gegensatz zu früheren Berichten. Mangold und Streeck (1993) fanden durch Mutationsanalyse, dass sowohl die inneren Cysteine an Position 48, 65 und 69 als auch die externen Cysteine 107, 137, 138, 139, 147 und 149 für die Bildung und Sekretion von HBsAg-Partikeln nötig waren. Dabei zeigte sich, dass die Partikel freie SH-Gruppen enthielten, die mit Iodacetamid reagierten. Später berichteten Mangold et al. (1997), dass nur die nicht essentiellen Cysteine 76, 90 und 221 freie SH-Gruppen enthielten. Guerrero et al. (1988) fanden überhaupt keine freien SH-Gruppen. Mangold

et al. berichteten außerdem, dass C121 und C124 an der Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken beteiligt sind. Andererseits berichten Ohnuma et al. (1990), dass ein konserviertes Epitop von AS 115 bis 128 nur mit dem entsprechenden monoklonalen Antikörper reagierte, wenn C121 und C124 verknüpft waren. Generell reagieren fast alle Anti-HBs-Antikörper nur mit nicht reduziertem HBsAg. Dieser klare Befund schließt freie SH-Gruppen in C121 und C124 weitgehend aus, so dass C107, 137, 138, 139, 147 und 149 als Träger der vier freien SH-Gruppen übrig bleiben. Huovila et al. (1992) berichteten, dass bei der Biosynthese des SHBs zunächst im Zytosol nur freie SH-Gruppen vorliegen, aber nach Sprossung in ein Intermediärkompartiment zwischen ER und Golgi Dimere und Oligomere entstehen. Stibbe und Gerlich (1983) fanden in silbergefärbten SDS-Gelen ohne Reduktion nur Spuren von monomeren HBs-Proteinen, was für eine fast komplette Vernetzung der HBs-Protein-Untereinheiten sprach. In dieser Arbeit wurde dagegen ein großer Anteil nicht vernetzter Untereinheiten gefunden, was aber mit der Existenz freier SH-Gruppen vereinbar ist. Möglicherweise war das in früheren Arbeiten verwendete Iodacetamid weniger geeignet, die freien SH-Gruppen zu blockieren als das hier verwendete Maleimid-Biotin. Auch die hier angewandte Reinigungsmethode mag schonender gewesen sein und somit unerwünschte SH-Oxidationen und Proteinfaltungen vermieden haben.

5.6 Einfluss der Disulfidbrücken und freien Sulfhydrylgruppen der HBs-Antigenschleife auf die HBV Infektion von primären *Tupaia* Hepatozyten

Glutathion ist die Grundlage vieler biologischer Redoxreaktionen in der Zelle. Durch die Oxidation zweier GSH Moleküle entsteht ein Molekül oxidiertes Glutathion (GSSG). Das Verhältnis der beiden Formen in lebenden Zellen ist GSH:GSSG = 400:1. Daher besitzen alle Zellen ein hohes Reduktionspotential in Form von reduziertem Glutathion.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HBV nicht mehr in der Lage ist, eine Infektion zu etablieren, wenn man es vor der Bindung mit TCEP reduziert, d. h., bestehende Disulfidbrücken aufbricht. Wurde das HBV vor der Bindung nur biotinyliert und damit die freien SH-Gruppen blockiert, so war die Infektion um ca. 40 % reduziert. Eine Reduzierung und Biotinylierung der

Hepatozyten vor der Bindung von HBV oder eine Reduzierung und Biotinylierung von HBV nach der Bindung hatte keinen Effekt auf die Infektion. Zusätzliche Versuche zeigten, dass, wenn man das HBV mit nicht physiologischen Konzentrationen von reduziertem GSH (10 mM) vorbehandelte, es ebenfalls nicht in der Lage war, eine Infektion zu etablieren. Wurde das HBV mit hohen Konzentrationen (10mM) GSSG vorbehandelt, so steigerte dies die HBV Infektion um 20 %.

Zerstört man also das bestehende Disulfidnetzwerk des HBV durch eine Reduktion, ist es nicht mehr in der Lage zu infizieren. Eine Blockierung der freien Cysteine kann eine Infektion nicht komplett inhibieren. Das zeigt die Bedeutung der Disulfidbrücken in der HBs-Antigenschleife für den Infektionsvorgang von HBV. Ein natürlicher Regulator des Reduktionspotentials der Zellen wie das Glutathion kann eine HBV Infektion sogar steigern, aber nur in der oxidierten Form.

Wie vorher schon beschrieben nimmt man an, dass HBV, nachdem es in den Blutkreislauf gelangt ist, im Dissé'schen Raum an Heparan-Sulfat-Proteoglykane bindet, die als „low-affinity“ Rezeptor dienen. Anschließend würde HBV mit seiner PräS1 Bindungsseite und der N-terminalen Myristinsäure an den „high-affinity“ Rezeptor wechseln. Dann würde die Aufnahme von HBV in ein noch nicht bekanntes Kompartiment erfolgen. Dieser wichtige Schritt könnte durch eine Interaktion zwischen HBs-Antigenschleife und Hepatozyten-Membran stattfinden. Diese Annahme wird durch die Versuche von Jaoudé und Sureau (2005) belegt. Sie konnten zeigen, dass die HBs-Antigenschleife ein wichtiger Bestandteil des viralen Eintritts ist. Die durch die Disulfidbrücken gebildete Struktur der HBs-Antigenschleife ist essentiell für die Bindung und Aufnahme des HBV. Dies wird durch die Tatsache belegt, dass der zurzeit erhältliche rekombinante Hepatitis B-Impfstoff HBsAg des Genotyps A2 enthält und ebenfalls gegen die anderen Genotypen von HBV schützt. Außerdem zeigten Glebe et al. 2003, dass monoklonale Antikörper (z. B. C20/2), welche die Konformation der Antigenschleife erkennen, eine Infektion völlig inhibieren können. Antikörper, welche sequenzielle Epitope der Antigenschleife erkennen, können die Infektion nicht so gut inhibieren. Andere Inhibitionsstudien belegten ebenfalls, dass die S-Domäne offensichtlich Elemente enthält, welche am Aufnahmemechanismus von HBV in die Hepatozyten beteiligt sind, da

Antikörper gegen die S-Domäne eine HBV Infektion *in vivo* und *in vitro* neutralisieren können (Iwarson et al., 1985; Shearer et al., 1998; Ogata et al., 1999). Antoni et al. konnten 1994 zeigen, dass die Struktur der S-Domäne, welche durch die Disulfidbrücken gebildet wird, verantwortlich für die antigenen Eigenschaften ist. Daher ist eine korrekt gefaltete Antigenschleife wichtig für die Aufnahme von HBV in die Hepatozyten und die Etablierung einer Infektion. Außerdem wird die Bedeutung der S-Domäne durch das Auftreten von „Escape“-Mutanten in der Antigenschleife (Aminosäuren 100 bis 170) des SHBs von anti-HBs positiven HBV infizierten Patienten (Carman et al., 1990; Nainan et al., 2002) deutlich.

Die Aminosäuren 121 bis 124 (CRTC) der HBs-Antigenschleife bilden ein CXXC Motiv und sind bei über 100 HBV-Subtypen und HBsAg-Mutanten konserviert (Qui et al., 1996). Dieses Motiv ist als aktives Zentrum der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) und verwandter Proteine bekannt (Chivers et al., 1997). Die PDI reduziert, isomerisiert und formiert Disulfidbindungen. Sie ist bei allen lebenden Zellen zu finden, wo sie in den Zellen Disulfidbrücken formiert und auf der Zelloberfläche Disulfidbrücken bricht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von HBV mit PDI vor, während oder nach der Bindung keinen Einfluß auf die Infektion hat. HIV (Fenouillet et al., 2001; Markovic et al., 2004; Ryser et al., 2005; Barbouche et al., 2005) und SV40 (Schelhaas et al., 2007) benötigen die PDI auf der Wirtszelloberfläche, um eine Infektion zu etablieren. HBV benötigt mutmaßlich deswegen keine PDI für eine Infektion, da es selbst ein CXXC Motiv hat, welches als aktives Zentrum der PDI bekannt ist (Wallin et al., 2004). Dies ist auch bei dem Mäuse-Leukämie Virus (MLV) der Fall. Das Envelope (Env) Protein des MLV besitzt ebenfalls ein CXXC, welches nach der Bindung an den Rezeptor eine Konformationsänderung und die damit verbundene Fusion mit der Wirtzellmembran auslöst (Wallin et al., 2005). Dies ist auch mit den Ergebnissen aus Punkt 5.3 vereinbar. Demnach benutzt das HBV nicht die Clathrin-abhängige Endozytose für den Eintritt in die Hepatozyten und ist auch nicht von einer anschließenden Ansäuerung im Endosom für die Etablierung der Infektion abhängig. Da HBV ein eigenes CXXC Motiv in der HBs-Antigenschleife trägt, könnte dies ebenfalls zu einer Fusion mit der Wirtzellmembran und somit zur Aufnahme von HBV in die Hepatozyten führen.

Mehrere Arbeitsgruppen postulierten die Involvierung der C121 und C124 in Disulfidbrücken (Antoni, et al. 1994; Ohnuma et al., 1990). Die Bedeutung des CXXC Motiv sowie die Konformation der S-Domäne für die Bindung und Aufnahme des HBV wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit belegt. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine Reduzierung des HBV vor der Bindung eine Infektion komplett inhibieren kann. Durch das Reduzieren des HBV wird die Konformation und somit auch das CXXC Motiv verändert. Damit ist eine Bindung und spätere Konformationsänderung, welche vielleicht zur Fusion mit der Hepatozytenmembran führen würde, nicht mehr möglich und das HBV kann nicht mehr infizieren.

Abschließend könnte man folgenden Ablauf der Infektion von Hepatozyten mit HBV annehmen. Das HBV gelangt in den Blutkreislauf und bindet im Dissé'schen Raum an Heparan-Sulfat-Proteoglykane, die als „low-affinity“ Rezeptor dienen. Anschließend würde HBV mit seiner PräS1 Bindungsseite und der N-terminalen Myristinsäure an den „high-affinity“ Rezeptor wechseln. Mit der Bindung an den „high-affinity“ Rezeptor würde die HBs-Antigenschleife mit ihrem CXXC Motiv ebenfalls eine Bindung mit der Wirtzellmembran eingehen. Dort würde durch eine Konformationsänderung, welche durch ein aktives CXXC Motiv zustandekommt, das HBV mit der Wirtzellmembran fusionieren und wäre somit im Zytoplasma der Hepatozyten.

5.7 Blockierung von Aminogruppen der HBsAg-Schleife

Die Markierung von HBsAg mit Sulfo-NHS-Biotin bestätigt, dass die Aminogruppen der Lysine in der HBs-Antigenschleife zugänglich sind. Die vollständige Inhibition der Infektiosität durch Sulfo-NHS-Biotin belegt außerdem, dass zumindest eine dieser Aminogruppen essentiell ist. Die Anzahl der Lysine ist bei den verschiedenen Genotypen des HBV und bei WHV unterschiedlich.

Gemäß Jaoudé und Sureau (2005) ist K122 als Teil des CXXC Motivs von 121 bis 124 essentiell, kann aber vollständig durch R122 ersetzt werden. Genotyp A2 und C enthält K122, Genotyp D R122, welches durch Sulfo-NHS-Biotin nicht modifiziert wird. Die hier beschriebenen Infektionsversuche wurden mit Genotyp D durchgeführt, so dass das Sulfo-NHS-Biotin mit den Lysin in Position 141 und / oder 160 reagiert haben muss. Nur K141 ist bei allen Genotypen und WHV konserviert, während K160 bei Genotyp C durch R ersetzt ist. Die

Sequenz 140 bis 146 gilt als Hauptepitop der Determinante a, so dass mutmaßlich der inaktivierende Effekt des Sulfo-NHS-Biotins auf eine Modifikation von K141 zurückzuführen ist. Zusätzliche Versuche mit Genotyp C könnten diese Vermutung beweisen, jedoch stand nicht genügend Ausgangsmaterial dieses hierzulande seltenen Genotyps zur Verfügung.

5.8 Biotinylierung und Neusynthese des HBV Rezeptors

Im Laufe der HBV Forschung wurden viele zelluläre HBV Bindungspartner für alle drei Oberflächenproteine (SHBs, MHBs und LHBs) gefunden. Forscher haben versucht, den potentiellen Rezeptoren direkt aus der Plasmamembran von Hepatozyten und hepatischen Zelllinien zu isolieren. Allerdings konnte bis heute noch kein publizierter Rezeptor als überzeugender HBV Bindungspartner für HBV verifiziert werden.

Eine Biotinylierung der Hepatozyten-Zelloberfläche mit einer Sulfo-NHS Konzentration von 2 mM inhibierte die HBV Infektion um 40 %. Sulfo-NHS blockiert die Aminogruppen, was nahelegt, dass man den potentiellen HBV Rezeptor biotinyliert bzw. blockiert hatte. Eine Kinetik, bei der die Oberfläche der Hepatozyten mit Sulfo-NHS biotinyliert und die Zellen an definierten Zeitpunkten mit HBV infiziert wurden, zeigte, dass 300 min nach der Biotinylierung eine steigende Tendenz der Infektion zu erkennen war. Bei 330 min betrug die Infektionseffizienz wieder 100 %. Das bedeutet, dass nach 5 h und 30 min der HBV Rezeptor wieder neu synthetisiert wurde und für eine Bindung von HBV zur Verfügung stand.

Treichel et al. konnten 1994 zeigen, dass der Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGPR) HBV bindet. Die Bindung stellte sich als PräS1 abhängig heraus, da sie nur durch monoklonale Antikörper, die gegen PräS1 und nicht gegen PräS2 gerichtet waren, inhibiert wurde. Außerdem konnte rekombinantes SHBs ohne PräS1 und PräS2 nicht an den ASGPR binden (Treichel et al., 1997). De Falco et al. berichteten 2001 von einem HBV Bindeprotein (HBV-BP). Das HBV-BP wurde aus der Plasmamembran von HepG2 Zellen gewonnen. CHO (chinese hamster ovary) Zellen, die mit HBV-BP cDNA transfiziert wurden, entwickelten Bindungsstellen für HBV. Trotz der großen Anzahl an potentiellen Bindungspartnern wurde noch kein Rezeptor identifiziert. Abschließend kann man feststellen, dass HBV möglicherweise an einen Bindungspartner auf der

Oberfläche von Hepatozyten bindet, der Aminogruppen enthält. Die nur partielle Inhibition legt aber nahe, dass der Effekt eher indirekt ist oder es alternative Eintrittswege ohne Beteiligung freier Aminogruppen gibt.

Literaturverzeichnis

- Abraham, T.M. und Loeb, D.D. (2006).** *Base pairing between the 5' half of ϵ and a cis-acting sequence, Φ , makes a contribution to the synthesis of minus-strand DNA for human hepatitis B virus.* J. Virol. 80 (9): 4380-4387.
- Abraham, T.M. und Loeb, D.D. (2007).** *The topology of hepatitis B virus pregenomic RNA promotes its replication.* J. Virol. 81 (21): 11577-11584.
- Albin, C. und Robinson, W.S. (1980).** *Protein kinase activity in hepatitis B virus.* J. Virol. 34: 297-302.
- Almeida, J.D., Rubinstein, D. und Stott, E.J. (1971).** *New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis.* Lancet II: 1225-1227.
- Antoni, B.A., Rodriguez-Crespo, I., Gomez-Gutierrez, J., Nieto, M., Peterson, D. und Gavilanes, F. (1994).** *Site-directed mutagenesis of cysteine residues of hepatitis B surface antigen: analysis of two single mutants and the double mutant.* Eur. J. Biochem. 222: 121-127.
- Arbuthnot, P., Capovilla, A. und Kew, M. (2000).** *Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effect on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways.* J. Gastroenterol. Hepatol. 15 (4): 339-341.
- Arbuthnot, P. und Kew, M. (2001).** *Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma.* Int. J. Exp. Pathol. 82: 77-100.
- Barbouche, R., Lortat-Jacob, H., Jones, I.M. und Fenouillet, E. (2005).** *Glycosaminoglycans and protein disulfide isomerase-mediated reduction of HIV-Env.* Mol. Pharmacol. 67 (4): 1111-1118.
- Bartenschlager, R. und Schaller, H. (1988).** *The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription.* EMBO J. 7: 4185-4192.
- Bartenschlager, R. und Schaller, H. (1992).** *Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome.* Embo J. 11: 3413-3420.
- Bartholomeusz A. und Schaefer S. (2004).** *Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods.* Rev. Med. Virol. 14: 3-16.
- Beasley, R.P., Huang, L.-Y., Lin, C. und Chien, C. (1981).** *Hepatocellular carcinoma and HBV: a prospective study of 22707 men in Taiwan.* Lancet 2: 1129-1133.
- Beasley, R.P. und Hwang, L.Y. (1984).** *Epidemiology of the hepatocellular carcinoma.* In: Vyas, G.N., Dienstag, J.L. und Hoofnagle, J.H. (Hrsg.). Viral Hepatitis and Liver Disease, Grune & Stratton, Orlando: 209-224.

- Beck, J. und Nassal, M (2007).** *Hepatitis B virus replication.* World J. Gastroenterol. 13 (1): 48-64.
- Ben-Ze'ev, A., Robinson, G.S, Bucher, N.L. und Farmer, S.R. (1988).** *Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2161-2165.
- Billet, O., Grimber, G., Levrero, M., Seye, K.A., Briand, P. und Joulin, V. (1995).** *In vivo activity of the hepatitis B virus core promoter: tissue specificity and temporal regulation.* J. Virol. 69 (9): 5912-5916.
- Bissell, D.M., Arenson, D.M., Maher, J.J. und Roll, F.J. (1987).** *Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver.* J. Clin. Invest. 79: 801-812.
- Blum, H.E., Zhang, Z.S., Galun, E., Weizsäcker, v.F., Garner, B., Liang, T.J. und Wands, J.R. (1992).** *Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro.* J. Virol. 66: 1223-1227.
- Block, G.D., Locker, J., Bowen, W.C., Petersen, B.E., Katyal, S., Strom, S.C., Riley, T., Howard, T.A. und Michalopoulos, G.K. (1996).** *Population expansion, clonal growth and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF α in a chemically defined (HGM) medium.* J. Cell Biol. 132: 1133-1149.
- Block, T.M., Mehta, A.S., Fimmel, C.J. und Jordan, R. (2003).** *Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma.* Oncogene 22: 5093-5107.
- Blumberg, B. S., Gerstley, B. J., Hungerford, D.A., London, W.T und Sutnik, A.I. (1967).** *A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis.* Ann Intern Med 66: 924-31.
- Bock, C.T., Schranz, P., Schröder, C.H. und Zentgraf, H. (1994).** *Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cells.* Virus Genes 8: 215-229.
- Bock, C.T., Malek, N.P., Tillmann, H.L., Manns, M.P. und Trautwein, C. (2000).** *The enhancer I core region contributes to the replication level of hepatitis B virus in vivo and in vitro.* J. Virol. 74: 2193-2202.
- Bouchard, M.J. und Schneider, R.J. (2004).** *The enigmatic X gene of hepatitis B virus.* J. Virol. 78 (23): 12725-12734.
- Breiner, K.M. und Schaller, H. (2000).** *Cellular receptor traffic is essential for productive duck hepatitis B virus infection.* J. Virol. 74 (5): 2203-2209.
- Bremer, C.M., Bung, C., Kott, N., Hardt, M. und Glebe, D. (2008).** *Hepatitis B virus infection is dependent on cholesterol in the viral envelope.* Cell. Microbiol. in press.

Bruss, V. und Ganem, D. (1991). *The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1059-1063.

Bruss, V., Lu, R., Thomssen, R. und Gerlich W.H. (1994). *Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein.* Embo J. 13: 2273-2279.

Buchner, N.L.R., Robinson, G.S. und Farmer, S.R. (1990). *Effects of extracellular matrix on hepatocyte growth and gene expression: Implications for hepatic regeneration and the repair of liver injury.* Semin. Liver Disease 10: 11-19.

Carman, W.F., Zanetti, A.R., Karayiannis, P., Waters, J., Manzillo, G., Tanzi, E., Zuckerman A.J. und Thomas, H.C. (1990). *Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus.* Lancet 336: 325-329.

Cattaneo, R. und Will, H. (1983). *Signals reducing hepatitis B surface antigen transcription.* Nature 305: 336-338.

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

Chang, S. F., H. J. Netter, M. Bruns, R. Schneider, K. Frolich und H. Will (1999). *A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA.* Virology 262: 39-54.

Chang, H.K., Wang, B.Y., Yuh, C.H., Wei, C.L. und Ting, L.P. (1989). *A liver-specific nuclear factor interacts with the promotor region of the large surface protein gene of human hepatitis B virus.* Mol. Cell. Biol. 9: 5189-5197.

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

Chen, M. und Ou, J'.H. (1995). *Cell type-dependent regulation of the activity of the negative regulatory element of the hepatitis B virus core promotor.* Virology 214: 198-206.

Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J. und Marks, R.M. (1997). *Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparin sulfate.* Nat. Med. 3: 866-871.

Chen, C.J., Yang, H.I., Su, J., Jen, C.L., You, S.L., et al (2006). *Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level.* JAMA 295: 65-73.

Chisari, F. V. und Ferrari, C. (1995). *Immunopathogenesis of viral hepatitis* Annu. Rev. Immunol. 13, 29–60.

- Chiu, C.M., Yeh, S.H., Chen, P.J., Kuo, T.J., Chang, C.J., Chen, P.J., Yang, W.J. und Chen, D.S. (2007).** *Hepatitis B virus X protein enhances androgen receptor-responsive gene expression depending on androgen level.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 (8): 2571-2578.
- Chivers, P.T., Prehoda, K.E. und Raines, R.T. (1997).** *The CXXC motif: a rheostat in the active site.* Biochemistry. 36 (14): 4061-4066.
- Chojnacki, A., Anderson, D.A. und Grgacic, E.V. (2005).** *A hydrophobic domain in the large envelope protein is essential for fusion of duck hepatitis B virus at the late endosome.* J. Virol. 79: 14945-14955.
- Cougot, D., Neuveut, C. und Buendia M.A. (2005).** *HBV induced carcinogenesis.* J. Clin. Virol. 34: 75-78.
- Crowther, R.A., Kiselev, N.A., Bottcher, B., Berriman, J.A., Borisova, G.P., Ose, V. und Pumpens, P. (1994).** *Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy.* Cell, 77: 943–50.
- Dane, D. S., Cameron, C. und Biggs, M. (1970).** *Virus like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis.* Lancet 1: 695-698.
- DeFalco, S., Ruvoletto, M.G., Verdoliva, A., Ruvo, M., Raucchi, A., Marino, M., Senatore, S., Cassani, G., Alberti, A., Pontisso, P und Fascina, G. (2001).** *Cloning and expression of a novel hepatitis B virus-binding protein from HepG2 cells.* J Biol. Chem. 276: 36613-36623.
- Dejean, A., Sonigo, P., Wain Hobson, S. und Tiollais, P. (1984).** *Specific hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA through a viral 11-base-pair direct repeat.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5350-5354.
- Di Persio, C.M., Jackson, D.A. und Zaret, K.S. (1991).** *The extracellular matrix coordinately modulates liver transcription factors and hepatocyte morphology.* Mol. Cell. Biol. 11: 4405-4414.
- Doerr, H. W. und Gerlich, W. H. (2002).** *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder.* Thieme Verlag.
- Doitsh, G. und Shaul, Y. (2004).** *Enhancer I predominance in the hepatitis B virus gene expression.* Mol. Cell. Biol. 24: 1799-1808.
- Dryden, K.A., Wieland, S.F., Whitten-Bauer, C., Gerin, J.L., Chisari, F.V. und Yeager, M. (2006).** *Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy.* Mol. Cell. 22 (6): 843-850.
- Ehlers, I., Horke, S., Reumann, K., Rang, A., Grosse, F., Will, H. und Heise, T. (2004).** *Functional characterization of the interaction between the human La and hepatitis B virus RNA.* J. Biol. Chem. 279: 43437-43447.
- Einarsson, M., Kaplan, L. und Utter, G. (1978).** *Purification of hepatitis B surface antigen by affinity chromatography.* Vox. Sang. 35: 224-233.

- Enders, G.H., Ganem, D. und Varmus, H.E. (1987).** *5'-terminal sequences influence the segregation of ground squirrel hepatitis virus RNA into polyribosomes and viral core particles.* J. Virol. 61: 35-41.
- Engelke, M., Mills, K., Seitz, S., Simon, P., Gripon, P., Schnolzer, M. und Urban, S. (2006).** *Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site.* Hepatology 43: 750-760.
- Esko, J.D. und Lindahl, U. (2001).** *Molecular diversity of heparan sulfate.* J. Clin. Invest. 108: 169-173.
- Esko, J.D. und Selleck, S.B. (2002).** *Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparin sulfate.* Annu. Rev. Biochem. 71: 435-471.
- Feitelson, M. A., Millman, I. und Blumberg, R. (1986).** *The hepadnavirus family: animal hepadnaviruses.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2994-2997.
- Fenouillet, E., Barbouche, R., Courageot, J. und Miquelis, R. (2001).** *The catalytic activity of protein disulfide isomerase is involved in human immunodeficiency virus envelope-mediated membrane fusion after CD4 cell binding.* J. Infect. Disease 183: 744-752.
- Fuetterer, J. und Hohn, A. (1987).** *Involvement of nucleocapsid in reverse transcription: a general phenomenon?* TIBS 12: 92-95.
- Funk, A., Mhamdi, M., Hohenberg, H., Will, H. und Sirma, H. (2006).** *pH-independent entry and sequential endosomal sorting are major determinants of hepadnaviral infection in primary hepatocytes.* Hepatology 44 (3): 685-693.
- Ganem, D. und Varmus, H. E. (1987).** *The molecular biology of hepatitis B viruses.* Ann. Rev. Biochem. 56: 651-693.
- Gazina, E.V. und Fielding, J.E. (2000).** *Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B virus.* J. Virol. 74: 4721-4728.
- Geerts, A., Greenwel, P., Cunningham, M., De Bleser, P., Rogiers, V., Wisse, E. und Rojkind, M. (1993).** *Identification of connective tissue gene transcripts in freshly isolated parenchymal, endothelial, Kupffer and fat-storing cells by northern hybridization analysis.* J. Hepatol. 19 (1): 148-158.
- Gerelsaikhon, T., Tavis, J.E. und Bruss, V. (1996).** *Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis.* J. Virol. 70: 4269-4274.
- Gerlich, W.H., Goldman, U., Müller, R., Stibbe, W. und Wolf, W. (1982).** *Specificity and localization of the hepatitis B virus-associated protein kinase.* J. Virol. 42: 761-766.
- Gerlich, W. H. und Robinson, W. S. (1980).** *Hepatitis B virus contains protein attached to the 5'terminus of its complete DNA-strand.* Cell 21: 801-809.

Glebe, D., Aliakbari, M., Krass, P., Knoop, E., Valerius, K.P. und Gerlich, W.H. (2003). *Pre-s1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus.* J. Virol 77: 9511-9521.

Glebe, D. und Gerlich, W.H. (2004). *Study of the endocytosis and intracellular localization of subviral partikeles of hepatitis B virus in primary hepatocytes.* In: Robert K. Hamatake, Johnson Y.N. Lau (Hrsg). Hepatitis B and D Protocols. Methods in molecular medicine. 2: 143-151, Humana Press.

Glebe, D., Urban, S., Knoop, E., Cag, N., Krass, P., Grün, S., Bulavaite, A., Sasnauskas, K. und Gerlich, W.H. (2005). *Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes.* Gastroenterology 129: 234-245.

Glebe, D. und Urban, S (2007). *Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry.* World J. Gastroenterol. 13 (1): 22-38.

Grethe S., Heckel, J.O., Rietschel W. und Hufert F.T. (2000). *Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates.* J. Virol. 74: 5377-5381.

Gripon, P, Diot, C., Theze, N., Fourel, I., Loreal, O., Brechot, C. und Guguen-Guillouzo, C (1988). *Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide.* J. Virol. 62: 4136-4143.

Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C. und Guguen-Guillouzo, C. (2002). *Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 15655-15660.

Guo, W., Chen, M., Yen, T.S., und Ou, J.H. (1993). *Hepatocyte-specific expression of the hepatitis B virus core promotor depends on both positive and negative regulation.* Mol. Cell Biol. 13: 443-448.

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

Hagelstein, J., Fathinejad, F., Stremmel, W. und Galle, P. (1997). *ph-dependent uptake of hepatitis B virus in primary human hepatocytes.* Virology: 229: 292-294.

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

Honigwachs, J., Faktor, O., Dikstein, R., Shaul, Y. und Laub, O. (1989). *Liver-specific expression of hepatitis B virus is determined by the combined action of the core gene promotor and the enhancer.* J. Virol. 63: 919-924.

- Hruska, F.J., Clayton, D.A., Rubenstein, J.L.R. und Robinson, W.S. (1977).** *Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after Dane particle DNA polymerase reaction.* J. Virol. 21: 666- 672.
- Hu, J. und Seeger, C. (1996).** *Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1060-1064.
- Hu, J., Toft, D.O. und Seeger, C. (1997).** *Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids.* Embo J. 16: 59-68.
- Hu, Z., Zhang, Z., Doo, E., Coux, O., Goldberg, A.L. und Liang, T.J. (1999).** *Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex.* J. Virol. 73 (9): 7231-7240.
- Huang, J. und Liang, T.J. (1993).** *A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products.* Mol. Cell. Biol. 13: 7476-7486.
- Huang, Z.M. und Yen, T.S. (1994).** *Hepatitis B virus RNA element that facilitates accumulation of surface gene transcripts in the cytoplasm.* J. Virol. 68: 3193-3199.
- Huang, Z.M. und Yen, T.S. (1995).** *Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts.* Mol. Cell. Biol. 15: 3864-3869.
- Huang, Z.M., Zang, W.Q. und Yen, T.S. (1996).** *Cellular proteins that bind to the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element.* Virology 217: 573-581.
- Huang, J., Kwong, J., Sun, E.C.Y. und Liang, T.J. (1996).** *Proteasome complex as a potential cellular target of hepatitis B virus X protein.* J. Virol. 70: 5582-5591.
- Huovila, A.P.J., Eder, A. und Fuller, D. (1992).** *Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment.* J. Cell. Biol. 118: 1305-1320.
- Iwarson, S., Tabor, E., Thomas, H.C., Goodall, A., Waters, J., Snoy, P., Shih, J.W. und Gerety, R.J. (1985).** *Neutralization of hepatitis B virus infectivity by a murine monoclonal antibody: an experimental study in the chimpanzee.* J. Med. Virol. 16: 89-96.
- Jaoudé, G.A. und Sureau, C. (2005).** *Role of the antigenic loop of the hepatitis B virus envelope proteins in infectivity of hepatitis delta virus.* J Virol. 79: 10460-10466.
- Junker-Niepmann, M., Bartenschlager, R. und Schaller, H. (1990).** *A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging for foreign RNA.* Embo J. 9: 3389-3396.

- Kaneko, S. und Miller, R.H. (1988).** *X-region-specific transcript in mammalian hepatitis B virus-infected liver.* J. Virol. 62: 3979-3984.
- Kann, M., Sodeik, A., Vlachou, A., Gerlich, W.H. und Helenius, A. (1999).** *Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex.* J. Cell. Biol. 145: 45-55.
- Kann, M. und Gerlich, W. H. (2005).** *Hepatitis B.* In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections.
- Kaplan, P.M., Greenman, R. L., Gerin, J. L., Purcell, R. H. und Robinson, W. S. (1973).** *DNA-Polymerase associated with human hepatitis B antigen.* J Virol. 17: 885-893.
- Kaplan, P.M., Ford, E.C., Purcell, R.H. und Gerin, J.L. (1976).** *Demonstration of subpopulations of Dane particles.* J. Virol. 17: 885-893.
- Kekule, A.S., Lauer, U., Weiss, L., Luber, B. und Hofschneider, P.H. (1993).** *Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumor promotor signalling pathway.* Nature 361: 742-745.
- Kenney, J.M., von Bonsdorff, C.H., Nassal, M. und Fuller, S.D. (1995).** *Evolutionary conservation in the hepatitis B virus core structure: comparison of human and duck cores.* Structure 3: 1009–1119.
- Kleinman, H.K., Luckenbill-Edds, L., Cannon, F.W. und Sephel, G.C. (1987).** *Use of extracellular matrix components for cell culture.* Anal. Biochem. 166: 1-13.
- Koike, K., Shirakata, Y., Yaginuma, K., Arie, M., Tadaka, S., Nakamura, I., Hayashi, Y., Kawada, M. und Kobayashi, M. (1989).** *Oncogenic potential of hepatitis B virus.* Mol. Biol. Med. 6: 151-160.
- Köck, J. und Schlicht, H.J. (1993).** *Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity.* J. Virol 67: 4867-4874.
- Köck, J., Borst, E.M. und Schlicht, H.J. (1996).** *Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment.* J. Virol. 70 (9): 5827-5831.
- Köck, J., Nassal, M., MacNelly, S., Baumert, T.F., Blum, H.E. und Von Weizsäcker, F. (2001).** *Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and wolly monkey hepatitis B virus.* J. Virol. 75: 5084-5089.
- Köck, J., Baumert, T.F., Delaney, W.E., Blum, H.E. und Weizsäcker F.v. (2003).** *Inhibitory effect of adefovir and lamivudine on the de novo hepatitis B virus infection in primary tupaia hepatocytes.* Hepatology 38: 1410-1418.

Kosovsky, M.J., Qadri, I. und Siddiqui, A. (1998). *The Regulation of Hepatitis B Virus Gene Expression: An Overview of the Cis- and Trans-Acting Components.* In: R. Koshy und W.H. Caselmann (Herausgeber). *Hepatitis B Virus: Molecular Mechanisms in Disease and Novel Strategies for Therapy.* Seite 21-50, Imperial College Press.

Kreuger, J., Spillmann, D., Li, J.P. und Lindahl, U. (2006). *Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity.* *J. Cell. Biol.* 174: 323-327.

Ladner, S.K., Otto, M.J., Barker, C.S., Zaifert, K., Wang, G.H., Guo, J.T., Seeger, C. und King, R.W. (1997). *Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stable transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1715-1720.

Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* *Nature.* 227 (5259): 680-685.

Lambert, C., Döring, T. und Prange, R. (2007). *Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin.* *J. Virol.* 81 (17): 9050-9060.

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

Lanford, R.E., Chavez, D., Brasky, K.M., Burns III, R.B. und Rico-Hesse, R. (1998). *Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 5757-5761.

Lavanchy, D. (2004). *Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures.* *J. Viral. Hepatitis* 11: 97-107.

Lee, T.H., Elledge, S.J. und Butel, J.S. (1995). *Hepatitis B virus X protein interacts with a probable cellular DNA repair protein.* *J. Virol.* 69: 1107-1114.

Leistner, C.M., Grün-Bernhard, S. und Glebe, D. (2008). *Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus.* *Cell. Microbol.* 10: 122-133.

Lien, J.M., Aldrich, C.E. und Mason, W.S. (1986). *Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis.* *J. Virol.* 57: 229-236.

Lin, Y., Nomura, T., Cheong, J., Dorjsuren, D., Lida, K. und Murakami, S. (1997). *Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor IIB and the RNA polymerase II subunit 5.* *J. Biol. Chem.* 272: 7132-7139.

- Liu, N., Tian, R. und Loeb, D.D. (2003).** *Base pairing among three cis-acting sequences contributes to template switching during hepadnavirus reverse transcription.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 1984-1989.
- Liu, M.-C., Yu, M., Zhang, N.-L., Gong, W.-B., Wang, Y., Piao, W.-H., Wang, Q.-H. und Wang, G.-Q. (2004).** *Dynamic analysis of hepatitis B virus DNA and its antigens in 2.2.15 cells.* J Viral Hepatitis: 124-129.
- Lo, W.Y. und Ting, L.P. (1994).** *Repression of enhancer II activity by a negative regulatory element in the hepatitis B virus genome.* Virology 68: 1758-1764.
- Lopez-Cabrera, M., Letovsky, J., Hu, K.Q. und Siddiqui A. (1990).** *Multiple liver-specific factors bind to hepatitis B virus core/pregenomic promotor: trans-activation and repression by CCAAT/enhancer binding protein.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5069-5073.
- Lürmann, A. (1885).** *Eine Icterusepidemie.* Berl. Klin. Wochenschr. 22: 20-23.
- Mangold, C.M.T. und Streeck, R.E. (1993).** *Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein.* J. Virol. 67 (8): 4588-4597.
- Mangold, C.M.T., Unckell, F., Werr, M. und Streeck, R.E. (1997).** *Analysis of the intermolecular disulfide bonds and free sulfhydryl groups in hepatitis B surface antigen particles.* Arch. Virol. 142: 2257-2267.
- Marion, P.L., Oshiro, L., Regnery, D.C., Scullard, G.H. und Robinson, W.S. (1980).** *A virus in Beechey ground squirrels which is related to hepatitis B virus of man.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 2941-2945.
- Marion, P.L. (1991).** *Ground squirrel hepatitis virus, p. 39–51.* In A. McLachlan (ed.), *Molecular biology of the hepatitis B virus.* CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Markovic, I., Stantchev, T.S., Fields, K.H., Tiffany, L.J., Tomic, M., Weiss, C.D., Broder, C.C., Strebel, K. und Clouse, K.A. (2004).** *Thiol/disulfide exchange is a prerequisite for CXCR4-tropic HIV-1 envelope-mediated T-cell fusion during viral entry.* Blood 103 (5): 1586-1594.
- Marsh, M. und Helenius, A. (2006).** *Virus entry: open sesame.* Cell 124: 729-740.
- Mason, W.S., Seal, G. und Summers, J. (1980).** *Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus.* J. Virol. 36: 829–836.
- Mason, W.S., Burrell, C.J., Casey, J., Gerlich, W.H., Howard, C.R., Kann, M., Lanford, R., Newbold, J., Schaefer, S., Taylor, J.M. und Will, H.** *Family Hepadnaviridae,* in C.M Fauquet, M.A. Mayo, Manilof, J., U. Desselberger und

L.A. Ball (editors). *Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier, Amsterdam 2005, Seiten 373-384.

McClure, M.O., Moore, J.P., Blanc, D.F., Scotting, P., Cook, G.M. und Keynes, R.J. et al. (1992). *Investigations into the mechanism by which sulfated polysaccharides inhibit HIV infection in vitro*. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 19-26.

Miller, R.H., Tran, C.T. und Robinson, W.S. (1984). *Hepatitis B virus particles of plasma and liver contain viral DNA-RNA hybrid molecules*. *Virology* 139: 53-63.

Miller, R.H. und Robinson, W.S. (1986). *Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 83: 2531-35.

Mitsya, H., Looney, D.J., Kuno, S., Ueno, R., Wong-Staal, F. und Broder, S. (1988). *Dextran sulfate suppression of viruses in the HIV family: inhibition of virion binding to CD4+ cells*. *Science* 240: 646-649.

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

Nainan, O.V., Khristova, M.L., Byun, K., Xia, G., Taylor, P.E., Stevens, C.E. und Margolis, H.S. (2002). *Genetic variation of hepatitis B surface antigen coding region among infants with chronic hepatitis B virus infection*. *J. Med. Virol.* 68: 319-327.

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

Newbold, J.E., Xin, H., Tencza, M., Sherman, G., Dean, J., Bowden, S. und Locarnini, S. (1995). *The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes*. *J. Virol.* 69: 3350-3357.

Norder, H., Ebert, J.W., Fields, H., Mushawar, I.K. und Magnius L.O. (1996). *Complete sequencing of a Gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus*. *Virology* 218: 214-223.

Norder, H., Courouce, A.M., Coursaget, P., Echevarria, J.M., Lee, S.D., Mushahwar, I.K., Robertson, B.H., Locarnini, S. und Magnius, L.O. (2004). *Genetic diversity of hepatitis B viruses strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes*. *Intervirology* 47: 289-309.

Offensperger, W.B., Offensperger, S., Walter, E., Blum, H.E. und Gerok, W. (1991). *Sulfated polyanions do not inhibit duck hepatitis B virus infection*. *Antimicrob. Agents Chemotherap.* 35: 2431-2433.

Ogata, N., Cote, P.J., Zanetti, A.R., Miller, R.H., Shapiro, M., Gerin, J. und Purcell, R.H. (1999). *Licensed recombinant hepatitis B vaccines protect chimpanzees against infection with the prototype surface gene mutant of hepatitis B virus*. *Hepatology* 30: 779-786.

Ohnuma, H., Takai, E., Machida, A., Tsuda, F., Okamoto, H., Tanaka, T., Naito, M., Munekata, E., Miki, K., Miyakawa, Y. und Mayumi, M. (1990). *Synthetic oligopeptides bearing a common or subtypic determinant of hepatitis B surface antigen*. *J. Immun.* 145: 2265-2271.

Oropeza, C.E. und McLachlan, A (2007). *Complementarity between epsilon and phi sequences in pregenomic RNA influences hepatitis B virus replication efficiency*. *Virology* 359 (2): 371-381.

Owada, T., Matsubayashi, K., Sakata, H., Ihara, H., Sato, S., Ikebuchi, K., Azuma, H. und Ikeda, H. (2006). *Interaction between desialylated hepatitis B virus and asialoglycoprotein receptor on hepatocytes may be indispensable for viral binding and entry*. *J. Viral. Hepat.* 13: 11-18.

Perlman, D. und Hu, J. (2003). *Duck hepatitis B virus virion secretion requires a double-stranded DNA genome*. *J. Virol.* 77: 2287-2294.

Ponsel, D. und Bruss, V. (2003). *Mapping of amino acid side chains on the surface of hepatitis B virus capsids required for envelopment and virion formation*. *J. Virol.* 77: 416-422.

Pourcel, C., Louise, A., Gervais, M., Chenciner, N., Dubois, M.F. und Tiollais, P. (1982). *Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in mouse cells transformed with cloned viral DNA*. *J. Virol.* 42: 100-105.

Prassolov, A., Hohenberg, H., Kalinina, T., Schneider, C., Cova, L., Krone, O., Frolich, K., Will, H. und Sirma, H. (2003). *New hepatitis B virus of cranes that has an unexpected broad host range*. *J. Virol.* 77:1964-76.

Preikschat, P. (2000). *Charakterisierung von Hepatitis B-Virus-Populationen in langzeit-immunsupprimierten Virusträgern im Verlauf der chronischen Hepatitis unter besonderer Berücksichtigung der Rolle der Core-Deletionsvarianten*, Dissertation, Humboldt-Universität Berlin.

Pugh, J.C. und Jesse, W.S. (1989). *Infection and uptake of hepatitis B virus duck hepatocytes maintained in the presence of dimethyl sulfoxide*. *Virology* 172: 564-572.

Pugh, J.C, Di, Q., Mason, W.S. und Simmons, H. (1995). *Susceptibility to duck hepatitis B virus infection is associated with the presence of cell surface receptor sites that efficiently bind viral particles*. *J. Virol.* 69: 4814-4822.

Pult, I., Netter, H.J., Bruns, M., Prassolov, A., Sirma, H., Hohenberg, H., Chang, S. F., Frolich, K., Krone, O., Kaleta, E. F. und Will, H. (2001). *Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks*. *Virology* 289: 114-28.

- Qiu, X., Schröder, P. und Bridon, D. (1996).** *Identification and characterization of a C(K/R)TC motif as a common epitope present in all subtypes of hepatitis B surface antigen.* J. Immunol. 156(9): 3350-3356.
- Rabe, B., Vlachou, A., Pante, N., Helenius, A. und Kann, M. (2003).** *Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 9849-9854.
- Rabe, B., Glebe, D. und Kann, M. (2006).** *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. 80: 5465-5473.
- Rall, L.B., Standring, D.N. und Laub, O. (1983).** *Transcription of Hepatitis B virus by RNA polymerase II.* Mol. Cell. Biol. 3: 1766-1773.
- Rana, B., Mischoulon, D., Xie, Y., Bucher, N.L. und Farmer, S.R. (1994).** *Cell-extracellular matrix interaction can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes: reciprocal expression of C/EBP alpha and immediate-early growth response transcription factors.* Moll. Cell Biol. 14: 5858-5869.
- Raney, A.K., Johnson, J.L., Palmer, C.N.A. und McLachlan, A. (1997).** *Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis virus nucleocapsid promoter.* J. Virol. 71: 1058-1071.
- Rigg, R.J. und Schaller, H. (1992).** *Duck hepatitis B virus infection of hepatocytes is not dependent on low pH.* J. Virol. 66 (5): 2829-2836.
- Robertson, B.H. und Margolis H.S. (2002).** *Primate hepatitis B viruses – genetic diversity, geography and evolution.* Rev. Med. Virol. 2002; 12: 133–141.
- Robinson, W. S., und Greenman, R. L. (1974).** *DNA polymerase in the core of the human hepatitis B candidate.* J. Virol 13: 1231-1236.
- Robinson, W.S. (1977).** *The genome of hepatitis B virus.* Ann. Rev. Microbiol. 31: 357-377.
- Robinson, W.S., Marion, P.L. und Miller, R.H. (1984).** *The hepadna viruses of animals.* Semin. Liver Dis. 4 (4): 347-360.
- Robinson, W.S. (1991).** *Hepadnaviridae and their replication.* In: Fundamental Virology 2nd Ed pp. 989-1021, Fields, B.N. and Knipe, D.N., Raven Press, New York.
- Rosmorduc, O., Petit, M.A., Pol, S., Capel, F., Bortolotti, F., Berthelot, P., Brechot, C. und Kremsdorf, D. (1995).** *In vivo and in vitro expression of defective hepatitis B virus particles generated by spliced hepatitis B virus RNA.* Hepatology 22: 10-19.

- Rost, M., Mann, S., Lambert, C., Döring, T., Thomé, N. und Prange, R. (2006).** *Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation.* J. Biol. Chem. 281 (39): 29297-29308.
- Runge, D.M., Runge, D., Dorko, K., Pizarov, L.A., Leckel, K., Kostrubsky, V.E., Thomas, D., Strom, S.C. und Michalopoulos, G.K. (1999).** *Epidermal growth factor- and hepatocyte growth factor-receptor activity in serum-free cultures of human hepatocytes.* J. Hepatol. 30: 265-274.
- Ryser, H.J.P. und Flückiger, R. (2005).** *Progress in targeting HIV-1 entry.* Drug Discovery Today 10 (16): 1085-1094.
- Sattler, F. und Robinson, W.S. (1979).** *Hepatitis B viral DNA have cohesive ends.* J. Virol. 32: 226-233.
- Schaefer, S. (2005).** *Hepatitis B virus: significance of genotypes.* J. Virol. Hepatitis 12: 111-124.
- Schaefer, S (2007).** *Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes.* World J. Gastroenterol. 13 (1): 14-21.
- Schaller, H. und Fischer, M (1991).** *Transcriptional control of hepadnavirus gene expression.* Curr. Top. Microbiol. Immunol. 168: 21-39.
- Schelhaas, M., Malmström, J., Pelkman, L., Haugstetter, J., Ellgaard, L., Grünewald, K. und Helenius, A. (2007).** *Simian virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells.* Cell 131: 516-529.
- Schuetz, J.D. und Schuetz, E.G. (1993).** *Extracellular matrix regulation of multidrug resistance in primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes.* Cell Growth Differ. 4: 31-40.
- Schulze, A., Gripon, P. und Urban, S. (2007).** *Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans.* Hepatology 46 (6): 1759-1768.
- Seeger, C. und Maragos, J. (1989).** *Molecular analysis of the function of direct repeats and a polypurine tract for plus-strand DNA priming in woodchuck hepatitis virus.* J. Virol. 63: 1907-1915.
- Seglen, P.O. (1976).** *Preparation of isolated rat liver cells.* Methods Cell. Biol. 13: 29-83.
- Seifer, M., Zhou, S. und Standring, D.N. (1993).** *A micromolar pool of antigenically distinct precursors is required to initiate cooperative assembly of hepatitis B virus capsids in Xenopus oocytes.* J. Virol. 67: 249-257.

- Seitz, S., Urban, S., Antoni, C und Böttcher, B. (2007).** *Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions.* EMBO 26 (18): 4160-4167.
- Sells, M.A., Chen, M.L. und Acs, G. (1987).** *Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis virus DNA.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1005-1009.
- Sells, M.A., Zelent, A.Z., Shvartsman, M. und Acs, G. (1988).** *Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions.* J. Virol. 62: 2836-2844.
- Seeger, C., Ganem, D. und Varmus, H.E. (1986).** *Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy.* Science 232: 477-484.
- Shaul, Y., Rutter, W.J. und Laub, O. (1985).** *A human hepatitis B virus enhancer element.* EMBO J. 4: 427-430.
- Shearer, M.H., Sureau, C., Dunbar, B. und Kennedy, R.C. (1998).** *Structural characterization of viral neutralizing monoclonal antibodies to hepatitis B surface antigen.* Mol. Immunol. 35: 1149-1160.
- Shouval D. (2003).** *Hepatitis B vaccines.* Review J Hepatology 39: 70-76.
- Siddiqui, A., Sattler, F.R. und Robinson, W.S. (1979).** *Restriction endonuclease cleavage map and location of unique features of the DNA of hepatitis B virus subtype adw2.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4664-4668.
- Soussan, P., Garreau, F., Zylberberg, H., Ferray, C., Brechot, C. und Kremsdorf, D. (2000).** *In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA.* J. Clin. Invest. 105: 55-60.
- Soussan, P., Tuveri, P., Nalpas, B., Garreau, F., Zavala, F., Masson, A., Pol, S., Brechot, C. und Kremsdorf, D. (2003).** *The expression of hepatitis B spliced protein (HBSP) encoded by a spliced hepatitis B virus RNA is associated with viral replication and liver fibrosis.* J. Hepatol. 38: 343-348.
- Spear, P.G., Shieh, M.T., Herold, B.C., WuDunn, D und Koshy, T.I. (1992).** *Heparan sulfate glycosaminoglycans as primary cell surface receptors for herpes simplex virus.* Adv. Exp. Med. Biol. 313: 341-353.
- Sprengel, R., Kaleta, E.F. und Will, H. (1988).** *Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons.* J. Virol. 62: 3832-3839.
- Standring, D.N., Rutter, W.J., Varmus, H.E. und Ganem, D. (1984).** *Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in cultured murine cells initiates within the presurface region.* J. Virol. 50: 563-571.
- Stibbe, W. und Gerlich, W.H. (1983).** *Variable protein composition of hepatitis B surface antigen from different donors.* Virology 123: 436-442.

- Su, T.S., Lai, C.J., Huang, L.H., Lin, Y.K., Yauk, Y.K., Chang, C.M., Lo, S.J. und Han, S.H. (1989).** *Hepatitis B virus transcripts produced by RNA splicing.* J Virol. 63: 4011-4018.
- Su, H, und Yee J.K. (1992).** *Regulation of hepatitis B gene expression by it two enhancers.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 2708-2712.
- Subtil, A., Hemar, A. und Dautry-Varsat, A. (1994).** *Rapid endocytosis of interleukin 2 receptors when clathrin-coated pit endocytosis is inhibited.* J. Cell. Sci. 107: 3461-3468.
- Sukeno, N., Shirachi, R., Yamaguchi, J., Ishida, N. (1972).** *Reduction and reoxidation of Australia antigen: loss and reconstitution of particle structure and antigenicity.* J. Virol. 9 (1):182–183.
- Summers, J.A., O'Connell, A. und Millman, I. (1975).** *Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure or DNA extracted from Dane particles.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 4597-4601.
- Summers, J., J.-M. Smolec und R. Snyder (1978).** *A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 4533-4537.
- Summers, J. und Mason, W.S. (1982).** *Replication of the genome hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate.* Cell 29: 403-415.
- Summers, J., Smith, P.M. und Horwich, A.L. (1990).** *Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification.* J. Virol. 64: 2819-2824.
- Tajima, Y., Nagumo, F., Nishimura, T. und Tadano, J. (1992).** *Phoshotungstate as a useful eluent for hepatitis B virus surface antigen purification by heparin-sepharose affinity chromatography.* Biomed. Chromatogr. 6: 72-76.
- Takada, S., Kaneniwa, N., Tsuchida, N. und Koike, K. (1996).** *Hepatitis B virus X gene expression is activated by X protein but repressed by p53tumor suppressor gene product in the transient expression system.* Virology 216: 80-89.
- Tang, H., Banks, K.E., Anderson, A.L. und McLachlan, A. (1991).** *Hepatitis B virus transcription and replication.* Drug News Perspect. 14 (6): 325-334.
- Tang, H. und McLachlan, A. (2002).** *A pregenomic RNA sequence adjacent to DR1 and complementary to epsilon influences hepatitis B virus replication efficiency.* Virology 303: 199-210.
- Testut P., C. A. Renard, O. Terradillos, L. Vitvitski-Trepo, F. Tekaiia, C. Degott, J. Blake, B. Boyer und M. A. Buendia (1996).** *A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska.* J. Virol 70: 4210-4219.

- Tiollais, P., Pourcel, C. und Dejean, A. (1985).** *The hepatitis B virus.* Nature 317: 489-95.
- Toh, H., Hayashida, H. und Miyata, T. (1983).** *Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerase of hepatitis B virus and cauliflowermosaic virus.* Nature 305: 827-9.
- Treichel, U., Meyer zum Büschenfelde, K.H., Stockert, R.J., Poralla, T. und Gerken, G. (1994).** *The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carriers.* J. Gen. Virol. 75 (11): 3021-3029.
- Treichel, U., Meyer zum Büschenfelde, K.H., Dienes, H.P. und Gerken, G. (1997).** *Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells.* Arch. Virol. 142: 493-498.
- Treinin, M. und Laub, O. (1987).** *Identification of a promotor element located upstream from the hepatitis B virus X gene.* Mol. Cell. Biol. 7: 545-548.
- Tuttleman, J.S., Pourcel, C. und Summers, J. (1986)a.** *Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells.* Cell 47: 451-460.
- Tuttleman, J.S., Pugh, J.C. und Summers, W. (1986)b.** *In vitro infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus.* J Virol. 58: 17-25.
- Vaudin, M., Wolstenholme, A.J., Tsiquaye, K.N., Zuckerman, A.J. und Harrison, T.J. (1988).** *The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee.* J. Gen. Virol. 69: 1389-1389.
- Wallin, M., Ekström, M. und Garoff, H. (2004).** *Isomerization of the intersubunit disulphide-bond in Env controls retrovirus fusion.* EMBO J. 23: 54-65.
- Wallin, M., Ekström, M. und Garoff, H. (2005).** *The fusion-controlling disulfide bond isomerase in retrovirus Env is triggered by protein destabilization.* J. Virol. 79 (3): 1678-1685.
- Watanabe, T., Sorensen, E.M., Naito, A., Schott, M., Kim, S. und Ahlquist, P. (2007).** *Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 (24): 10205-10210.
- Wang, G.H. und Seeger, C. (1992).** *The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis.* Cell 71: 663-670.
- Wang, G.H. und Seeger, C. (1993).** *Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses.* J. Virol. 67: 6507-6512.

Wang, L.H., Rothberg, K.G. und Anderson, R.G. (1993). *Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation.* J. Cell. Biol. 123: 1107-1117.

Warren, K.S., Heeney, J.L., Swan, R.A., Heriyanto, A. und Verschoor E.J. (1999). *A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (pongo pygmaeus).* J. Virol. 73: 7860-7865.

Weber, M., Bronsema, V., Bartos, H., Bosserhoff, A., Bartenschlager, R. und Schaller, H. (1994). *Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription.* J. Virol. 68: 2994-2999.

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

Wu, H.L., Chen, P.J., Lin, M.H. und Chen, D.S. (1991). *Temporal aspects of major viral transcript expression in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA: with emphasis on the X transcripts.* Virology 185: 644-651.

Wu, T.T., Coates, L., Aldrich, C.E., Summers, J. und Mason, W.S. (1990). *In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway.* Virology 259: 299-304.

Xu, Z., Jensen, G. und Yen, T.S. (1997). *Activation of hepatitis B virus S promotor by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum.* J Virol. 71: 7387-7392.

Yaginuma, K., Shirakata, Y., Kobayashi, M. und Koike, K. (1987). *Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture by transient expression of transfected HBV DNA.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 2678-2682.

Yu, M.W. und Chen, C.J. (1994). *Hepatitis B and C viruses in the development of hepatocellular carcinoma.* Crit. Rev. Oncol. Hematol. 17 (2): 71-91.

Yu, X. und Mertz, J.E. (1996). *Promoters for synthesis of the pre-C and pregenomic mRNAs of human hepatitis B virus are genetically distinct and differentially regulated.* J. Virol. 70: 8719-8726.

Yu, X. und Mertz, J.E. (1997). *Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoters of human hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily.* J. Virol. 71: 9366-9374.

Yu, X. und Mertz, J.E. (2003). *Distinct modes of regulation of transcription of hepatitis B virus by the nuclear receptors HNF4alpha and COUP-TF1.* J. Virol. 77: 2489-2499.

Yuh, C.H. und Ting, L.P. (1991). *C/EBP-like proteins binding to the functional box-alpha and box-beta of the second enhancer of hepatitis B virus.* Mol. Cell. Biol. 11: 5044-5052.

Yuh, C.H., Chang, Y.L. und Ting, L.P. (1992). *Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNA's of hepatitis B virus.* J. Virol. 66: 4073-4084.

Yuh, C.H. und Ting, L.P. (1993). *Differentiated liver cell specificity of the second enhancer of hepatitis B virus.* J. Virol. 67 (1): 142-149.

Zahn, A. und Allain, J.P. (2005). *Hepatitis C virus and hepatitis B virus bind to heparin: purification of largely IgG-free virions from infected plasma by heparin chromatography.* J. Gen. Virol. 86: 677-685.

Zang, W.Q., Fieno, A.M., Grant, R.A. und Yen, T.S. (1998). *Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a cellular protein that binds to the hepatitis B virus postranscriptional regulatory element.* Virology 248: 46-52.

Zang, W.Q. und Yen, T.S. (1999). *Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase.* Virology 259: 299-304.

Zhang, P., Raney, A.K. und McLachlan, A. (1992). *Characterization of the hepatitis B virus X-and nucleocapsid gene transcriptional regulatory elements.* Virology 191: 31-41.

Zhang, P. und McLachlan, A. (1994). *Differentiation-specific transcriptional regulation of the hepatitis B virus nucleocapsid gene in human hepatoma cell lines.* Virology 202: 430-440.

Zhang, Z., Protzer, U. et al. (2004). *Inhibition of cellular proteasome activities enhances hepadnavirus replication in an HBx-dependent manner.* J. Virol. 78: 4566-4572.

Zhu, Y., Yamamoto, T., Cullen, J., Saputelli, J., Aldrich, C.E., Miller, D.S., Litwin, S., Furman, P.A., Jilbert, A.R. und Mason, W.S. (2001). *Kinetics of hepadnavirus loss from the liver during inhibition of viral DNA synthesis.* J. Virol. 75 (1): 311-322.

Zoulim, F., Saputelli, J. und Seeger, C. (1994). *Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo.* J. Virol. 68: 2026-2030.

Danksagung

Ich danke

Herrn Prof. Dr. phil. nat. W. H. Gerlich

(Institut für Medizinische Virologie, FB Humanmedizin, JLU Gießen)
für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung optimaler
Arbeitsbedingungen, seine engagierte Betreuung, praktische Unterstützung und
ständige Gesprächsbereitschaft während aller Phasen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. A. Bindereif

(Institut für Biochemie der naturwissenschaftlichen Fachbereiche
- Biologie - der JLU Gießen)
für die freundliche Betreuung und Vertretung meiner Arbeit vor den
naturwissenschaftlichen Fachbereichen.

Herrn Prof. Dr. W. Clauss

(Institut für Tierphysiologie der naturwissenschaftlichen Fachbereiche
- Biologie - der JLU Gießen)
für die freundliche Bereitschaft als Drittprüfer meiner Disputation beizusitzen.

Herrn PD Dr. D. Glebe

(Institut für Medizinische Virologie, FB Humanmedizin, JLU Gießen)
für die intensive Zusammenarbeit, für die wissenschaftlichen Diskussionen und
die Hilfestellung bei der Planung und Realisierung der Experimente.

Herrn Prof. Dr. Kestutis Sasnauskas und Frau Dr. Aurelia Zvirblienė

(Institute for Biotechnology, Laboratory of Eukaryote Genetic Engineering,
Vilnius, Litauen)
für die Herstellung und Überlassung des monoklonalen HB1.

Herrn Prof. Dr. P. Pumpens und Dr. I. Sokminkaja

(Biomedical Research and Study Center der Universität von Riga, Lettland)
für die Herstellung und Überlassung des Kaninchen Antiserum frCP +
28aa preS1 20 – 47 und der Bestimmung der Binderegion des Antikörpers HB1.

allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Virologie

für das kollegiale, freundliche Arbeitsklima, die große Hilfsbereitschaft und die
erfolgreiche Zusammenarbeit.

meinem Ehemann Marco Bernhard

der mir während der Anfertigung der Arbeit verständnisvoll
sowie mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Lebenslauf

Vorname:	Stefanie
Name:	Grün-Bernhard
Geburtsdatum:	12.07.1979
Nationalität	Deutsch
Familienstand:	Verheiratet
Schul Ausbildung:	
August 1990 – Juli 1999	Sophie-Hedwig-Gymnasium Diez Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
August 1986 – Juli 1990	Karl-von-Ibell Grundschule Diez
Studium/Promotion:	
Seit Oktober 2004 – Dezember 2008	Promotion am Institut für Medizinische Virologie Justus-Liebig-Universität Gießen AG von Prof. Dr. W. H. Gerlich „Molekulare Determinanten der Infektiosität von Hepatitis B Virus Partikeln“
November 2004 – Februar 2005	Marie Curie Training Program am Biomedical Research and Study Center der Universität von Riga, Lettland “Artificial chimeric proteins as diagnostic, vaccine, and gene therapy carriers”
August 2004	Praktikum an der School of Biological Sciences der Royal Holloway University of London, Egham, England
Oktober 2003 – Juli 2004	Diplomarbeit am Institut für Medizinische Virologie Justus-Liebig-Universität Gießen AG von Prof. Dr. W. H. Gerlich „Quantitativer Nachweis der replikativen Intermediate des Hepatitis B Virus in infizierten Tupaia Hepatozyten“ Abschluss: Diplom-Biologin
Oktober 2001 – September 2003	Hauptstudium Biologie Justus-Liebig-Universität Gießen
Oktober 1999 – September 2001	Grundstudium Biologie, Universität Rostock Abschluss: Vordiplom

Teile der vorgelegten Arbeit sind Bestandteil von vier Publikationen und wurden auf mehreren internationalen Kongressen präsentiert.

Publikationen

Wittkop, L., **Grün-Bernhard, S.**, Schwarz, A., Delaleau, M., Rabe, B., Cazenave, C., Glebe, D. und Kann, M.

„Inhibition of protein kinase C phosphorylation of hepatitis B virus capsids inhibits virion formation and causes intracellular capsid accumulation”

eingereicht bei Journal of Virology

Tavakoli, S., Mederacke, I., Herzog-Hauff, S., Glebe, D., **Grün, S.**, Strand, D., Urban, S., Gehring, A., Galle, P. R. and Böcher, W. O. (2008)

„Peripheral blood dendritic cells are phenotypically and functionally intact in chronic hepatitis B virus (HBV) infection”

Clinical and Experimental Immunology 2008; 151: 61-70

Leistner, C. M., **Grün-Bernhard, S.** and Glebe, D. (2007)

„Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus“

Cellular Microbiology 2007; 10: 122-133

Glebe, D., Urban, S., Knoop, E. V., Cag, N., Krass, P., **Grün, S.**, Bulavaite, A., Sasnauskas, K. and Gerlich, W. H. (2005)

„Mapping of the Hepatitis B Virus Attachment Site by Use of the Infection-Inhibiting preS1 Lipopeptides and Tupaia Hepatocytes”

Gastroenterology 2005; 129: 234-245

Poster

Early Steps of the Virus Life Cycle: Molecular and Cellular Insights,
Institut Pasteur, Paris, Frankreich, 4. – 5. Oktober 2007,

“Early Steps in the life cycle of Hepatitis B Virus“

D. Glebe, C. M. Leistner, **S. Grün-Bernhard** and W. H. Gerlich

Third European Congress of Virology,

Nürnberg, Deutschland, 1. – 5. September 2007,

“Role of disulfide-bridges of small hepatitis B virus surface protein for viral infectivity”

S. Grün-Bernhard, C. M. Leistner and D. Glebe

The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses,

Heidelberg, Deutschland, 18. – 21. September 2005,

“HBV infection follows a two-step mechanism mediated by the preS1 and the S-domain”

D. Glebe, **S. Grün**, A. Bulavaite, K. Sasnauskas and W. H. Gerlich

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie,

Hannover, Deutschland, 16. – 19. März 2005,

„ Fine Mapping of a Hepatitis B Virus attachment site necessary for infection“

D. Glebe, S. Urban, E. Knoop, N. Cag, **S. Grün** and W. H. Gerlich

The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses,

Woodshole, Vereinigte Staaten von Amerika, 23. – 31. Oktober 2004,

„Fine Mapping of a Hepatitis B Virus attachment site necessary for infection“

D. Glebe, S. Urban, E. Knoop, N. Cag, **S. Grün** and W. H. Gerlich

Kongressbeiträge

International Meeting of the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses,

Rom, Italien, 16. – 20. September 2007,

“A triple function for the N-terminal domain of large HBS protein: viral binding, antigenicity and influence on folding of the S-domain”

C. M. Leistner, **S. Grün-Bernhard**, I. Sominskaya, D. Skrastina, P. Pumpens,
A. Bulavaite, K. Sasnauskas, W. H. Gerlich and D. Glebe

The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses,
Vancouver, Kanada, 17.–20. September 2006,

“Attachment and entry of hepatitis B virus is mediated by coordinate action of preS1 and S-domains”

D. Glebe, **S. Grün-Bernhard**, C. M. Leistner, A. Bulavaite, K. Sasnauskas and W. H. Gerlich

12th International symposium on viral hepatitis and liver disease,
Paris, Frankreich, 01. – 05. Juli 2006,

“Hepatitis B Virus infection is dependent on a multistep attachment and entry process mediated by the pres1 and the S-domain”

D. Glebe, **S. Grün**, C. M. Leistner, A. Bulavaite, K. Sasnauskas and W. H. Gerlich

41st Annual meeting of „The European Association For The Study Of The Liver”,
Wien, Österreich, 26. – 30. April 2006,

“Hepatitis B Virus infection is dependent on a multistep attachment and entry process mediated by the pres1 and the S-domain”

D. Glebe, **S. Grün**, A. Bulavaite, K. Sasnauskas and W. H. Gerlich

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie,
München, Deutschland, 15. – 18. März 2006,

„Multistep attachment and entry process of Hepatitis B Virus infection mediated by the preS1 and the S-domain“

D. Glebe, **S. Grün**, C. M. Leistner, A. Bulavaite, K. Sasnauskas and W. H. Gerlich

3. Workshop „Zellbiologie von Virusinfektionen“ der Gesellschaft für Virologie,
Zeilitzheim, Deutschland, 13. – 15. September 2004,

„Fine Mapping of a Hepatitis B Virus attachment site necessary for infection”

D. Glebe, S. Urban, E. Knoop, N. Cag, **S. Grün** and W. H. Gerlich

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie,
Tübingen, Deutschland, 17. – 20. März 2004,

„Fine Mapping of a Hepatitis B Virus attachment site necessary for infection”

D. Glebe, S. Urban, E. Knoop, N. Cag, **S. Grün** and W. H. Gerlich

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt,
die vorliegende Arbeit selbständig ausgeführt
und keine anderen als die angegebenen
Hilfsmittel verwendet zu haben.

Stefanie Grün-Bernhard

