



**Replikation von drei Säuger-Hepadnaviren im  
Amerikanischen Waldmurmeltier (*Marmota monax*)  
und Expression der viralen Oberflächenproteine  
in transgenen Pflanzen**

**HEIKE LORENZ**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

**édition scientifique**  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

Aus der  
Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische  
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. E. F. Kaleta

und dem

Institut für Medizinische Virologie  
des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. W. H. Gerlich

**Replikation von drei Säuger-Hepadnaviren  
im Amerikanischen Waldmurmeltier (*Marmota monax*)  
und Expression der viralen Oberflächenproteine  
in transgenen Pflanzen**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**HEIKE LORENZ**

Tierärztin aus Hoyerswerda

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter:

Prof. Dr. E. F. Kaleta

Prof. Dr. W. H. Gerlich

HD Dr. N. Tautz

Tag der Disputation: 20.12.2006

Ich erkläre:

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

### Danksagung

Herrn Prof. Dr. W.H. Gerlich gilt mein besonderer Dank für das interessante Dissertationsthema, die konstruktiven Vorschläge und die stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. E.F. Kaleta möchte ich für die Vertretung und Begutachtung dieser Arbeit vor dem Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen danken.

Herrn Dr. Dieter Glebe danke ich für die intensive Zusammenarbeit, für die wissenschaftlichen Diskussionen und die Hilfestellung bei der Planung und Realisierung der Experimente.

Desweiteren möchte ich meinen Kooperationspartnern Herrn Dr. Stephan Menne (College of Veterinary Medicine der Cornell University, Ithaka, NY, USA), Herrn Dr. J. Imani (Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) und Herrn Dr. M. Lu (Institut für Virologie des Universitätsklinikum Essen) für die engagierte Zusammenarbeit und die vielen Anregungen danken.

Meinen KollegInnen sowie allen MitarbeiterInnen des Instituts für Medizinische Virologie danke ich für das kollegiale, freundliche Arbeitsklima, die große Hilfsbereitschaft und die fruchtbare Zusammenarbeit.

Großer Dank gilt meinem Freund Micha, der mir beim Anfertigen dieser Arbeit verständnisvoll und aufmunternd zur Seite gestanden hat.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter Marion Lorenz und meiner Schwester Katja Lorenz, die mich während der gesamten Studien- und Promotionszeit tatkräftig und liebevoll unterstützt haben.

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Geschichtliche Einleitung	1
1.2	Die Virusfamilie <i>Hepadnaviridae</i>	1
1.3	Morphologie und Struktur des Virus	3
1.4	Genomstruktur	4
1.5	Infektion durch das Hepatitis B Virus des Menschen	6
1.5.1	Epidemiologie und Übertragung	6
1.5.2	Klinischer Verlauf	7
1.5.3	Pathogenese, Immunantwort und Eliminierung des Virus	7
1.5.4	Prävention und Therapie	9
1.6	Tiermodelle für die Hepatitis B Infektion des Menschen	11
1.6.1	Die WHV Infektion bei Woodchucks	11
1.6.2	Das Ground Squirrel- und Arctic Squirrel Hepatitis Virus (GSHV, ASHV)	12
1.6.3	Die DHBV Infektion bei Enten	13
1.7	Verwendung transgener Pflanzen zur Produktion essbarer Impfstoffe	14
1.7.1	Integration von Fremd-DNA in das Genom der Pflanze	15
1.8	Ziele und Ansätze dieser Arbeit	18
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>20</b>
2.1	Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	20
2.2	Chemikalien	21
2.3	Enzyme	21
2.4	Plasmide und Bakterienstämme	22
2.5	Antikörper und Antiseren	22
2.6	Primer und Hybridisierungssonden (Hybprobes)	23
2.6.1	all ortho-Primer und -Hybprobes	23
2.6.2	Primer für die präS1-Sequenzierung von ASHV und GSHV	23
2.6.3	Primer und Nukleotide für die Klonierung der SWHs-, MWHs- und LWHs-Gene	23

2.6.4	Primer für die Sequenzierung der SWHs-, MWHs- und LWHs-Gene	24
2.7	DNA- und Protein-Längenstandards	24
2.8	Kommerzielle Reaktionssysteme	24
2.9	Puffer, Lösungen und Medien	25
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>28</b>
3.1	Experimentelle Infektion von adulten Amerikanischen Waldmurmeltieren (Woodchucks) mit Woodchuck-, Ground Squirrel- und Arctic Squirrel Hepatitis Virus (WHV, GSHV, ASHV)	28
3.1.1	Quantitative Bestimmung der Virus-DNA mittels real-time PCR (LightCycler)	28
3.1.1.1	Prinzip der real-time PCR (LightCycler)	28
3.1.1.2	Spezifität der Primer und Hybridisierungs sonden (Hybprobes)	30
3.1.1.3	Isolierung der Virus-DNA aus Serum	30
3.1.1.4	Durchführung der PCR	30
3.1.1.5	Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte	31
3.1.2	Quantitative Bestimmung des Oberflächenantigens mit Hilfe der Laurell-Elektrophorese	32
3.1.2.1	Prinzip der Laurell-Elektrophorese	32
3.1.2.2	Durchführung der Laurell-Elektrophorese	33
3.1.2.3	Quantitative Bestimmung des Oberflächenantigens in den Seren der mit WHV, GSHV und ASHV inokulierten Woodchucks	35
3.1.3	Präzipitation und Detektion von Oberflächenantigen-Immunkomplexen	36
3.1.4	Isolierung von subviralen Partikeln (WHsAg, GSHsAg, ASHsAg) aus Serum	36
3.1.4.1	Zentrifugation des Serums durch ein Saccharose-Kissen	37
3.1.4.2	CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	37
3.1.4.3	Fraktionierung des CsCl-Gradienten	38
3.1.4.4	Ultrafiltration	38

3.1.5	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	39
3.1.6	Silberfärbung von SDS-Gelen	40
3.1.7	Detektion von Proteinen mittels Western Blot	40
3.1.7.1	Detektion des mittleren Oberflächenproteins (M-Protein) von WHV, GSHV und ASHV	41
3.1.7.2	Detektion des großen Oberflächenproteins (L-Protein) von WHV, GSHV und ASHV	42
3.1.8	präS1-Sequenzierung von ASHV und GSHV	42
3.2	Verwendung transgener Pflanzen zur Produktion von Impfstoffen gegen das Hepatitis B Virus	44
3.2.1	Präparation und Aufreinigung der Vektor-DNA	44
3.2.1.1	Der Vektor pPCV812	44
3.2.1.2	Restriktionsverdau des Vektors	44
3.2.1.3	Elektrophorese mit Low Melting Point (LMP)-Agarose	45
3.2.1.4	Verdau der LMP-Agarose mit $\beta$ -Agarase	46
3.2.1.5	Aufreinigung der DNA mit Hilfe von Mikrokonzentratoren	46
3.2.1.6	Dephosphorylierung des Vektors mit Antarktischer Phosphatase (AP)	47
3.2.2	Präparation und Aufreinigung der Insert-DNA	47
3.2.2.1	PCR zur Amplifikation der DNA-Fragmente	47
3.2.2.2	Restriktionsverdau der PCR-Amplifikate	49
3.2.2.3	Aufreinigung der Insert-DNA	49
3.2.3	Klonierung der WHV-Oberflächenprotein-Plasmide	50
3.2.3.1	Ligation der Insert-DNA (Expressionskassetten für SWHs, MWHs und LWHs) in den Vektor pPCV812	50
3.2.3.2	Transformation der WHV-Oberflächenprotein-Plasmide in kompetente E. coli	50
3.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus kompetenten E. coli	51
3.2.4.1	Selektion und Vermehrung der Plasmid-haltigen E. coli auf Agarplatten und in Flüssigkulturen	51
3.2.4.2	Minipräparation mittels Alkalischer Lyse	51
3.2.4.3	Maxipräparation mittels Alkalischer Lyse	52
3.2.4.4	Photometrische Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades der DNA	53

3.2.5	Isolierung von mRNA aus Pflanzengewebe	53
3.2.6	Nachweis spezifischer mRNA mittels RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR)	54
3.2.7	Isolierung subviraler Partikel (HBsAg und WHsAg) aus transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzell-Suspensionskulturen	55
3.2.7.1	Extraktion der subviralen Partikel (HBsAg und WHsAg)	55
3.2.7.2	Isolierung und Aufreinigung von subviralen Partikeln (HBsAg und WHsAg) mittels Dichtegradientenzentrifugation	56
3.2.7.3	Nachweis von HBsAg- sowie WHsAg-Untereinheiten mittels SDS-Page und Western Blot	57
3.2.7.4	Nachweis von HBsAg- sowie WHsAg- Partikeln mittels nativer Agarosegel-Elektrophorese und Western Blot	57
3.2.7.5	Quantitativer Nachweis von HBsAg mittels densitometrischer Auswertung des Chemilumineszenzsignals	58
3.2.7.6	Nachweis von HBsAg mittels ELISA	58
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
4.1	Experimentelle Infektion von adulten Amerikanischen Waldmurmeltieren mit Woodchuck-, Ground Squirrel- und Arctic Squirrel Hepatitis Virus (WHV, GSHV, ASHV)	60
4.1.1	Quantitative Bestimmung der Virus-DNA mittels real-time PCR	61
4.1.1.1	Schmelzkurvenanalytik	63
4.1.2	Quantitative Bestimmung des Oberflächenantigens mit Hilfe der Laurell-Elektrophorese	64
4.1.3	Untersuchung des Verlaufs der Antigenämie in chronisch WHV-infizierten Woodchucks nach Applikation von DNA- und Immunkomplex-Vakzinen in Kombination mit Lamivudin	67
4.1.3.1	Verlauf des WHsAg unter Lamivudin-Therapie	68
4.1.3.2	Verlauf des WHsAg unter Lamivudin-Therapie in Kombination mit DNA-Vakzinierung	69

4.1.3.3	Verlauf des WHsAg unter Lamivudin-Therapie in Kombination mit Immunkomplex- und DNA-Vakzinierung	70
4.1.4	Detektion von Oberflächenantigen-Immunkomplexen	71
4.1.4.1	Nachweis von Immunkomplexen in akut mit WHV infizierten Woodchucks	72
4.1.4.2	Nachweis von Immunkomplexen in chronisch mit WHV infizierten Woodchucks	74
4.1.5	Infektion von Woodchucks mit Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)	75
4.1.5.1	Kinetik der WHV-DNA	75
4.1.5.2	Kinetik des (freien) WHsAg	78
4.1.5.3	Detektion von WHsAg-Immunkomplexen	79
4.1.5.4	Kinetik von anti-WHc und anti-WHs	80
4.1.5.5	Kinetik des Leberenzym SDH (Sorbitol-Dehydrogenase)	81
4.1.6	Infektion von Woodchucks mit Ground Squirrel Hepatitis Virus (GSHV)	82
4.1.6.1	Kinetik der GSHV-DNA	82
4.1.6.2	Kinetik des (freien) GSHsAg	82
4.1.6.3	Detektion von GSHsAg-Immunkomplexen	84
4.1.6.4	Kinetik von anti-GSHc und anti-GSHs	84
4.1.6.5	Kinetik des Leberenzym SDH (Sorbitol-Dehydrogenase)	84
4.1.7	Infektion von Woodchucks mit Arctic Squirrel Hepatitis Virus (ASHV)	85
4.1.7.1	Kinetik der ASHV-DNA	85
4.1.7.2	Kinetik des (freien) ASHsAg	87
4.1.7.3	Detektion von ASHsAg-Immunkomplexen	87
4.1.7.4	Kinetik von anti-ASHc und anti-ASHs	88
4.1.7.5	Kinetik des Leberenzym SDH (Sorbitol-Dehydrogenase)	88
4.1.8	Vergleichende Analyse der Aminosäuresequenz der ASHV- und GSHV-präS1-Domäne von Inokulum und Virusreplikaten (Nachkommen-Viren) im Serum	88
4.1.9	Isolierung subviraler Partikel von WHV, GSHV und ASHV aus positiven Woodchuckseren	89

4.1.10	Charakterisierung der gereinigten Oberflächenproteine von WHV, GSHV und ASHV	92
4.1.10.1	SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung	92
4.1.10.2	Charakterisierung des mittleren Oberflächenproteins (M-Protein)	94
4.1.10.3	Charakterisierung des großen Oberflächenproteins (L-Protein)	95
4.2	Verwendung transgener Pflanzen zur Produktion von Impfstoffen gegen das Hepatitis B Virus	97
4.2.1	Nachweis der Expression von HBsAg (SHBs) in Karottenzell-Suspensionskulturen	97
4.2.1.1	Extraktion und Aufreinigung von HBsAg aus Karottenzell-Suspensionskultur mittels Dichtegradientenzentrifugation	98
4.2.1.2	Nachweis von HBsAg (SHBs) im Western Blot nach denaturierender SDS-PAGE	99
4.2.1.3	Nachweis von HBsAg-Partikeln im Western Blot nach nativer Agarosegel-Elektrophorese	101
4.2.1.4	Detektion des HBsAg mittels ELISA	103
4.2.2	Nachweis der Expression von WHsAg-Partikeln in Tabakpflanzen	103
4.2.2.1	Klonierung der für die Oberflächenproteine SWHs-, MWHs- und LWHs-codierenden Gene des Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) in den Vektor pPCV812	104
4.2.2.2	Transformation der Oberflächenprotein-exprimierenden Plasmide in Karotten- und Tabakzellen	105
4.2.2.3	Nachweis von MWHs-mRNA in Zellen transgener Tabakpflanzen mittels RT-PCR	106
4.2.2.4	Extraktion und Aufreinigung von WHsAg aus Tabakpflanzen mittels Dichtegradientenzentrifugation	107
4.2.2.5	Nachweis von WHsAg (MWHs) im Western Blot nach denaturierender SDS-PAGE	107
4.2.2.6	Nachweis von WHsAg-Partikeln im Western Blot nach nativer Agarosegel-Elektrophorese	109

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>111</b>
5.1	Experimentelle Infektion von adulten Amerikanischen Waldmurmeltieren (Woodchucks) mit WHV	111
5.2	Experimentelle Infektion von adulten Woodchucks mit GSHV und ASHV	115
5.3	Die Bedeutung der WHV-Infektion von Woodchucks als Modell für die HBV-Infektion des Menschen	119
5.4	Isolierung von subviralen Partikeln von WHV, GSHV und ASHV aus positiven Woodchuckseren und Charakterisierung der Struktur der Oberflächenproteine von GSHV und ASHV	121
5.5	Evaluierung der Effizienz von DNA- und Immunkomplex-Vakzinen in Kombination mit Lamivudin gegen die chronische Hepatitis B anhand des Woodchuck-Tiermodells	124
5.6	Expression von HBsAg- und WHsAg-Partikeln in transgenen Pflanzen	127
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>131</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>133</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>135</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>149</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b>	<b>154</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Geschichtliche Einleitung

Der erste Schritt zur Entdeckung des Hepatitis B Virus gelang B. Blumberg 1963 mit der Entdeckung des sogenannten „Australia Antigens“ im Blut eines australischen Ureinwohners. Dabei handelte es sich um ca. 20 nm große Partikel, die jedoch keine Nukleinsäure enthielten. Vier Jahre später konnte die Verbindung zur Hepatitis vom Typ B hergestellt werden, nachdem das „Australia Antigen“ nicht nur im Serum weiterer Personen, sondern auch bei Hepatitis-Patienten nachgewiesen werden konnte (Blumberg et al., 1967). 1970 wurden durch D. Dane elektronenmikroskopisch Virus-ähnliche Partikel mit einer Größe von ca. 45 nm entdeckt, die das „Australia Antigen“ an ihrer Oberfläche enthielten (Dane et al., 1970). Aus diesen sogenannten „Dane-Partikeln“ konnte 1971 J. Almeida das „Core“ isolieren. W. S. Robinson gelang danach die Entdeckung einer endogenen DNA-Polymerase (1973) und schließlich einer kleinen, zirkulären, partiell doppelsträngigen DNA (1974) innerhalb des Core-Partikels (Almeida et al., 1971; Kaplan, 1973; Robinson et al., 1974). Daraufhin wurden die „Dane-Partikel“ als Hepatitis B Virus (HBV) und das „Australia Antigen“ als Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) bezeichnet.

### 1.2 Die Virusfamilie *Hepadnaviridae*

Kurz nach der Entdeckung des humanen Hepatitis B Virus (HBV), wurden strukturell sehr ähnliche Viren in verschiedenen Säugetier- und Vogelarten identifiziert. Zunächst konnte das HBV-assoziierte Antigen bei Schimpansen nachgewiesen werden (Blumberg et al., 1968; Barker et al., 1973). In den Folgejahren gelang die Entdeckung einer Vielzahl HBV-verwandter Virusspezies in verschiedenen Säugetieren und Vögeln. Die Familie der *Hepadnaviridae* wird in zwei Genera unterteilt: die *Orthohepadnaviren* der Säugetiere und die *Avihepadnaviren* der Vögel.

Die Hepadnaviren der Altwelt-Primaten gelten als Varianten des humanen HBV neben den 8 verschiedenen Genotypen A - H beim Menschen (Bartholomeusz & Schaefer, 2004; Robertson et al., 2002). Das Hepadnavirus des Wollaffen (Lanford et al., 1998) bildet eine eigene Art, da es weniger eng mit den HBV-Varianten der anderen Affen verwandt ist. Einen weiteren Zweig bilden die He-

padnaviren der *Rodentia* (*Sciuridae*). Dazu zählen das Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) des Woodchucks (Amerikanisches Waldmurmeltier, *Marmota monax*, Summers et al., 1978), das Ground Squirrel Hepatitis Virus (GSHV) des Beechey Ground Squirrels (Erdhörnchen, *Spermophilus beecheyi*, Marion et al., 1980) und das Arctic Squirrel Hepatitis Virus (ASHV) des Arctic Ground Squirrels (Arktisches Hörnchen, *Spermophilus parryi kennicotti*, Testut et al., 1996). Eine weitere Virusspezies konnte aus Richardson Ground Squirrels (Richardson Hörnchen; *Spermophilus Richardsonii*, Minuk et al., 1986) isoliert werden.

Zu den *Avihepadnaviren* zählen das Duck Hepatitis B Virus der Pekingente (*Anas platyrhynchos domesticus*, Mason et al., 1980), das Heron Hepatitis B Virus (HHBV) des Graureihers (*Ardea cinerea*, Sprengel et al., 1988), das Ross' Goose Hepatitis B Virus (RGHBV) der Ross' Gans (*Anser rosii*), das Snow Goose Hepatitis B Virus (SGHBV) der Schneegans (*Anser caerulescens caerulescens*, Chang et al., 1999), das Stork Hepatitis B Virus (STHBV) der Weißstörche (*Ciconia ciconia ciconia*, Pult et al., 2001) sowie das Crane Hepatitis B Virus (CHBV) der Kraniche (*Grus Grus*, Prassolov et al., 2003).

Alle *Hepadnaviridae* zeichnen sich durch eine hohe Wirtsspezifität und einen strengen Lebertropismus aus. Nur dem natürlichen Wirt sehr verwandte Arten sind für eine Infektion mit dem entsprechenden Hepadnavirus empfänglich.

**Tabelle 1: Die Virusfamilie der *Hepadnaviridae***

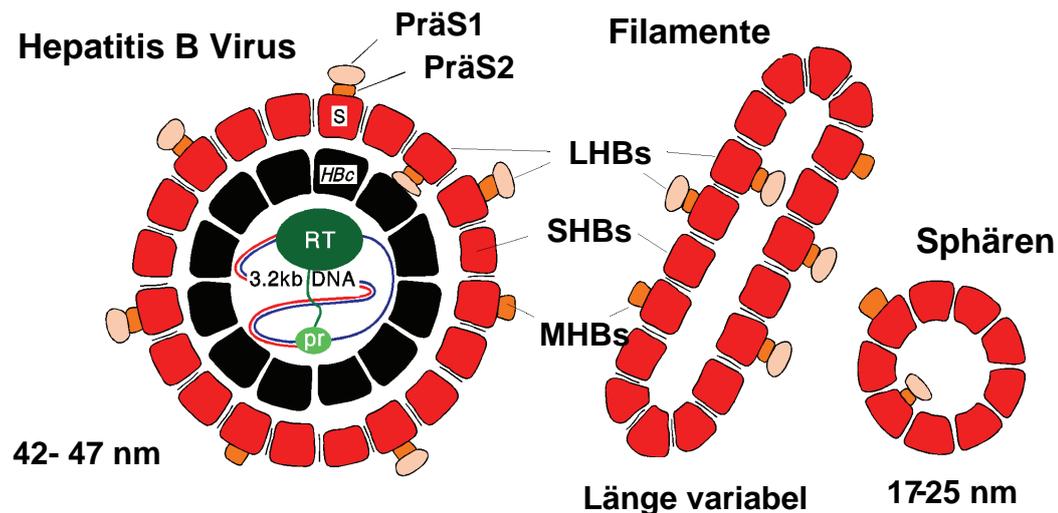
<b>Genus</b>	<b>Spezies</b>	<b>Wirt</b>
<i>Orthohepadnavirus</i>	HBV	Mensch, Schimpansen, Orang-Utans, Gorillas, Gibbons
	WMHBV	Wollaffe (woolly monkey)
	WHV	Amerikanisches Waldmurmeltier (woodchuck)
	GSHV	Erdhörnchen (ground squirrel)
	ASHV	Arktisches Hörnchen (arctic squirrel)
	weitere Spezies isoliert aus: <sup>1</sup>	Richardson Hörnchen
<i>Avihepadnavirus</i>	DHBV	Pekingente (duck)
	RGHBV <sup>1</sup>	Ross' Gans (Ross' goose)
	SGHBV <sup>1</sup>	Schneegans (snow goose)
	HHBV	Graureiher (heron)
	STHBV	Weißstorch (stork)
	CHBV <sup>1</sup>	Kranich (crane)

<sup>1</sup> Spezies nicht in der Taxonomie-Liste des ICTV- International Committee on Taxonomy of Viruses (8th report, Mason et al., 2005) geführt

### 1.3 Morphologie und Struktur des Virus

Bei den Hepadnaviren handelt es sich um umhüllte Viren mit einem Durchmesser von 42-47 nm (Dane, 1970). Die Virushülle ist aus mehreren hundert Untereinheiten zusammengesetzt und besteht aus einer lipidhaltigen Membran, in die die Oberflächenproteine verankert sind (Almeida et al., 1971). Man unterscheidet drei Oberflächenproteine: das große (L-large), mittlere (M-middle) sowie das kleine (S-small) Oberflächenprotein (surface protein). Die drei Proteine sind carboxyterminal identisch und bestehen alle aus der S-Domäne. Aminoterminal befindet sich beim M-Protein zusätzlich die präS2-Domäne und beim L-Protein die präS1- und präS2-Domäne (Heermann et al., 1984). Im Gegensatz zu den Orthohepadnaviren, die drei Hüllproteine bilden, kodieren die Avihepadnaviren nur für ein großes (L-) und ein kleines (S-) Oberflächenprotein.

Innerhalb der Virushülle befindet sich das ikosaedrische Nukleokapsid (Core Partikel). Es setzt sich entweder aus 180 oder 240 Core Protein-Untereinheiten zusammen und hat einen Durchmesser von 32 bzw. 36 nm (Crowther et al., 1994; Kenney et al., 1995). Neben dem partiell doppelsträngigen Virusgenom beinhaltet das Nukleokapsid eine zelluläre Proteinkinase sowie die virale DNA-Polymerase, die eine Reverse Transkriptase (RT)-Aktivität besitzt und am 5'-Ende des codierenden DNA-Minusstrangs kovalent gebunden ist (Gerlich und Robinson, 1980). Zusätzlich induziert das Virus die Sekretion von subviralen Partikeln, die in bis zu 1000fachem Überschuss zu Virionen im Serum vorliegen. Dabei handelt es sich um nukleinsäurefreie, nicht infektiöse Partikel, die aus den viralen Oberflächenproteinen gebildet werden. Sie kommen als Filamente variabler Länge und Sphären mit einem Durchmesser von 17-25 nm vor (Robinson et al., 1977). Die Hauptkomponente, sowohl in den subviralen Partikeln als auch in der Virushülle, bildet das kleine Oberflächenprotein (S-Protein), wobei das mittlere Oberflächenprotein (M-Protein) nur eine Nebenkomponekte darstellt. Der Anteil des großen Oberflächenproteins (L-Protein) variiert. Während in Virionen und Filamenten relativ viel L-Protein vorkommt, enthalten sphärische Partikel wenig L-Protein (Heermann et al., 1984).



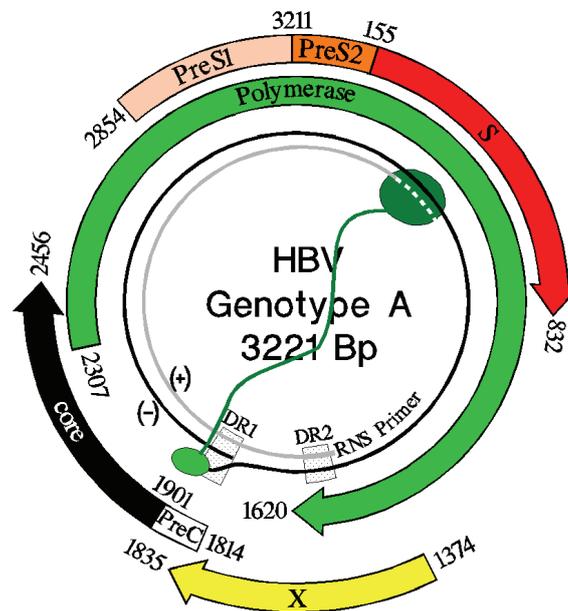
**Abb. 1: Schematische Darstellung des Virions und der subviralen Partikel (Filamente und Sphären) am Beispiel des Hepatitis B Virus**

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)

#### 1.4 Genomstruktur

Das Genom der Hepadnaviren ist mit einer Größe zwischen 3,0 (DHBV) und 3,3 kb (WHV, GSHV, ASHV) eines der kleinsten viralen Genome. Die partiell doppelsträngige zirkuläre DNA (Summers et al., 1975) besteht aus dem kompletten Minusstrang, während die Länge des komplementären Plusstranges am 3'-Ende variiert (Hruska et al., 1977; Landers et al., 1977). Bevor die DNA-Polymerase den Plusstrang fertigstellen kann, erfolgt die Sekretion des Virus, was dazu führt, dass der Plusstrang zwar ein definiertes 5'-Ende, aber ein variables 3'-Ende aufweist. Er codiert nicht für virale Genprodukte und wird daher nicht transkribiert. Die beiden Enden des Minusstranges überlappen sich in einem Bereich von ca. 9 Basen (terminale Redundanz) und werden von dem Plusstrang überspannt (Sattler und Robinson, 1979). An dieser Stelle liegt das Virusgenom dreisträngig vor (Will et al., 1987). An das 5'-Ende des codierenden Minusstranges ist kovalent ein terminales Protein gebunden (Gerlich u. Robinson, 1980), welches später als DNA-Polymerase identifiziert wurde (Bartenschlager et al., 1988). Am 5'-Ende des nicht-codierenden Plusstranges befindet sich ein RNA-Primer bestehend aus 17-19 Nukleotiden mit mRNA-ähnlicher Cap-Struktur (Seeger et al., 1986). Desweiteren enthält das Virusgenom die zwei identischen Sequenzbereiche DR1 und DR2 (direct repeats). Sie haben eine Länge von 11 Nukleotiden und liegen ungefähr 225 Basenpaare

voneinander entfernt. DR1 und DR2 spielen eine wichtige Rolle bei der Replikation des Virus (Summers, 1984; Siddiqui et al., 1979; Will et al., 1987).



**Abb. 2: Genomstruktur der Orthohepadnaviren mit vier konservierten ORFs (offene Leserahmen) am Beispiel des Hepatitis B Virus (Genotyp A)**

Der S-ORF (rot, orange, rosa) codiert 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 (schwarz) codiert für das Core-Protein. Die Funktion des X-ORF (gelb) ist weitgehend unbekannt. DR1, DR2: Direct Repeat 1 und 2; (+): Plus-Strang; (-): Minus-Strang (modifiziert nach Kann und Gerlich, 2005)

Auf dem codierenden Minusstrang befinden sich vier konservierte, offene Leserahmen (ORF = open reading frame), welche teilweise überlappen und durch die alternative Nutzung der Startcodons für z.T. mehrere Proteine codieren. Der C-ORF codiert das Core-Protein (c-Antigen). Dem C-ORF ist die präC-Sequenz vorangestellt, deren Translation zusammen mit dem Core-codierenden Gen die sezernierte, lösliche Form des Core-Protein (e-Antigen) ergibt. Der S-ORF wird durch drei verschiedene Startcodons in die präS1-, präS2- und S-Domäne untergliedert und codiert die drei carboxyterminal identischen Oberflächenproteine (Schaeffer et al., 1986; Heermann et al., 1984; Hermann & Gerlich, 1991). Bei den Avihepadnaviren besteht der S-ORF nur aus der präS- und S-Domäne und codiert dementsprechend nur das große und kleine Oberflächenprotein (Schödel et al., 1991; Marion et al., 1983). Der P-ORF, der etwa 80% des gesamten Genoms umfasst, codiert die DNA-Polymerase (mit Primerdomäne, reverser Transkriptase und einer RNase-H-Domäne). Die Funktion des X-ORF, welcher das X-Protein codiert, ist weitgehend unbekannt. Auch die Avihepadnaviren ha-

ben dieses Protein, da DHBV einen versteckten Leserahmen besitzt (Chang et al., 2001). Doch dessen Funktion für das Virus ist unbekannt (Meier et al., 2003).

### **1.5 Infektion durch das Hepatitis B Virus des Menschen**

#### **1.5.1 Epidemiologie und Übertragung**

Mit ca. 400 Millionen chronischen Trägern gehört HBV noch immer zu den bedeutendsten Infektionserregern weltweit. Leberzirrhose und Hepatozelluläres Karzinom (HCC), Folgen der chronischen Verlaufsform, fordern jährlich 1 Million Todesfälle. Dabei stellt die Infektion vor allem ein Problem der Entwicklungsländer dar, wo in Hochendemiegebieten (Südostasien, Zentral- und Südafrika) bis zu 20% der Bevölkerung Virusträger sind. In den westlichen Industrienationen sind weniger als 1% der Bevölkerung chronisch infiziert, wobei die Erkrankung besonders Angehörige bestimmter Risikogruppen (medizinisches Personal, Drogenabhängige, Prostituierte und Menschen mit häufig wechselndem Geschlechtspartner) betrifft.

Das Hepatitis B Virus wird sowohl auf horizontalem als auch vertikalem Weg übertragen. Die Infektion erfolgt durch Blut, Geschlechtsverkehr oder Schleimhautkontakt mit infektiösem Material. Dabei stellen asymptomatische, persistent infizierte Virusträger mit zumeist sehr hohen Titern von bis zu  $10^{10}$ /ml ein wichtiges Erregerreservoir dar. Bereits Personen mit Virustitern von  $\geq 10^8$ /ml sind äußerst infektiös und geringste Mengen Blut sowie auch andere Körperflüssigkeiten (Speichel, Ejakulat, Vaginalsekret, Tränenflüssigkeit, Muttermilch, Wundsekret) können zur Übertragung des HBV führen.

Neben der Höhe des Genomtitors spielen auch die Häufigkeit und Intensität der Exposition sowie die hygienischen Verhältnisse im sozialen Umfeld eine Rolle. Generell lässt sich sagen, dass mit sinkendem Lebensstandard die Prävalenz steigt. Iatrogene Übertragung, insbesondere durch Bluttransfusion, spielt nur noch eine untergeordnete Rolle, seitdem Blutkonserven einem umfangreichen Screening unterzogen werden. In den Entwicklungsländern sind zwei Übertragungswege von großer Bedeutung. Zum einen handelt es sich um die Übertragung zwischen Kindern im Vorschulalter, wie sie v.a. in Afrika vorkommt. In Südostasien dagegen wird die Mehrzahl der Virusträger perinatal infiziert.

### **1.5.2 Klinischer Verlauf**

Die Hepatitis B Infektion kann in Abhängigkeit von der Infektionsdosis und dem Immunstatus sowohl transient als auch persistierend verlaufen. Eine geringe Infektionsdosis führt bei einem kompetenten Immunsystem meist zu einer inapparenten Infektion mit nachfolgender Ausbildung einer Immunität. Eine akute Hepatitis entwickelt sich meist bei Immunkompetenz und einer hohen Infektionsdosis. An die Inkubationsphase, die bis zu 6 Monate dauern kann, schließt sich das Prodromalstadium mit unspezifischen, grippeähnlichen Symptomen an. Gelegentlich treten Erytheme und Arthritis auf, Folgen einer Ablagerung von Immunkomplexen in Haut und Gelenken. Die Prodromalphase kann bis zu vier Wochen dauern. Die klinische Symptomatik der manifesten Hepatitis ist gekennzeichnet durch Übelkeit, Erbrechen, Schmerzen im rechten Oberbauch und in schwereren Fällen Ikterus. Die Diagnose akute Hepatitis B lässt sich allerdings nur stellen, wenn neben dem klinischen Befund eine Erhöhung der Alanin-Amino-Transferase (ALT) auf  $\geq 500$  IU/l vorliegt. In 0,5 - 1% der akuten Fälle lässt sich ein besonders schwerer Verlauf mit hepatischer Enzephalopathie, Versagen des Gerinnungssystems und häufig letalem Ausgang ( $\leq 70\%$ ) beobachten. Die fulminante Verlaufsform ist oft Folge einer Superinfektion mit anderen hepatotropen Viren (HAV, HDV, HCV) bei bereits bestehender chronischer Hepatitis B. Desweiteren ist sie eine gefürchtete Komplikation bei Patienten mit chronisch persistierender und auch ausgeheilte Hepatitis B Infektion, bei denen sich nach einer Immunsuppression (Cortison, Tumorthherapie, Organtransplantation) das Immunsystem wieder rekonstituiert. Denn selbst bei einer klinisch ausgeheilten Hepatitis B verbleiben oft replikative Intermediate (insbesondere cccDNA im Kern der Hepatozyten) in der Leber. Während der Immunsuppression kommt es dann meist zur ungehinderten Replikation des Virus. Das hat zur Folge, dass es nach Ende der Therapie, wenn das Immunsystem reaktiviert wird, zu einer überschießenden Immunantwort kommt, bei der die Leberzellen durch die zytotoxische T-Zell-Antwort in großem Maßstab zerstört werden (Westhoff et al., 2003).

### **1.5.3 Pathogenese, Immunantwort und Eliminierung des Virus**

Entscheidend für die Pathogenese und die Viruseliminierung ist die zelluläre, CD8-T-Zell vermittelte Immunantwort gegen HBc/eAg und HBsAg (Chisari und

Ferrari, 1995). Es kann jedoch unter Umständen Wochen bis Monate dauern, bis die antivirale Immunantwort ausgelöst wird. Welche Faktoren letztendlich das Immunsystem aktivieren ist nicht bekannt. Zwei Mechanismen sind grundlegend für die vollständige Viruseliminierung. Die initiale Reduktion der Viruslast erfolgt durch die Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Während IFN- $\gamma$  direkt von Antigen-spezifischen CD8-T-Zellen exprimiert wird, wird TNF- $\alpha$  erst durch IFN- $\gamma$  und Interleukin-2 stimulierte Makrophagen und den Makrophagen-verwandten Kupffer'schen Sternzellen der Leber produziert. Zytokine inhibieren die Virusreplikation (Guidotti et al., 1994; 1996), indem HBV mRNA und cccDNA destabilisiert werden (Heise et al., 2001; Murray et al., 2005). Diese frühen Mechanismen der Viruseliminierung führen beim Schimpansen bereits zu einer Reduktion der Virus-DNA um bis zu 50%, bevor es zur Zellzerstörung und Transaminasenerhöhung kommt (Murray et al., 2005). Die vollständige Viruseliminierung mit Rekonvaleszenz wird erst durch die immuninduzierte Apoptose Antigen-präsentierender Hepatozyten erreicht. Im Tierversuch mit Woodchucks und Schimpansen konnte gezeigt werden, dass das Ende der viralen Infektion mit der Zerstörung infizierter Hepatozyten und anschließender Regeneration der Leber assoziiert war (Guo et al., 2000; Kajino et al., 1994; Wieland et al., 2004, Thimme et al., 2003). Im Gegensatz zu Patienten mit ausheilender akuter Hepatitis, bei denen HBc/e- und HBs-spezifische CD8-T-Zellen isoliert werden konnten, waren die antigen-spezifischen CD8-T-Zellen bei chronischen Patienten vermindert (Rehermann et al., 1996a/b). Die klinische Symptomatik der Hepatitis B wird durch die Immunpathomechanismen, die zur Eliminierung des Virus führen, hervorgerufen. Während die unspezifische Grippe-symptomatik in der Prodromalphase auf die Aktivität der Zytokine zurückzuführen ist, bewirkt die hepatozelluläre Apoptose die typischen Hepatitissymptome (Übelkeit, Erbrechen, Ikterus).

Neben der zellulären Immunantwort wird auch die humorale Immunantwort induziert. Generell werden gegen alle Virus-assoziierten Proteine Antikörper gebildet, wobei anti-HBc und anti-HBs von besonderer diagnostischer Relevanz sind. Der zuverlässigste serologische Marker für die akute Hepatitis B ist das Auftreten HBcAg-spezifischer IgM-Antikörper, zusammen mit Beginn der Transaminasenerhöhung. Während IgM-anti-HBc nach der Ausheilung verschwindet, bleibt IgG-anti-HBc meist noch jahrzehntelang positiv und dient somit als

Marker einer ausgeheilten oder immer noch vorhandenen HBV-Infektion. Anti-HBs erscheint meist erst nach der Rekonvaleszenz und ist zusammen mit anti-HBc der Indikator für eine ausgeheilte HBV-Infektion mit Immunität. HBsAg-spezifische Antikörper können bei chronischen Patienten an der Bildung zirkulierender Immunkomplexe beteiligt sein, die durch Ablagerung in Nierengewebe und Arterienwandgewebe zu Glomerulonephritis und Periarteriitis nodosa führen können.

### 1.5.4 Prävention und Therapie

Der erste Impfstoff gegen HBV wurde Ende der 70iger Jahre entwickelt und enthielt gereinigte subvirale Partikel aus dem Plasma HBsAg-positiver Träger. Er wurde Mitte der 80iger Jahre durch rekombinante, gentechnisch in Hefezellen generierte Vakzine abgelöst, die auch heute noch eingesetzt werden. Diese Impfstoffe der zweiten Generation enthalten unglykosiliertes SHBs (p24) vom Genotyp A2 bzw. Subtyp adw2 und werden zusammen mit einem Adjuvans (Aluminiumhydroxid) dreimal im Abstand von 0, 1 und 6 Monaten i.m. appliziert. Die HBsAg-Injektionsdosis beträgt pro Applikation 10 µg bei Kindern und 20 µg bei Erwachsenen. Eine Seroprotektion ( $\geq 10$  IU/l anti-HBs) wird bei durchschnittlich 95% erreicht, wobei die Protektionsraten bei Kindern und Jugendlichen am höchsten sind und mit zunehmendem Alter sinken. Faktoren für Nichtreaktivität bzw. eine schwache Immunantwort ( $\leq 100$  IU/l) sind neben fortgeschrittenem Alter, männliches Geschlecht, Übergewicht und Rauchen. Auch wenn der Impfstoff nur gegen einen Genotyp/Subtyp generiert ist, besteht gegen alle Genotypen ein Impfschutz (Hillemann, 1993). Trotz erfolgreicher Impfung kann es bei Neugeborenen HBsAg-positiver Mütter bei ca. 10% zu Impfdurchbrüchen kommen. Die Ursache sind oftmals Escape-Mutanten, wobei die häufigste Variante eine Mutation von Glycin nach Arginin an Position 145 der S-Domäne aufweist (Nainan et al., 2002).

Neben der aktiven Immunisierung kann ein kurzzeitiger Schutz durch passive Immunisierung mit anti-HBs-Immunglobulinen (HBIG) erzielt werden, wobei die Gabe von HBIGs meist zusammen mit der aktiven Impfung vorgenommen wird. Diese Simultanimpfung kommt insbesondere bei Neugeborenen HBsAg-positiver Mütter, nach Exposition mit HBV-kontaminierten Materialien sowie zur

Reinfektionsprophylaxe bei HBV-positiven Patienten nach einer Lebertransplantation zum Einsatz.

Das Risiko der Nichtreaktivität durch die bereits beschriebenen Faktoren sowie die Problematik der Escape-Mutanten machen die Entwicklung neuer Vakzine erforderlich. Rekombinante, in Hefe generierte Impfstoffe mit präS<sub>2</sub>/S als Antigen scheinen zu einer rascheren Serokonversion zu führen und auch bei Non-Respondern eine Immunantwort hervorzurufen (Suzuki et al., 1994). Auch die Verwendung von tierischen Zelllinien (Maus-, CHO-Zelllinie) als Expressionssystem für rekombinante subvirale Partikel scheint deren Immunogenität zu steigern (Soulie et al., 1991). Im Gegensatz zum konventionellen Impfstoff aus Hefe sind die in tierischen Zelllinien generierten Partikel nicht nur potente B-Zell- sondern auch starke T-Zell-Aktivatoren (Jones et al., 2000; Zuckerman, 1999). In einer klinischen Studie mit 920 Neugeborenen und Erwachsenen in Französisch Polynesien führte eine CHO-generierte präS<sub>2</sub>/S-Vakzine bereits nach der ersten und zweiten Applikation zu Serokonversionsraten von bis zu 98% (Mouliat-Pelat et al., 1994). Weitere Impfstoffkonzepte sehen die Verwendung von DNA-Vektoren vor, die die Gene für die entsprechenden immunogenen Proteine enthalten und erst im Organismus translatiert werden. In transgenen HBV Mäusen konnte durch die Injektion von Plasmiden, die die präS- und S-Domäne von HBV enthielten, selbst bei Non-Responder-Mäusen sowohl eine humorale als auch zelluläre Immunantwort induziert werden (Michel et al., 1995; Davis et al., 1995). Versuche mit Schimpansen erwiesen sich jedoch als weniger erfolgreich, da eine Immunantwort erst durch sehr hohe Impfdosen erzielt werden konnte (Davis et al., 1996).

Von Impfstoffen erhofft man sich auch ein kuratives Potential bei der Therapie der chronischen Hepatitis B, wie im Woodchuck-Tiermodell gezeigt werden konnte (Menne et al., 2002b).

Im Gegensatz zur akuten Hepatitis B, deren Infektion in der Regel selbstlimitierend ist und eine antivirale Therapie nicht nötig macht, ist der chronische Verlauf medikamentös schwer zu beeinflussen und sehr langwierig. Zwei Medikamentengruppen werden in der Therapie der chronischen Hepatitis B eingesetzt, zum einen Interferon- $\alpha$  und - $\beta$ , zum anderen die Nukleosidanaloga Lamivudin (3TC), Adefovir, Tenofovir und Entecavir. Zwar lässt sich mit diesen Medikamenten eine Reduktion der Viruslast erreichen, doch kommt es in einer

Vielzahl von Fällen nach einer gewissen Zeit unter Ausbildung resistenter HBV-Varianten zum Wiederaufflackern der Infektion. Die Therapie mit Interferon ist außerdem sehr nebenwirkungsreich und führt neben grippeähnlichen Symptomen und Depressionen zu Leuko- und Thrombopenie. Die Nukleosidanaloga, die die Reverse Transkriptase hemmen, sind zwar besser verträglich, aber insbesondere bei Langzeitapplikation von Lamivudin werden gehäuft Resistenzen beobachtet. In einer klinischen Studie waren nach 5 Jahren bereits 65% der Patienten gegenüber Lamivudin resistent (Lok et al., 2003). Ursache der Resistenz ist eine Mutation im Aminosäuremotiv YMDD der viralen Reversen Transkriptase nach YIDD, YSDD oder YVDD (Stuyver et al., 2001).

### **1.6 Tiermodelle für die Hepatitis B Infektion des Menschen**

Aufgrund der ausgeprägten Wirtsspezifität der Hepadnaviren eignen sich die klassischen Labortiere wie Maus, Ratte und Meerschweinchen nur begrenzt zur Erforschung des humanen Hepatitis B Virus. Eine Ausnahme stellen transgene HBV- oder HBsAg-produzierende Mauslinien dar.

Das ähnlichste Tiermodell sind nach wie vor Schimpansen, deren Infektion mit HBV einen analogen Verlauf zu der Infektion des Menschen zeigt. Doch aufgrund anerkannter ethischer Bedenken sowie der geringen Verfügbarkeit und der hohen Kosten, werden Versuche an Schimpansen nur sehr selten durchgeführt. Es sind vor allem das Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) des Amerikanischen Waldmurmeltieres sowie das Duck Hepatitis B Virus (DHBV) der Ente, die als Tiermodelle in der aktuellen Hepatitis B-Forschung eingesetzt werden.

#### **1.6.1 Die WHV-Infektion bei Woodchucks**

Wie die HBV-Infektion des Menschen, kann die WHV-Infektion von Woodchucks ebenfalls transient oder persistierend verlaufen. Welchen Verlauf die akute WHV-Infektion nimmt, ist in besonderem Maße vom Alter des Tieres, dessen Immunstatus sowie der Infektionsdosis abhängig. Während die experimentelle Inokulation von WHV bei neonatalen Woodchucks ( $\leq 3$  Tage Lebensalter) in 65-75% zum chronischen Verlauf führt, heilt die akute Infektion bei adulten Woodchucks zu 100% aus (Cote et al., 2000a). Der mutmaßliche Grund für die hohe Chronizität bei Neonaten ist, vergleichbar mit der HBV-Infektion des Menschen, die unzureichende Kompetenz des neonatalen Immunsystems

in den ersten Tagen bis Wochen nach der Geburt. Es reagiert mit Immuntoleranz, was zur Folge hat, dass der Erreger vom Wirtsorganismus nicht eliminiert wird. Wurden adulte Tiere experimentell immunsupprimiert (Cyclosporin), stieg die Chronifizierungsrate auf 50-92% (Cote et al., 1991, 1992, 2000a). Diese Studien verdeutlichen, dass neben dem Alter, das Immunsystem eine entscheidende Rolle im Infektionsgeschehen spielt. Welche Mechanismen jedoch für den Verlauf der neonatalen Infektion hinsichtlich Rekonvaleszenz oder Chronizität verantwortlich sind, ist bisher unklar. Der Vergleich der Infektionsverläufe neonatal mit WHV inokulierter Woodchucks zeigt, dass jene Tiere, die später einen chronischen Infektionsverlauf entwickeln, von Anfang an deutlich höhere Konzentrationen an WHV DNA sowie WHsAg aufweisen, als die Tiere, bei denen die Infektion später ausheilt (Wang et al., 2004). Auch unterschiedlich hohe WHV-Inokulationsdosen beeinflussen den Verlauf der akuten Infektion neonataler Woodchucks, wobei niedrige Dosen Virus viel seltener zur Entwicklung eines chronischen Verlaufs führen als hohe Dosen (Cote et al., 2000a).

WHV besitzt mehr noch als HBV onkogenes Potential und induziert hepatozelluläre Adenome und Karzinome in der Leber. Im Gegensatz zu HBV, wo nur 5% der chronischen Träger Leberkarzinome ausbilden (Beasley et al., 1981), entwickeln chronisch WHV infizierte Woodchucks innerhalb von 2-4 Jahren zu 100% Lebertumore (Popper et al., 1987; Gerin et al., 1990). Selbst bei akut verlaufenden WHV-Infektionen mit anschließender Rekonvaleszenz ist die Inzidenz an HCC zu erkranken gegenüber nicht-infizierten Kontrolltieren deutlich erhöht (Tennant et al., 2001).

### **1.6.2 Das Ground Squirrel- und Arctic Squirrel Hepatitis Virus (GSHV, ASHV)**

Das Ground Squirrel Hepatitis Virus wurde 1979, ein Jahr nach der Entdeckung des WHV in Woodchucks, aus kalifornischen Beechey Ground Squirrels (*Spermophilus beecheyi*) isoliert (Marion et al., 1980). Die Entdeckung des Arctic Squirrel Hepatitis Virus erfolgte erst Mitte der 90iger Jahre, nachdem bei Arctic Ground Squirrels (*Spermophilus parryi kennicotti*) in Alaska recht häufig hepatische Erkrankungen und Knoten in der Leber festgestellt worden waren (Testut et al., 1996).

Das Virusgenom von GSHV und ASHV ist 3.311 bzw. 3.302 Nukleotide lang und besteht ebenfalls aus den vier offenen, sich überlappenden Leserahmen (S-, C-, P-, X-ORF) (Seeger et al., 1984; Testut et al., 1996). Beide Genome weisen eine Abweichung in der Nukleotidsequenz von 16% auf (Testut et al., 1996). Die vergleichende Analyse von ASHV mit WHV und HBV ergibt eine Übereinstimmung der Nukleotidsequenzen von 84% zwischen WHV und ASHV sowie 63% zwischen ASHV und HBV (Testut et al., 1996). Die Nukleotidsequenzen von GSHV und WHV bzw. GSHV und HBV sind zu 82% bzw. 55% homolog (Seeger et al., 1984). Eine Vergleich der einzelnen Gene zeigt, dass insbesondere die C- und S-Gene jener Virusspezies hoch konserviert sind, wohingegen die preS- und X-Regionen größere Differenzen aufweisen (Seeger et al., 1984; Testut et al., 1996).

Die experimentelle Inokulation von GSHV in Ground Squirrels führt sowohl zum transienten Verlauf mit selbst-limitierender Infektion, als auch zur Persistenz des Virus mit chronischem Verlauf (Ganem et al., 1982). Über den akuten und chronischen Infektionsverlauf von ASHV ist hingegen noch nichts bekannt. Infektionsstudien mit GSHV zeigen, dass diese Virusspezies weniger pathogen als HBV und WHV ist und zu einer milden bis mäßigen Hepatitis führt (Ganem et al., 1982). Im Gegensatz zu HBV resultiert die GSHV-Infektion nicht in einer Leberzirrhose. Doch scheinen auch GSHV und ASHV onkogenes Potential zu besitzen. Sowohl bei chronischen GSHV- als auch ASHV-Trägern besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Infektion und der Entwicklung von hepatozellulären Karzinomen (Marion et al., 1986; Testut et al., 1996).

### **1.6.3 Die DHBV-Infektion bei Enten**

Das Duck Hepatitis B Virus ist phylogenetisch am weitesten vom HBV entfernt, wobei die DNA-Sequenzen beider Virusspezies nur zu etwa 40% identisch sind (Schäfer et al., 1998). Unterschiede zum HBV bestehen vor allem im Übertragungsweg und in der Ausprägung des Krankheitsbildes der Hepatitis. Die natürliche Übertragung von DHBV findet wie bei allen Spezies der *Avihepadnaviren* kongenital statt, d.h. von der persistent infizierten Ente zum Ei. Das Virus repliziert im Dottersack sowie in der sich entwickelnden Leber des Embryos und erreicht sehr hohe Konzentrationen an Virus und Antigen (Urban et al., 1985; Jilbert et al., 1992). In kongenital infizierten Enten persistiert DHBV lebenslang

und infiziert >95% der Hepatozyten sowie auch zu einem kleinen Prozentsatz Pankreas, Niere und Milz (Tagawa et al., 1985). Trotz der hohen Replikationsraten verursacht das Virus nur geringe histologische Veränderungen in der Leber (Marion et al., 1984). Die experimentelle Inokulation von DHBV in einen Tag alte Küken resultierte ebenfalls in einer persistierenden Infektion (Marion et al., 1984, 1987; Tagawa et al., 1985). Bei 2-4 Wochen alten Enten dagegen verlief die experimentelle DHBV-Infektion in Abhängigkeit vom Alter und der Inokulationsdosis entweder transient oder persistierend (Jilbert et al., 1998). In persistent infizierten Tieren dieser Altersgruppe konnten histologische Veränderungen mit mononukleärer Zellinfiltration nachgewiesen werden. Die experimentelle Inokulation von DHBV in adulte Enten resultierte in einer transienten Infektion mit der Entwicklung neutralisierender Antikörper und nachfolgender Immunität (Jilbert et al., 1998). Bei wenigen Tieren entwickelte sich jedoch eine chronische Hepatitis mit gemäßigter Symptomatik.

Durch die von Immunpathomechanismen weitgehend unbeeinflusste Replikation des Virus konnten anhand dieses Tiermodells in den 80iger Jahren erste wichtige Erkenntnisse zum Replikationszyklus der Hepadnaviren gewonnen werden (Summers & Mason, 1982; Mason et al., 1982; Summers et al., 1988; Seeger et al., 1986).

### **1.7 Verwendung transgener Pflanzen zur Produktion essbarer Impfstoffe**

Ähnlich der gentechnischen Produktion des HBsAg als Subunit-Vakzine in Hefefermentern, wie sie derzeit Standard ist, können fremde Antigene in gentechnisch veränderten Pflanzen exprimiert werden. Neben HBsAg (Mason et al., 1992; Kapusta et al., 1999; Richter et al., 2000; Kong et al., 2000; Imani et al., 2002; Gao et al., 2003) konnte bisher u.a. die Expression der hitzelablen Enterotoxin B Untereinheit (LT-B) von *E. coli* (Mason et al., 1998; Lauterslager et al., 2001; Chikwamba et al., 2002), der Cholera toxin B Untereinheit (CT-B) von *Vibrio cholerae* (Arakawa et al., 1998; Daniell et al., 2001), das Capsidprotein des *Norwalk virus* (Mason et al., 1996; Tacket et al., 2000), des Glykoproteins des *Rabiesvirus* (McGarvey et al., 1995) sowie das Capsidprotein des *Humanen Papillomavirus* (Warzecha et al., 2003; Biemelt et al., 2003) in transgenen Pflanzen demonstriert werden. Neben der Problematik, dass Pflanzen, die fremde Antigene exprimieren, ein schlechteres Wachstum zeigen, sind vor

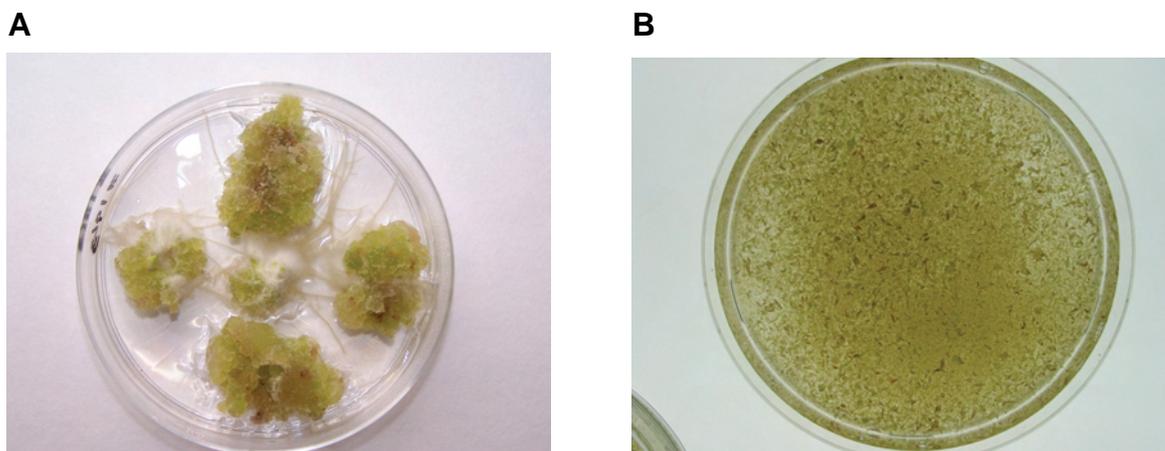
allem die Antigen-Expressionsraten häufig zu niedrig. Trotzdem konnte in mehreren Versuchen gezeigt werden, dass oral applizierte, HBsAg exprimierende Pflanzen, sowohl im tierischen als auch menschlichen Organismus immunogen wirken und entsprechende Antikörperbildung induzieren (Gao et al., 2003; Thanavala et al., 1995, 2005).

Die Produktion von Subunit-Vakzinen in transgenen, essbaren Pflanzen als oral verabreichbarer Impfstoff ist ein attraktives Impfstoffkonzept zur Prävention der HBV-Infektion. Gegenüber der konventionellen, in Hefe generierten Vakzine hätte der in Pflanzen generierte Impfstoff mehrere Vorteile, die insbesondere für die Eradikationsprogramme bestimmter Infektionskrankheiten (z.B. HBV) in Entwicklungsländern von unschätzbarem Wert wären. Der Anbau der Pflanzen könnte praktisch in jeder Region der Welt erfolgen. Aufwendige Reinigungsverfahren, wie sie derzeit für die parenteral zu applizierende Vakzine nötig sind, würden entfallen, was eine erhebliche Kostenreduktion bedeuten würde. Lagerung und Transport geeigneter transgener Pflanzen könnten ohne große Kühlung, wie sie Impfstoffe normalerweise benötigen, erfolgen. Desweiteren wäre die orale Applikation der Vakzine wesentlich praktikabler, preiswerter und sicherer als die Impfung auf parenteralem Weg, nicht zuletzt deshalb, weil die Verwendung von Spritzen auch mit dem Risiko iatrogenen Übertragung von HIV, HCV und HBV verbunden sein kann. Wie der Einsatz oral zu applizierender Polio-Vakzine (attenuiertes Poliovirus) im Zuge des globalen Eradikationsprogramm der WHO zeigt, sind orale Vakzine logistisch einfacher zu handhaben und stoßen auf größere Akzeptanz in der Bevölkerung (Bloom, 1998).

### **1.7.1 Integration von Fremd-DNA in das Genom der Pflanze**

Die Integration fremder Gene in das Pflanzengenom geschieht mit Hilfe des pflanzenpathogenen Bakteriums *Agrobacterium tumefaciens*, welches bei verschiedenen Pflanzen Tumore induziert. Die Tumor-induzierenden Faktoren (T-DNA) sind auf dem sogenannten Ti-Plasmid genetisch codiert und werden bei der Infektion der Pflanze mit dem Erreger in das Genom der Pflanze integriert, wo die T-DNA bei jeder Zellteilung mitrepliziert wird. Ausgelöst wird die Tumorbildung durch die verstärkte Synthese der Phytohormone IES (Indolessigsäure) und 2iP (2-Isopentenyladenin), die die Zellteilungsrate erhöhen. Die T-DNA ist sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende mit jeweils einer aus 25 Basenpaaren be-

stehenden Nukleotidsequenz gekoppelt („direct repeats“), die für die Integration der T-DNA in das Wirtsgenom erforderlich ist, selbst allerdings nicht in das Wirtsgenom eingebaut wird. Das Einschleusen von Fremd-DNA in die Pflanze wird möglich, indem man sich diesen Mechanismus zunutze macht. Die T-DNA wird entfernt und stattdessen die gewünschte Fremd-DNA in das Plasmid zwischen die „direct repeats“ integriert (Zambryski, 1988). Über die Infektion der Pflanzenzellen durch *A. tumefaciens* wird die Fremd-DNA in das chromosomale Genom der Pflanze inseriert, wobei der Integrationsprozess absolut zufällig hinsichtlich der Insertionsstelle geschieht (Hermann et al., 1990). Auch die Anzahl der integrierten Kopien der Fremd-DNA ist vom Zufall abhängig, was demzufolge einen großen Einfluss auf die Expressionsrate des fremden Antigens hat. Zusammen mit den Antigen-codierenden Genen werden noch regulatorische Elemente (z.B. Promotoren), über die die Expressionsrate beeinflusst werden kann, sowie Resistenzgene, die für die Selektion transformierter Pflanzen entscheidend sind, in das Pflanzengenom integriert. In speziellen Nährmedien werden die transformierten Pflanzenzellen vermehrt, wobei durch den Zusatz bestimmter Antibiotika *A. tumefaciens* eliminiert wird.



**Abb. 3: Kalluskultur (A) und Suspensionskultur (B)**

---

Bei der Kultivierung der transformierten Pflanzenzellen unterscheidet man Zellsuspensions- und Kalluskulturen (Abb. 3). Bei der Zellsuspension handelt es sich um eine Flüssigkultur, in der eine Vielzahl verschiedener Zellformen isoliert vorliegt. Dieser Zustand wird durch die Zugabe von Enzymen, die die Mittella-

melle abbauen oder durch mechanische Mazeration erreicht. Bei der Kalluskultur werden beliebige Gewebestücke einer Pflanze entnommen und auf einem Nährboden kultiviert, aus denen sich nach einer gewissen Zeit eine morphologisch unorganisierte Gewebemasse, der Kallus, ausbildet. Bei beiden Kulturen lässt sich die somatische Embryogenese induzieren, die zur Differenzierung der Pflanzenteile und zum Wachstum der vollständigen Pflanze führt.

### 1.8 Ziele und Ansätze dieser Arbeit

Eine Eigenschaft der *Hepadnaviridae* ist ihre ausgeprägte Wirtsspezifität, wobei sich gezeigt hat, dass einander nah verwandte Tierspezies für dasselbe Virus empfänglich sind. So lassen sich z.B. höhere Primaten wie Schimpansen und Orang-Utans mit HBV (Barker et al., 1973; Deinhardt, 1976) bzw. Gänse mit DHBV infizieren (Marion et al., 1987). Bei WHV und GSHV ließ sich bezüglich der Empfänglichkeit des jeweiligen Fremdwirts jedoch eine interessante Entdeckung machen. Während sich neonatale Woodchucks mit GSHV infizieren ließen, waren Ground Squirrels gegenüber der Infektion mit WHV resistent (Seeger et al., 1987; 1991). Die Faktoren, die die Wirtsspezifität determinieren, sind bisher ungeklärt. Adulte Woodchucks sind bislang noch nicht mit GSHV oder anderen Hepadnaviren inokuliert worden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden adulte Woodchucks mit den beiden wirtsfremden Virusspezies GSHV und ASHV und zur Kontrolle auch mit WHV inokuliert. Die verschiedenen Infektionsverläufe sollten hinsichtlich verschiedener Parameter [Virus-DNA, virales Oberflächenantigen (sAg), Antikörper gegen die viralen Hüll- und Core-Proteine (anti-s, anti-c), Oberflächenantigen-Immunkomplexe, Leberenzyme] untersucht werden. Der Nachweis der Virus-DNA sollte mit Hilfe der real-time PCR geführt werden, die eine weitaus sensitivere Quantifizierung erlaubt als die bei Woodchuck-Versuchen bislang übliche Konzentrationsbestimmung mittels dot blot. Die Quantifizierung subviraler Partikel (sAg) im Serum sollte mit Hilfe der Laurell-Elektrophorese erfolgen, die sich in der Diagnostik des HBV bereits bewährt hat. Um die Eliminierung subviraler Partikel aus dem Serum zu untersuchen, sollten Oberflächenantigen-Immunkomplexe aus Seren gefällt und detektiert werden.

Die akute WHV-Infektion ist im Gegensatz zum chronischen Verlauf noch nicht sehr gut untersucht. Insbesondere für die Erforschung der den Verlauf einer Infektion beeinflussenden Mechanismen, ist die Charakterisierung der akuten Infektion von Bedeutung. Es ist immer noch nicht bekannt, welche Determinanten des Immunsystems den Verlauf der Infektion hinsichtlich Rekonvaleszenz oder Chronizität entscheidend beeinflussen und welche Rolle die Spezifität des Virus dabei spielt.

Desweiteren sollten aus den sAg-positiven Seren virusspezifische subvirale Partikel isoliert und deren Proteinstruktur analysiert werden. Im Gegensatz zum

WHsAg (Tolle et al., 1998), sind die Oberflächenproteine von GSHV und ASHV bisher unvollständig charakterisiert (Gerlich et al., 1980; Persing et al., 1986; Schaeffer et al., 1986; Testut et al., 1996).

Die Bedeutung des Woodchuck-Tiermodells liegt neben der Erforschung der der Infektion zugrunde liegenden Pathomechanismen, in der Erprobung und Evaluierung neu konzipierter antiviraler Therapeutika und Vakzine. In Kooperation mit Dr. M. Lu (Institut für Medizinische Virologie des Universitätsklinikum Essen) sollte für eine klinische Studie zur Evaluierung der Effizienz therapeutischer DNA- und Immunkomplexvakzine, die Beeinflussung des Verlaufs der Antigenämie bei chronisch WHV-infizierten Woodchucks durch diese Therapieform untersucht werden.

Ein innovatives Impfstoffkonzept gegen die HBV-Infektion ist die orale, aktive Immunisierung mittels essbarer, das Antigen produzierender transgener Pflanzen. Die immunogene Wirkung von HBsAg-exprimierenden transgenen Kartoffeln, Tabak und Tomaten konnte bereits gezeigt werden (Thanavala et al., 1995, 2005; Gao et al., 2003). Bisherige Versuche wurden jedoch nur an Mäusen und bereits immunisierten Personen durchgeführt. Insbesondere hinsichtlich der Evaluierung der Effizienz der Vakzine, ist es wichtig, die Schutzwirkung des Impfstoffs durch Infektionsversuche an immunisierten Tieren zu testen. Da dies an Mäusen und Menschen nicht möglich ist, ist das Woodchuck-Tiermodell eine sehr gute Alternative. Von unserem Kooperationspartner Dr. J. Imani (Institut für Phytopathologie und angewandte Zoologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) konnte die Expression von HBsAg in Karotten bereits gezeigt werden (Imani et al., 2002). In Anknüpfung an diese Versuche sollten WHsAg-codierende Plasmide kloniert und in transgene Karotten transformiert werden. Anschließend sollten die WHsAg-Expressionsraten der transformierten Karotten bestimmt werden. Letztendlich war es das Ziel, die transgenen Karotten Woodchucks oral zu applizieren, um die Immunogenität des in der Karotte exprimierten Antigens zu beurteilen.

## 2 Material

### 2.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Automatischer Filmentwickler CURIX 60	AGFA, Mortsel, Belgien
Autoradiographiefilme Hyperfilm MP	AMERSHAM Biosciences, Braunschweig
Autoradiographiekassetten	AMERSHAM Biosciences, Braunschweig
Bakterienschüttler	INFORS AG, Bottingen, CH
Binokularmikroskop TELAVAL 31	CARL ZEISS, Wetzlar
Blotkammer Xcell II Blot Module	INVITROGEN, Karlsruhe
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Werkstatt des Mehrzweckinstitutes der JLU Gießen
Elektrophoresekammer XCell Sure-Lock™ Mini Cell für SDS-PAGE	INVITROGEN, Karlsruhe
Elektrophoresekammer für Laurell Elektrophorese (LE)	Werkstatt des Mehrzweckinstitutes der JLU Gießen
ELISA-Shaker ZLI 164	AMERSHAM Biosciences, Braunschweig
ELISA-Washer COLUMBUS	TECAN Deutschland GmbH
Filterpapier WHATMAN 2mm 7,5 x 10 cm (Kat.Nr. 2668/8)	SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel
Glasplatten für LE (5 x 7,5 x 0,2 cm)	KALENSEE, Gießen
LightCycler Kapillaren	ROCHE Diagnostics, Mannheim
Mikrokonzentratoren 100 kDa Vivascience Vivaspin®	VIVASCIENCE, Binbrook, Lincoln, GB
Mikrotiterplatten MaxiSorb für ELISA	NUNC, Wiesbaden
Nivelliertisch	SHANDON Scientific, London
PCR LightCycler®	ROCHE Diagnostics, Mannheim
PCR Mastercycler gradient®	EPPENDORF, Hamburg
pH-Meter 26	RADIOMETER, Copenhagen
Photometer DU 70	BECKMANN, München
Photometer LP 400 für Mikrotiterplatten	PASTEUR
Pipetten	EPPENDORF, Hamburg
PVDF-Transfermembran IMMOBILON-P (Porengröße: 0,45 µm)	MILLIPORE, Eschborn
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	EPPENDORF, Hamburg
Reaktionsgefäße 14 ml, 50 ml	FALCON, New Jersey, USA
Refraktometer	CARL ZEISS, Wetzlar
Reinstwasseranlage	MILLIPORE, Eschborn
Schlauchpumpe MASTERFLEX EASY LOAD 7518-00	NOVODIRECT Kehl/Rhein
SDS-Gele NuPAGE™ 12% Bis-Tris (17 well/1 mm; 12 well/1 mm; 10 well/1 mm)	INVITROGEN, Karlsruhe
Stanze für Laurell Agaroseplatten	Werkstatt des Mehrzweckinstitutes der JLU Gießen
Ultraschall UW 70	BANDELIN ELECTRONIC, Berlin
Ultrazentrifuge OPTIMA™ L-70K	BECKMANN, München
Ultrazentrifugen-Rotoren: SW 28; SW 41	BECKMANN, München
UV-Transluminator TFX-20M	VILBER-LOURMAT, Torcy, FR

Waage Typ 1413	SARTORIUS AG, Göttingen
Zentrifugen:	
5810 R (falcons)	EPPENDORF, Hamburg
VF2	JANKE & KUNKEL IKA
	Labortechnik
5417 R	EPPENDORF, Hamburg
Zentrifugenröhrchen für UZ	BECKMANN, München

## 2.2 Chemikalien

### Agarose:

SeaKem® LE Agarose	BIOZYM, Oldendorf
SeaPlaque® GTG® LMP Agarose ≥1 kB (Kat.Nr.: 50110)	BMA, Rockland, USA
Biozym LMP Agarose ≤1 kB	BIOZYM, Oldendorf
standard low relative molecular mass-	BIO-RAD Laboratories, USA
Agarose für LE (Kat.Nr.: 162-0100)	
Ampicillin	ROTH, Karlsruhe
Antioxidans (für SDS-PAGE)	INVITROGEN, Karlsruhe
Bacto™ Hefe Extrakt	BD, Le Pont de Claix, FR
Bacto™ Trypton	BD, Le Pont de Claix, FR
Bacto-Trypton	DIFCO Laboratories, USA
Coomassie Brilliantblau R250	MERCK, Darmstadt
Digitonin	SIGMA, Taufkirchen
ELISA-Substrat O-Phenylenediamine	DAKO, Glostrup, Dänemark
Ethidiumbromid	SERVA, Heidelberg
Fotofixierer ILFOFIX II (Kat.Nr.: 1756966)	ILFORD, Paramus, NJ, USA
Magermilchpulver	SUCOFIN, Zeven
Proteinaseinhibitor complete®	ROCHE, Mannheim
RNase Zap®	INVITROGEN, Karlsruhe
Rotiblock®	ROTH, Karlsruhe
Sigmacote	SIGMA, Taufkirchen
SYBR® Green nucleic acid gel stain	Molecular Probes, Oregon, USA

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

## 2.3 Enzyme

Antarktische Phosphatase (Kat.Nr.: M0289S/L)	NEW ENGLAND BIOLABS, Inc., Frankfurt
Beta Agarase I (Kat.Nr.: M0392S/L)	NEW ENGLAND BIOLABS, Inc., Frankfurt
Restriktionsenzyme ( <i>Sma</i> I , <i>Sac</i> I)	NEW ENGLAND BIOLABS, Inc., Frankfurt
Hi-Fidelity Extensor PCR Enzyme Mix (Kat.Nr.: AB-0720/A,B)	ABgene Germany, Hamburg
Quick Ligation™ Kit (Kat.Nr.: M2200S)	NEW ENGLAND BIOLABS, Inc., Frankfurt

## 2.4 Plasmide und Bakterienstämme

One Shot® Top 10 Kompetente Zellen  
(Kat.Nr.: C4040-10)

INVITROGEN, Karlsruhe

Plasmid: pPCV812  
(Vektorkarte 3.8.1.)

freundlicherweise von Dr. J. Imani (Institut für  
Phytopathologie und angewandte Zoologie der  
JLU Gießen) zur Verfügung gestellt

## 2.5 Antikörper und Antiseren

Antikörper / -serum	Funktion	Konzentration
anti-HBs C20/2 (Maus) <i>monoklonal</i>	Detektion der a-Determinante der S-Domäne des HBsAg (konformationell) (W.H. Gerlich, Gießen)	stock: 1 mg/ml
anti-HBs HB1 (Maus) <i>monoklonal</i>	Detektion der S-Domäne des HBsAg (K. Sasnauskas, Vilnius)	stock: 1 mg/ml
anti-HBs-POD (Ziege) <i>polyklonal</i>	Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper (DADE BEHRING, Marburg)	
anti-Kaninchen-AP (Esel) <i>polyklonal</i>	Alkalische Phosphatase-konjugierter Sekundärantikörper (DIANOVA, Hamburg)	
anti-Maus-AP (Ziege) <i>polyklonal</i>	Alkalische Phosphatase-konjugierter Sekundärantikörper (Western Breeze® Chemiluminescent Western Blot Immunodetection Kit, INVITROGEN)	
anti-Kaninchen-POD (Esel) <i>monoklonal</i>	Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper (DIANOVA, Hamburg)	stock: 1 mg/ml
anti-Maus-POD (Schaf) <i>monoklonal</i>	Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper (DIANOVA, Hamburg)	stock: 1 mg/ml
anti-preS1-Peptidantiserum (6. Boost) (Kaninchen) <i>polyklonal</i>	Detektion der präS1-Domäne des WHsAg (Tolle et al., 1998)	Serum
anti-WHs 2722 (Kaninchen) <i>polyklonal</i>	Detektion des WHsAg (SWHs, MWHs) (Tolle et al., 1998)	Serum
anti-WHs 2723 (Kaninchen) <i>polyklonal</i>	Detektion des WHsAg (SWHs, MWHs) (Tolle et al., 1998)	Serum
anti-WHs 31 (Maus) <i>monoklonal</i>	Detektion des WHsAg (SWHs, MWHs) (P. Cote, USA)	Ascites

## 2.6 Primer und Hybridisierungssonden (Hybprobes)

### 2.6.1 all ortho-Primer und -Hybprobes

HBV S3 s	5' TGC CTC ATC TTC TTR TTG GTT CT 3' (R: G/A)	nt 422 – 444
HBV S3 as	5' CCC CAA WAC CAV ATC ATC CAT ATA 3' (W: A/T ; V: G/T)	nt 735 – 758
HBV SA FL -Hybprobe	5' CCT ATG GGA GTG GGC CTY AG - FL (Y: C/T)	nt 637 - 656
HBV SA LC -Hybprobe	5' - LC RED 640 - CGT TTC TCY TGG CTC ART TTAC T 3' (Y: C/T ; R: A/G)	nt 658 - 681

Referenzgenom HBV (Genotyp D): NCBI locus: NC\_003977

Sowohl Primer als auch Hybprobes wurden bei der Firma TIB MOLBIOL, Berlin bestellt.

### 2.6.2 Primer für die präS1-Sequenzierung von ASHV und GSHV

preS1 ASHV/GSHV s	5' CTT GGG RAC ACGAC AGC TAG 3' (R: G/A)	ASHV: nt 1029-1049 GSHV: nt 1029-1049
preS1 ASHV/GSHV as	5' GAG ACC TGA TGG TGA CAT CTC 3'	ASHV: nt 1671-1691 GSHV: nt 1674-1694

Referenzgenom ASHV: NCBI locus: AGU29144 (Testut et al., 1996)

Referenzgenom GSHV: NCBI locus: NC\_001484 (Seeger et al., 1984)

Die Primer wurden von der Fa. GATC, Konstanz synthetisiert, bei der auch die Sequenzierung erfolgte.

### 2.6.3 Primer und Nukleotide für die Klonierung der SWHs-, MWHs- und LWHs-Gene

100 mM dNTP Set

INVITROGEN, Karlsruhe

(Kat.Nr.: 10297-018 [4 x 250 µl])

Sma I – SWHs 296 s	5' ACAC CCC GGG ATG TCA CCA TCA AGT CTC 3'	nt 296 - 313
Sma I – MWHs 116 s	5' ACAC CCC GGG ATG AAA AAT CAG ACT TTT CAT CTC 3'	nt 116 - 139
Sma I – LWHs 2989 s	5' ACAC CCC GGG ATG GGC AAC AAC ATA AAA GTC 3'	nt 2989 - 3009
Sac I – SWHs 964 as	5' CAGC GAG CTC TCA AAT GTA TAC CCA AAT CAA GAA AAA C 3'	nt 937 - 964

Referenzgenom WHV 2: NCBI locus: OHVCGB (Kodama et al., 1985)

Die Sequenzen der Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Sma*I und *Sac*I sind grau markiert.

Die Primer wurden bei MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) bestellt.

## 2.6.4 Primer für die Sequenzierung der SWHs-, MWHs- und LWHs-Gene

SWHs 501 s	5' GCT TTC GTT GGA TGT ATC 3'
SWHs 451 as	5' TGT TTG CAA GTT TGG AAC 3'
SWHs 964 as	5' C TCA AAT GTA TAC CCA AAT C 3'

Referenzgenom WHV 2: NCBI locus: OHVCGB (Kodama et al., 1985)

Die Primer wurden von der Fa. GATC, Konstanz synthetisiert, bei der auch die Sequenzierung der Gene für die drei WHV-Oberflächenproteine erfolgte.

sequenziertes Gen (Größe in nt) Nukleotidbereich im WHV-Genom	Sequenzier- primer	Leserichtung	sequenzierter Nukleotidbereich im WHV-Genom
SWHs (669 nt) 296-964	SWHs 964 as SWHs 501 s	Rückwärtsprimer Vorwärtsprimer	296-930 nt 549-964 nt
MWHs (849 nt) 116-964	SWHs 451 as SWHs 964 as SWHs 501 s	Rückwärtsprimer Rückwärtsprimer Vorwärtsprimer	116-430 nt 179-930 nt 549-964 nt
LWHs (1296 nt) 2989-964	SWHs 451 as SWHs 964 as SWHs 501 s	Rückwärtsprimer Rückwärtsprimer Vorwärtsprimer	2989-430 nt 179-930 nt 542-964 nt

## 2.7 DNA- und Protein-Längenstandards

DNA-Längenstandards :

1 kB DNA Ladder (Kat.Nr.:15615016)

INVITROGEN, Karlsruhe

Protein-Längenstandards:

SeeBlue Plus2™ Prestained

INVITROGEN, Karlsruhe

Mark12 Protein Marker

INVITROGEN, Karlsruhe

## 2.8 Kommerzielle Reaktionssysteme

Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro  
Kit (Kat. Nr. 610.21)

DYNAL BIOTECH, Hamburg

High Pure Viral Nucleic Acid Kit  
(Kat.Nr.: 1 858 874)

ROCHE, Mannheim

Immobilon Western Chemilum AP Substrat  
LightCycler® FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup>  
Hybridization Probes Kit (Kat.Nr.: 03  
515 567)

MILLIPORE, Molsheim, FR

ROCHE, Mannheim

LightCycler® RNA Amplification Kit  
Hybridization Probes Kit (Kat.Nr.: 12  
015 145)

ROCHE, Mannheim

Qiagen Plasmid Maxi Kit  
(Kat.Nr.: 12163)

QIAGEN, Hilden

Western Breeze® Chemiluminescent Western Blot Immunodetection Kit (Kat.Nr.: WB 7104)	INVITROGEN, Karlsruhe
Western Lightning® Chemiluminescence Reagent Plus (Kat.Nr.: NEL100001EA)	PERKIN ELMER, Rodgau

## 2.9 Puffer, Lösungen und Medien

Agarose-Probenpuffer (6x)	Glycerin	60 ml
	Bromphenolblau	0,1 g
	ad TAE	100 ml
ELISA-Beschichtungspuffer (NaPP)	NaCl	183 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	8,6 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,2 mM
	auf pH 7,4 einstellen	
Extraktionspuffer	TNE	
	Glycerin	5%
	Triton X-100	0,1%
	Proteinaseinhibitor	1 Tablette pro 10 ml TNE
	Digitonin	250 µg/g Frischgewicht
Fixierer (für Silberfärbung)	Fotofixierer	120 g
	ad dH <sub>2</sub> O	500 ml
LB-Medium	Bacto-Trypton	10 g
	Hefe Extrakt	5 g
	NaCl	10 g
	ad dH <sub>2</sub> O	1000 ml
	vor Gebrauch autoklavieren	
LE-Entfärber	Methanol	450 ml
	Essigsäure	100 ml
	dH <sub>2</sub> O	450 ml
LE-Färber	Coomassie blau	2,5 g
	Methanol	450 ml
	Essigsäure	100 ml
	dH <sub>2</sub> O	450 ml
LE-Puffer (2x)	Tris	17,7 g
	CaCl <sub>2</sub>	0,15 g
	mit HCl auf pH 9,4 einstellen	
	5,5 Diethylbarbitursäure	9,0 g
	ad dH <sub>2</sub> O	1000 ml
	auf pH 8,6 einstellen	
	(Achtung! Barbiturate unterliegen dem	

	Betäubungsmittelgesetz und sind nicht frei erhältlich.)	
Minipräparation Puffer 1	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
	pH 8,0	
Minipräparation Puffer 2	NaOH	200 mM
	SDS	1%
Minipräparation Puffer 3	KOAc	2,55 M
	pH 4,8	
MOPS / SDS-Puffer	Tris	1M
	MOPS	1M
	EDTA	20,5 mM
	SDS	69,3 mM
NuPAGE™ LDS Probenpuffer (4x) gebrauchsfertig, INVITROGEN (Kat.Nr.NP0007)		
PBS	NaCl	136 mM
	KCl	3 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
	mit HCl auf	pH 7,4 einstellen
Reducer (für Silberfärbung)	Zitronensäure	50 mg
	Formalin 37%	0,7 ml
	ad dH <sub>2</sub> O	1000 ml
Silbernitratlösung	Lösung A:	
	AgNO <sub>3</sub>	1,55 g
	dH <sub>2</sub> O	8 ml
	Lösung B:	
	NaOH, 1M	3,8 ml
	Ammoniak 25%	2,8 ml
	dH <sub>2</sub> O	38,2 ml
	Lösung A tropfenweise in Lösung B überführen.	
	ad dH <sub>2</sub> O	200 ml
SSC-Puffer (10x)	NaCl	1,5 M
	Trinatriumzitat	150 mM

TAE-Puffer (50x )	Tris	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	EDTA (0,5 M)	100 ml
	pH 8,0 mit Essigsäure einstellen	
TE-Puffer	Tris-HCl	50 mM (pH 8,0)
	EDTA	1 mM
TNE	NaCl	140 mM
	EDTA	1 mM
	Tris-HCl, pH 7,4	20 mM
Transferpuffer (1x) Western Blot	Glycin	14,4 g
	Tris	3 g
	Methanol	150 ml
	ad dH <sub>2</sub> O	1000 ml

## 3 Methoden

### 3.1 Experimentelle Infektion von adulten Amerikanischen Waldmurmeltieren (Woodchucks) mit Woodchuck-, Ground Squirrel- und Arctic Squirrel Hepatitis Virus (WHV, GSHV, ASHV)

#### 3.1.1 Quantitative Bestimmung der Virus-DNA mittels real-time PCR (LightCycler)

##### 3.1.1.1 Prinzip der real-time PCR (LightCycler)

Während durch die Standard-PCR nur ein qualitativer Nachweis von Virus-DNA in Serum oder anderem Ausgangsmaterial möglich ist, gestattet die real-time PCR auch die Quantifizierung von Virus-DNA.

Für die Messung der amplifizierten DNA-Menge nutzt man Fluoreszenzfarbstoffe, wobei zwei Methoden unterschieden werden. Bei der unspezifischeren von beiden wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green verwendet, der sich in die Doppelstrangstruktur der amplifizierten DNA einlagert und durch Bestrahlung mit UV-Licht angeregt wird. Die Messung der Fluoreszenz findet in jedem Zyklus jeweils nach der Elongation statt. Unspezifischer ist diese Methode deshalb, da SYBR® Green nicht an eine bestimmte Zielsequenz bindet, sondern sich in jegliche doppelsträngige DNA, also auch in Fehlamplifikationen und Primer-Dimere einlagert.

Bei der zweiten Methode werden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Hybridisierungssonden (Hybprobes) eingesetzt. Diese sind, ähnlich Primern, Oligonukleotide, die 1-5 Basen voneinander entfernt an eine spezifische Zielsequenz der DNA binden. Hierbei handelt es sich immer um ein Paar, bei dem die eine Hybridisierungssonde am 3'-Ende eine Fluoreszein-Molekül (Donor) und die andere am 5'-Ende ein LC-Rot-Molekül (Akzeptor) besitzt. Um zu verhindern, dass die Akzeptorsonde als Primer fungieren kann, ist sie am 3'-Ende methyliert. Wird die Donorsonde mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt, wird mittels FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) Energie auf die wenige Basen entfernte Akzeptorsonde transferiert. Diese emittiert rotes Licht, welches von der Photozelle des LightCycler gemessen wird. Die Messung findet während jedem Zyklus, immer am Ende der Annealing-Phase, statt. Dabei ist die Fluoreszenz direkt proportional zum Gehalt an PCR-Produkten.

Während der PCR steigt die Fluoreszenz logarithmisch an, bevor sie ein Plateau erreicht. Die Plateauphase wird erreicht, wenn alle Hybprobes gebunden sind und die freien Desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTPs) in ihrer Konzentration sinken. Durch das Messen der Fluoreszenz bei jedem Zyklus, kann der Zeitpunkt, an dem die Fluoreszenz erkennbar wird, exakt erfasst werden. Dieser sogenannte „crossing point“ gibt die Zykluszahl an, in der die Fluoreszenz sicher messbar wird. Er wird umso früher erreicht, je mehr DNA zu Beginn der PCR vorhanden war.

Die Quantifizierung der DNA wird durch das Mitführen einer in mehreren log-Stufen verdünnten Standardreihe ermöglicht. Die LightCycler-Software erstellt aus den crossing points der einzelnen Verdünnungen und den vom Benutzer vorgegebenen Konzentrationen der Standardreihe eine Regressionsgerade. Mit Hilfe dieser Funktion werden die unbekannt Konzentrationen von der LightCycler-Software errechnet. Dabei werden die DNA-Konzentrationen in „Kopien“ angegeben. Diese sind vom Anwender noch in Genomäquivalente pro ml umzurechnen, wobei das aufgereinigte Serumvolumen und das Probenvolumen, was in die PCR eingesetzt wurde, zu berücksichtigen sind.

Im Anschluss an die Quantifizierung folgt die Schmelzkurvenanalytik. Dabei wird nach dem letzten Zyklus noch eine weitere Denaturierung und ein letztes Annealing durchgeführt. Anschließend wird die Temperatur bis zum Erreichen der Schmelztemperatur des Amplifikats schrittweise um 0,1 °C erhöht. Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) für dsDNA gibt an, bei welcher Temperatur 50% der DNA noch als Doppelstrang bzw. 50% schon als Einzelstränge vorliegen. Sie ist abhängig von der Länge und dem G/C-Gehalt des amplifizierten DNA-Stückes. In der LightCycler-PCR ist sie durch eine abnehmende Fluoreszenz gekennzeichnet. Bei der SYBR® Green-Fluoreszenz ermöglicht die Schmelzkurvenanalytik dem Benutzer zwischen spezifischem Amplifikat und Fehlhybridisierungen zu unterscheiden. Als Orientierung dient die Schmelztemperatur /-kurve des Standards.

Bei der Hybprobe-Fluoreszenz gelingt mit ihr sogar das Unterscheiden verschiedener Genotypen oder das Erkennen von Mutanten. Liegen in der Zielsequenz der Hybprobes Punktmutationen vor, so können diese bis zu einem gewissen Grad trotzdem binden. Jedoch ist die Bindung weniger stabil und die Schmelztemperatur fällt geringer aus. Eine niedrigere Schmelztemperatur als

erwartet kann also ein Hinweis auf eine Mutation in der amplifizierten Sequenz oder einen anderen Genotyp sein.

### **3.1.1.2 Spezifität der Primer und Hybridisierungssonden (Hybprobes)**

Die Primer und Hybridisierungssonden (Hybprobes) wurden so ausgewählt, dass sie gleichermaßen spezifisch für die Orthohepadnaviren WHV, GSHV als auch ASHV waren. Hierbei handelt es sich um so genannte all ortho-Primer und -Hybprobes.

Ziel bei der Konzipierung dieser Primer war es, eine hoch konservierte Region im Genom aller bekannten Orthohepadnaviren zu finden, um bei der Routine-diagnostik alle Genotypen des HBV zu erfassen sowie falsch negative Ergebnisse durch unbekannte Virusvarianten zu vermeiden. Die S-Domäne ist nicht nur in den HBV-Genotypen, sondern ebenso in allen anderen bekannten Orthohepadnaviren konserviert. Die Spezifität und Sensitivität der Primer ist sowohl für die quantitative Bestimmung von HBV- als auch WHV DNA mittels real-time PCR (LightCycler) bestätigt. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 100, die Obere bei  $10^{10}$  Genomequivalenten pro ml. Die DNA-Sequenz, die mit diesen Primern amplifiziert wird, hat eine Länge von 336 Basenpaaren (Schaefer et al., 2002).

Die all ortho-Hybprobes binden wie die Primer in der hoch konservierten S-Domäne aller Orthohepadnaviren.

### **3.1.1.3 Isolierung der Virus-DNA aus Serum**

Aus jeweils 200 µl Serum wurde mit dem High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim) die Virus-DNA extrahiert, die am Ende der Aufreinigung in 50 µl Elutionspuffer aufgenommen wurde. Um Kontaminationen während der Aufreinigung auszuschließen, wurden als Negativkontrolle 200 µl Bdest denselben Aufreinigungsschritten wie die Serumproben unterzogen.

Von den 50 µl isolierten DNA-Extrakts wurden 10 µl direkt in die PCR eingesetzt.

### **3.1.1.4 Durchführung der PCR**

Als Standard wurde das Plasmid WHV2-Dimer (Referenzgenom: Kodama et al., 1985) verwendet, in das zwei Kopien des WHV-Genoms linear hintereinander inkloniert wurden. Bei jedem LightCycler-Lauf wurde eine Verdünnungsreihe

von  $10^5$  bis  $10^0$  Genomequivalenten absolut in 20  $\mu$ l PCR-Ansatz eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde Bidest mitgeführt.

Jede LightCycler-Kapillare enthielt ein Reaktionsvolumen von 20  $\mu$ l (10  $\mu$ l Mastermix plus 10  $\mu$ l Probe). Der Mastermix je Probe setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

dH <sub>2</sub> O	3 $\mu$ l
HBV S3 s sense Primer (10 pmol)	1 $\mu$ l
HBV S3 as antisense Primer (10 pmol)	1 $\mu$ l
SA FL Hybprobe (4 pmol)	0,5 $\mu$ l
SA LC Hybprobe (4 pmol)	0,5 $\mu$ l
Master Mix Fast Start plus	4 $\mu$ l

Zu je 10  $\mu$ l Mastermix wurden 10  $\mu$ l DNA-Extrakt gegeben.

Nach dem Einpipettieren der Probe in die Kapillare, wurde der Inhalt für etwa 10 Sekunden bei 2500 rpm (660 g) abzentrifugiert. Anschließend wurden die Kapillaren in das LightCycler-Rondell eingesetzt. Für die PCR wurde folgendes Programm verwendet:

	Aktivierung	Amplifikation			Schmelzkurve			Kühlen
Cycles	1	50			1			1
Type	Regular	Quantification			Melting Curve			Regular
Target Temp. [°C]	95	95	60	72	95	45	80	40
Incubation Time	10 min	10''	15''	14''	10''	15''	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	

### 3.1.1.5 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Nach beendetem LightCycler-Lauf wurden die einzelnen Proben aus den Kapillaren herauszentrifugiert und in Reaktionsgefäßen aufgefangen.

Von jedem PCR-Ansatz wurden 10  $\mu$ l elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und die DNA im Gel anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt. Das Gel stellt eine Kontrolle dar. Zum einen kann anhand der Bandenhöhe des Amplifikats gezeigt werden, dass es spezifisch amplifiziert wurde. Zum anderen kann es vorkommen, dass bestimmte Proben vom LightCycler nicht quantifiziert

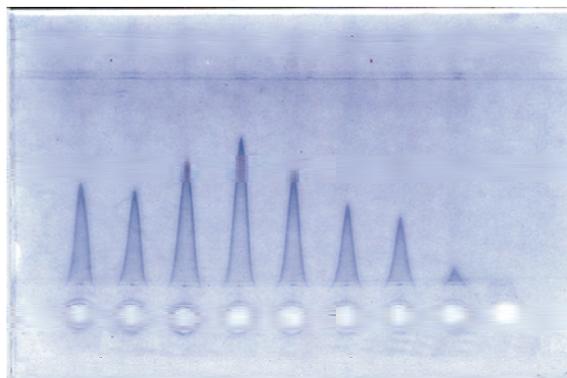
werden und bei der Berechnung negativ sind, obwohl DNA amplifiziert werden konnte. Das geschieht bei zu geringen Viruskonzentrationen im Ausgangsmaterial, zum Beispiel bei sehr niedrigtitrigen Seren.

### 3.1.2 Quantitative Bestimmung des Oberflächenantigens mit Hilfe der Laurell-Elektrophorese

#### 3.1.2.1 Prinzip der Laurell-Elektrophorese

Diese Methode dient dem Nachweis und der Quantifizierung von virusspezifischem Antigen in Serum oder Plasma. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Kombination aus Elektrophorese und Immunpräzipitation. Hierfür werden Antigen und Antikörper auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach Anlegen einer Spannung wandert das Antigen zur Anode und der Antikörper bleibt stationär, kann aber diffundieren. Die Antigen-Antikörper-Komplexe bilden in der Äquivalenzzone lichtstreuende Präzipitationslinien in Form von Bögen, wobei die Höhe der Präzipitationsbögen direkt proportional zur Antigen-Konzentration ist (Gerlich et al., 2003).

zur **Anode** ausgerichtete Seite



zur **Kathode** ausgerichtete Seite

Antikörperfreier Agar

Antikörperhaltiger Agar

← Stanzlöcher mit Antigenproben

Antikörperfreier Agar

**Abb. 4:** Darstellung einer Laurell-Elektrophorese zur Quantifizierung von WHsAg in Serum.

Die Präzipitationsbögen der Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mit Coomassie blau gefärbt.

Es ist darauf zu achten, dass das Verhältnis zwischen Antigen und Antikörper ausgewogen ist. Ist die Konzentration des Antiserums zu niedrig bzw. liegt das Antigen im Überschuss vor, wandert das Antigen aus dem Immunagar heraus und es entstehen nach oben offene Präzipitationsbögen, die nicht auswertbar sind. Wird auf der anderen Seite zu viel Antiserum eingesetzt, sind die Präzipi-

tationsbögen zu kurz. Um das Antigen im Serum quantifizieren zu können, benötigt man einen Standard mit bekannter Konzentration. Die Nachweisgrenze für WHsAg liegt bei dem verwendeten Protokoll bei etwa 2 µg/ml.

### 3.1.2.2 Durchführung der Laurell-Elektrophorese

Die 1,2%-ige Agarose (1,2 g auf 100 ml dH<sub>2</sub>O) wurde in der Mikrowelle erhitzt, bis eine klare Lösung entstand und anschließend in einem 56 °C heißen Wasserbad abgekühlt. Dabei war darauf zu achten, dass sich in der Agarose keine Schlieren bildeten. Parallel wurden die Laurell-Elektrophorese (LE)-Platten für das Gießen der Gele vorbereitet. Die mit Alkohol entfetteten Glasplatten wurden in ein mit ein paar Tropfen Agarose versehenes Wasserbad getaucht und getrocknet. Diese Prozedur führte zu einer besseren Haftung des Agarose-Puffer-Gemischs auf der Glasplatte und verhinderte ein versehentliches Überlaufen der Agarose über den Rand der Platte. Die LE-Platten wurden auf einem waagrecht justierten Nivelliertisch positioniert.

Anschließend wurde die 1,2%-ige Agarose mit 2x LE-Puffer, der zuvor für ca. 10 min im 56 °C heißen Wasserbad erwärmt wurde, im Verhältnis 1:1 verdünnt. Jeweils 6 ml dieses 0,6%-igen Agarose-Puffer-Gemischs wurden mit einer Pipette zügig und gleichmäßig pro LE-Platte aufgetragen.

Nach etwa 10 min, wenn die Agarose auf den Glasplatten erhärtet war, wurden mit einer speziell angefertigten Stanze (Werkstatt des Mehrzweckinstituts der JLU Gießen, Abb. 5) ein 3 cm breiter Mittelstreifen und 9 Löcher (Durchmesser 5 mm) in das Gel gestanzt. Der Mittelstreifen wurde vorsichtig unter Zuhilfenahme eines Spatels und die Agarose aus den Löchern mit einer an ein Unterdrucksystem angeschlossenen Kanüle entfernt, wobei darauf geachtet wurde, dass der Rand der Löcher nicht beschädigt wurde.

Danach wurden 3 ml des 0,6%-igen Agarose-Puffer-Gemischs mit 125 µl Antiserum (anti-WHs 2723, Tolle et al., 1998) vermischt und zügig in die freie Fläche des zuvor entfernten Mittelstreifens gegossen.

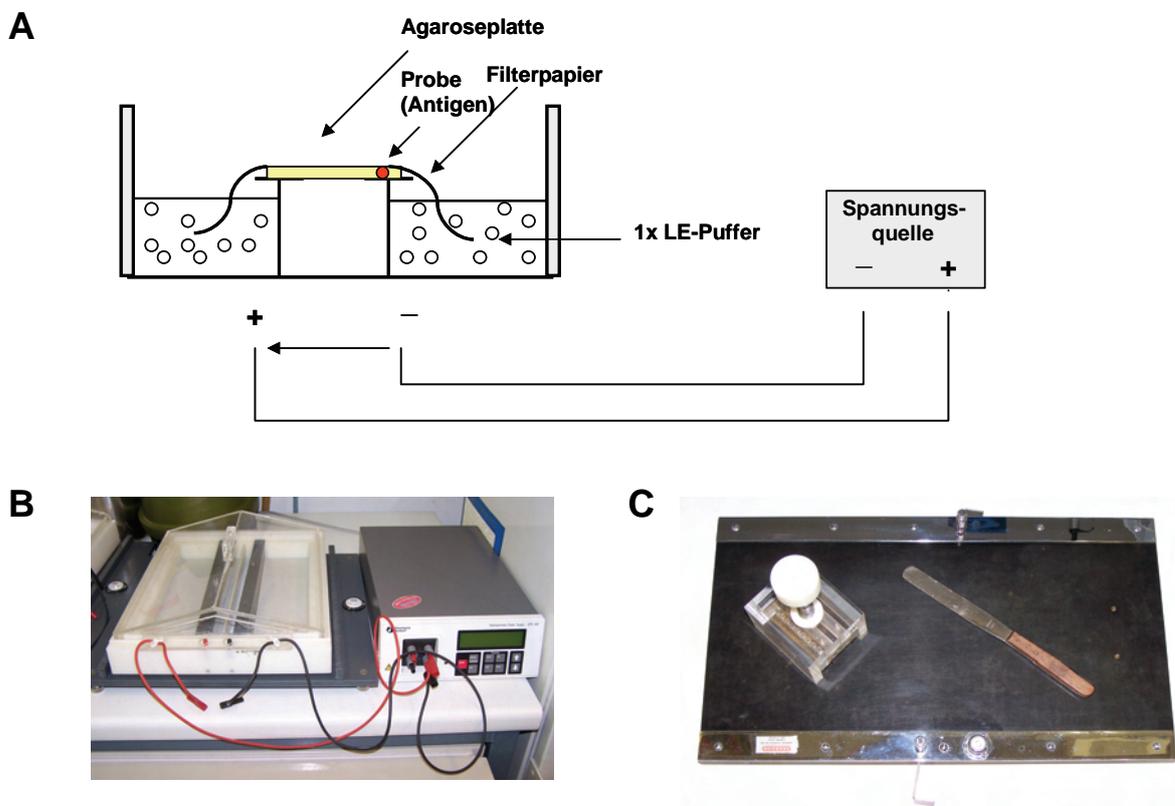
Nun wurden beide Kammern der Elektrophoresekammer (Abb. 5 B) mit je 450 ml 1x LE-Puffer befüllt.

Nachdem der Immunagar verfestigt war, wurden die Agaroseplatten so in der Elektrophoresekammer positioniert, dass die Stanzlöcher zur Kathode (Minus-Pol) gerichtet waren (Abb. 5 A). An beiden Längsseiten der Platten wurden die

mit 1x LE-Puffer befeuchteten Filterpapiere platziert: die eine Seite circa 3-5 mm mit der Agarose überlappend und die andere Seite in den Laufpuffer der Elektrophoresekammer hängend (Abb. 5 A). Dabei darf das Filterpapier nicht auf den ausgestanzten Löchern liegen.

Nun wurden 10  $\mu$ l jeder Probe sowie 10  $\mu$ l des Standardserums, was auf jeder Laurell Elektrophorese-Platte mitgeführt wurde, in die ausgestanzten Löcher pipettiert. Das Standardserum, dessen Konzentration bekannt ist, wird für die quantitative Auswertung der Proben benötigt. Die Elektrophorese dauerte 16 h; pro Agaroseplatte wurden 4 mA Stromstärke eingestellt.

Nach dem Lauf wurden die LE-Platten der Elektrophoresekammer entnommen, mit Filterpapier bedeckt, leicht gepresst und anschließend im Inkubator bei 50°C für ca. 30 min getrocknet. Die getrockneten LE-Platten wurden so lange im Coomassie Blau-Färbebad geschwenkt, bis die Präzipitationslinien sichtbar wurden. Ein zu starker Hintergrund wurde durch eine kurze Behandlung mit Entfärber reduziert.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Laurell-Elektrophorese (A), Abbildung der Elektrophoresekammer mit angeschlossener Spannungsquelle (B) sowie Nivelliertisch, Stanze und Spatel zum Präparieren der LE- Agarosegele (C)

Die gefärbten Platten wurden anschließend eingescannt und digital ausgewertet. Für die Bestimmung der Länge der Präzipitationsbögen wurde die Funktion „Meßwerkzeug“ der Grafiksoftware Adobe® Photoshop genutzt. Eine andere Möglichkeit der Auswertung ist das Ausmessen der Präzipitationsbögen mit einem einfachen Lineal unter einer Kaltlichtlampe, was direkt im Anschluss an den Elektrophoreselauf und ohne Färbung geschehen kann. Die digitale Auswertung der Coomassie Blau-gefärbten Platten erweist sich jedoch als genauer. Um das Antigen in den zu untersuchenden Seren quantifizieren zu können, wird aus der Länge der Präzipitationsbögen und der bekannten Konzentration des Standardserums eine Funktion ermittelt, mit deren Hilfe die Antigenkonzentrationen der Seren bestimmt werden (4.1.2).

### **3.1.2.3 Quantitative Bestimmung des Oberflächenantigens in den Seren der mit WHV, GSHV und ASHV inokulierten Woodchucks**

Für die Quantifizierung des viralen Oberflächenantigens der im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchenden Seren, wurde das Serum 5413 jeweils in einer 1:10 Verdünnung als interne Referenz eingesetzt (4.1.2.1). Nach jedem Lauf wurde die Länge des Präzipitationsbogens des WHV-Standards bestimmt und gegen dessen bekannte Konzentration in einem Diagramm aufgetragen. Die daraus resultierende Funktion bildete jeweils die Berechnungsgrundlage für die Quantifizierung des Oberflächenantigens der zu untersuchenden Woodchuckseren.

Von allen vorhandenen Serumproben wurde die Oberflächenantigenkonzentration wöchentlich (WHV-Infektion, 17 Wo Laufzeit) bzw. zweiwöchentlich (GSHV-, ASHV-, WHV-Infektion, 30 Wo Laufzeit) bestimmt. Die Seren der Infektionsverläufe, bei denen ein Anstieg zu verzeichnen war, wurden aufgrund des relativ kurzen Zeitraums, in dem Oberflächenantigen im Blut zirkulierte, in wöchentlichem Abstand auf die Präsenz von sAg untersucht.

Die zu untersuchenden Seren enthielten z.T. sehr hohe Konzentrationen an Antigen. Um eine Quantifizierung zu ermöglichen, wurden sie entsprechend verdünnt. Erfahrungsgemäß müssen Seren mit einer WHsAg-Konzentration  $\geq 80$   $\mu\text{g/ml}$  in FKS (Fetales Kälberserum) verdünnt werden.

### **3.1.3 Präzipitation und Detektion von Oberflächenantigen-Immunkomplexen**

Die Immunkomplexpräzipitation wurde in Anlehnung an das Protokoll nach Creighton, Lambert und Miescher (1973) modifiziert nach Madalinski et al. (1991) durchgeführt.

Das zu fällende Serum wurde zunächst für 5 min bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert. 100 µl des geklärten Serumüberstandes wurden anschließend mit 50 µl 7,5%-igen PEG 6000 (w/w) in TNE vermischt, so dass man eine Endkonzentration von 2,5% PEG 6000 im Serum erhielt. Nach der Inkubation bei 4 °C über Nacht wurden die gefällten Immunkomplexe bei 8000 rpm und 4 °C für 5 min abzentrifugiert. Daraufhin wurde das Präzipitat zweimal mit 200 µl kaltem 2,5%-igem PEG 6000 (w/w) in TNE gewaschen und zum Schluss in 30 µl PBS resuspendiert.

Da sämtliche Immunkomplexe aus dem Serum gefällt wurden, erfolgte der spezifische Nachweis der Oberflächenantigen-Immunkomplexe im Western Blot.

10 µl der Immunkomplexsuspension wurden in einem SDS-Gel (NuPage™ 12% Bis-Tris-Gele) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran (Immobilon, Millipore, Bedford, MA) für 2 Stunden transferiert (3.1.7). Detektiert wurde die Oberflächenantigen-Immunkomplexe mit dem Antiserum anti-WHs 2722, das im Besonderen gegen das kleine und mittlere Oberflächenantigen (S- und M-Protein) von WHV gerichtet ist (3.1.7.2). Aufgrund der Kreuzreaktivität des Antiserums mit dem S- und M-Protein von GSHV und ASHV, konnten damit ebenso GSHsAg- und ASHsAg-Immunkomplexe nachgewiesen werden.

### **3.1.4 Isolierung von subviralen Partikeln (WHsAg, GSHsAg, ASHsAg) aus Serum**

Mittels Sedimentation durch ein Saccharose-Kissen und anschließende Flotation durch einen diskontinuierlichen Cäsiumchlorid-Gradienten können subvirale Partikel aus Serum isoliert und gereinigt werden. Diese Methode macht sich zunutze, dass sich subvirale Partikel, Core-Partikel, Virionen und allgemeine Serumproteine wie Albumin und Globuline aufgrund ihrer verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften während der Zentrifugation in unterschiedlichen Dichten anreichern (Glebe und Gerlich, 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe dieser Methode subvirale Partikel aus acht Seren mit WHV, GSHV sowie ASHV infizierter Woodchucks aufgereinigt. Dabei handelte es sich um Oberflächenantigen-positive Seren von akut und chronisch infizierten Tieren. Die Daten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2: Auflistung der Woodchuckseren, aus denen mittels Dichtegradientenzentrifugation subvirale Partikel isoliert und aufgereinigt wurden**

Versuchstier Nr. (Woche p.i.)	Serumvolumen in ml	Menge gereinigter subviraler Partikel in µg	Virusspezies	Verlaufsform: akut / chronisch
3539 (Wo 4)	3	93	WHV	akut
3538 (Wo 4)	1,5	3,2	WHV	akut
3538 (Wo 5)	2	10	WHV	akut
6328	6	630	WHV	chronisch
5375	3	200	WHV	chronisch
3545 (Wo 6)	3	138	GSHV	akut
3545 (Wo 8)	2,7	88	GSHV	akut
3537 (Wo 14)	3	9	ASHV	akut

#### 3.1.4.1 Zentrifugation des Serums durch ein Saccharose-Kissen

Zuerst wurde das jeweilige Serum durch ein Saccharosekissen pelletiert. Hierbei handelte es sich um zwei Schichten aus 15% und 10%iger Saccharose, auf die die Probe aufgetragen wurde. Die Zentrifugation erfolgte in einem Schwingbecherrotor, Rotor SW 41 (Beckmann), für 16 h bei 25.000 rpm und 10 °C. Nach dem Zentrifugenlauf wurde die Saccharoseüberstand durch schnelles Kippen des Zentrifugenröhrchens entfernt und das verbliebene Pellet in 1 ml sterilfiltriertem, etwa 4 °C kaltem TNE-Puffer resuspendiert.

#### 3.1.4.2 Cäsiumchlorid (CsCl)-Dichtegradientenzentrifugation

Im nächsten Schritt wurde das resuspendierte Pellet in einem diskontinuierlichen CsCl-Gradienten eingesetzt. In dem Gradienten wurden CsCl-Konzentrationen von 1,35 -1,16 g/ml mit abnehmender Dichte aufeinander geschichtet (Abb. 6). Das resuspendierte Pellet wurde zuvor mit kristallinem CsCl auf eine Dichte von 1,30 g/ml eingestellt.

Während der Zentrifugation flotieren die subviralen Partikel im Gradienten nach oben und sammeln sich bei einer Dichte von 1,18 g/ml (Gerlich et al., 1980, Feitelson et al., 1982, Werner et al., 1979), während Albumin und Globuline im

unteren Teil des Gradienten verbleiben. Die Zentrifugation erfolgte im Rotor SW 41 (Beckmann) bei 25.000 rpm und 10 °C und dauerte 37 h.

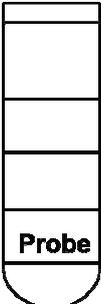
	Volumen	Dichte (g/ml)
	3 - 7 mm frei	
	4 ml	1,16
	2 ml	1,24
	2 ml	1,27
Probe	2 ml	1,30
	1,5 ml	1,35

Abb. 6: Darstellung der verschiedenen Schichten des Cäsiumchlorid-Gradienten mit unterschiedlicher Dichte zur Isolierung subviraler Partikel aus Serum.

### 3.1.4.3 Fraktionierung des CsCl-Gradienten

Im Anschluss an die Zentrifugation wurde das Zentrifugenröhrchen in ein Gestell gespannt und in den CsCl-Gradienten eine Stahlkanüle bis zum Boden des Zentrifugenröhrchens eingeführt, welche mit einem Schlauchpumpensystem (Masterflex easyload model 7518-00) verbunden war. Damit wurde der Gradient in 12 x 1 ml Fraktionen in silikonisierte Eppendorfgefäße ausgetropft.

Von jeder Fraktion wurde anschließend die Proteinmenge durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm im Photometer (DU 70, Spektrophotometer, Beckmann) bestimmt. Mittels SDS-PAGE und Silberfärbung des Gels wurden die WHsAg enthaltenden Fraktionen detektiert.

### 3.1.4.4 Ultrafiltration

Die WHsAg enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und in einen Mikrokonzentratoren (100 kDa, Vivascience) pipettiert. Dieser Mikrokonzentratoren beinhaltet eine Polyethersulfonmembran mit einer Ausschlußgröße für Proteine von 100 kDa. Größere Moleküle (WHsAg) werden zurückgehalten, während kleinere (CsCl) durchfiltriert werden.

Durch Zentrifugation bei 1000 rpm und 4 °C wurde die Probe aufkonzentriert. Im Anschluss wurde das Retentat dreimal mit sterilfiltriertem TNE (das Volumen richtete sich hierbei nach dem Fassungsvermögen des Konzentratoren) gewaschen und das CsCl aus der Probe entfernt.

Die Konzentration des gereinigten WHsAg wurde durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm im Photometer ermittelt und daraus mit folgender Formel berechnet:

$$5,1 \text{ OD}_{280} = 1 \text{ mg/ml gereinigtes WHsAg}$$

Die Extinktion von 5,1 für WHsAg bei 280 nm basiert auf dem Absorptionswert und der daraus abgeleiteten Formel, die für das HBsAg ermittelt wurde ( $4,3 \text{ OD}_{280} = 1 \text{ mg/ml gereinigtes HBsAg}$ ; Gerlich und Thomssen, 1975). Dem Wert wurde die Anzahl der Tyrosin- (7) und Tryptophanreste (13-14) im kleinen Oberflächenprotein des HBV zugrunde gelegt. Durch proportionale Umrechnung der Anzahl der Tyrosin- (7) und Tryptophanreste (17) im kleinen Oberflächenprotein des WHV wurde der Absorptionswert für das WHsAg ermittelt (Tolle et al., 1998).

Bei allen Aufreinigungsschritten wurde mit silikonisierten Materialien (Zentrifugenröhrchen, Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen) gearbeitet. Zentrifugenröhrchen und Eppendorfgefäße wurden mit Sigmacote (Sigma, Taufkirchen) silikonisiert.

### **3.1.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (nach Laemmli, 1970) werden Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Die Denaturierung der Proteine durch das Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat), das Reduktionsmittel DTT (Dithiothreitol) und hohe Temperaturen gewährleistet, dass das Laufverhalten nicht durch die Tertiärstruktur der Proteine beeinflusst wird. Durch die Verbindung mit SDS werden die Proteine mit einer negativen Ladung versehen. 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 Proteine bestimmt werden. Das Mitführen eines in mehreren Verdünnungsstufen vorliegenden Standards ermöglicht die Quantifizierung der Proben.

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden gebrauchsfertige SDS-Gele (NuPage™ 12% Bis-Tris-Gele; Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Elektrophorese wurde in XCell SureLock™ Mini Cell Kammern (Invitrogen, Karlsruhe)

durchgeführt. Als Laufpuffer diente 1x MOPS-Puffer, der zusätzlich 500 µl Antioxidans (Invitrogen, Karlsruhe) enthielt. Zu den Proben wurden 4x Probenpuffer und 10% DTT (1M) hinzugefügt. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben für 10 min bei 70 °C im Heizblock erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 200 V durchgeführt und dauerte etwa eine Stunde.

### **3.1.6 Silberfärbung von SDS-Gelen**

Bei der Silberfärbung handelt es sich um eine hochsensitive Methode, um Proteine in einem SDS-Gel sichtbar zu machen. Ihre Empfindlichkeit liegt bei ca. 5 ng Protein pro Bande (Merril et al. 1981). Freie Silber-Ionen bilden mit Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine Komplexe, die mittels starker Reduktionsmittel (Formaldehyd) zu metallischem Silber reduziert werden. Die Reaktion wird durch Zugabe von Foto-Fixierer gestoppt.

Das SDS-Gel wurde in ca. 100 ml 50% Methanol in Bidest über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Schüttler geschwenkt. Am nächsten Tag wurde das Methanol durch Bidest ersetzt und das Gel für ca. 15 min gewaschen. Dabei wurde das Bidest mehrmals erneuert. Danach wurde das Gel mit der Silbernitratlösung für 20 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Es folgten ein 15 minütiger Waschschrift, bei dem das Bidest wieder mehrmals gewechselt wurde. Anschließend wurde das Gel solange in Reducer-Lösung geschwenkt, bis es die gewünschte Bandenstärke erreichte. Der Vorgang wurde mit Fixierer gestoppt.

### **3.1.7 Detektion von Proteinen mittels Western Blot**

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 (z.B. BSA oder getrocknetes Magermilchpulver oder FKS) abgesättigt. Daran schließt sich die Inkubation mit dem ersten Antikörper, der gegen das Zielprotein gerichtet ist, an. Der zweite Antikörper ist mit einem Enzym, meist Peroxidase oder Alkalische Phosphatase, konjugiert und detektiert den ersten Antikörper. Durch Zugabe eines Substrats (z.B. Diaminobenzidin), 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-Membran für jeweils 5 min in Methanol inkubiert und anschließend mit 1x Transferpuffer äquilibriert. 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 mit 1x 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 1x Transferpuffer und in den äußeren Bidest gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 250 mA für 2 Stunden durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran mit 5% Magermilchpulver in PBS (w/v) über Nacht bei 4 °C oder 1 h bei RT geblockt.

Direkt nach dem Blocken erfolgte die Inkubation der Membran mit den Antikörpern in 5% Magermilchpulver in PBS (w/v). Die Membran wurde dafür in Folie eingeschweißt, um den Antikörperverbrauch möglichst niedrig zu halten. Nicht gebundene Antikörper wurden nach jeder Antikörperinkubation mit 0,1% Tween 20 + 0,5% Magermilchpulver in PBS für 3 x 10 min abgewaschen. Nach dem Abwaschen des 2. Antikörpers wurde die Membran noch einmal für 10 min in PBS geschwenkt, bevor das Substrat aufgetragen und der Blot immunologisch entwickelt wurde. Das Visualisieren der Proteine erfolgte mittels Chemilumineszenz. Das ECL-Substrat wurde für 1 min mit der Blotmembran inkubiert und das Signal auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

### **3.1.7.1 Detektion des mittleren Oberflächenproteins (M-Protein) von WHV, GSHV und ASHV**

Zur Detektion des M-Proteins wurde das in Kaninchen generierte Antiserum anti-WHs 2722 (Tolle et al., 1998) in einer Konzentration von 1:500 eingesetzt und die Blotmembran damit für 1 h bei 37 °C auf einem Drehrad inkubiert. Der 2. Antikörper war Peroxidase-konjugiert und gegen Kaninchen gerichtet (anti-Kaninchen-POD; Dianova, Hamburg). Er wurde 1:10.000 verdünnt angewendet und ebenfalls für 1 h bei 37 °C auf dem Drehrad mit der Membran inkubiert. Die

Entwicklung erfolgte mit dem ECL-Substrat: Western Lightning® Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer, Rodgau).

### 3.1.7.2 Detektion des großen Oberflächenproteins (L-Protein) von WHV, GSHV und ASHV

Für die Detektion des L-Proteins wurde ein Peptidantiserum verwendet, welches gegen die Aminosäuren 126-146 (TNRDQGRKPTPPTPPLRDTHP) des präS1-Bereichs des WHV-L-Proteins generiert wurde. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte mit 200 µg des synthetischen Peptids (Tolle et al., 1998). Das Antiserum war wegen der hohen Sequenzähnlichkeit auch für Detektion der L-Proteine von GSHV und ASHV geeignet (Abb. 7).

Das Peptidantiserum wurde in der Konzentration 1:200 angewendet und die Membran damit 45 min bei RT leicht schüttelnd inkubiert. Der 2. Antikörper, anti-Kaninchen-AP (Dianova, Hamburg), wurde in der Konzentration 1:50.000 eingesetzt und ebenfalls für 45 min bei RT mit der Membran inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mit dem AP-Substrat: Immobilon Western Chemilum AP Substrat (Milipore, Molsheim).

---

WHV-präS1-Peptid:	TNRDQGRKPTPPTPPLRDTHP
präS1 GSHV:	SNRDQRRKPTPLTPPLRDTHP
präS1 ASHV:	PNRDKGRKPTPQTPPLRDTHP

---

**Abb. 7: Sequenzvergleich des für die Immunisierung verwendeten WHV-präS1-Peptids mit der homologen Sequenz von GSHV und ASHV**

---

### 3.1.8 PräS1-Sequenzierung von ASHV und GSHV

Zum einen wurde die präS1-DNA-Sequenz der für die Infektion der Woodchucks verwendeten Virus-Inokulate und zum anderen die der Replikate der entsprechenden Virus-DNA (3.1.1.3) während der Infektion analysiert. Das ASHV- bzw. GSHV-Template wurde unverdünnt sowie 1:10 oder 1:100 verdünnt eingesetzt. Für die PCR wurde der Hi-Fidelity-Extensor PCR Enzyme Mix (ABgene, Hamburg) verwendet, dessen Polymerase eine 3'-5' Exonukleaseaktivität besitzt, wodurch Fehler bei der Synthese des Komplementärstranges korrigiert werden. Der Mastermix je Probe setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

A	Hi-Fidelity Puffer 1	5 $\mu$ l
	Hi-Fidelity Polymerase	0,25 $\mu$ l
	dH <sub>2</sub> O	19,75 $\mu$ l
B	10 mM dNTP´s	2 $\mu$ l
	preS1 ASHV/GSHV s (10 pmol)	1 $\mu$ l
	preS1 ASHV/GSHV as (10 pmol)	1 $\mu$ l
	ASHV- bzw. GSHV-Template	1 $\mu$ l
	dH <sub>2</sub> O	10 $\mu$ l

Die Ansätze A und B mit einem Volumen von je 25  $\mu$ l wurden separat auf Eis angesetzt und zum Schluss vereinigt.

Die PCR wurde im Mastercycler gradient® (Eppendorf, Hamburg) mit folgendem Programm durchgeführt:

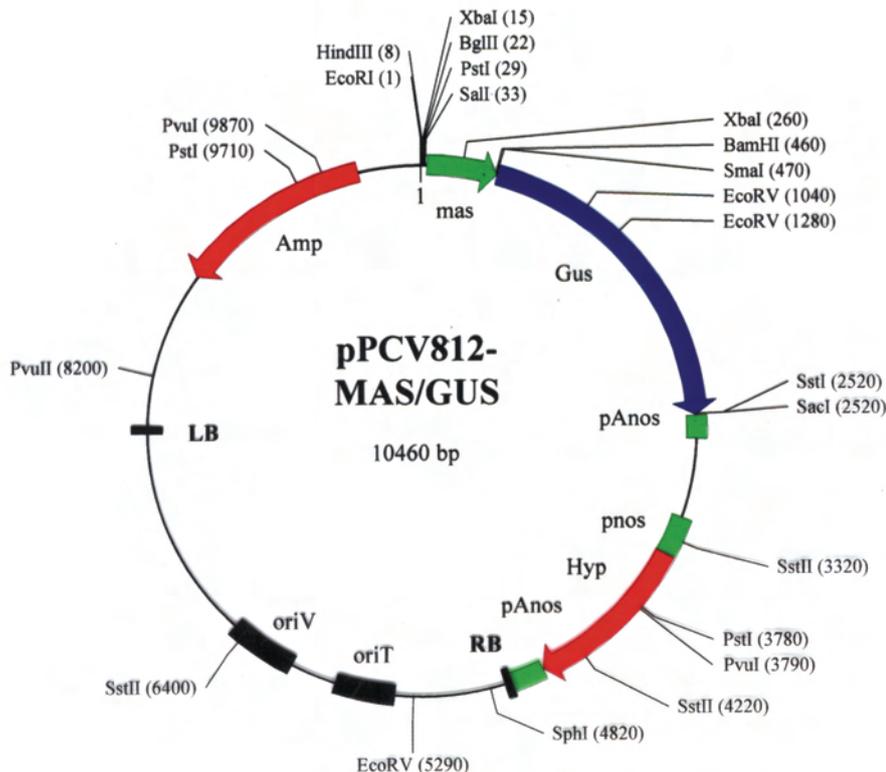
initiale Denaturierung	94 °C	2 min	1 x
Denaturierung	94 °C	30 sec	35 x
Annealing	58 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	1.30 min	
finale Elongation	72 °C	5 min	1 x

Um zu kontrollieren, ob das entsprechende DNA-Fragment spezifisch amplifiziert wurde, wurden 5  $\mu$ l des PCR-Ansatzes in einem 2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA mittels Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde von der Firma GATC, Konstanz mit den Primern preS1 ASHV/GSHV s (Vorwärtsprimer) und preS1 ASHV/GSHV as (Rückwärtsprimer) vorgenommen (2.6.2).

## 3.2 Verwendung transgener Pflanzen zur Produktion von Impfstoffen gegen das Hepatitis B Virus

### 3.2.1 Präparation und Aufreinigung der Vektor-DNA

#### 3.2.1.1 Der Vektor pPCV812



**Abb. 8: Karte des Vektors pPCV812, der für die Klonierung der Oberflächenprotein-Expressionskassetten SWHs, MWHs und LWHs verwendet wurde.**

Die jeweiligen Gene wurden anstelle des Glucuronidase-Gens (GUS; blau) in den Vektor kloniert (3.2.1.2 / 3.2.3.1). Neben der Ampicillinresistenz (Amp; rot) enthält der Vektor einen durch das Pflanzenhormon Auxin induzierbaren Promotor (mas; grün), der die Expression der Oberflächenproteine steigert.

#### 3.2.1.2 Restriktionsverdau des Vektors

Um DNA an spezifischen Stellen zu schneiden, werden Restriktionsenzyme der Klasse II verwendet. Restriktionsenzyme erkennen eine bestimmte DNA-Sequenz (meist Palindrome von 4-8 Nukleotiden), in der sie die Phosphoesterbindung an definierter Stelle (cleavage site) zwischen den Nukleotiden spalten. Restriktionsenzyme wirken nur unter definierten Puffer- und Temperaturbedingungen, was insbesondere bei Doppelverdau zu beachten ist. Zuweilen ist der Zusatz von BSA erforderlich.

Um die Vektor-DNA zu schneiden, wurden die Restriktionsenzyme *Sma*I und *Sac*I (New England Biolabs, Frankfurt) verwendet. Durch sie wurde das Glucuronidase-Gen GUS aus dem Vektor pPCV812 herausgeschnitten, an dessen Stelle später das Insert ligiert wurde. Für den Verdau wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen eingehalten.

10 µg Vektor-DNA wurden nach folgendem Schema verdaut:

20 µl	Vektor pPCV 812 (c=0,47 mg/ml)
1 µl	<i>Sma</i> I
1 µl	<i>Sac</i> I
0,5 µl	BSA
2,5 µl	10x Puffer 4 (New England Biolabs, Frankfurt)

Die Inkubation der Restriktionsenzyme erfolgte für 5 h bei RT (Temperaturoptimum von *Sma*I) und anschließend über Nacht bei 37 °C (Temperaturoptimum von *Sac*I). Anschließend wurden die Restriktionsenzyme für 20 min bei 65 °C inaktiviert. Der Restriktionsverdau wurde kontrolliert, indem 1 µl des Verdauansatzes in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt wurde.

### 3.2.1.3 Elektrophorese mit Low Melting Point (LMP)-Agarose

Bei der Agarosegel-Elektrophorese werden die DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Durch Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid oder dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green (Molecular Probes, Oregon, USA) ist es möglich, das gesuchte Fragment unter UV-Licht aus dem Agarosegel auszuscheiden und die DNA aus der Agarose zu isolieren. Aufgrund des niedrigen Schmelzpunktes der LMP-Agarose, ist nur diese für die Reinigung von DNA mittels  $\beta$ -Agarase-Verdau (3.2.1.4) geeignet.

Die beiden DNA-Fragmente des Restriktionsverdau, d.h. der linearisierte Vektor (Vektor-backbone) und das Glucuronidase-Gen (GUS), wurden in einem 1% LMP-Agarosegel aufgetrennt. Vor dem Gießen des Agarosegels wurde der geschmolzenen Agarose SYBR® Green zugesetzt, welches sich in den Nukleotid-Doppelstrang der DNA einlagert und die DNA unter UV-Licht sichtbar macht. Mit Hilfe eines DNA-Längenstandards konnte das Fragment des geschnittenen Vektors unter UV-Licht eruiert und gezielt mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden.

#### **3.2.1.4 Verdau der LMP-Agarose mit $\beta$ -Agarase**

Die Methode des  $\beta$ -Agarase-Verdaus mit anschließender Aufreinigung der DNA mittels Mikrokonzentratoren ist insbesondere für die Isolierung großer DNA-Fragmente geeignet. Die  $\beta$ -Agarase schneidet die Agarose-Polysaccharide in Oligosaccharide, so dass die sich im Polysaccharidnetz befindende DNA freigesetzt wird.

Die Agarosegelstückchen, mit der darin enthaltenen Vektor-DNA, wurden bei 70 °C für 10 min geschmolzen. Dem Volumen der geschmolzenen Agarose entsprechend wurde zu der Probe 10x  $\beta$ -Agarase-Puffer hinzugefügt, so dass eine 1x Konzentration erzielt wurde. Anschließend wurde die Probe bei 42 °C für 10 min abgekühlt, um das Wirkoptimum der  $\beta$ -Agarase zu erreichen. Jeweils zwei Einheiten  $\beta$ -Agarase pro 100  $\mu$ l geschmolzener Agarose wurden anschließend dazugegeben und die Probe 1½ h bei 42 °C leicht schüttelnd inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wurde der Ansatz für 15 min bei 15.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der die DNA enthielt, wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

#### **3.2.1.5 Aufreinigung der DNA mit Hilfe von Mikrokonzentratoren**

Mikrokonzentratoren sind kleine Filtereinheiten, die eine Polyethersulfon-Membran beinhalten. Diese fungiert als eine Art Molekülsieb, welches während der Zentrifugation Moleküle bestimmter Größe zurückhält und kleinere passieren läßt. Bei der Reinigung und Isolierung von DNA werden die Nukleotidstränge vom Filter zurückgehalten, während die Oligosaccharide und Salze durch die Membran zentrifugiert werden.

Für die Isolierung der Vektor-DNA wurden 100 kDA Mikrokonzentratoren (Vivascience, Binbrook, GB) mit einem Fassungsvermögen von 0,5 ml verwendet. Die Angabe von 100 kDA korrespondiert laut Produktinformation des Herstellers mit 125 Basenpaaren bei dsDNA.

Vor der Zentrifugation wurde die DNA mit 40% Isopropanol gefällt, wobei Überstand und Isopropanol zu gleichen Teilen gemischt wurden. Davon wurden 500  $\mu$ l in die Kammer des Mikrokonzentrators pipettiert und so lange bei 500 x g und 10 °C zentrifugiert, bis ein Restvolumen von ca. 100  $\mu$ l erreicht wurde. Anschließend wurde der restliche Überstand-Isopropanol-Mix durch den Filter zentrifugiert. Das in der Kammer verbliebene Retentat wurde dreimal mit 500  $\mu$ l TE-Puffer gewaschen, wobei wiederum bei 500 x g und 10 °C zentrifugiert wurde,

bis das Restvolumen ca. 100 µl betrug. Die Filtrate aus der Zentrifugation des Überstands (Filtrat 1) sowie der Waschschriffe mit TE-Puffer (Filtrat 2) wurden aufgefangen und aufbewahrt. Das Retentat, mit der gereinigten DNA, wurde aus dem Konzentrator in ein Eppendorfgefäß überführt und der Gehalt sowie der Reinheitsgrad der DNA photometrisch bestimmt (3.2.4.4.). Dafür wurde die DNA 1:100 in TE-Puffer verdünnt. Auch die Filtrate 1 und 2 wurden im Photometer gemessen. Falls eine Absorption bei 260 nm messbar war, war das ein Anzeichen auf einen Riss in der Filtermembran und die Isolierung der DNA musste wiederholt werden.

### **3.2.1.6 Dephosphorylierung des Vektors mit Antarktischer Phosphatase (AP)**

Die Phosphatase katalysiert das Abspalten der Phosphatgruppen am 5'-Ende der DNA, was eine Selbstligation des geschnittenen Vektors verhindert. Im Gegensatz zur Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP; calf intestine alkaline phosphatase) lässt sich die Antarktische Phosphatase leicht durch Hitze inaktivieren. Eine Inaktivierung der Phosphatase ist unerlässlich, damit bei der sich anschließenden Ligation nicht auch das Insert dephosphoryliert wird. Fehlende 5'-Phosphatreste des Inserts würden das Verknüpfen mit der Vektor-DNA mittels Phosphoesterbindung und somit die Ligation unmöglich machen.

Die geschnittene Vektor-DNA wurde für 1 h bei 37 °C mit 1 µl AP (New England Biolabs, Frankfurt), unter Zusatz von AP-Puffer, inkubiert. Danach wurde die Antarktische Phosphatase für 20 min bei 65 °C inaktiviert.

## **3.2.2 Präparation und Aufreinigung der Insert-DNA**

### **3.2.2.1 PCR zur Amplifikation der DNA-Fragmente**

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction; PCR) ermöglicht die Vervielfältigung von DNA und besteht aus drei Schritten:

Bei der Denaturierung wird die Temperatur im PCR-Ansatz so stark erhöht (95 °C), dass der DNA-Doppelstrang des Templates in zwei Einzelstränge zerfällt.

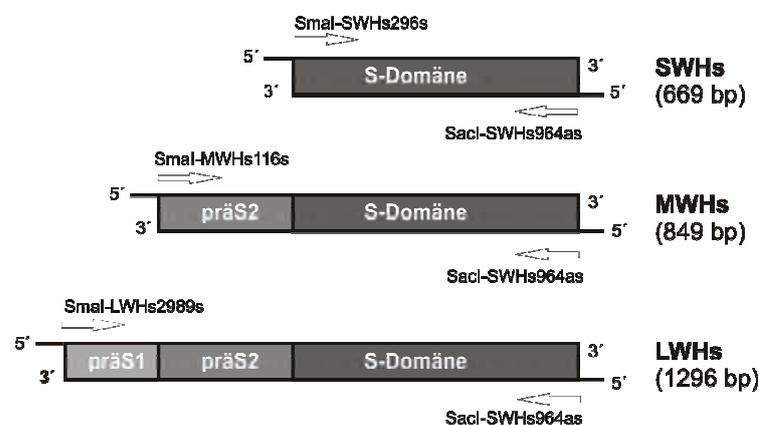
Bei dem sich anschließenden Annealing hybridisieren sense- und antisense-Primer an die DNA-Zielsequenz, die komplementär zu der Nukleotidsequenz der Primer ist. Die Temperatur für das Annealing sollte etwa 5 °C unterhalb der

Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer liegen. Die Schmelztemperatur gibt an, bei welcher Temperatur 50% der Primer noch an das Template gebunden sind. Sie ist abhängig von der Anzahl der Nukleotide und dem G/C-Gehalt der Primer. Für Primer mit weniger als 20 nt lässt sich die Schmelztemperatur mit der folgenden Formel berechnen:

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G/C}) + 2 \times (\text{Anzahl A/T})$$

Für längere Primer lässt sich die Schmelztemperatur mit Hilfe von Computerprogrammen ermitteln. Für die hier verwendeten Primer wurde die Schmelztemperatur von der Fa. MWG Biotech (Ebersberg) berechnet, bei der die Oligosynthese der Primer in Auftrag gegeben wurde.

Der letzte Schritt der PCR ist die Elongation, d.h. die Neusynthese des Doppelstrangs, wobei die jeweiligen Einzelstränge als Matrize dienen. Ausgehend von den Primern wird die DNA durch die Taq-Polymerase verlängert, die die Bindung einzelner Desoxyribonukleotide (dNTPs) an den Komplementärstrang katalysiert. Die Temperatur der Elongation richtet sich nach dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase und beträgt 72 °C. Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments.



**Abb. 9: Darstellung der SWHs-, MWHs- und LWHs-Expressionskassetten**

Für die Amplifikation der jeweiligen Gene wurden Primer verwendet, die die Nukleotidsequenzen der Restriktionsenzym-Schnittstellen *Sma*I und *Sac*I enthielten, die amino- und carboxyterminal der Expressionskassetten lagen

Für die Amplifikation der Gene für die jeweiligen WHV-Oberflächenproteine diente das Plasmid WHV2-Dimer mit zwei kompletten WHV-Genomen (Referenzgenom: Kodama et al., 1985) als Template. Als Polymerase wurde der Hi-Fidelity Extensor PCR Enzyme Mix (ABgene, Hamburg) verwendet. Die Hi-Fidelity-

Polymerase besitzt eine 3'-5' Exonukleaseaktivität, die Fehler bei der Synthese des Komplementärstranges korrigiert. So wird die Fehlerrate auf einen Fehler pro  $10^6$  Basenpaare gesenkt. Die Primer wurden so konzipiert, dass sie die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *SmaI* und *SacI* enthielten, die sich amino- bzw. carboxyterminal der Expressionskassetten befanden (Abb. 9).

Der Mastermix je Probe setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

A	Hi-Fidelity Puffer 1	5 $\mu$ l
	Hi-Fidelity Polymerase	0,25 $\mu$ l
	dH <sub>2</sub> O	19,75 $\mu$ l
B	10 mM dNTP's	2 $\mu$ l
	sense Primer (10 pmol)	1 $\mu$ l
	antisense Primer (10 pmol)	1 $\mu$ l
	Plasmid WHV2-Dimer (c= 1,54 $\mu$ g/ml)	10 $\mu$ l
	dH <sub>2</sub> O	11 $\mu$ l

Die Ansätze A und B mit einem Volumen von je 25  $\mu$ l wurden separat auf Eis angesetzt und zum Schluss vereinigt. Die PCR wurde im Mastercycler gradient® (Eppendorf) mit folgendem Programm durchgeführt:

initiale Denaturierung	94 °C	2 min	1 x
Denaturierung	94 °C	30 sec	35 x
Annealing	50 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	1.30 min	

Um zu kontrollieren, ob das entsprechende DNA-Fragment spezifisch amplifiziert wurde, wurden 5  $\mu$ l des PCR-Ansatzes in einem 2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA mittels Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht.

### 3.2.2.2 Restriktionsverdau der PCR-Amplifikate

Da die Taq-Polymerase keine glatten Enden produziert, sondern an die neu synthetisierten Nukleotidstränge zusätzliche Basen in Form mehrerer Adenosine anhängt, wurden die Enden mit Hilfe der Restriktionsenzyme *SmaI* und *SacI* abgespalten (3.2.1.2). Die verwendeten Enzymeinheiten (units) richteten sich nach der Menge der zu verdauenden Insert-DNA.

### 3.2.2.3 Aufreinigung der Insert-DNA

Die Insert-DNA wurde nach demselben Schema wie der Vektor aufgereinigt. Die DNA wurde mittels LMP-Agarosegel-Elektrophorese isoliert und aus dem

Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten (3.2.1.3). Die Gelstückchen wurden geschmolzen, die Agarose mit dem Enzym  $\beta$ -Agarase verdaut (3.2.1.4) und die DNA unter Verwendung von Mikrokonzentratoren aufgereinigt (3.2.1.5).

### 3.2.3 Klonierung der WHV-Oberflächenprotein-Plasmide

#### 3.2.3.1 Ligation der Insert-DNA (Expressionskassetten für SWHs, MWHs und LWHs) in den Vektor pPCV812

Das Enzym Ligase katalysiert das Knüpfen einer Phosphoesterbindung zwischen Insert-DNA und Vektor-DNA. In die Ligrationsreaktion wurden 50 ng der gereinigten, dephosphorylierten Vektor-DNA (pPCV812) (3.2.1) sowie die 4fache molare Menge an gereinigter Insert-DNA (SWHs-, MWHs-, LWHs-Expressionskassetten) (3.2.2) eingesetzt. Als Ligase wurde die Quick T4 DNA Ligase aus dem Quick Ligation™ Kit (New England Biolabs, Frankfurt) verwendet, die eine sehr schnelle Ligation ermöglicht. Der Ligrationsansatz, mit einem Endvolumen von 20  $\mu$ l, bestand aus folgenden Anteilen:

x $\mu$ l	Vektor-DNA
y $\mu$ l	Insert-DNA
1 $\mu$ l	Quick T4 DNA Ligase
10 $\mu$ l	Quick T4 DNA Ligase 2x Puffer
ad 20 $\mu$ l	dH <sub>2</sub> O

Ligiert wurde für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Ansatz direkt in kompetente *E. coli* transformiert.

#### 3.2.3.2 Transformation der WHV-Oberflächenprotein-Plasmide in kompetente *E. coli*

Kompetente *E. coli* sind Bakterien mit einer unvollständigen Zellwand, wodurch die Aufnahme von Plasmid-DNA um ein Vielfaches erhöht wird. Während der Transformation wird die Plasmid-DNA von den Bakterien aufgenommen und anschließend mit jeder Zellteilung vermehrt.

5-10  $\mu$ l des Ligrationsansatzes wurden in 100  $\mu$ l kompetente *E. coli* (One Shot® Top 10, Invitrogen) pipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein kurzer Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C im Heizblock. Im Anschluss wurden die Bakterien in 500  $\mu$ l vorgewärmtem LB-Medium für 1 h bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. Jeweils 100  $\mu$ l und 200  $\mu$ l des Transformationsansatzes wurden auf

Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **3.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus kompetenten *E. coli***

#### **3.2.4.1 Selektion und Vermehrung der Plasmid-haltigen *E. coli* auf Agarplatten und in Flüssigkulturen**

Das im Vektor pPCV812 enthaltene Ampicillinresistenz-Gen gewährleistet eine Selektion Plasmid-positiver *E. coli*, die im Gegensatz zu Plasmid-negativen Bakterien in der Lage sind, sich in ampicillinhaltigen Nährmedien zu vermehren. Das Ampicillin wurde dem LB-Medium bzw. dem LB-Agar in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

Nach der Inkubation des Transformationsansatzes auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten, wurden mehrere Bakterienkolonien einzeln mit einer Pipettenspitze gepickt und diese in Reagenzgläser mit je 2 ml ampicillinhaltigen LB-Medium abgeworfen. Die Bakterien wurden in dem LB-Medium unter Schütteln bei etwa 250 rpm und 37 °C über Nacht vermehrt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mittels Minipräparation aus 1 ml Bakterienkultur isoliert (3.2.4.2). Plasmid-haltige Klone wurden in Glycerin im Verhältnis 1:1 bei -20 °C eingefroren. Für Maxipräparationen (3.2.4.3) wurden jeweils 500 µl aus einem Bakterien-Glycerinstock in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml Ampicillin-haltigen LB-Medium überführt und darin über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei etwa 250 rpm vermehrt.

Um eine Kontamination der *E. coli*-Kulturen mit Pilzen und Bakterien zu vermeiden, wurde unter sterilen Bedingungen und mit sterilem Material gearbeitet.

#### **3.2.4.2 Minipräparation mittels Alkalischer Lyse**

Die Minipräparation eignet sich zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA aus kompetenten Bakterien.

Aus 1 ml Übernachtskultur wurden die Bakterien bei 6.500 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 300 µl Puffer 1 resuspendiert. Das im Puffer 1 enthaltene EDTA bindet zweiwertige Kationen, insbesondere  $Mg^{2+}$ , wodurch Nukleinsäurespaltende Enzyme inaktiviert werden. Zur Zelllyse und Proteindenaturierung wurden 300 µl Puffer 2 hinzugefügt und vorsichtig mit der Bakteriensuspension gemischt. Die alkalischen Eigenschaften von Puffer 2 wurden durch die Zugabe von 300 µl Puffer 3 abgepuffert. Die Zelltrümmer wurden bei 12.000 rpm für 10

min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Während genomische DNA v.a. an der Zellwand gebunden bleibt und frei werdende RNA durch die im Puffer 1 enthaltene RNase zerstört wird, sammelt sich die Plasmid-DNA im Überstand. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde das 0,7fache Volumen an Isopropanol zu der Lösung gegeben und die DNA anschließend bei 14.000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde danach noch einmal mit 500 µl 70%-igem unvergälltem Ethanol gewaschen und die DNA ein weiteres Mal bei 14.000 rpm für 2 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde für ca. 15 min getrocknet und zum Schluss in 20 µl Reinst-H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Konzentration und der Reinheitsgehalt der Plasmid-DNA wurden photometrisch bestimmt (3.2.4.4). Um zu überprüfen, ob die isolierte Plasmid-DNA die einklonierte Insert-DNA enthielt, wurde ein Kontrollrestriktionsverdau mit *Sma*I und *Sac*I durchgeführt (3.2.1.2).

### **3.2.4.3 Maxipräparation mittels Alkalischer Lyse**

Die Maxipräparation dient der Gewinnung großer Mengen Plasmid-DNA. Für die Präparation wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers verwendet.

Die Bakterien aus einer 100 ml Übernachtskultur wurden bei 4500 rpm für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml Puffer 1 resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurden 10 ml Puffer 2 zugegeben, vorsichtig gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 10 ml Puffer 3 und eine 20minütige Inkubation auf Eis wurde die Alkalische Lyse gestoppt. In der Zwischenzeit wurde die Qiagen-Säule mit 10 ml Puffer QBT equilibriert und ein Papierfilter in einem Trichter auf der Säule befestigt. Durch den Papierfilter wurden die Bakterienzellreste abgetrennt, während die DNA in der Säule gebunden wurde. Es folgten zwei Waschschrte mit je 30 ml Puffer QC. Anschließend wurde die in der Säule gebundene DNA in 15 ml Puffer QF eluiert, wobei die DNA in einem unter der Säule platzierten Reaktionsgefäß aufgefangen wurde. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde das Eluat mit 10,5 ml Isopropanol gemischt und die DNA für 30 min bei 12.000 und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 70%-igem unvergällten Ethanol resuspendiert, wobei das Isopropanol durch das schneller verdampfende Ethanol ersetzt wurde. Zur Gewinnung der hochreinen Plasmid-DNA wurde ein weiteres Mal für 15 min bei 12.000 rpm zentrifugiert,

das Pellet für ca. 15 min getrocknet und in 50 µl Reinst-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Konzentration und der Reinheitsgehalt der Plasmid-DNA wurden photometrisch bestimmt (3.2.4.4).

Die in das Plasmid pPCV812 einklonierten Gene für die WHV-Oberflächenproteine SWHs, MWHs und LWHs wurden von der Fa. GATC, Konstanz sequenziert. Die verwendeten Primer sind in 2.6.4. aufgeführt.

#### **3.2.4.4 Photometrische Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades der DNA**

Aus der optischen Dichte bei 260 nm lässt sich mit der Formel:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD 260} \times \text{Multiplikationsfaktor (F)} \times \text{Verdünnungsfaktor (V)}$$

die DNA-Konzentration ermitteln. Der Multiplikationsfaktor (F) beträgt für dsDNA 50, der Verdünnungsfaktor ergibt sich aus der in der Messung eingesetzten Verdünnung (100 bei einer 1:100-Verdünnung). Je nach DNA-Konzentration wurde die DNA 1:100 in TE-Puffer oder Bidest verdünnt.

Der Quotient aus den Wellenlängen 260 und 280 nm gibt den Reinheitsgrad der DNA an. Er sollte bei 1,8-2 liegen. Niedrigere Werte deuten auf eine Proteinkontamination der präparierten Plasmid-DNA hin.

#### **3.2.5 Isolierung von mRNA aus Pflanzengewebe**

Die Isolierung der mRNA erfolgte mit dem Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Dynal Biotech, Hamburg). Dieses Kit ermöglicht die Isolierung hoch gereinigter poly(A)<sup>+</sup> RNA aus geringen Probenmengen. Das Prinzip der Isolierung beruht darauf, dass die Poly-A's 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.

Bevor mit der Isolierung der mRNA begonnen wurde, wurden sämtliche Arbeitsutensilien mit RNase Zap® (Invitrogen, Karlsruhe) dekontaminiert. Die Pistille wurden zur Dekontamination für jeweils 5 min in 0,1 N NaOH sowie in 0,25 M HCl gelegt. Bis auf Tris-HCl, welches auf Eis gestellt wurde, wurden alle Lösungen des Kits auf Raumtemperatur gebracht. Das ca. 5 mm<sup>3</sup> große, gefrorene Stück Pflanzengewebe wurde mit einem Pistill in einem Eppendorfgefäß zerstoßen und mit 100 µl Lysis/Bindingpuffer versetzt. Anschließend wurden die Pflanzenzelltrümmer bei 10.000 rpm für 5 min abzentrifugiert und der Überstand

für die Isolierung der mRNA verwendet. Parallel erfolgte die Vorbereitung der Oligos aus dem Kit. Dazu wurden die Oligos kurz gevortext. Für jeden Ansatz benötigte man 20 µl Oligos. Für alle Ansätze wurde ein Mastermix angefertigt. Das Reaktionsgefäß mit dem Mastermix wurde für etwa 20 sek auf den Magnetständer gestellt, bis sich die Oligos am Rand abgesetzt hatten. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Oligos mit dem gleichen Volumen des Mastermixes, d.h. pro Ansatz 20 µl, Lysis-/Bindepuffer resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurden 20 µl der gewaschenen Oligos zum Überstand hinzugefügt und der Reaktionsansatz für 5 min bei 60% und Raumtemperatur gevortext. Während der Inkubation bindet die mRNA an die Oligo-dT's der Dynabeads. Danach wurden die Reaktionsgefäße mit den Proben für 20 sek auf den Magnetständer gestellt, der Überstand abgezogen und verworfen. Dann folgten drei Waschschriffe. Zuerst wurden die Dynabeads mit 100 µl Waschpuffer A und dann zweimal mit 100 µl Waschpuffer B resuspendiert. Zwischen den Waschschriffen wurden die Proben, wie bereits beschrieben, auf den Magnetständer gestellt, bis sich die Oligos an der Wand abgesetzt hatten, der Überstand verworfen und der neue Waschpuffer hinzugefügt. Nach dem letzten Waschen wurde der Überstand nicht abgezogen, sondern die Oligos kurz in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Erst dann wurde das Eppendorfgefäß wieder auf den Magnetständer gestellt, der Überstand abgezogen und das so gewonnene Pellet in 20 µl Tris-HCl (0,25 M) resuspendiert. Anschließend wurden die Proben für 2 min bei 90 °C im Heizblock erhitzt, so dass sich die mRNA von den oligo-dT's trennen konnte. Danach wurde der Überstand, der die mRNA enthält, schnell im Magnetständer abgezogen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und sofort auf Eis gestellt. Zu dem Überstand wurden 5 µl MgCl<sub>2</sub> und 2 µl DNase (RNase frei) gegeben und die Ansätze für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNase für 15 min bei 75 °C inaktiviert. Zum Schluß wurden die Proben kurz abzentrifugiert und bei -70 °C eingefroren oder direkt in die RT-PCR eingesetzt.

### **3.2.6 Nachweis spezifischer mRNA mittels RT-PCR (Reverse Transkriptionse-PCR)**

Die isolierte mRNA wurde mit Hilfe des LightCycler® RNA Amplification Kit Hybridization Probes Kit (Roche, Mannheim) revers transkribiert und amplifi-

ziert. Für die spezifischen Nachweis der MWHs mRNA wurden die bereits erwähnten all ortho-Primer (2.6.1 / 3.1.1.2) verwendet, mit denen ein 336 bp langes DNA-Fragment aus der S-Region aller Orthohepadnaviren amplifiziert wird. Als Standard für die RT-PCR wurde ein in vitro transkribiertes HBV-RNA Fragment der präS2-S-Region (MHBs) verwendet, welches freundlicherweise von Daniel Bock, Institut für Medizinische Virologie, Gießen zur Verfügung gestellt wurde. Der Mastermix je Probe enthielt folgende Bestandteile:

dH <sub>2</sub> O	4,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (6,75mM)	3 µl
HBV S3 sense Primer (10 pmol)	1 µl
HBV S3 antisense Primer (10 pmol)	1 µl
SA FL Hybprobe (4 pmol)	0,5 µl
SA LC Hybprobe (4 pmol)	0,5 µl
Taq	0,5 µl
Reaction Mix	4 µl

Zu je 15 µl Mastermix werden 5 µl mRNA-Extrakt gegeben.

Für die PCR (LightCycler) wurde folgendes Programm verwendet:

	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						
Acquisition Mode	None		None		Single	None	None		Cont	

### 3.2.7 Isolierung subviraler Partikel (HBsAg und WHsAg) aus transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzell-Suspensionskulturen

#### 3.2.7.1 Extraktion der subviralen Partikel (HBsAg und WHsAg)

Die Extraktion der subviralen Partikel aus dem Pflanzengewebe wurde in Anlehnung an das Protokoll von Jefferson et al., 1987 modifiziert nach J. Imani, 2002 durchgeführt. Die Aufbereitung erfolgte auf Eis bzw. bei 4 °C.

Die Zellwände des Pflanzengewebes wurden mechanisch in einem Mörser, zusammen mit etwas autoklaviertem Sand, und mittels Ultraschallwellen (5 x 1

min) aufgebrochen. Die Kontrolle erfolgte mikroskopisch durch Anfärben der Pflanzenteile mit Trypanblau. Die im Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebundenen Partikel wurden mit Digitonin und Triton X-100 extrahiert. Frei werdende Proteinase wurden durch den Zusatz von Proteinaseinhibitor (complete®; Roche, Mannheim) gehemmt. Durch zwei Zentrifugationen wurden der Sand (4.000 rpm für 10 min) und anschließend die Pflanzentrümmer (12.000 rpm für 30 min) abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur Aufreinigung des HBsAg bzw. WHsAg in einen diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten (3.2.7.2) eingesetzt.

### 3.2.7.2 Isolierung und Aufreinigung von subviralen Partikeln (HBsAg und WHsAg) mittels Dichtegradientenzentrifugation

Der Überstand mit den darin enthaltenen extrahierten subviralen Partikeln wurde auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten (Abb. 10), bestehend aus Dichten von 5-60% Saccharose in TNE (w/w), aufgeschichtet und durch diesen zentrifugiert. Dafür wurden silikonisierte Zentrifugenröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 39 ml benutzt. Die Zentrifugation erfolgte in einem Schwingbecherrotor (SW 28) für 16 h bei 25.000 rpm und 10 °C in der Ultrazentrifuge.

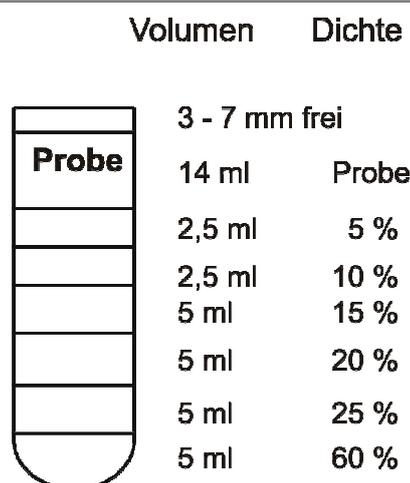


Abb. 10: Zusammensetzung des Saccharose-Dichtegradienten zur Aufreinigung von subviralen Partikeln (HBsAg und WHsAg) aus transgenen Pflanzen

Nach beendetem Zentrifugenlauf wurde der Gradient in 39 Fraktionen a 1 ml in silikonisierte Eppendorfgefäße ausgetropft (3.1.4.3). Von den ersten 20 Fraktio-

nen wurden refraktrometrisch die Saccharosedichte bestimmt sowie photometrisch die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt, die Rückschlüsse auf die Proteinmenge in den einzelnen Fraktionen zulässt.

### **3.2.7.3 Nachweis von HBsAg- sowie WHsAg-Untereinheiten mittels SDS-Page und Western Blot**

Nach der Fraktionierung der Gradienten wurden ausgewählte Fraktionen auf ein SDS-Gel aufgetragen, die darin enthaltenen Proteine elektrophoretisch aufgetrennt (3.1.5) und auf eine PVDF-Membran transferiert (3.1.7). Die entsprechenden Detektions- und Sekundärantikörper wurden für jeweils 1 h bei 37 °C mit der Blotmembran inkubiert. Die Visualisierung der gebundenen Antigene erfolgte mittels Chemilumineszenz unter Verwendung des ECL-Substrats Western Lightning<sup>®</sup> Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer, Rodgau).

Das HBsAg wurde mit dem Antikörper HB1 (K. Sasnauskas, Vilnius) in einer Konzentration von 1:5000 detektiert. Als Sekundärantikörper wurde der Peroxidase-konjugierte Antikörper anti-Maus-POD (1:50.000, DIANOVA, Hamburg) verwendet.

Die Detektion des WHsAg erfolgte mit dem Antiserum anti-WHs 2722 (1:300 verdünnt, Tolle et al., 1998). Als Sekundärantikörper wurde der Peroxidase-konjugierte Antikörper anti-Kaninchen-POD (1:10.000, DIANOVA, Hamburg) eingesetzt.

### **3.2.7.4 Nachweis von HBsAg- sowie WHsAg-Partikeln mittels nativer Agarosegel-Elektrophorese und Western Blot**

Während bei der SDS-Page die Proteine denaturiert werden, bleibt bei der Agarosegel-Elektrophorese durch den Verzicht auf SDS die native Tertiärstruktur der Proteine und deren Ladung erhalten. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 1% Agarosegel (SeaKem<sup>®</sup> LE Agarose) bei 100 V. Anschließend wurden die Partikel mittels Kapillarblot über Nacht auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde zuvor für ca. 5 min in Methanol geschwenkt, anschließend mit Bidest gewaschen und danach für ca. 10 min in 10x SSC-Puffer äquilibriert. Als Laufpuffer diente ebenfalls 10x SSC-Puffer. Nach dem Proteintransfer wurden die restlichen freien Bindungsstellen mit einer Blocklösung (1x Rotiblock, 10% BSA in PBS) abgesättigt. Danach erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden HBsAg- und WHsAg-spezifischen Detektions- und Sekun-

däntikörpern für jeweils 1 h bei 37 °C. Dafür wurden die Antikörper in 10 ml 0,1% FKS in PBS gelöst. Nach jeder Antikörperinkubation wurde die Membran in einem Waschpuffer (1% Tween 20, 0,1% FKS in PBS) für jeweils 5 min bei RT geschwenkt. Die Visualisierung der gebundenen Antigene erfolgte mittels Chemilumineszenz (3.1.7.1). Dafür wurde das AP-Substrat: Immobilon Western® Chemilum AP Substrat (Millipore, Molsheim) verwendet.

Um das HBsAg nachzuweisen, wurde als Detektionsantikörper C20/2 (1:2000) und als Sekundärantikörper anti-Maus-AP (5 ml aus Western Breeze® Chemiluminescent Western Blot Immunodetection Kit, Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt.

Der Nachweis des WHsAg erfolgte mit zwei verschiedenen Antikörperkombinationen. Einerseits wurden das polyklonale Antiserum anti-WHs 2722 (1:300, Tolle et al., 1998) und anti-Kaninchen-AP (DIANOVA, Hamburg) als Sekundärantikörper (1:50.000) zur Detektion verwendet. Andererseits wurde das WHsAg mit dem monoklonalen Antikörper anti-WHs 31 (1:100.000, P. Cote, USA) und anti-Maus-AP (5 ml aus Western Breeze® Chemiluminescent Western Blot Immunodetection Kit, Invitrogen, Karlsruhe) nachgewiesen.

### **3.2.7.5 Quantitativer Nachweis von HBsAg mittels densitometrischer Auswertung des Chemilumineszenzsignals im Western Blot**

Für die densitometrische Quantifizierung wurde die PC-Software „Image Quant“ verwendet. Die Software errechnet für die Intensität jedes einzelnen Chemilumineszenzsignals einen entsprechenden Zahlenwert. Ausgehend von der aufgetragenen Standardreihe wird eine Eichkurve erstellt, anhand derer sich die HBsAg-Konzentration in den einzelnen Fraktionen ermitteln lässt.

### **3.2.7.6 Nachweis von HBsAg mittels ELISA**

Die Detektion des HBsAg erfolgte mit einem sogenannten in house „Sandwich-ELISA“ (direkter ELISA). Zuerst wird das nachzuweisende Antigen durch einen immobilisierten Primärantikörper gebunden. Anschließend wird dieser Antigen-Antikörper-Komplex durch einen Detektionsantikörper, der direkt mit einem Enzym konjugiert ist, nachgewiesen. Das Enzym katalysiert die Umsetzung eines Substrates, was durch einen Farbumschlag in der Probe sichtbar wird.

Zuerst wurden die Vertiefungen der Mikrotiter-Platte mit je 100 µl des gegen HBsAg gerichteten Antikörpers C20/02 (W. H. Gerlich, Gießen) beschichtet.

Dazu wurde die Antikörperstammlösung (1mg/ml) in 0,0175 M Beschichtungspuffer (NaPP, pH 7,4) 1:1000 verdünnt. Die Inkubation erfolgte entweder für 2 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C. Danach wurde die Platte zweimal mit 0,25% Tween 20 in PBS und zweimal mit PBS im ELISA-Washer (Columbus, Tecon) gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Proteinbindungsstellen mit je 200 µl 10% FKS in TNE geblockt und die Platte für 2 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachdem das FKS durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt wurde, wurden die Proben aufgetragen. Es wurden je 100 µl der Fraktionen 3-14 (1:5 in 0,1% Casein in PBS verdünnt) eingesetzt. Zur Quantifizierung des HBsAg in den zu bestimmenden Proben wurde eine Standardreihe mit definierten Mengen an gereinigtem HBsAg aus Plasma erstellt. Die Standardreihe bestand aus folgenden Konzentrationen des HBsAg-Referenzserums ID1: 0,4 -0,2- 0,1- 0,05- 0,025- 0,01- 0,005- 0,0025-ng pro 100 µl. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37 °C auf dem Plattenrüttler. Anschließend wurden die Proben im ELISA-Wascher entfernt (2 x 0,25% Tween 20/PBS und 2 x PBS), je 100 µl des zweiten Antikörpers [Anti-HBs-Peroxidase-Konjugat (Dade-Behring, Marburg); 1:100 in 0,1% Casein/PBS verdünnt] dazugegeben und dieser für 1 h bei 37 °C auf dem Plattenrüttler inkubiert. Nach Entfernen des Detektionsantikörpers (2 x 0,25% Tween 20/PBS und 2 x PBS) erfolgte die Inkubation mit dem OPD-Substrat für 15 min auf dem Plattenschwenker. Dafür wurden vier Tabletten des Substrats (o-Phenylenediamine, Dako) in einem lichtgeschützten Reaktionsgefäß in 12 ml dH<sub>2</sub>O und 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%, Sigma) gelöst und je 100 µl des Entwicklersystems in die Vertiefungen der Mikrotiter-Platte pipettiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 100 µl 0,5 M Schwefelsäure (1N) gestoppt und die Extinktion des umgesetzten OPD-Substrates im Photometer (LP 400, Diagnostic, Pasteur) bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Die Referenzwellenlänge betrug 620 nm.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Experimentelle Infektion von adulten Amerikanischen Waldmurmeltieren mit Woodchuck-, Ground Squirrel- und Arctic Squirrel Hepatitis Virus (WHV, GSHV, ASHV)

Das amerikanische Waldmurmeltier (Woodchuck) ist der natürliche Wirt des Woodchuck Hepatitis Virus (WHV). Es konnte gezeigt werden, dass sich neonatale Woodchucks außerdem mit dem Ground Squirrel Hepatitis Virus (GSHV) infizieren ließen (Seeger et al., 1991), wohingegen Ground Squirrels nicht empfänglich für WHV waren (Seeger et al., 1987). Für adulte Woodchucks ist die Infizierbarkeit durch GSHV noch nicht bestätigt. Ebenso ist nicht bekannt, ob auch das Arctic Squirrel Hepatitis Virus (ASHV) im Woodchuck repliziert. Aufgrund der nahen Verwandtschaft von Ground Squirrel und Arctic Squirrel lag die Vermutung nahe, dass Woodchucks gleichfalls für ASHV empfänglich sind.

Im Rahmen dieser Studie wurden jeweils drei adulte (2-6 Jahre) Woodchucks mit GSHV und ASHV infiziert und über einen Zeitraum von 30 Wochen beobachtet. Drei mit WHV infizierte Tiere dienten als Kontrollgruppe. Dieser Studie ging ein Kontrollversuch mit drei WHV infizierten Woodchucks voraus, der allerdings nur über 17 Wochen lief.

Die Infektionsversuche als auch die Blutentnahmen wurden von Dr. Stephan Menne am College of Veterinary Medicine der Cornell University, Ithaka, NY (USA) durchgeführt, dem eine der größten Woodchuck-Kolonien der USA für Forschungszwecke zur Verfügung steht. Die erste Blutabnahme erfolgte zwei Wochen vor Inokulation. In Woche 0 wurden die Waldmurmeltiere mit dem entsprechenden Virus i.v. inokuliert. Die Infektionsdosis war bei allen Tieren identisch und betrug  $10^7$  GE des jeweiligen Virus. Bis zur 15. bzw. 28. Woche post infectionem wurde den Tieren wöchentlich Blut entnommen und auf verschiedene serologische Marker der Infektion untersucht (Tab. 9-11 Anhang). Außerdem wurde jede Woche das Körpergewicht protokolliert sowie alle vier Wochen Leberbiopsien entnommen. Nach Abschluß der Untersuchungsphase wurden die Tiere euthanasiert.

Die Inokula, mit denen die Woodchucks infiziert wurden, wurden am College of Veterinary Medicine der Cornell University, Ithaka, NY (USA) zur Verfügung ge-

stellt und der Gehalt an Hepadnavirus-DNA von Dr. Stephan Menne mittels real-time PCR quantifiziert.

Die verschiedenen Infektionsparameter wurden sowohl am College of Veterinary Medicine der Cornell University als auch am Institut für Medizinische Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen untersucht. An der Cornell University erfolgten die Messung der Leberenzyme [Sorbit-Dehydrogenase (SDH), Asparat-Amino-Transferase (AST, alte Bezeichnung: GOT), Alanin-Amino-Transferase (ALT, alte Bezeichnung: GPT), Alkalische Phosphatase (AP) und  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase ( $\gamma$ -GT)] und die Bestimmung der gegen das Oberflächen- sowie das Core-Protein gerichteten Antikörper (anti-WHs, anti-GSHs, anti-ASHs bzw. anti-WHc, anti-GSHc, anti-ASHc). Am Institut für Medizinische Virologie wurden von mir Verlauf und Konzentration der Virus-DNA mit Hilfe der real-time PCR (LightCycler, Fa. Roche) sowie des Oberflächenantigens (sAg) mit der Laurell-Elektrophorese bestimmt. Neben dem freien Oberflächenantigen wurde ferner das in Immunkomplexen gebundene Oberflächenantigen nachgewiesen. Ein weiterer Gesichtspunkt, der im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte, war die Isolierung der virusspezifischen subviralen Partikel aus sAg-positiven Seren und die Charakterisierung der Oberflächenproteine von GSHV und ASHV.

### **4.1.1 Quantitative Bestimmung der Virus-DNA mittels real-time PCR**

Die Spezifität und Sensivität der all-ortho-Primer ist für das WHV belegt. Der Referenzbereich für den Nachweis der Virusgenome liegt dabei zwischen  $10^2$  und  $10^{10}$  Genomequivalenten pro ml (GE/ml) (Schaefer et al., 2002).

Da die Auswahl der all-ortho-Primer nach einem Abgleich der Genome von 177 Orthohepadnaviren erfolgte, darunter auch Ground Squirrel- und Arctic Squirrel Hepatitis Virus, ist davon auszugehen, dass damit ebenso eine sensitive Detektion und Quantifizierung von GSHV und ASHV möglich ist (Schaefer et al., 2002) (3.1.1.2). Das von Schäfer et al. beschriebene Verfahren verwendete SYBR® Green zur Detektion, was für eine Quantifizierung suboptimal ist. Daher wurden für die Quantifizierung der Virus-DNA in den Seren der hier untersuchten Infektionsverläufe spezifische Hybprobes (Hybridisierungssonden) verwendet. Die Gegenüberstellung der Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer und Hybprobes mit den entsprechenden Zielsequenzen der jeweiligen Virus-

spezies zeigt gewisse Unterschiede, die sich jedoch als irrelevant erwiesen, da die entsprechenden Positionen berücksichtigt wurden (Abb. 11).

---

**A**

HBVs3 s	5' TGCCTCATCTTCTTRTTGGTTCT 3'
HBV (Genotyp C)	.....G.....
WHV	.....G.....
ASHV	.....G.....
GSHV	.T.....CT.....G.....

HBVs3 as	5' TATATGGATGATBTGGTWTTGGGG 3'
HBV (Genotyp C)	.....G.....A.....
WHV	.....T.....T.....
ASHV	.....CT.....T.....
GSHV	.....T.....T.....

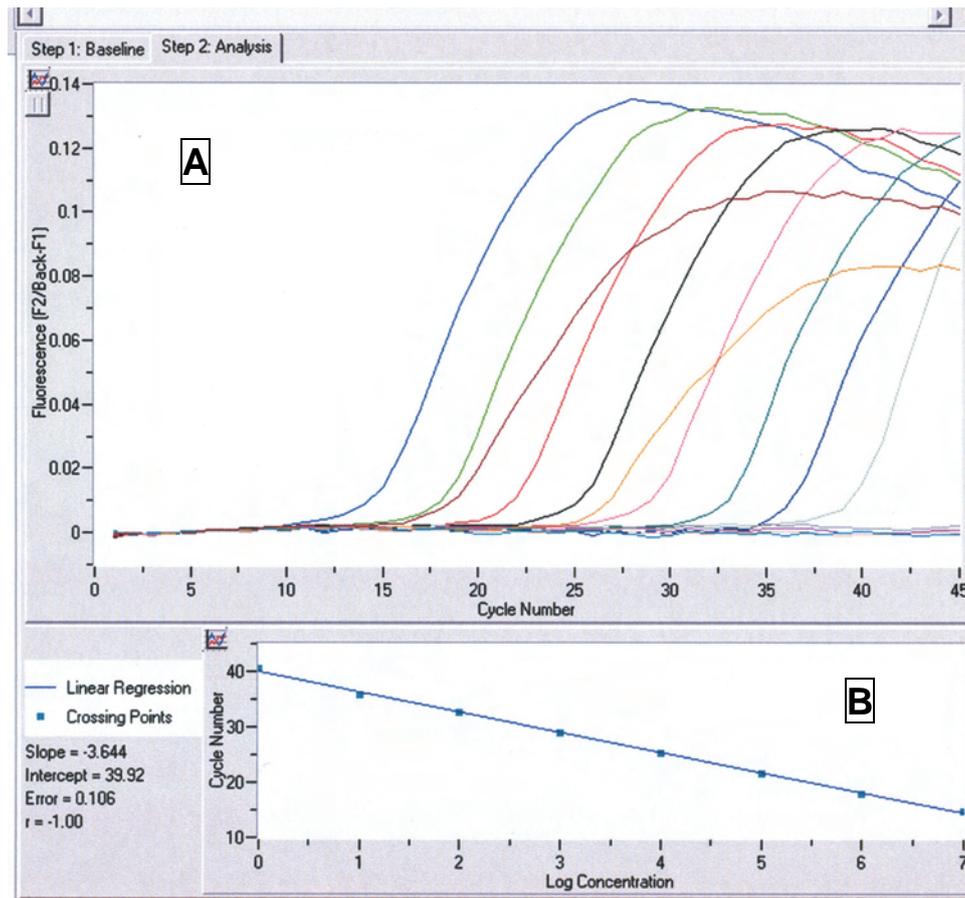
---

**B**

HBV SA FL	5' CCTATGGGAGTGGGCCTYAG..... 3'
HBV SA LC	5' .....CGTTTCTCYTGGCTCARTTTACT 3'
HBV (Genotyp C)	CCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACT
WHV	.....T..CT...C....T.....A.....
ASHV	.....T..TC...T....T.....G.....
GSHV	.....T..CC...T....T.....G.....

**Abb. 11: Vergleich der Nukleotidsequenzen der all-ortho-Primer (A) und -Hybprobes (B) mit den entsprechenden Zielsequenzen von HBV (Genotyp C), WHV, GSHV und ASHV**

(HBVs3 s/as: sense-/antisense-Primer; HBV SA FL/LC: Hybprobes; R: A/G; B: C/G/T; W: A/T; Y: C/T)



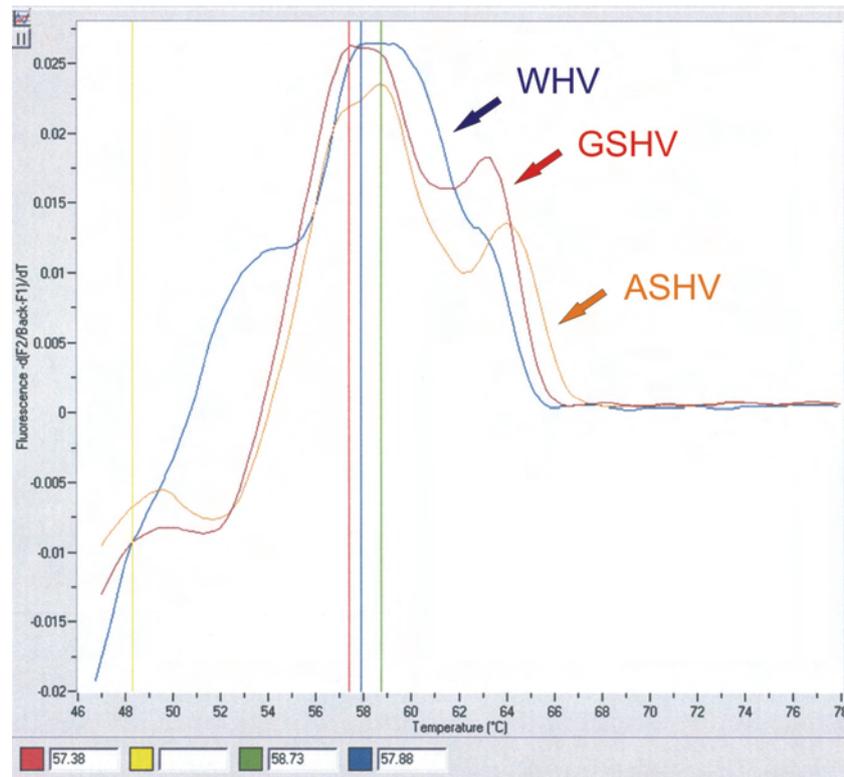
**Abb. 12: Quantitative Bestimmung von WHV-DNA mittels real-time PCR (LightCycler)**

Logarithmisches Ansteigen der gemessenen Fluoreszenzsignale der PCR-Amplifikate mit zunehmender Zykluszahl bis zur maximalen Fluoreszenz (A) und Regressionsgerade (B), die aus den „crossing points“ der Standardreihe erstellt wird

#### 4.1.1.1 Schmelzkurvenanalytik

Die Analyse der Schmelzkurven ermöglicht zum einen eine Aussage über die Spezifität des amplifizierten PCR-Produkts und zum anderen die Unterscheidung verschiedener Genotypen. Je spezifischer die Hybprobes an die Zielsequenz binden, desto höher ist die Schmelztemperatur. Fehlbindungen, aufgrund geringer Abweichungen zwischen der Nukleotidsequenz der Hybprobes und des Templates, werden zwar bis zu einem gewissen Grad toleriert, aber die Bindung beider DNA-Stränge ist weniger stabil. Die Schmelztemperatur fällt geringer aus.

Die Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) von WHV, GSHV und ASHV divergieren erwartungsgemäß nur leicht, wobei die Differenz von max. 1,5 °C zwischen GSHV und ASHV sehr gering ausfällt. Auffällig sind die Schultern in der Schmelzkurve um 63°C bei GSHV und 64°C bei ASHV.



**Abb. 13: Darstellung der LightCycler-Schmelzkurven von amplifizierter WHV-, GSHV- und ASHV-DNA.**

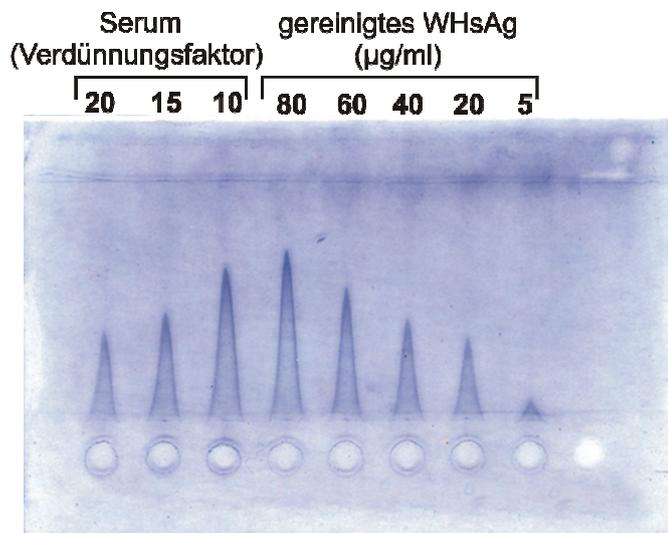
Die Schmelzkurvenanalyse ermöglicht eine sensitive Differenzierung verschiedener Virusspezies und Genotypen.

#### 4.1.2 Quantitative Bestimmung des viralen Oberflächenantigens mit Hilfe der Laurell-Elektrophorese

Bei der Laurell-Elektrophorese handelt es sich um eine Kombination aus Elektrophorese und Immunpräzipitation, bei der in einem elektrischen Feld Antigen und Antikörper gegeneinander diffundieren. In der so genannten Äquivalenzzone bilden die beiden Diffusionspartner lichtstreuende Präzipitationsbögen, deren Höhe direkt proportional ist zur eingesetzten Antigenmenge. Mit Hilfe eines geeichten Standards, welcher bei jeder Laurell-Elektrophorese als Referenz eingesetzt wird, kann die Antigenkonzentration im Serum ermittelt werden (3.1.2).

Das Serum eines chronisch WHV-infizierten Woodchucks (# 5413) wurde in drei Verdünnungen (1:10; 1:15; 1:20) zusammen mit einer Verdünnungsreihe, bestehend aus 5 verschiedenen Konzentrationen (5, 20, 40, 60, 80 µg/ml) von hochreinem WHsAg aus dem WHV+ Serum 5413, auf eine Laurellplatte aufgetragen (Abb.14). Insgesamt wurden vier Laurellplatten mit diesem Verdün-

nungsschema angefertigt und gemeinsam in einem Elektrophoreselauf eingesetzt (Abb. 43, Anhang).

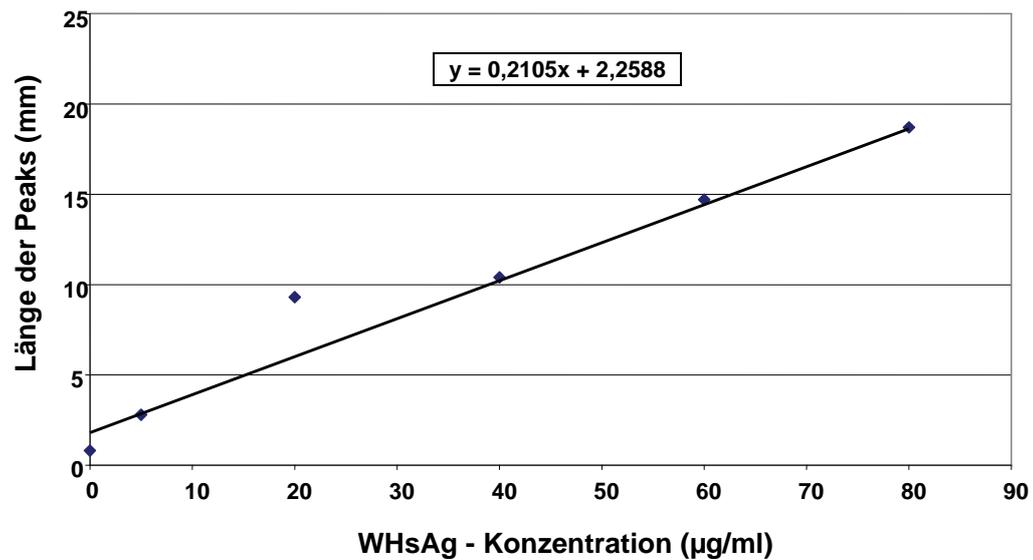


**Abb. 14: Eichung des WHV-Standardserums 5413**

Laurell-Elektrophorese mit 3 Verdünnungen (1:20, 1:15, 1:10) des WHV+ Serums 5413 sowie 5 verschiedenen Konzentrationen von gereinigtem WHsAg (5, 20, 40, 60, 80 µg/ml) zur Eichung des Standardserums 5413

Anschließend wurden alle Präzipitationsbögen ausgemessen und deren Längen in ein Diagramm eingetragen. Aus den fünf verschiedenen Konzentrationen (5, 20, 40, 60, 80 µg/ml) des gereinigten WHsAg wurde eine Funktion ermittelt, die die Grundlage für die Berechnung der unbekannt Konzentrationen des in mehreren Verdünnungen vorliegenden Serums 5413 darstellte (Abb. 15). Jede der vier Laurellplatten wurde separat ausgewertet.

Aus allen errechneten Konzentrationen der Verdünnungen des Serums 5413 (Tabelle 3) wurde ein Mittelwert gebildet. Dabei flossen zwei Werte nicht in die Berechnung ein, da sie deutlich von den übrigen errechneten Konzentrationen abwichen (1:20 Verdünnung der Platte 2 und 4). Aus der Bestimmung des Mittelwertes ergibt sich eine Konzentration des Standardserums von 729 µg/ml Serum +/- 87 µg/ml Standardabweichung bzw. +/- 27 µg/ml Standardfehler.



**Abb. 15: Eichung des WHV-Standardserums 5413**

Regressionsgerade aus mehreren Verdünnungsstufen von hochreinem WHsAg (5, 20, 40, 60, 80 µg/ml) zur Berechnung der WHsAg-Konzentration des WHV-Standardserums 5413

**Tabelle 3: Eichung des WHV-Standardserums 5413**

Übersicht der WHsAg-Konzentrationen des Serums 5413, welches in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:20; 1:15; 1:10) mehrmals quantifiziert wurde. Aus dem Mittelwert wurde die WHsAg-Standard-Konzentration für das Serum 5413 ermittelt (\* Werte wurden nicht in die Auswertung einbezogen).

	Verdünnungsstufe	WHsAg-Konzentration im Serum 5413 (µg/ml)
Platte 1	01:20	887,5
	01:15	886,5
	01:10	724,0
Platte 2	01:20	1021,8 *
	01:15	706,5
	01:10	635,0
Platte 3	01:20	708,3
	01:15	670,2
	01:10	685,1
Platte 4	01:20	982,4 *
	01:15	699,7
	01:10	689,4

#### **4.1.3 Untersuchung des Verlaufs der Antigenämie in chronisch WHV-infizierten Woodchucks nach Applikation von DNA- und Immunkomplex-Vakzinen in Kombination mit oraler Verabreichung von Lamivudin**

Im Rahmen dieser Studie sollte bei zehn adulten, chronisch WHV-infizierten Woodchucks die Beeinflussung der Antigenämie durch die therapeutische Vakzinierung mit DNA- und Immunkomplex-Vakzinen in Kombination mit oraler Applikation von Lamivudin untersucht werden, um die Effizienz dieser Kombinationstherapie bei der chronischen Hepatitis zu evaluieren. Die zehn Woodchucks wurden über vier Monate täglich mit 15 mg Lamivudin per os behandelt. Davon wurden jeweils vier Woodchucks zusätzlich mit DNA-Vakzinen oder einer Kombination aus DNA- und Immunkomplex-Vakzinen immunisiert. Zwei Tiere, die nur mit Lamivudin therapiert wurden, dienten als Kontrolle. Bei der DNA-Vakzinierung handelte es sich um eine Kombination aus den drei Plasmiden pWHslm, pWHclm und pWHIF, die entsprechend WHsAg, WHcAg und Woodchuck-IFN- $\gamma$  exprimierten. Die Plasmide wurden zu gleichen Teilen gemischt. Den Woodchucks wurden drei Injektionen in den Wochen 9, 13 und 18 intramuskulär appliziert, wobei eine Dosis 500  $\mu$ l Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 1 mg/ml enthielt. Die Immunkomplex-Vakzine wurden durch parallele Inkubation von gereinigtem WHsAg und anti-WHs generiert. Jeweils 20  $\mu$ g der Immunkomplexe wurden in Kombination mit 250  $\mu$ g Plasmid-DNA in einer Dosis gemischt und den Tieren ebenfalls in den Wochen 9, 13 und 18 i.m. appliziert. Alle zwei Wochen wurden Blutproben entnommen und der Verlauf der Virämie (WHV-DNA), Antigenämie (WHsAg) und anti-WHs Antikörper bestimmt. Die Quantifizierung des WHsAg im Serum erfolgte mittels Laurell-Elektrophorese. Die klinischen Versuche, die Generierung der Vakzine sowie die Messung der WHV-DNA und der anti-WHs Antikörper wurden von Dr. Menji Lu, Institut für Virologie des Universitätsklinikum Essen, durchgeführt.

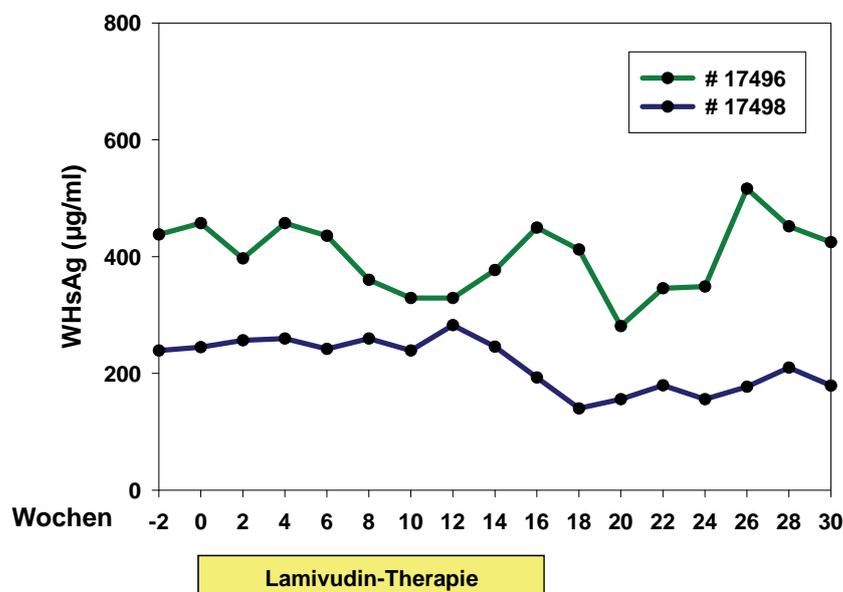
Aufgrund sehr hoher Konzentrationen subviraler Partikel (bis zu 1000  $\mu$ g/ml) im Serum chronisch WHV infizierter Woodchucks eignet sich die Laurell-Elektrophorese weitaus besser für die Quantifizierung des WHsAg als der ELISA. Deswegen Vorteil liegt insbesondere in der Detektion sehr geringer Konzentrationen, bei dessen Verwendung die Serumproben hätten extrem verdünnt werden müssen.

#### 4.1.3.1 Verlauf des WHsAg unter Lamivudin-Therapie

Durch die Therapie mit Lamivudin wurde bei beiden Tieren keine signifikante Reduktion des WHsAg erreicht (Abb. 16; Tab. 8A Anhang). Das Tier # 17496 wies vor Beginn der Therapie eine WHsAg-Konzentration von 438  $\mu\text{g/ml}$  auf, die unter der Lamivudin-Behandlung auf 329  $\mu\text{g/ml}$  in Woche 12 sank. Danach kam es noch unter der Lamivudinverabreichung zu einem Anstieg der Konzentration auf 450  $\mu\text{g/ml}$  bis zum Ende der Therapie in Woche 16. Anschließend ließ sich ein erneuter Abfall des WHsAg auf 281  $\mu\text{g/ml}$  nachweisen. Bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes kehrten die WHsAg-Konzentrationen auf das anfängliche Niveau zurück.

Bei Tier # 17498 war ab Woche 12 eine leichte Reduktion der WHsAg zu beobachten. Dieses Tier wies eine Ausgangskonzentration von 239  $\mu\text{g/ml}$  auf, die unter der Lamivudin-Therapie auf 140  $\mu\text{g/ml}$  in Woche 18 sank. Die WHsAg-Konzentration stieg bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes wieder leicht an, blieb mit 179  $\mu\text{g/ml}$  allerdings unter der vor Beginn der Therapie ermittelten Antigenkonzentration.

Bei 12% Variationskoeffizient der Meßmethode sind diese Schwankungen als echt zu bezeichnen. Allerdings stehen sie in keiner klaren Beziehung zur Lamivudin-Therapie.

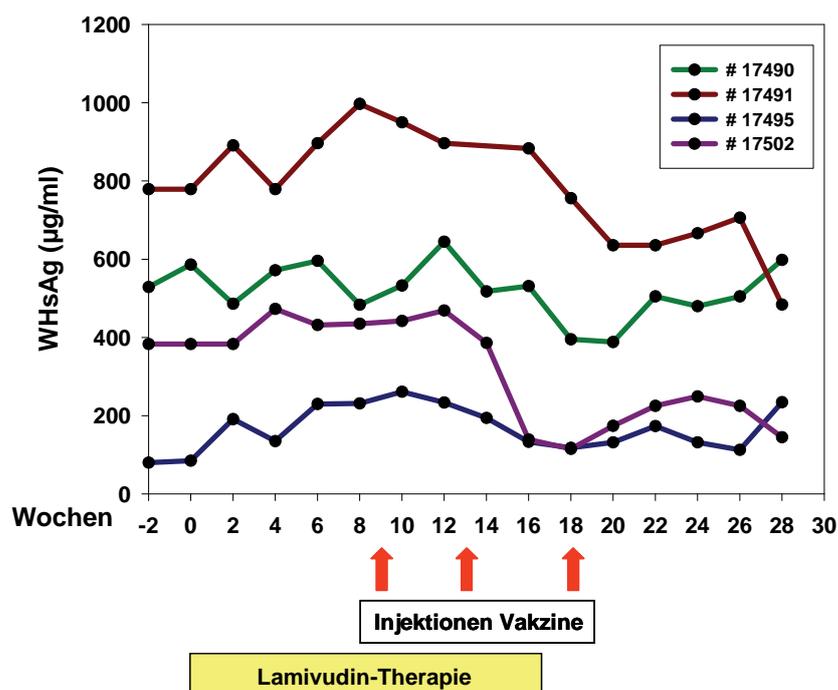


**Abb. 16: Verlauf des WHsAg unter Lamivudin-Therapie bei chronisch WHV-infizierten Woodchucks**

Beide Woodchucks erhielten über 4 Monate (Woche 0-16) täglich 15 mg Lamivudin per os. Die WHsAg-Konzentrationen wurden nach Beginn der Therapie insgesamt über einen Zeitraum von 30 Wochen bestimmt, wobei die Blutabnahmen alle zwei Wochen erfolgten.

#### 4.1.3.2 Verlauf des WHsAg unter Lamivudin-Therapie in Kombination mit DNA-Vakzinierung

Eine signifikante Beeinflussung der Antigenämie durch die Therapie mit Lamivudin und der DNA-Vakzinierung konnte nur bei einem Woodchuck (# 17502) nachgewiesen werden (Abb. 17; Tab. 8B Anhang). Nachdem die WHsAg-Konzentration sich über mehrere Wochen auf einem Niveau von 383-469  $\mu\text{g/ml}$  bewegte, war nach Woche 12 eine Reduktion des Antigens auf bis zu 115  $\mu\text{g/ml}$  in Woche 18 zu beobachten. Dabei war der Abfall der Antigenkonzentration besonders markant zwischen der 14. und 16. Woche, d.h. eine Woche nach dem ersten Boost des Impfstoffs. Nach der 18. Woche war ein leichter Anstieg des WHsAg bis zum Ende des Untersuchungszeitraums nachzuweisen, wobei die terminal gemessene Konzentration von 145  $\mu\text{g/ml}$  noch deutlich unter dem vor Therapiebeginn ermittelten WHsAg-Titer lag.



**Abb. 17: Verlauf des WHsAg unter Lamivudin-Therapie in Kombination mit DNA-Vakzinierung bei chronisch WHV-infizierten Woodchucks**

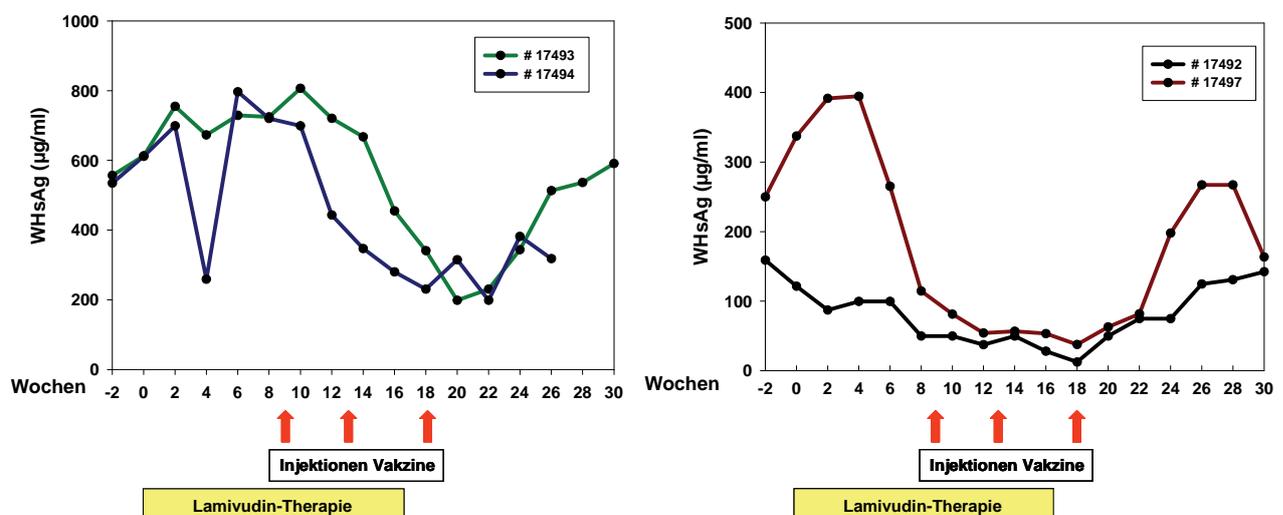
Die Woodchucks erhielten über 4 Monate (Woche 0-16) täglich 15 mg Lamivudin per os. Zusätzlich wurden den Tieren in den Wochen 9, 13 und 18 drei Injektionen einer DNA-Vakzine intramuskulär appliziert, die drei verschiedene Plasmide enthielt. Die Plasmide codierten WHsAg, WHcAg oder Woodchuck IFN- $\gamma$ . Jede Impfdosis enthielt insgesamt 500  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA. Die WHsAg-Konzentrationen wurden nach Beginn der Therapie insgesamt über einen Zeitraum von 30 Wochen bestimmt, wobei die Blutabnahmen alle zwei Wochen erfolgten.

Ein weiteres Tier (# 17491) zeigte nach einem initialen Anstieg der WHsAg-Konzentration von 779  $\mu\text{g/ml}$  auf 997  $\mu\text{g/ml}$  in Woche 8, einen konstanten Abfall der Antigenkonzentration nach der ersten Injektion der DNA-Vakzine bis zum

Ende des Untersuchungszeitraums. Der terminale Titer betrug bei diesem Tier 448 µg/ml, womit während der Therapie eine Reduktion des WHsAg um ca. 50% erzielt wurde. Die beiden restlichen Tiere (# 17490 und # 17495) zeigten über den gesamten Untersuchungszeitraum einen sehr konstanten WHsAg-Verlauf.

#### 4.1.3.3 Verlauf des WHsAg unter Lamivudin-Therapie in Kombination mit Immunkomplex- und DNA-Vakzinierung

Unter der Kombinationstherapie von Lamivudin in Verbindung mit Immunkomplex- und DNA-Vakzinen war bei allen vier Tieren eine starke Reduktion der WHsAg-Konzentration zu beobachten (Abb. 18; Tab. 8C Anhang). Bei den Tieren # 17497 und # 17492 kam es bereits vor der ersten Applikation des Impfstoffs in Woche 9 zu einem deutlichen Absinken des WHsAg, das sich während der Impfstoffinjektionen fortsetzte. Allerdings stiegen die Antigenkonzentrationen nach dem zweiten Boost in Woche 18 wieder an.



**Abb. 18: Verlauf des WHsAg unter Lamivudin-Therapie in Kombination mit Immunkomplex- und DNA-Vakzinierung bei chronisch WHV-infizierten Woodchucks**

Die Woodchucks erhielten über 4 Monate (Woche 0-16) täglich 15 mg Lamivudin per os. Zusätzlich wurden den Tieren drei Injektionen der Immunkomplex-/DNA-Vakzine mit 20 µg WHsAg-Immunkomplexen und 250 µg Plasmid-DNA je Dosis in den Wochen 9, 13 und 18 intramuskulär appliziert. Die WHsAg-Konzentrationen wurden nach Beginn der Therapie insgesamt über einen Zeitraum von 30 Wochen bestimmt, wobei die Blutabnahmen alle zwei Wochen erfolgten.

Bei den Tieren # 17493 und # 17494 war ein Abfall des WHsAg ab Woche 10, also eine Woche nach der ersten Injektion der Vakzine, nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Woodchucks eine WHsAg-Konzentration von 807

µg/ml und 699 µg/ml auf. Über die folgenden Wochen reduzierte sich die Antigenkonzentration um über 70% auf 198 µg/ml in Woche 20 bzw. 22. Bis zum Ende des Untersuchungszeitraums in Woche 30 (# 17493) bzw. Woche 26 (# 17494) stiegen die WHsAg-Konzentrationen wieder an und erreichten zumindest bei Tier # 17493 wieder ähnlich hohe Antigentiter wie zu Beginn der Therapie.

#### **4.1.4 Detektion von Oberflächenantigen-Immunkomplexen**

Mittels Laurell-Elektrophorese lässt sich nur frei im Blut zirkulierendes Antigen nachweisen. Mit Einsetzen der humoralen Immunantwort, wird vermehrt Antigen von spezifischen Antikörpern in Immunkomplexen gebunden. Das gebundene Antigen lässt sich erst nach Fällung der Immunkomplexe aus dem Serum und anschließender Detektion im Immunoblot nachweisen.

Von der akuten sowie der chronischen Form der Hepatitis B des Menschen ist bekannt, dass neben dem freien HBsAg auch in Immunkomplexen gebundenes HBsAg im Blut zirkuliert (Madalinski und Bragiel, 1979). Da bisher noch keine Daten über zirkulierende Immunkomplexe während einer WHV-Infektion und deren Rolle im Infektionsgeschehen publiziert wurden, sollten sie im Rahmen dieser Studie ebenfalls untersucht werden. Im Vorversuch wurden mehrere Seren von akut sowie chronisch mit WHV infizierten Woodchucks, die uns freundlicherweise von Dr. S. Menne [College of Veterinary Medicine der Cornell University, Ithaca, NY (USA)] zur Verfügung gestellt wurden, getestet.

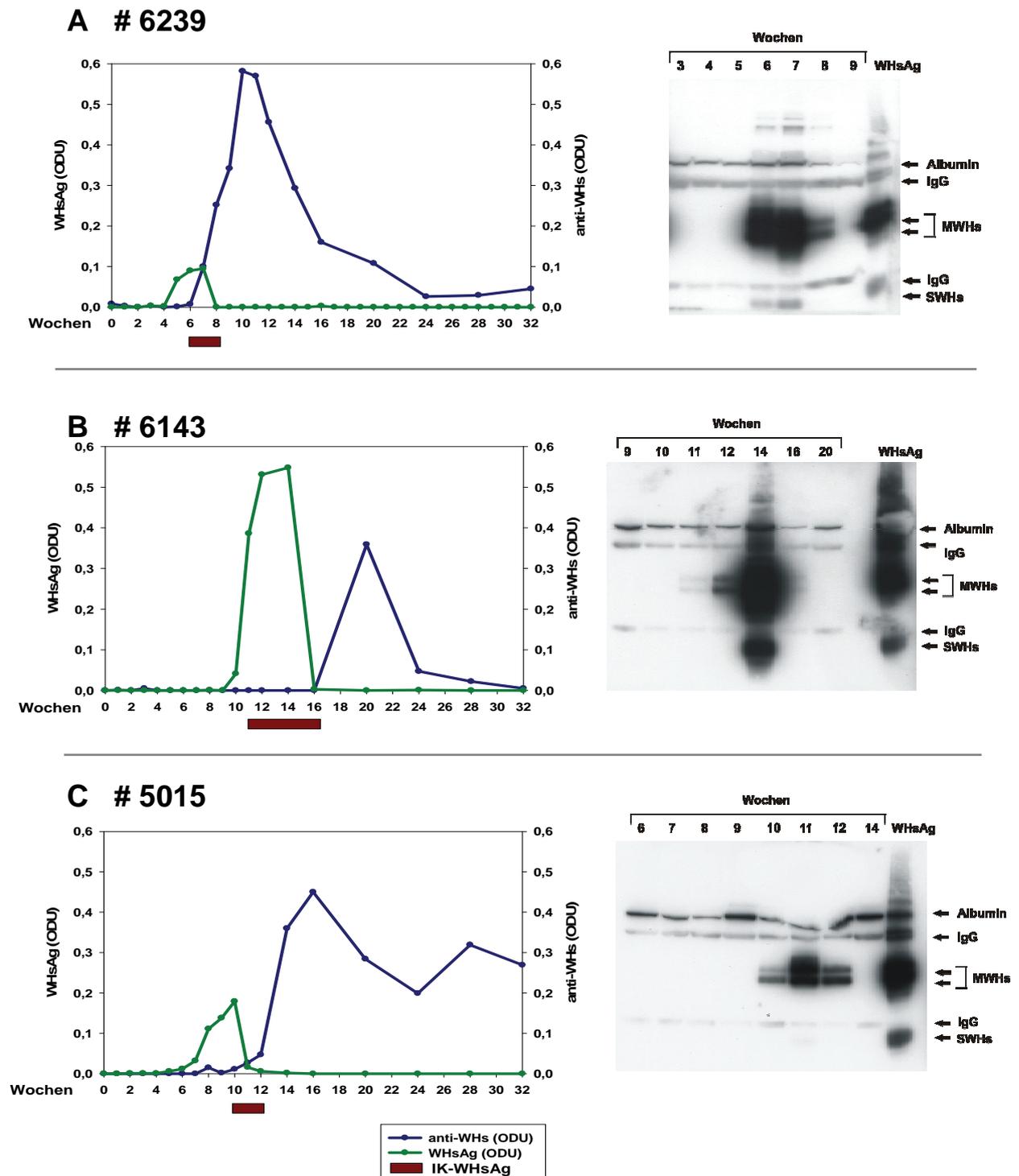
Insgesamt standen drei Serumreihen akut WHV-infizierter Woodchucks und 9 Seren chronisch WHV-infizierter Tiere zur Verfügung. Die akut infizierten Woodchucks wurden über einen Zeitraum von 32 Wochen beobachtet, wobei die Blutabnahmen anfangs wöchentlich, ab Wo 12 zweiwöchentlich und ab Wo 20 vierwöchentlich erfolgten. Die chronisch infizierten Tiere waren als Neonaten mit WHV infiziert worden und hatten zum Zeitpunkt der Blutentnahme ein Alter von 15 Monaten (# 6510; # 9539) und 22 Monaten (# 5929; # 5890; # 5954; # 5904; # 5883; # 5927; # 5951) erreicht. Von allen Seren wurden die Konzentrationen von WHV-DNA, WHsAg, anti-WHs und anti-WHc bestimmt, wobei uns diese Daten freundlicherweise von Dr. S. Menne zur Verfügung gestellt wurden. Die Immunkomplexe wurden aus jeweils 100 µl Serum gefällt und spezifisch mit einem gegen das mittlere Oberflächenprotein (MWHs) gerichteten Antiserum

(anti-WHs 2722) detektiert (3.1.3). Als Standard wurde 0,5µg hochreines WHsAg verwendet.

#### **4.1.4.1 Nachweis von Immunkomplexen in akut mit WHV infizierten Woodchucks**

Bei allen Infektionsreihen der akut mit WHV infizierten Woodchucks waren Immunkomplexe jeweils über einen Zeitraum von 3-6 Wochen nachweisbar (Abb. 19). Bei dem Tier # 6143, welches fünfmal so hohe WHsAg-Mengen wie die beiden anderen Woodchucks aufwies, ließen sich die Immunkomplexe auch über einen doppelt so langen Zeitraum (6 Wochen) detektieren.

Individuell verschieden traten die ersten Immunkomplexe bereits am Anfang (# 6143), in der Mitte (# 6239) oder am Ende (# 5015) der Antigenämie des WHsAg auf. Zumindest bei 2 Tieren (# 6239, # 5015) stimmte dieser Zeitpunkt mit dem Nachweis erster freier, gegen das WHsAg gerichteter Antikörper überein. Bei dem dritten Tier (# 6143) konnten freie Antikörper erst nach dem Verschwinden der Immunkomplexe detektiert werden (Abb. 19). Gemessen an der Signalstärke des Standard-WHsAg (0,5 µg) wiesen die Tiere # 6143 und # 6239 mehr Immunkomplexe als das Tier # 5015 auf. So ließen sich zum Zeitpunkt der maximalen Immunkomplexkonzentration (Wo 6/7 bei # 6239; Wo 14 bei # 6143) in etwa 0,8-1 µg der WHsAg-anti-WHs-Komplexe aus dem Serum fällen, während es bei Tier # 5015 (Wo 11) geschätzte 0,2 µg waren. Bemerkenswert ist dabei, dass sich die Woodchucks # 6239 und # 5015 jedoch nur geringfügig im Gehalt an freiem WHsAg unterschieden. Möglicherweise besteht dabei ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Immunkomplexen und anti-WHs, da das Tier mit dem höheren Immunkomplexgehalt im Serum (# 6239) auch höhere anti-WHs Konzentrationen als # 5015 aufwies. Bezieht man jedoch die Daten des dritten Tieres (# 6143) mit in den Vergleich ein, lässt sich wiederum kein Zusammenhang zwischen anti-WHs und der Menge an Immunkomplexen feststellen.



**Abb. 19: Graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen freiem WHsAg, anti-WHs sowie WHsAg-Immunkomplexen während der akuten WHV-Infektion bei Woodchucks (Tiere # 6239, # 6143, # 5015).**

Freies WHsAg und anti-WHs wurden mittels ELISA quantifiziert. Der Nachweis der WHsAg-Immunkomplexe erfolgte mittels Immunoblot, wobei als Standard 0,5 µg hochreines WHsAg verwendet wurde.

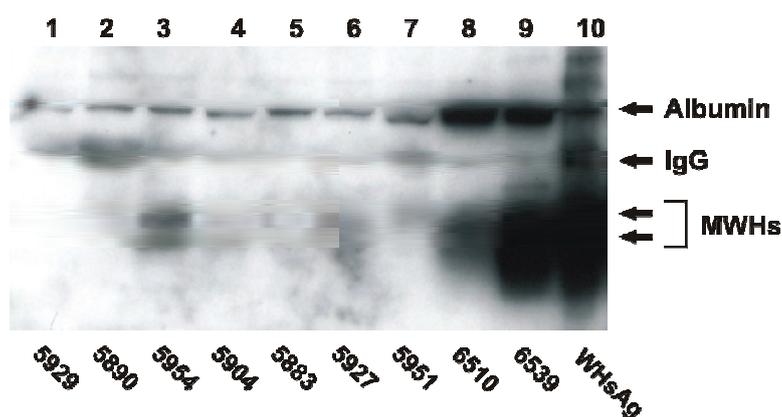
(IgG: leichte und schwere Ketten der Immunglobuline; MWHS: mittleres Oberflächenprotein; SWHS: kleines Oberflächenprotein)

#### 4.1.4.2 Nachweis von Immunkomplexen in chronisch mit WHV infizierten Woodchucks

5 von 9 Seren der chronisch mit WHV infizierten Tiere wiesen Immunkomplexe auf (# 5954; # 5904; # 5927; # 6510 und # 6539; Abb. 20:). Die Intensität der Immunfärbung lässt erkennen, dass die Konzentrationen der Immunkomplexe stark variierten. Verglichen mit dem Standard wiesen zwei Seren sehr geringe (# 5904; # 5927), zwei Seren mittlere (# 5954; # 6510) und ein Serum (# 6539) hohe Immunkomplexkonzentrationen auf.

**Tabelle 4: Serologische Daten der chronisch mit WHV infizierten Woodchucks, deren Seren für die Fällung und den Nachweis von Immunkomplexen verwendet wurden** (Signalstärke im Western Blot: + schwach; ++ mittel; +++ stark; - kein Signal; Quantifizierung von WHsAg, anti-WHs und anti-WHc mittels ELISA (ODU: optical density unit, Messung der Extinktion im Photometer)

	Nr.	WHV-DNA (GE/ml)	WHsAg (ODU)	anti-WHs (ODU)	anti-WHc (ODU)	WHsAg-Immunkomplexe
1	5929	7,19E+09	0,154	0	0,131	-
2	5890	7,62E+09	0,172	0	0,097	-
3	5954	6,65E+10	0,228	0	0,122	++
4	5904	7,66E+09	0,218	0	0,226	+
5	5883	1,80E+10	0,196	0	0,077	-
6	5927	9,21E+09	0,183	0	0,152	+
7	5951	4,03E+10	0,205	0	0,122	-
8	6510	2,56E+10	0,177	0	0,195	++
9	6539	7,51E+10	0,319	0	0,295	+++



**Abb. 20: Spezifischer Nachweis von WHsAg-Immunkomplexen in Seren chronisch WHV-infizierter Woodchucks mittels Immunoblot.**

Insgesamt wurden 9 Seren verschiedener Tiere im Western Blot getestet (1-9). Als Standard (10) wurde 0,5 µg hochreines WHsAg verwendet. (IgG: Immunglobuline; MWHs: mittleres Oberflächenprotein)

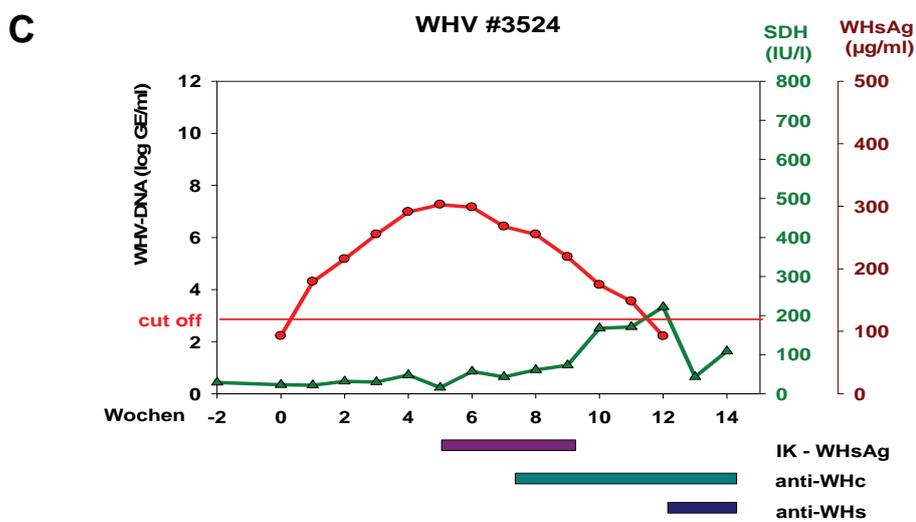
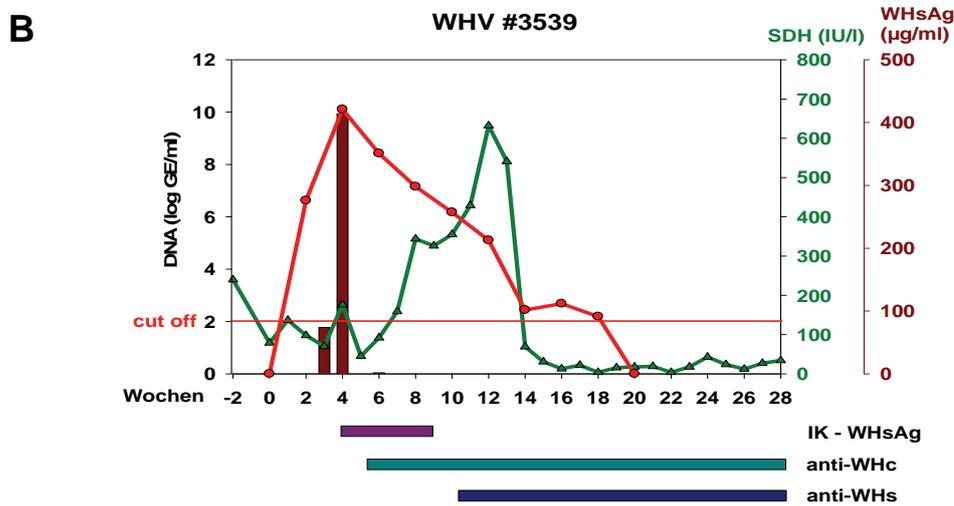
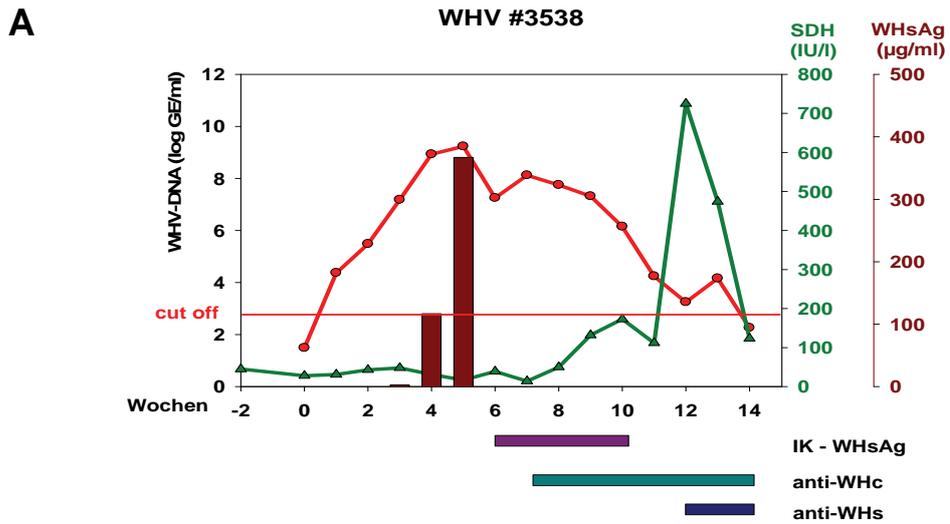
Der Vergleich der Daten von WHV-DNA, WHsAg sowie der Antikörper gegen WHsAg und WHcAg belegt, dass das Auftreten von Immunkomplexen nicht von der Anzahl der Viren im Blut, der Höhe der Antigenmenge oder der Stärke des anti-WHc-Signals abhängt (Tab. 4). Es besteht nur ein teilweiser Zusammenhang zwischen der Menge an freiem Antigen und in Immunkomplexen gebundenem Antigen, wie sich bereits bei den akut infizierten Tieren zeigte. Einerseits ließen sich bei dem Tier 6539 (9), welches die höchsten Antigenmengen aufweist, die meisten Immunkomplexe aus dem Serum fällen. Andererseits konnte aus dem Vergleich der WHsAg-Konzentrationen der anderen Tiere geschlossen werden, dass große Mengen an freien subviralen Partikeln nicht unbedingt mit hohen Immunkomplexmengen einhergehen. Betrachtet man die WHsAg-Konzentrationen der Tiere 5890 (2) und 6510 (8), so ist festzustellen, dass bei annähernd gleicher WHsAg-Ausgangskonzentration bei dem einen Tier keine (2), bei dem anderen Tier (8) viele Immunkomplexe aus dem Serum gefällt werden können.

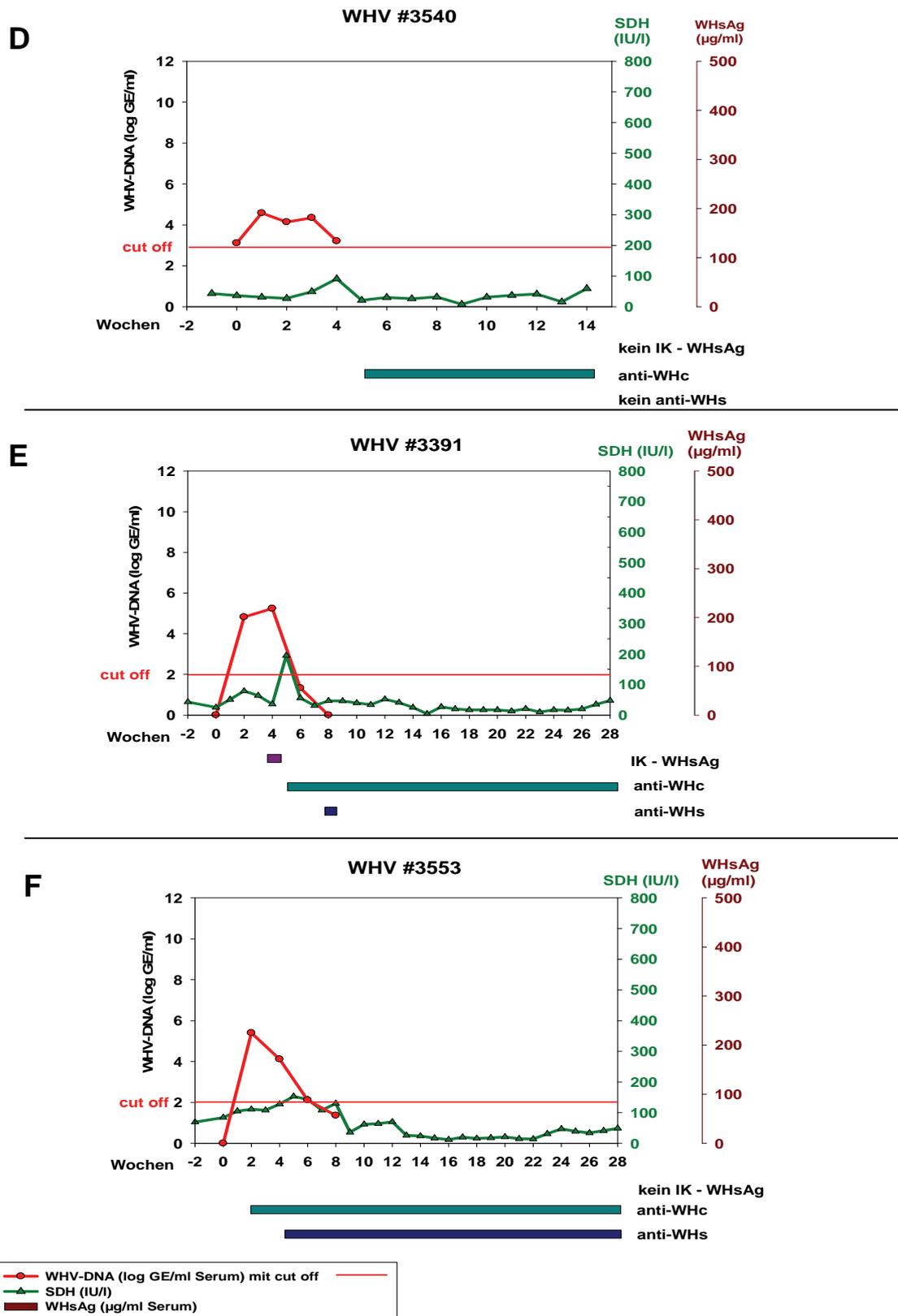
### **4.1.5 Infektion von Woodchucks mit Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)**

#### **4.1.5.1 Kinetik der WHV-DNA**

Sechs adulte (1-6 Jahre alt), WHV negative Woodchucks wurden mit je  $10^7$  Genomequivalenten (GE) WHV i.v. inokuliert. Die sechs Tiere waren je zwei Gruppen zugeordnet worden. Zu der ersten Untersuchungsgruppe gehörten die Tiere 3538, 3524 und 3540. Die zweite Untersuchungsgruppe setzte sich aus den Tieren 3539, 3391 sowie 3553 zusammen. Beide Gruppen unterschieden sich lediglich in der Beobachtungsdauer. Der Zeitraum der Untersuchung war in der zweiten Versuchstiergruppe mit 30 Wochen doppelt so lang wie in der ersten. Die Quantifizierung der DNA erfolgte in der ersten Gruppe wöchentlich und in der zweiten Gruppe in zweiwöchentlichem Abstand. Aufgrund einer allgemeinen Kontamination der Serumproben der ersten Untersuchungsgruppe, wurde das Detektionslimit für die WHV-DNA bei diesen Proben von  $10^2$  GE/ml auf  $10^3$  GE/ml heraufgesetzt.

Von den sechs mit WHV inokulierten Woodchucks wiesen zwei Tiere (# 3538, # 3539) einen hoch replikativen Verlauf, ein Tier (# 3524) einen mittleren und drei Tiere (# 3540, # 3391, # 3553) einen schwach replikativen Verlauf auf.





**Abb. 21: Graphische Darstellung akuter Infektionsverläufe von Woodchucks nach Inokulation mit WHV.**

A: # 3538, B: # 3539, C: # 3524, D: # 3540, E: # 3391, F: # 3553

In der Auswertung wurden die Daten von WHV-DNA [rot; cut-off bei  $10^2$  GE/ml (# 3539, # 3391, # 3553) bzw.  $10^3$  GE/ml (# 3538, # 3524, # 3540)], freiem WHsAg (braune Balken), WHsAg-Immunkomplexen (IK-WHsAg; violett), den Antikörpern anti-WHs (türkis) und anti-WHc (blau) sowie dem Leberenzym Sorbitol-Dehydrogenase (SDH, grün) einbezogen. Der Zeitraum der Untersuchung betrug 15 Wochen (# 3538, # 3524, # 3540) bzw. 28 Wochen (# 3539, # 3391, # 3553) nach Inokulation mit dem Virus.

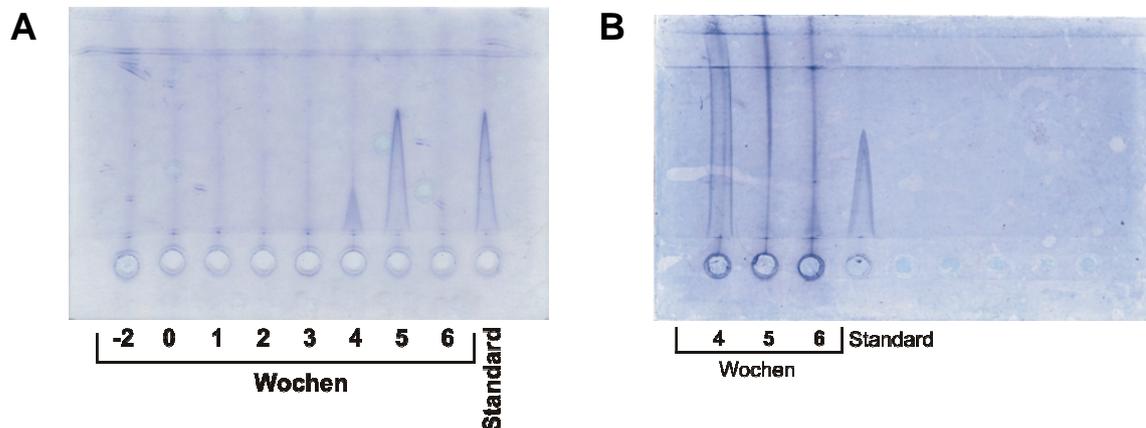
Bei allen Woodchucks ließ sich bereits eine bzw. zwei Wochen nach Inokulation (in Abhängigkeit vom Untersuchungsintervall) virale DNA nachweisen, wobei sich die initial gemessenen Konzentrationen zwischen  $3 \times 10^4$  GE/ml (# 3524) und  $6 \times 10^6$  GE/ml (# 3539) bewegten (Abb. 21 A-F). Das Virusmaximum ließ sich bei den meisten Tieren in den Wochen 4-5 p.i. detektieren, nur bei den Woodchucks 3540 und 3553 stellte der initial gemessene Wert in Woche 1 bzw. 2 p.i. den Zeitpunkt der maximalen Virusreplikation dar. Bei den drei Tieren, die einen schwach replikativen Verlauf zeigten, konnten maximale Viruskonzentrationen von  $10^4$ - $10^5$  GE/ml ermittelt werden. Das Tier 3524 wies einen maximalen Virustiter von  $3 \times 10^7$  GE/ml auf und bei den beiden Tieren 3538 und 3539 waren maximale Viruskonzentrationen von  $2 \times 10^9$  GE/ml und  $1 \times 10^{10}$  GE/ml zu verzeichnen.

Die Eliminationszeit war bei allen Tieren unterschiedlich lang. Während sich bei den drei schwach virämischen Tieren (# 3540, # 3391, # 3553) das Virus bereits nach den Wochen 4-6 p.i. nicht mehr im Serum nachweisen ließ, fielen die messbaren Viruskonzentrationen bei den Woodchucks 3538 und 3524 erst nach 11 bzw. 13 Wochen p.i. unter das Detektionslimit. Bei Tier 3539 ließ sich die Virus-DNA selbst noch in Woche 18 p.i. detektieren und war erst anschließend nicht mehr im Serum nachweisbar.

#### 4.1.5.2 Kinetik des (freien) WHsAg

Mittels Laurell-Elektrophorese ließ sich nur bei den beiden hoch virämischen Tieren 3538 und 3539 freies WHsAg nachweisen (Abb. 22). Im Vergleich zum Virus war das Antigen allerdings nur über einen kurzen Zeitraum von drei bzw. vier Wochen messbar. Erstes WHsAg konnte 3 Wochen p.i. detektiert werden. Innerhalb von zwei Wochen stieg die Antigenkonzentration bei Tier 3538 von 3 µg/ml auf das über 100fache an und erreichte eine maximale Konzentration von 367 µg/ml Serum. Bei Tier 3539 war ebenfalls ein sprunghafter Anstieg zu verzeichnen, wobei sich die Antigenkonzentration innerhalb einer Woche von initial 74 µg/ml auf maximal 414 µg/ml Serum mehr als verfünffachte. Bei beiden Tieren fiel der Zeitpunkt der maximalen Antigenämie mit dem der maximalen Virämie zusammen. Ebenso rasch wie die WHsAg-Konzentration anstieg, fiel sie auch wieder ab. Bei # 3538 war bereits in der 6. Woche p.i., d.h. eine Woche nach Erreichen der maximalen Antigenkonzentration, kein WHsAg mehr detektierbar. Bei # 3539 bewegten sich die WHsAg-Konzentrationen in der 5. und 6.

Woche p.i. am Rande des Detektionslimit. Während in der 5. Woche kein freies WHsAg nachweisbar war, ließen sich in der 6. Woche 1,6 µg WHsAg quantifizieren.

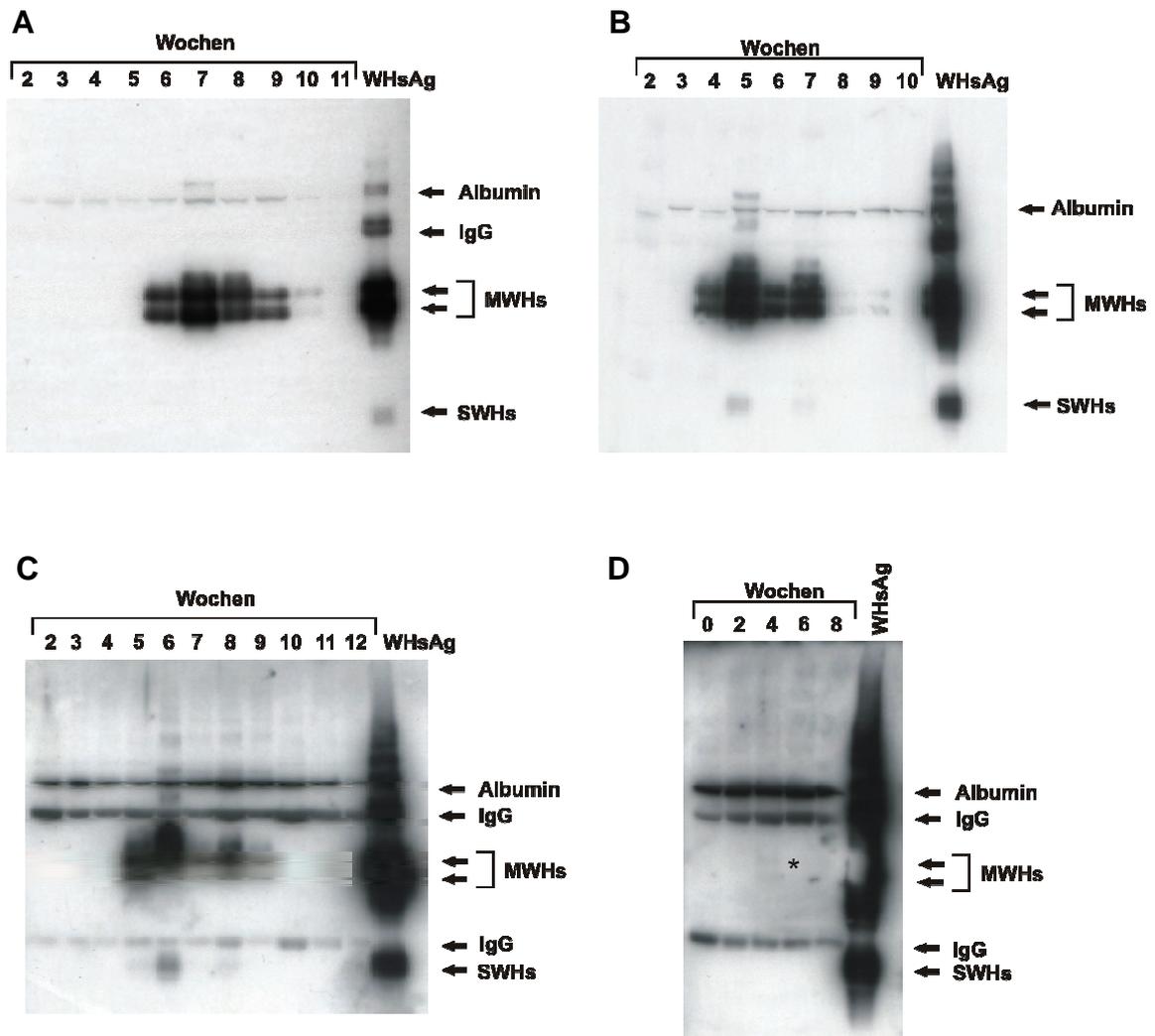


**Abb. 22: Quantifizierung von WHsAg im Serum mittels Laurell-Elektrophorese.**

Aufgrund der hohen Antigenkonzentrationen wurden die entsprechenden Seren 1:5 in FKS verdünnt (A: # 3538). Abb. B (# 3539) zeigt eine Elektrophorese mit unverdünntem Serum. Als Standard wurde ein geeichtes WHV+ Serum verwendet.

#### 4.1.5.3 Detektion von WHsAg-Immunkomplexen

Im Gegensatz zum freien WHsAg, welches nur bei # 3538 und # 3539 detektierbar war, ließ sich in Immunkomplexen gebundenes WHsAg desweiteren bei # 3524 und # 3391 nachweisen (Abb. 23 A-D). Bei allen vier Tieren konnten erste WHsAg-Immunkomplexe zeitgleich zum Virus- und WHsAg-Peak bzw. bei Tier 3538 in direktem Anschluss daran detektiert werden. Das entspricht Woche 4 (# 3539, # 3391), Woche 5 (# 3524) und Woche 6 (# 3538) nach Virusinokulation. Mit Ausnahme von # 3391 (Abb. 23 D), wo Immunkomplexe nur in einer Woche (Woche 4 p.i.) schwach nachweisbar waren, ließen sie sich, im Gegensatz zum freien WHsAg, über einen längeren Zeitraum von 5-6 Wochen erfassen. Die Immunfärbung mit ECL lässt erkennen, dass dabei die Hauptmenge an WHsAg-Immunkomplexen in den ersten zwei bis vier Wochen im Blut zirkuliert. Während bei Tier 3539 das Verschwinden der Immunkomplexe mit dem Erscheinen erster freier Antikörper gegen das WHsAg (anti-WHs) korrelierte, ließ sich bei den restlichen Tieren anti-WHs erst 2-4 Wochen im Anschluss an die Immunkomplexe detektieren.



**Abb. 23: Detektion von WHsAg-Immunkomplexen.**

WHsAg-Immunkomplexe ließen sich bei den Woodchucks 3538 (A), 3539 (B), 3524 (C) sowie schwach(\*) bei 3391 (D) mittels Immunoblot nachweisen. Als Standard wurde 0,5 µg hochreines WHsAg eingesetzt. [IgG: schwere (50 kDa) und leichte Ketten (25 kDa) der Immunglobuline; SWHs: kleines Oberflächenprotein; MWHs: mittleres Oberflächenprotein]

#### 4.1.5.4 Kinetik von anti-WHc und anti-WHs

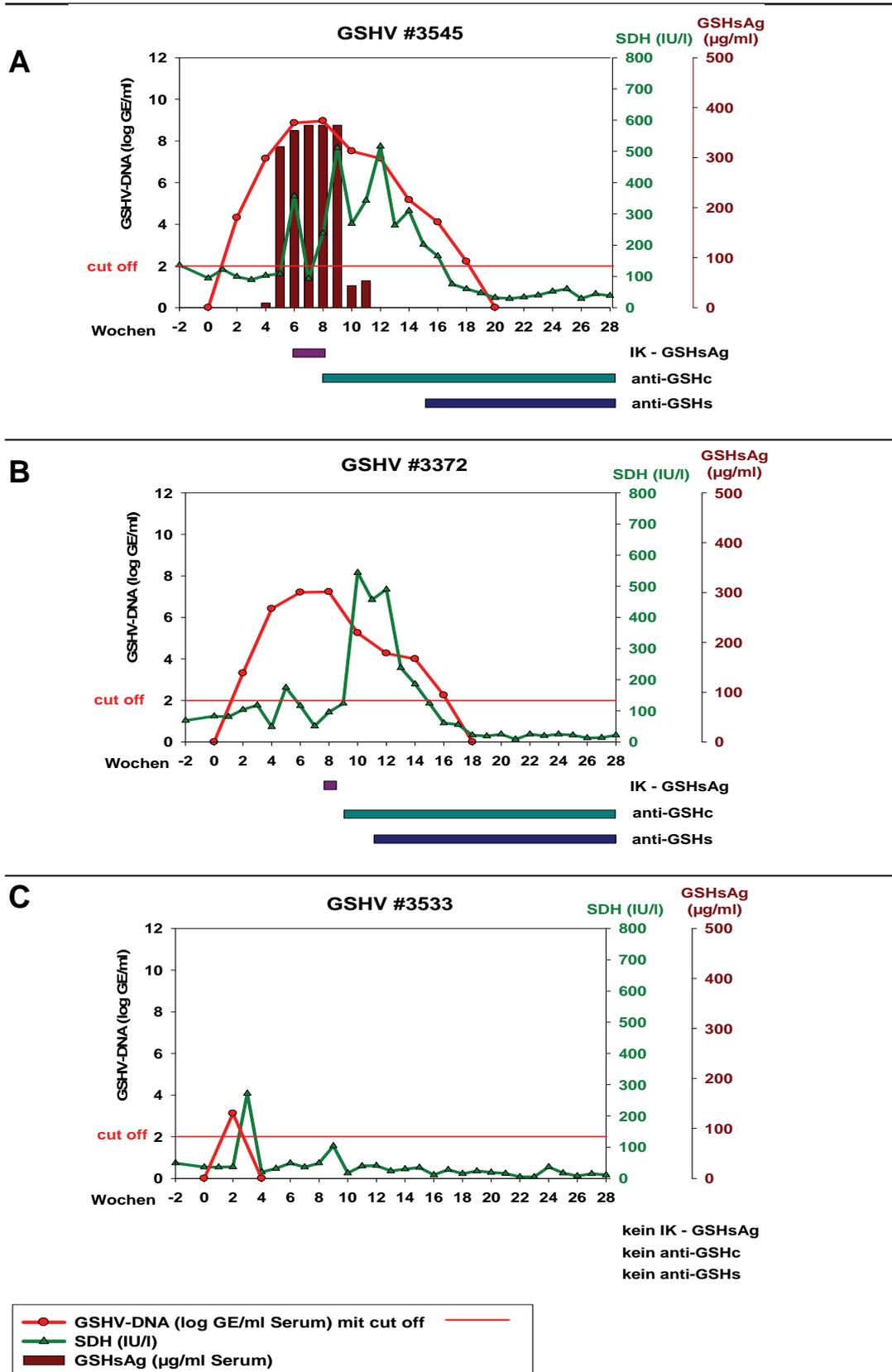
Bei allen sechs Tieren ließ sich eine Serokonversion zu anti-WHc nachweisen (Abb. 21 A-F). Erste WHc-spezifische Antikörper konnten bei den meisten Tieren 1-2 Wochen nach dem Viruspeak detektiert werden. Bei Tier 3553 ließen sie sich sogar zeitgleich mit dem Viruspeak erfassen, bei Tier 3540 dagegen erst vier Wochen später. Das entspricht Woche 2 (# 3553), Woche 5 (# 3539, # 3391) und Woche 7 (# 3538, # 3524, # 3540) nach Virusinokulation. Anti-WHc ließ sich dabei bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes (d.h. 15 bzw. 28 Wochen p.i.) nachweisen.

Die Serokonversion zu anti-WHs war, individuell verschieden, zwei bis fünf Wochen nach der Serokonversion zu anti-WHc nachweisbar und blieb bei Tier 3540 sogar aus (Abb. 21 A-F). Bei diesem Tier war allerdings auch kein WHsAg, weder freies noch in Immunkomplexen gebundenes, detektiert worden. Im Gegensatz dazu zeigte das Tier 3553, trotz völligen Fehlens der Antigenämie, eine ausgeprägte Immunantwort gegen das WHsAg. Mit Ausnahme von Tier 3391, bei dem anti-WHs nur punktuell in der 8. Woche p.i. nachgewiesen werden konnte, ließen sich freie WHs-spezifische Antikörper bis zum Ende des Untersuchungszeitraums detektieren.

#### **4.1.5.5 Kinetik des Leberenzym SDH (Sorbitol-Dehydrogenase)**

Die Beobachtung des SDH-Verlaufs im Serum der Tiere lässt Rückschlüsse auf den Grad der Leberzellzerstörung während der Infektion zu (Abb. 21 A-F). Besonders bei den Tieren 3539 und 3538, die einen hoch replikativen Verlauf zeigten, war ein signifikanter Anstieg der SDH von physiologisch maximal 40 IU/l (internationale Einheit pro Liter) auf 632 bzw. 725 IU/l zu verzeichnen. Bei Tier 3539 lagen die SDH-Konzentrationen jedoch schon vor Virusinokulation über physiologischem Niveau. Das Maximum der hepatozellulären Schädigung wurde bei beiden Tieren 12 Wochen p.i. erreicht. Die anderen vier Tiere wiesen eine deutlich geringere Leberzellschädigung auf, wobei maximal 90 IU/l (# 3540) bis 222 IU/l (# 3524) gemessen wurden. Signifikant bei allen Tieren war, dass die SDH-Konzentrationen erst anstiegen, nachdem die Viruskonzentrationen bereits abnahmen und nachdem die spezifische Immunantwort (anti-WHc) induziert wurde. Eine deutliche Reduktion der SDH-Konzentrationen wurde selbst bei den beiden hoch virämischen Tieren 3539 und 3538 sehr schnell, innerhalb von einer (# 3540, # 3391) bis vier (# 3553) Wochen, erreicht. Aufgrund der verkürzten Beobachtungsdauer bei den Tieren 3538 und 3524 konnte eine Normalisierung der SDH-Konzentrationen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die letzten gemessenen Werte waren bei beiden Tieren noch leicht erhöht, wobei sich allerdings eine sinkende Tendenz erkennen ließ.





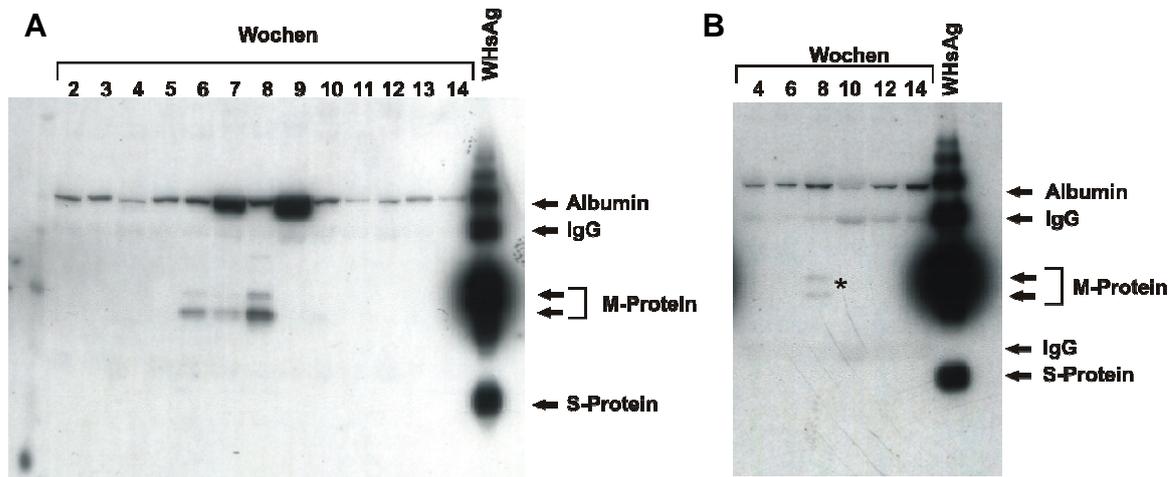
**Abb. 25: Graphische Darstellung akuter Infektionsverläufe von Woodchucks nach Inokulation mit GSHV.**

A: # 3545, B: # 3372, C: # 3533

In der Auswertung wurden die Daten von GSHV-DNA (rot; cut-off bei  $10^2$  GE/ml), freiem GSHsAg (braune Balken), GSHsAg-Immunkomplexen (IK-GSHsAg; violett), den Antikörpern anti-GSHs (türkis) und anti-GSHc (blau) sowie dem Leberenzym Sorbitol-Dehydrogenase (SDH, grün) einbezogen. Der Zeitraum der Untersuchung betrug 28 Wochen nach Inokulation mit dem Virus.

#### 4.1.6.3 Detektion von GSHsAg-Immunkomplexen

GSHsAg-Immunkomplexe konnten bei den Tieren 3545 und 3372 detektiert werden (Abb. 26). Bei Tier 3545 ließen sie sich in Woche 6-8, parallel zum freien GSHsAg, nachweisen. Beim Tier 3372 waren Immunkomplexe schwach in der 8. Woche p.i. detektierbar



**Abb. 26: Detektion von GSHsAg-Immunkomplexen.**

GSHsAg-Immunkomplexe ließen sich bei den Woodchucks 3545 (A) sowie schwach(\*) bei 3372 (B) mittels Immunoblot nachweisen. Als Standard wurde 0,5 µg hochreines WHsAg eingesetzt. [IgG: schwere (50 kDa) und leichte Ketten (25 kDa) der Immunglobuline; S-Protein: kleines Oberflächenprotein; M-Protein: mittleres Oberflächenprotein]

#### 4.1.6.4 Kinetik von anti-GSHc und anti-GSHs

Bei den Tieren 3545 und 3372, die beide eine ausgeprägte Virämie aufwiesen, fand sowohl die Serokonversion zu anti-GSHc als auch anti-GSHs statt (Abb. 25). Anti-GSHc ließ sich ab der 8. (# 3545) bzw. 9. Woche (# 3372) p.i., zeitgleich zum Viruspeak, detektieren und blieb bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes (28 Wochen p.i.) nachweisbar. Anti-GSHs ließ sich zwei (# 3372) bzw. sieben (# 3545) Wochen nach anti-GSHc erfassen und blieb ebenfalls bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes detektierbar. Bei Tier 3533 ließ sich keine spezifische humorale Immunantwort feststellen. Es ließen sich weder GSHc- noch GSHs-spezifische Antikörper nachweisen.

#### 4.1.6.5 Kinetik des Leberenzym SDH (Sorbitol-Dehydrogenase)

Vergleichbar mit den WHV-infizierten Woodchucks, ließ sich bei den mit GSHV inokulierten Tieren die maximale Leberzellzerstörung ebenfalls während der Eliminationsphase des Virus nachweisen. Bei den Tieren 3545 und 3371 war

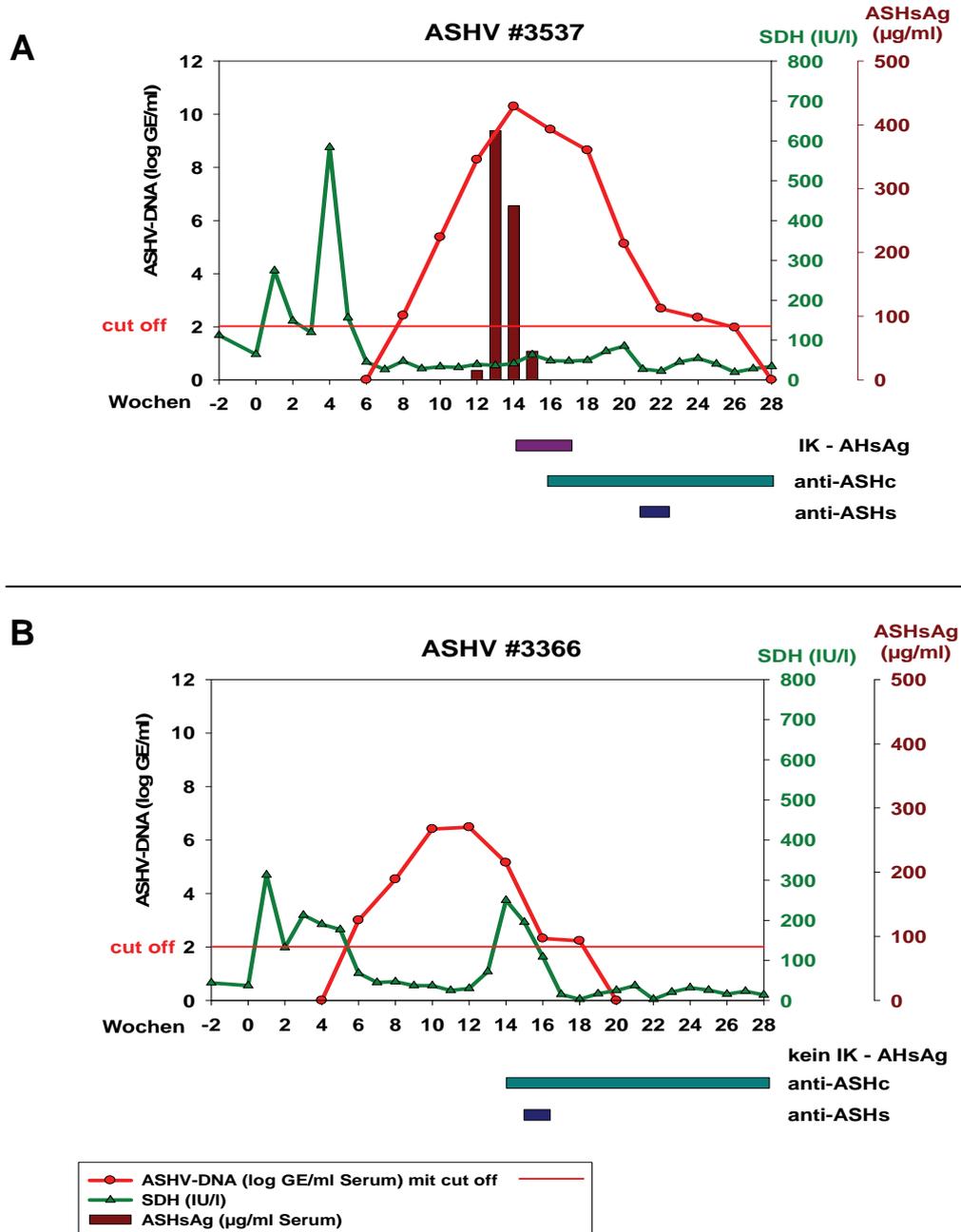
zudem ein kurzzeitiger Anstieg und Abfall während des Viruspeaks zu beobachten (Abb. 25). Die hohen SDH-Konzentrationen von ca. 500 IU/l ließen bei diesen Tieren eine ausgeprägte hepatozelluläre Schädigung erkennen, deren Regeneration sich im Gegensatz zu den mit WHV inokulierten Tieren über einen relativ langen Zeitraum von 8-11 Wochen hinzog. Erstaunlicherweise wies selbst das Tier 3533 eine deutliche Leberbeteiligung mit einem Anstieg der SDH bis zu 272 IU/l auf, obwohl die Infektion im Blut nur schwach ausgeprägt war und das Virus rasch eliminiert wurde.

### **4.1.7 Infektion von Woodchucks mit Arctic Squirrel Hepatitis Virus (ASHV)**

Aus ungeklärten Gründen starb von den ursprünglich drei mit ASHV inokulierten Tieren eines drei Wochen p.i., weshalb nur von zwei Tieren Daten vorliegen.

#### **4.1.7.1 Kinetik der ASHV-DNA**

Im Gegensatz zu den Infektionen mit WHV und GSHV, konnten erste ASHV-Replikate erst sechs (# 3366) bzw. acht Wochen (# 3537) p.i. nachgewiesen werden (Abb. 27). Bei beiden Tieren war ein kontinuierlicher Anstieg und Abfall der Virus-DNA zu beobachten. Bei Tier 3537 stieg die DNA-Konzentration innerhalb von sechs Wochen von initial  $4 \times 10^2$  GE/ml (Wo 8) auf  $3 \times 10^{10}$  GE/ml (Wo 14) an. Die Reduktion der Virus-DNA dauerte bis zur 26. Woche, wobei der letzte positive Wert von 97 GE/ml am Detektionslimit lag. Bei Tier 3366 lag die Konzentration der ersten messbaren Virus-DNA bei  $10^3$  GE/ml (Wo 6). Während der folgenden vier Wochen stieg die DNA-Konzentration auf einen Höchstwert von  $4 \times 10^6$  GE/ml in Woche 10 p.i. an, verblieb auf einem ähnlich hohen Niveau bis Woche 12 und fiel anschließend auf  $2 \times 10^2$  GE/ml in Woche 18 p.i. ab. Danach ließ sich keine Virus-DNA mehr quantifizieren. Die gemessenen Virusmengen (Woche 24 und 26) lagen unterhalb des Detektionslimit von 100 GE/ml.



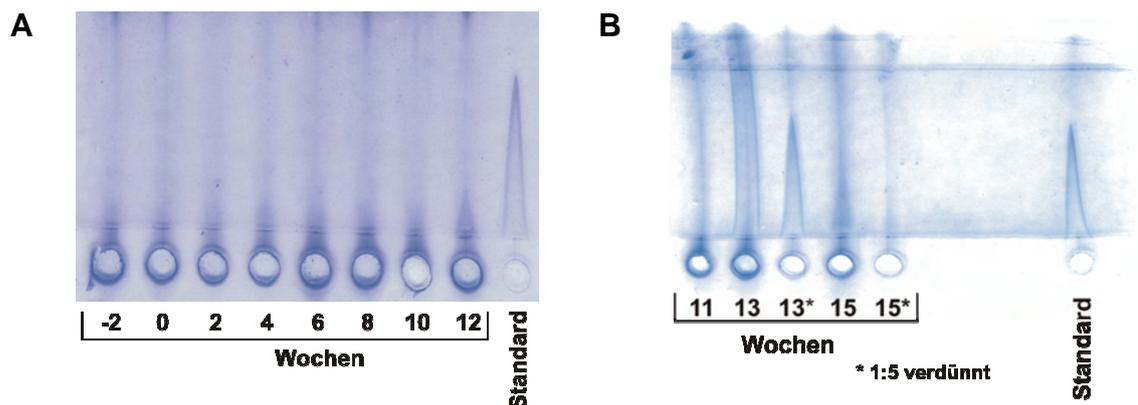
**Abb. 27: Graphische Darstellung akuter Infektionsverläufe von Woodchucks nach Inokulation mit ASHV.**

A: # 3537; B: 3366

In der Auswertung wurden die Daten von ASHV-DNA (cut-off bei  $10^2$  GE/ml; rot), freiem ASHsAg (braune Balken), ASHsAg-Immunkomplexen (IK-ASHsAg; violett), den Antikörpern anti-ASHs (türkis) und anti-ASHc (blau) sowie dem Leberenzym Sorbitol-Dehydrogenase (SDH, grün) einbezogen. Der Zeitraum der Untersuchung betrug 28 Wochen nach Inokulation mit dem Virus.

#### 4.1.7.2 Kinetik des (freien) ASHsAg

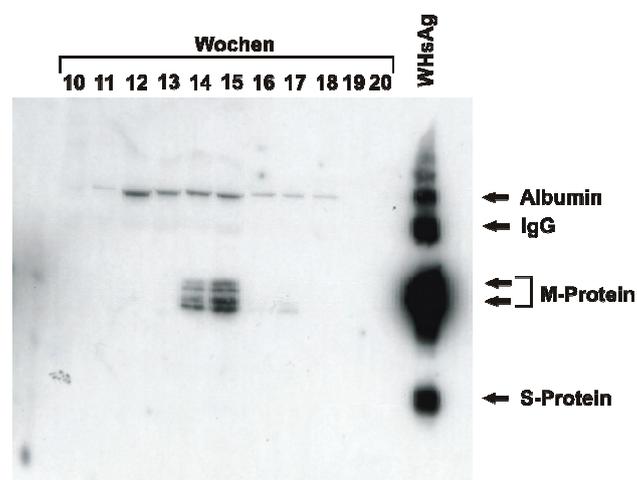
Nur bei Tier 3537 ließ sich freies ASHsAg nachweisen (Abb. 28). Während die initialen Antigenkonzentrationen in Woche 12 noch bei 15 µg/ml Serum lagen, konnte bereits eine Woche später die maximale Konzentration von 391 µg/ml gemessen werden. In den zwei folgenden Wochen sank die ASHsAg-Konzentration auf terminal 45 µg/ml (Wo 15). Anschließend war kein Oberflächenantigen mehr mit der Laurell-Elektrophorese nachzuweisen.



**Abb. 28: Quantifizierung von ASHsAg im Serum mittels Laurell-Elektrophorese (# 3537)**  
Sowohl in Woche 12 (A) als auch in Woche 13 +15 ließ sich ASHsAg nachweisen. Die \* Seren wurden 1:5 in FKS verdünnt. Als Standard wurde ein WHV+ Serum verwendet.

#### 4.1.7.3 Detektion von ASHsAg-Immunkomplexen

Nur beim Tier 3537 waren Immunkomplexe detektierbar (Abb. 29). Die ersten Immunkomplexe ließen sich in Woche 14, zum Zeitpunkt des Viruspeaks, nachweisen. In dieser und der folgenden Woche konnten die meisten Immunkomplexe detektiert werden. Danach zirkulierten die Immunkomplexe noch für zwei weitere Wochen im Serum, wobei das detektierbare Antigen an der Nachweisgrenze lag.



**Abb. 29: Detektion von ASHsAg-Immunkomplexen.**

ASHsAg-Immunkomplexe ließen sich bei dem Tier 3537 mittels Immunoblot nachweisen. Als Standard wurde 0,5 µg hochreines WHsAg eingesetzt. [IgG: schwere (50 kDa) und leichte Ketten (25 kDa) der Immunglobuline; S-Protein: kleines Oberflächenprotein; M-Protein: mittleres Oberflächenprotein]

#### 4.1.7.4 Kinetik von anti-ASHc und anti-ASHs

Wie bei den WHV- und GSHV-Infektionsverläufen fand die Serokonversion zu anti-ASHc vor der Serokonversion zu anti-ASHs statt (Abb. 27). Dabei waren die ersten ASHc-spezifischen Antikörper kurz nach dem Viruspeak in Wo 14 (# 3366) bzw. 16 (# 3537) detektierbar und blieben bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes nachweisbar. ASHs-spezifische Antikörper ließen sich bei beiden Tieren nur über einen kurzen Zeitraum von jeweils zwei Wochen detektieren. Bei Tier 3366 war die Serokonversion zu anti-ASHs in 15. Woche p.i., bei Tier 3537 erst in der 21. Woche nachweisbar.

#### 4.1.7.5 Kinetik des Leberenzym SDH (Sorbitol-Dehydrogenase)

Signifikant bei den mit ASHV inokulierten Tieren war im Vergleich zu den mit WHV und GSHV inokulierten Tieren, ein starker Anstieg der SDH bereits eine Woche p.i. und noch vor Beginn der Replikation des Virus. Der bei den Infektionen mit WHV und GSHV beobachtete typische SDH-Verlauf mit maximalen Konzentrationen während der Elimination des Virus und nach Einsetzen der spezifischen Immunantwort blieb bei dem Tier 3537 weitgehend aus. Nachdem die SDH-Konzentrationen von ursprünglich fast 600 IU/l in Woche 4 p.i. wieder auf physiologische Werte in Woche 6 p.i. fielen, konnte nur noch ein kurzzeitiger, minimaler Anstieg der SDH-Konzentration in den Wochen 19 und 20 auf durchschnittlich 80 IU/l verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu kam es bei Tier 3366 nach dem ersten Anstieg in Woche 1 p.i. auf 313 IU/l zu einem zweiten Peak in Woche 14 p.i. (250 IU/l). Bei beiden Tieren war der zweite SDH-Peak während der Eliminationsphase des Virus zu verzeichnen.

#### 4.1.8 Vergleichende Analyse der Aminosäuresequenz der ASHV- und GSHV-präS1-Domäne von Inokulum und Virusreplikaten (Nachkommen-Viren) im Serum

Auf der präS1-Domäne des großen Oberflächenproteins ist bei dem humanen HBV eine Bindungsdomäne lokalisiert, die eine entscheidende Rolle bei der wirtsspezifischen Interaktion zwischen Virus und Zelle spielt (Neurath et al., 1986; Jin et al., 1996). Um eine mögliche Adaptation von ASHV und GSHV an den Fremdwirt mittels Punktmutation im Virusgenom zu untersuchen, wurden die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der präS1-Domäne beider Virusspezies vor und während der Infektion analysiert. Mit spezifischen Primern wurde

die präS1-Sequenz der für die Infektionen verwendeten Inokulate sowie der entsprechenden Virusreplikate der Nachkommenviren aus den Seren der infizierten Woodchucks amplifiziert und sequenziert (2.6.2 / 3.1.8). Der Vergleich der Sequenzen zeigte keine Unterschiede im amplifizierten Genombereich zwischen Inokulum und Nachkommenviren. Jedoch erwiesen sich die amplifizierten Nukleotidsequenzen von ASHV als nicht identisch mit der einzigen, bereits publizierten Sequenz eines ASHV-Genoms (Testut et al., 1996), was auf einen bisher unveröffentlichten Subtyp schließen lässt. Die Unterschiede in der Aminosäuresequenz des (ASHV)präS1-Bereichs sind in Abb. 30 dargestellt. Auffällig sind eine Insertion von 4 Aminosäuren bei Aminosäure 71 und 12 Austausche im Bereich von AS 70-94.

	1-----10-----20-----30-----40-----50
<b>AGU 29144</b>	<b>MGNNMKVTFNPEKVAAWWPAVGTYTNSTPQDPPVFQPGIYQTTSLVNP</b>
<b>Inokulum</b>	..... <b>I</b> ..... <b>D.K</b> ..... <b>L</b> .....
<b># 3366</b>	..... <b>I</b> ..... <b>D.K</b> ..... <b>L</b> .....
<b># 3537</b>	..... <b>I</b> ..... <b>D.K</b> ..... <b>L</b> .....
	51-----60-----70-----80-----90-----100
<b>AGU 29144</b>	<b>NQOQLEAVLEKRYKQIDWDSL----VNQKLPVSRVPPKSPPQDQRAQTF</b>
<b>Inokulum</b>	..... <b>NWQGF</b> ..... <b>R.V.NLPS.PK.TV</b> .....
<b># 3366</b>	..... <b>NWQGF</b> ..... <b>R.V.NLPS.PK.TV</b> .....
<b># 3537</b>	..... <b>NWQGF</b> ..... <b>R.V.NLPS.PK.TV</b> .....
	101-----110-----120-----130-----140-----149
<b>AGU 29144</b>	<b>EIKPRPIIVPGIRDIPRGIVPPQTPPNRDKGRKPTPQTPPLRDTHPHLN</b>
<b>Inokulum</b>	..... <b>T.Q</b> ..... <b>T</b>
<b># 3366</b>	..... <b>T.Q</b> ..... <b>T</b>
<b># 3537</b>	..... <b>T.Q</b> ..... <b>T</b>

Abb. 30: Vergleich der Aminosäuresequenzen des ASHV-präS1-Bereichs zwischen Inokulum, Nachkommenviren aus den Seren der Tiere # 3366 und # 3537 und publizierter Genomsequenz AGU 29144 (Testut et al., 1996).

#### 4.1.9 Isolierung subviraler Partikel von WHV, GSHV und ASHV aus positiven Woodchuckseren

Aus verschiedenen Seren akut sowie chronisch infizierter Woodchucks wurden mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation virusspezifische subvirale Partikel aufgereinigt. Zum einen handelte es sich dabei um die Seren der Tiere, die im Rahmen dieser Arbeit mit WHV, GSHV bzw. ASHV inokuliert wurden und hohe Oberflächenantigen-Mengen aufwiesen. Zum anderen wurden dem Institut

freundlicherweise von Dr. Stephan Menne (College of Veterinary Medicine der Cornell University, Ithaca, NY, USA) mehrere WHsAg-positive Seren von chronisch infizierten Woodchucks zur Verfügung gestellt, die als Kontrolle dienten (Tabelle 5).

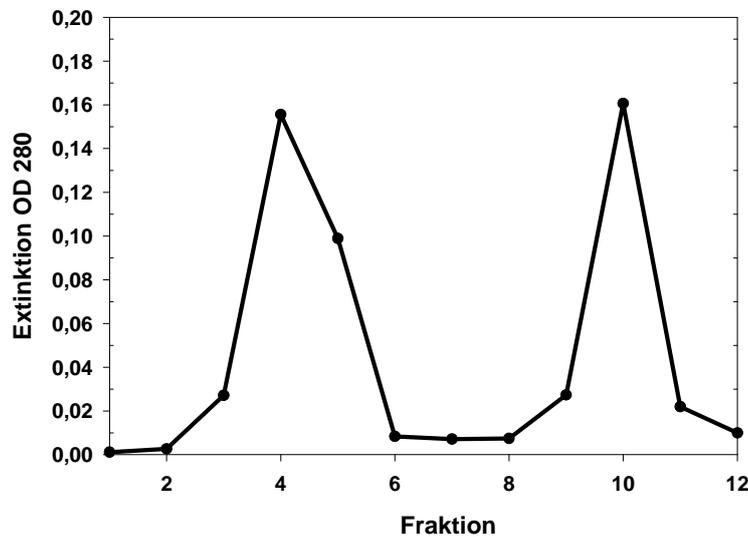
**Tabelle 5: Übersicht der Seren, aus denen mittels Dichtegradientenzentrifugation subvirale Partikel isoliert wurden**

<b>Serum Nr.:</b> (Woche p.i.)	<b>Virus- spezies</b>	<b>Infektions- verlauf</b>	<b>Konzentration WHsAg (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
6328	WHV	chronisch	1261
5375	WHV	chronisch	801
5413	WHV	chronisch	729
3539 (Wo 4)	WHV	akut	414
3538 (Wo 4)	WHV	akut	117
3538 (Wo 5)	WHV	akut	367
3545 (Wo 6)	GSHV	akut	354
3545 (Wo 8)	GSHV	akut	365
3537 (Wo 14)	ASHV	akut	273

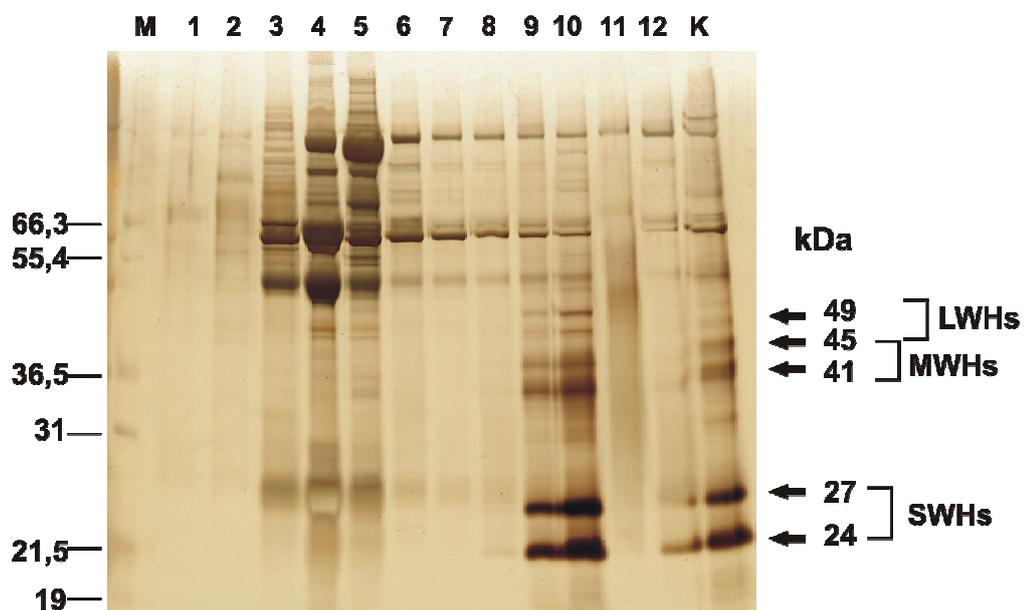
Ziel war es, die Struktur der gereinigten, virusspezifischen subviralen Partikel im silbergefärbten SDS-Gel und im Western Blot miteinander zu vergleichen. Insbesondere sollten die Oberflächenproteinmuster von GSHV und ASHV charakterisiert werden, die im Gegensatz zum bekannten Oberflächenproteinmuster von WHV bisher nur teilweise analysiert werden konnten.

Die Isolierung der virusspezifischen subviralen Partikel erfolgte in zwei Aufreinigungsschritten in der Ultrazentrifuge. Durch Pelletierung des Serums durch ein Saccharosekissen und die nachfolgende Reinigung in einem diskontinuierlichen Cäsiumchloridgradienten wurden die subviralen Partikel von den Virionen und Serumproteinen (z.B. Globuline, Albumin) getrennt (3.1.4). Die anschließende photometrische Bestimmung der Proteinverteilung (OD 280) in den einzelnen Fraktionen des Cäsiumchlorid-Gradienten ergab bei allen Gradienten eine typische Verlaufskurve mit zwei deutlichen Peaks. Der erste Peak lag bei den Fraktionen 3 bis 5, der zweite zeigte sich in Fraktion 10 oder den beiden angrenzenden Nachbarfraktionen (Abb. 31). In Anbetracht der Tatsache, dass die CsCl-Dichte im Gradienten mit steigender Fraktionsnummer abnimmt und subvirale Partikel von WHV und GSHV sich bei einer CsCl-Dichte von 1,18 g/ml an-

reichern (Gerlich et al., 1980; Feitelson et al., 1982) war anzunehmen, dass es sich bei dem zweiten Peak um das isolierte Oberflächenprotein handelt.



**Abb. 31: Proteinverteilung der Plasmaproteine im Cäsiumchlorid-Gradienten**  
Photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 280 nm.



**Abb. 32: Proteinverteilung der Plasmaproteine im fraktionierten Cäsiumchlorid-Gradienten [Aufreinigung subviraler Partikel aus einem WHV positiven Woodchuckserum (# 3539)]**

Elektrophoretische Auftrennung der Fraktionen 1-12 des Cäsiumchlorid-Gradienten im SDS-Gel und anschließende Silberfärbung der Proteine. Als Kontrolle (K) wurde 0,5µg gereinigtes WHsAg in die Elektrophorese eingesetzt. Durch die Dichtegradientenzentrifugation ergibt sich ein spezifisches Verteilungsmuster. Der Hauptanteil subviraler Partikel befindet sich in den Fraktionen 9+10. SWHS, MWHs, LWHS: kleines, mittleres und großes WHV-Oberflächenprotein. Bei den Fraktionen 3-5 handelt es sich um Albumin- und Globulinreiche Fraktionen. (Marker (M) in kDa: Mark12<sup>TM</sup>; Invitrogen)

Für eine genauere Charakterisierung der Proteine wurden je 10 µl der Fraktionen 1-12 in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Silbernitrat gefärbt. Im silbergefärbten Gel wurde das typische Verteilungsmuster der Proteine sichtbar gemacht. Bei den proteinreichen Fraktionen 3 bis 5 handelte es sich hauptsächlich um Albumin (66 kDa), Immunglobuline, High density lipoprotein und Low density lipoprotein, den Hauptproteinbestandteilen des Serums. Fraktion 10 und die angrenzenden Nachbarfraktionen enthielten jeweils die zu isolierenden virusspezifischen subviralen Partikel, mit dem großen, mittleren und kleinen Oberflächenprotein (Abb. 32).

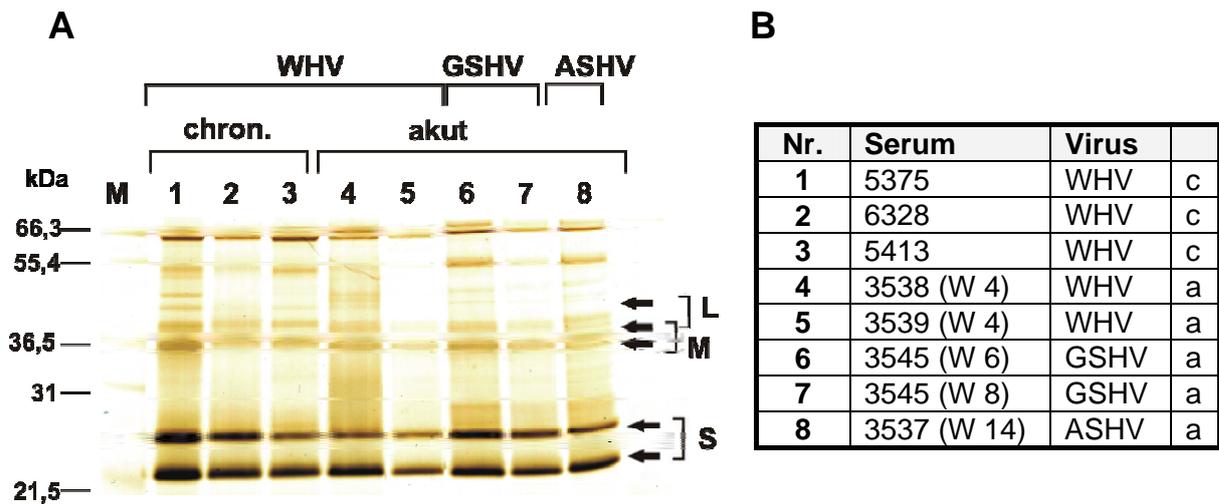
Die sAg-positiven Fraktionen wurden vereinigt und die subviralen Partikel mittels Ultrafiltration in einem Mikrokonzentratoren vom Cäsiumchlorid gereinigt und aufkonzentriert. Nach Messung der optischen Dichte des Retentats bei 280 nm im Photometer, wurde mit der Formel  $5,1 \text{ OD } 280 = 1 \text{ mg/ml WHsAg}$  (Tolle et al., 1998) die Konzentration der gereinigten subviralen Partikel bestimmt. (3.1.4.4)

#### **4.1.10 Charakterisierung der gereinigten Oberflächenproteine von WHV, GSHV und ASHV**

Die aus den verschiedenen Woodchuckseren (Tabelle 5) gereinigten subviralen Partikel, sollten nun mit spezifischen Antiseren näher charakterisiert werden. Um die Proteinstruktur der drei virusspezifischen Oberflächenproteine (S-, M- und L-Protein) zu analysieren, wurden jeweils gleiche Mengen subviraler Partikel in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mit verschiedenen Nachweisverfahren (Visualisierung der Proteine mittels Silberfärbung sowie Detektion der M- und L-Proteine im Immunoblot) wurden die Oberflächenproteine analysiert.

##### **4.1.10.1 SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung**

Dem Schema B in Abbildung 33 entsprechend wurden jeweils 0,5 µg der gereinigten, virusspezifischen subviralen Partikel in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine mittels Silberfärbung visualisiert.



**Abb. 33 A: Proteinmuster der viruspezifischen gereinigten Oberflächenproteine**

Elektrophoretische Auftrennung im SDS-Gel und anschließende Silberfärbung der gereinigten Oberflächenproteine von WHV (1-5), GSHV (6, 7) und ASHV (8). Es wurde jeweils 0,5 µg in die Gelelektrophorese eingesetzt. [M: Mark12™ Wide Range Protein Standard (kDa)]

**B:** Dem in der Tabelle dargestellten Schema entsprechend, wurden die aus den jeweiligen Seren aufgereinigten Oberflächenproteine in die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. (Nr.: Proben-Nr. im Gel; c=chronisch; a=akut)

Das Proteinmuster der Oberflächenproteine von WHV ist bereits früher analysiert worden (Tolle et al., 1998) und ließ sich in dieser SDS-Gelelektrophorese bestätigen. Durch die Silberfärbung wurden besonders die beiden Proteinbanden zwischen 21 und 31 kDa stark angefärbt. Hierbei handelte es sich um das unglykosilierte und einfach N-glykosilierte S-Protein, mit einem jeweiligen Molekulargewicht von 24 kDa und 27 kDa. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich das Proteinmuster des S-Protein von WHV, nicht wesentlich von dem der S-Proteine von GSHV und ASHV unterscheidet.

Die beiden Banden über dem S-Protein sind dem M-Protein zuzuordnen. Das M-Protein von WHV (MWHs) ist mehrfach N- und O-glykosiliert und bandiert entsprechend des Molekulargewichtes bei 41 kDa und 45 kDa (Tolle et al., 1998). Aus dem Vergleich von MWHs mit den M-Proteinen von GSHV (MGSHs) und ASHV (MASHs) lassen sich Rückschlüsse auf deren Größe und Struktur ziehen. Es ist erkennbar, dass MWHs und MGSHs in ihrem Bandenmuster und der Größe identisch sind. Interessanterweise weist das M-Protein von ASHV, trotz enger phylogenetischer Verwandtschaft von GSHV und ASHV, eine differente Struktur auf. Statt der beiden Einzelbanden, lassen sich zwei Doppelbanden detektieren.

Das L-Protein lässt sich durch die Silberfärbung der Proteine nicht eindeutig nachweisen. Das L-Protein von WHV (LWHS) liegt sowohl in einer unglykosilierten als auch einer einfach N-glykosilierten Form vor und bandiert bei 45 kDa und 49 kDa (Tolle et al., 1998). Durch die Überlappung des unglykosilierten L-Proteins mit dem mehrfach glykosilierten M-Protein, kann nur die Bande des glykosilierten L-Proteins detektiert werden. Eine Aussage über Strukturunterschiede der virusspezifischen L-Proteine lässt sich aufgrund der schwachen Färbung nicht treffen.

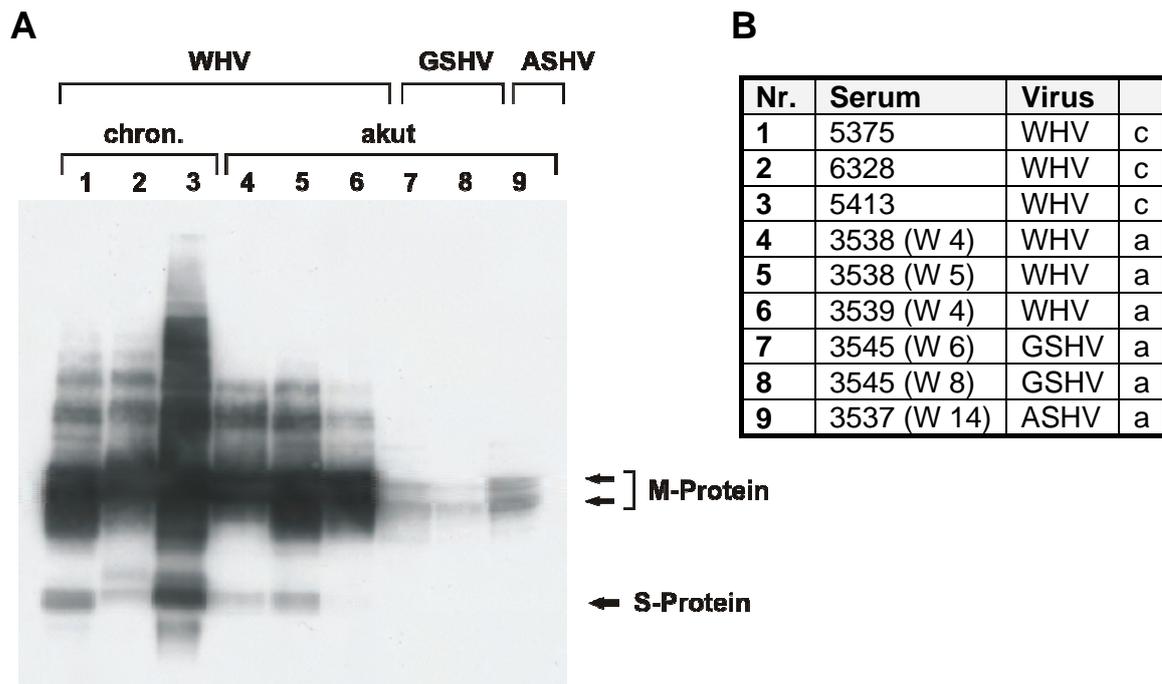
Letztendlich konnten auch keine Unterschiede im Verteilungsmuster der Oberflächenproteine während der akuten und chronischen Infektion mit WHV festgestellt werden. Sowohl in den chronisch als auch akut mit WHV infizierten Tieren ist das S-Protein vorherrschende Fraktion der subviralen Partikel im Serum. Auch im Verlauf der akuten Infektion scheint sich das Verteilungsmuster der Oberflächenproteine nicht wesentlich zu verändern (siehe GSHV 6+7).

#### **4.1.10.2 Charakterisierung des mittleren Oberflächenproteins (M-Protein)**

Die selektive Detektion des mittleren Oberflächenproteins erfolgte mit dem polyklonalen anti-WHs Antiserum 2722. Während dieses Antiserum unter nativen Bedingungen konformationell mit dem kleinen Oberflächenprotein (S-Protein) reagiert, detektiert es bei denaturiertem WHsAg hauptsächlich das mittlere Oberflächenprotein. Bei der Erkennungssequenz spielt die starke Glykosylierung des M-Proteins eine Rolle (Tolle et al., 1998).

Dem Schema B in Abbildung 34 entsprechend wurden jeweils 1 µg der gereinigten subviralen Partikel in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend im Immunoblot detektiert. Wie bereits beschrieben, ist die Struktur des M-Proteins des WHsAg bekannt. Die beiden mit dem Antiserum 2722 detektierten Banden, konnten dem mehrfach glykosilierten M-Protein zugeordnet werden. Bei den mit WHV infizierten Tieren ließ sich noch eine weitere Bande nachweisen, die dem einfach glykosilierten S-Protein entsprach.

Da das Antiserum gegen WHsAg generiert wurde, war die Sensitivität für GSHsAg und ASHsAg eingeschränkt, wie man an der Signalstärke im Western Blot erkennen kann. Trotzdem konnte die für das M-Protein von WHsAg beschriebene Doppelbande auch bei GSHV und ASHV detektiert werden.



**Abb. 34 A: Detektion des mittleren Oberflächenproteins (M-Protein) von WHV, GSHV und ASHV.**

Der Nachweis des M-Proteins im Western Blot erfolgte mit einem anti-WHVs Antiserum. Die viruspezifischen subviralen Partikel wurden wie folgt aufgetragen: WHV (1-6), GSHV (7+8) und ASHV (9).

**B:** Dem in der Tabelle dargestellten Schema entsprechend, wurden die aus den jeweiligen Seren aufgereinigten Oberflächenproteine in die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. (Nr.: Proben-Nr. im Gel; W: Woche p.i.; c: chronisch; a: akut)

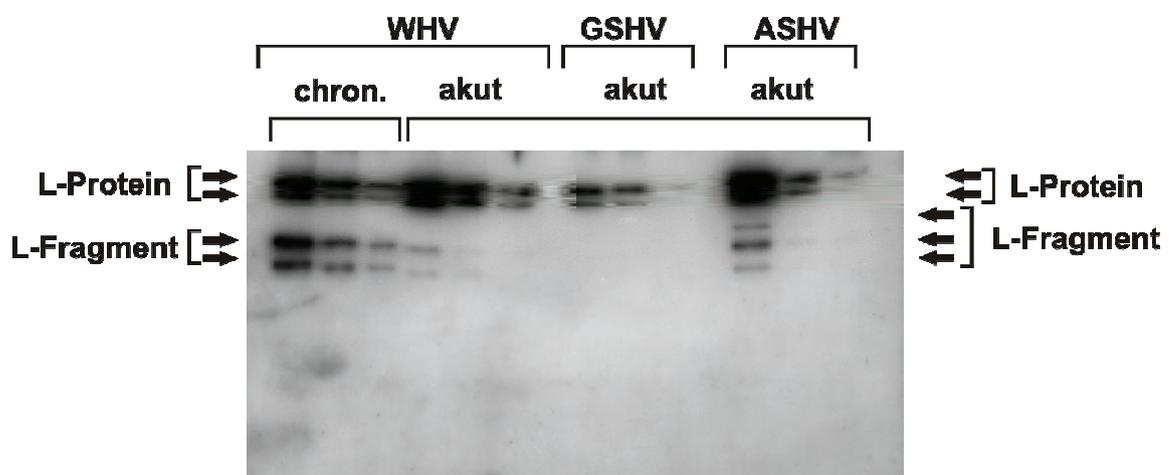
#### 4.1.10.3 Charakterisierung des großen Oberflächenproteins (L-Protein)

Die gereinigten subviralen Partikel aus den Seren eines chronischen (# 5413) sowie akut (# 3539) mit WHV infizierten Woodchucks sowie eines mit GSHV (# 3545) und ASHV (# 3537) infizierten Tieres wurden jeweils in drei Verdünnungen (1µg; 0,5µg, 0,25µg) auf ein SDS-Gel aufgetragen und das L-Protein anschließend im Western Blot nachgewiesen (Abb. 35). Für die Detektion des L-Proteins wurde ein Peptidantiserum verwendet, welches gegen die Aminosäuren 126–146 des präS1-Bereichs von WHV generiert wurde.

Das für das L-Protein von WHV beschriebene Proteinmuster, mit einer unglykosilierten (45 kDa) und einer glykosilierten (49 kDa) Form (Tolle et al., 1998), konnte auch bei den anderen beiden Virusspezies nachgewiesen werden. Daraus lässt sich ableiten, dass das L-Protein von GSHV und ASHV wahrscheinlich ebenso in einer unglykosilierten (45 kDa) und einer glykosilierten (49 kDa) Form vorliegt. Die stärkere Färbung der oberen Bande, die insbesondere in den

unteren Verdünnungsstufen deutlich wird, lässt darauf schließen, dass die glykosilierte Form des L-Proteins dominiert.

Neben der dem L-Protein zugeordneten Doppelbande, ließen sich bei drei Tieren weitere Banden detektieren, die möglicherweise Degradationsprodukten des L-Proteins entsprechen. Dabei konnte insbesondere bei den chronisch WHV infizierten Tieren eine weitere Doppelbande nachgewiesen werden, die bei den akut WHV infizierten Tieren weitaus schwächer war. Das L-Fragment, welches sich bei den mit ASHV infizierten Tieren detektieren ließ, ging dagegen mit einem Dreibandemuster mit dominierender Mittelbande einher.



**Abb. 35: Detektion des großen Oberflächenproteins (L-Protein) von WHV, GSHV und ASHV.**

Der Nachweis erfolgte im Western Blot mit einem Peptidantiserum, das gegen die präS1-Domäne des L-Proteins gerichtet war. Auf das SDS-Gel wurden jeweils drei Verdünnungen (1µg; 0,5 µg, 0,25 µg) der gereinigten virusspezifischen Oberflächenproteine aufgetragen.

## **4.2 Verwendung transgener Pflanzen zur Produktion von Impfstoffen gegen das Hepatitis B Virus**

Mit WHV infizierte Woodchucks stellen das derzeit praktikabelste Tiermodell für die HBV-Infektion dar, um die Effizienz neuer Impfstoffe zu evaluieren. Eine neuartige Strategie ist die Produktion von Subunit-Vakzinen in transgenen, essbaren Pflanzen, die praktisch direkt über die Aufnahme der Antigen-exprimierenden Pflanze oral appliziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten transgene Pflanzen generiert werden, die als Antigen WHsAg exprimieren, um sie anschließend im Woodchuck-Modell zu testen. Dafür sollten Plasmide kloniert werden, die die entsprechenden Gene enthielten. Anschließend sollten die Plasmide in Pflanzenzellen transformiert und die Expression von WHsAg in den Pflanzen getestet werden. Die Versuche wurden in Kooperation mit Dr. J. Imani (Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der Justus-Liebig-Universität Giessen) durchgeführt, der die Transformation der Plasmide sowie die Aufzucht der Pflanzen übernahm. Als geeignete Pflanze kam die Karotte in Frage, da sie im Gegensatz zu den bisher verwendeten Pflanzen den Vorteil hat, dass sie weltweit einfach kultivierbar und lange lagerfähig ist sowie in rohem Zustand verzehrt werden kann. Durch Imani et al. (2002) konnte bereits die Expression von HBsAg (SHBs) in Karottenzellkulturen (Suspensionskulturen und Kalluskulturen) demonstriert werden. Dabei wurden mit einem HBsAg-spezifischen ELISA Expressionsraten von durchschnittlich 25 ng HBsAg pro g Karottenzellpellet ermittelt (Imani et al., 2002). Da mit dem ELISA nur ein quantitativer Nachweis des in Karotten generierten HBsAg gelang, sollte in Anknüpfung an diese Versuche der qualitative Nachweis subviraler Partikel erfolgen. Dafür sollten die HBsAg-Partikel aus den Pflanzen isoliert und im Western Blot detektiert werden.

### **4.2.1 Nachweis der Expression von HBsAg (SHBs) in Karottenzell-Suspensionskulturen**

Das Plasmid, mit der für das SHBs kodierenden Expressionskassette, wurde von Andreas Berting am Institut für Medizinische Virologie (jetzt Fa. Baxter, Wien) kloniert. Es handelt sich dabei um den HBV Genotyp A2 (HBsAg Subtyp adw2, EMBL-Nummer: AJ012207 HBV012207) (Imani et al., 2002).

Drei HBsAg produzierende Karottenzell-Klone (Nr. 1, 9 und 10), die in Vorversuchen eine gute Expression von HBsAg zeigten, wurden von Dr. J. Imani selektiert und in einer Suspensionskultur unter Einfluss des Phytohormons Auxin vermehrt. Als Negativkontrolle diente unbehandelte Karottenzellsuspension. Für die anschließende Aufreinigung des HBsAg wurden die Zellen abzentrifugiert und in Flüssigstickstoff tiefgefroren.

#### 4.2.1.1 Extraktion und Aufreinigung von HBsAg-Partikeln aus Karottenzell-Suspensionskultur mittels Dichtegradientenzentrifugation

Es wurden jeweils 10 g der tiefgefrorenen Karottenzellen für die Aufreinigung und Isolierung der HBsAg-Partikel verwendet. Die Pflanzenzellen wurden sowohl mechanisch (Mörser) als auch mit Ultraschall aufgebrochen. Die im ER gebundenen Partikel wurden mit einem Digitonin- und Triton X100-haltigen Puffer extrahiert (Jefferson et al., 1987, modifiziert nach Imani et al., 2002). Die Isolierung und Aufreinigung des HBsAg erfolgte über einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten in der Ultrazentrifuge (3.2.7).



- ← **Fraktionen 37-39**
- ← **Fraktionen 25-36**
- ← **Fraktionen 13-24**
- ← **Fraktionen 1-12**

**Abb. 36: Fraktionierter Saccharose-Dichtegradient zur Isolierung subviraler Partikel aus transgenen Karotten**  
(Die Fraktionen 1-12 befinden sich in der ersten Reihe.)

---

Von den ersten 20 Fraktionen jedes Gradienten wurden refraktometrisch die Saccharosedichte und photometrisch der Proteingehalt bestimmt und in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen. Die Hauptmasse der Proteine befand sich bei allen Gradienten, einschließlich der Negativkontrolle, in den Fraktionen 4, 5 und 6. Wie man den Tabellen und Diagrammen entnehmen kann, korrelier-

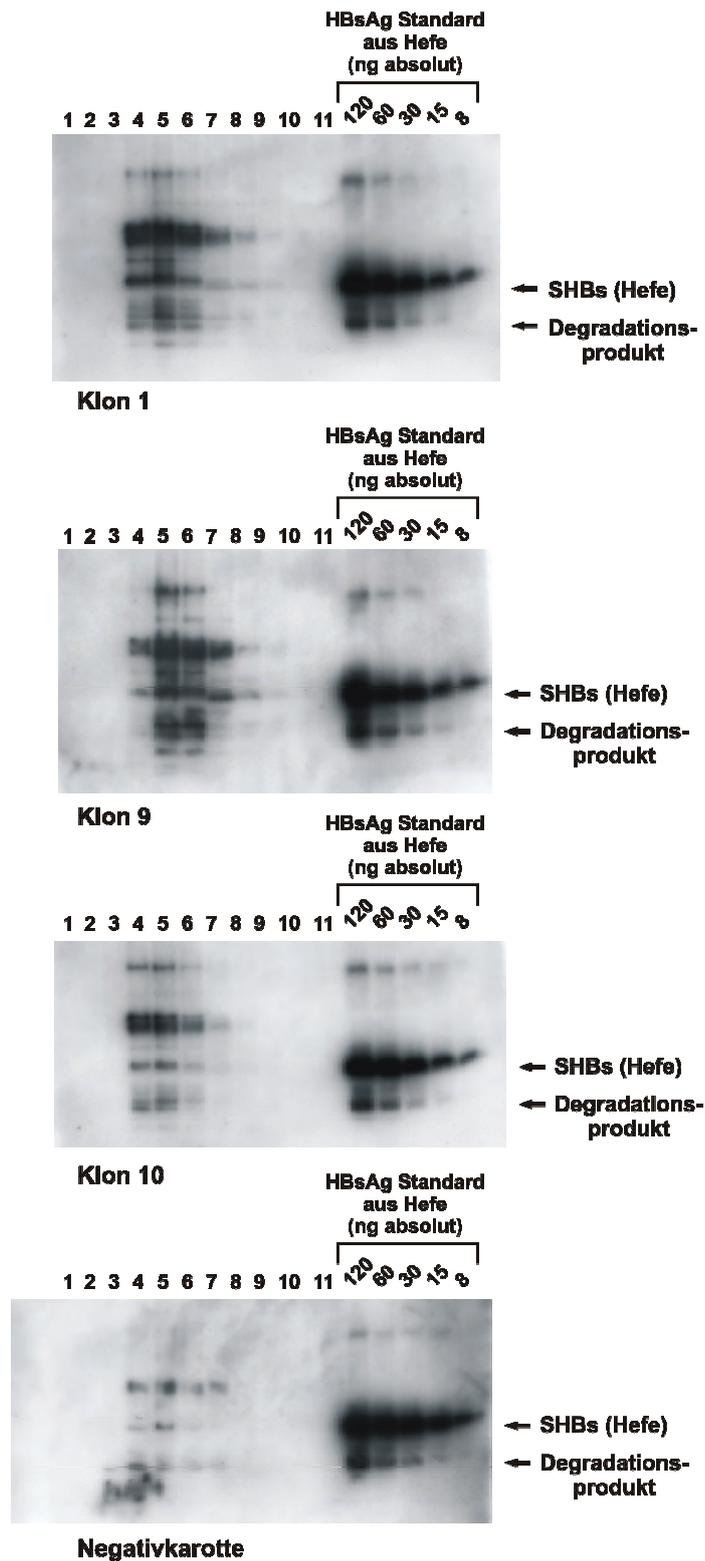
te sie mit Saccharosedichten von 40 bis 50% (Tabellen 12 A-D/Abb. 44 A-D, Anhang). Da diese Fraktionen sehr chlorophyllreich waren, handelt es sich bei den erfassten Proteinen wahrscheinlich um pflanzliches Chloroplastin, einem Chromoprotein (komplexe Chlorophyll-Eiweißverbindung) (Abb. 36).

Für eine spezifischere Analyse der HBsAg-Expression in den Pflanzenzellen, wurden die ersten Fraktionen mittels Immunoblot untersucht.

#### **4.2.1.2 Nachweis von HBsAg (SHBs) im Western Blot nach denaturierender SDS-PAGE**

Zur genaueren Charakterisierung der in der Pflanze synthetisierten, viralen Oberflächenproteine, wurden jeweils 10 µl der Fraktionen 1-11 in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Standard wurden aus Hefe gereinigtes HBsAg-Partikel in einer Verdünnungsreihe (8-120 ng absolut) eingesetzt. Anschließend wurde das HBsAg mit dem monoklonalen Antikörper HB1 detektiert, der mit denaturiertem SHBs sequenzspezifisch reagiert.

Bei allen vier Gradienten (1, 9, 10 und Negativkontrolle) erbrachten insbesondere die Fraktionen 4-7 ein Signal (Abb. 37). Jedoch reagierte der Antikörper mit den Fraktionen der unbehandelten Karottenzellsuspension deutlich schwächer. Da eine Kontamination bei der Aufreinigung ausgeschlossen werden kann, ist anzunehmen, dass der Antikörper mit bestimmten Pflanzenproteinen kreuzreagierte. Dafür spricht auch das vielschichtige Bandenmuster mit zwei Haupt- und mehreren Nebenbanden, die einen eindeutigen Nachweis des HBsAg verhindern.



**Abb. 37: Nachweis von HBsAg (SHBs) aus transgenen Karotten-Suspensionskulturen**  
 Elektrophoretische Auftrennung der Proteine im SDS-Gel und anschließende Detektion des HBsAg im Immunoblot. Als Proben wurden die Fraktionen 1-11 der Saccharose-Dichtegradienten der SHBs-Klone 1, 9 + 10 und der Negativkontrolle (unbehandelte Karottenzellsuspension) eingesetzt. Als Standard wurden gereinigte HBsAg-Partikel (SHBs) aus Hefe verwendet.

#### 4.2.1.3 Nachweis von HBsAg-Partikeln im Western Blot nach nativer Agarosegel-Elektrophorese

Da der Antikörper HB1 mit denaturiertem Protein aus Pflanzenextrakten zu unspezifisch im Western Blot reagierte, wurde als nächstes versucht, native HBsAg-Partikel mittels Western Blot nachzuweisen. Auf ein 1% Agarosegel wurden jeweils 10 µl der Fraktionen 3-10 der vier Gradienten aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Kapillarblot auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper C 20/2, der konformationell mit den Epitopen der antigenen Determinante (a-Determinante) der subviralen Partikel reagiert. Als Standard dienten hochreine, in Hefe generierte HBsAg-Partikel.

In den SHBs-Klonen 1, 9 und 10 ließen sich subvirale Partikel nachweisen (Abb. 38). Besonders HBsAg-reich waren die Fraktionen 6-9 der Klone 1 und 9 sowie die Fraktionen 5-7 des Klons 10. Anhand der Verdünnungsreihe gereinigter subviraler Partikel aus Hefe lässt sich erkennen, dass sich Mengen ab 40 ng gut mit dem Antikörper C 20/2 detektieren ließen. Die densitometrische Auswertung der Chemilumineszenzsignale mit der PC-Software „Image Quant“ ermöglichte die Quantifizierung der HBsAg-Partikel in den positiven Fraktionen. Die errechneten HBsAg-Konzentrationen pro ml Fraktion (A) bzw. pro g Karottenzellpellet (Suspensionskultur) (B) sind in Tabelle 6 A+B dargestellt.

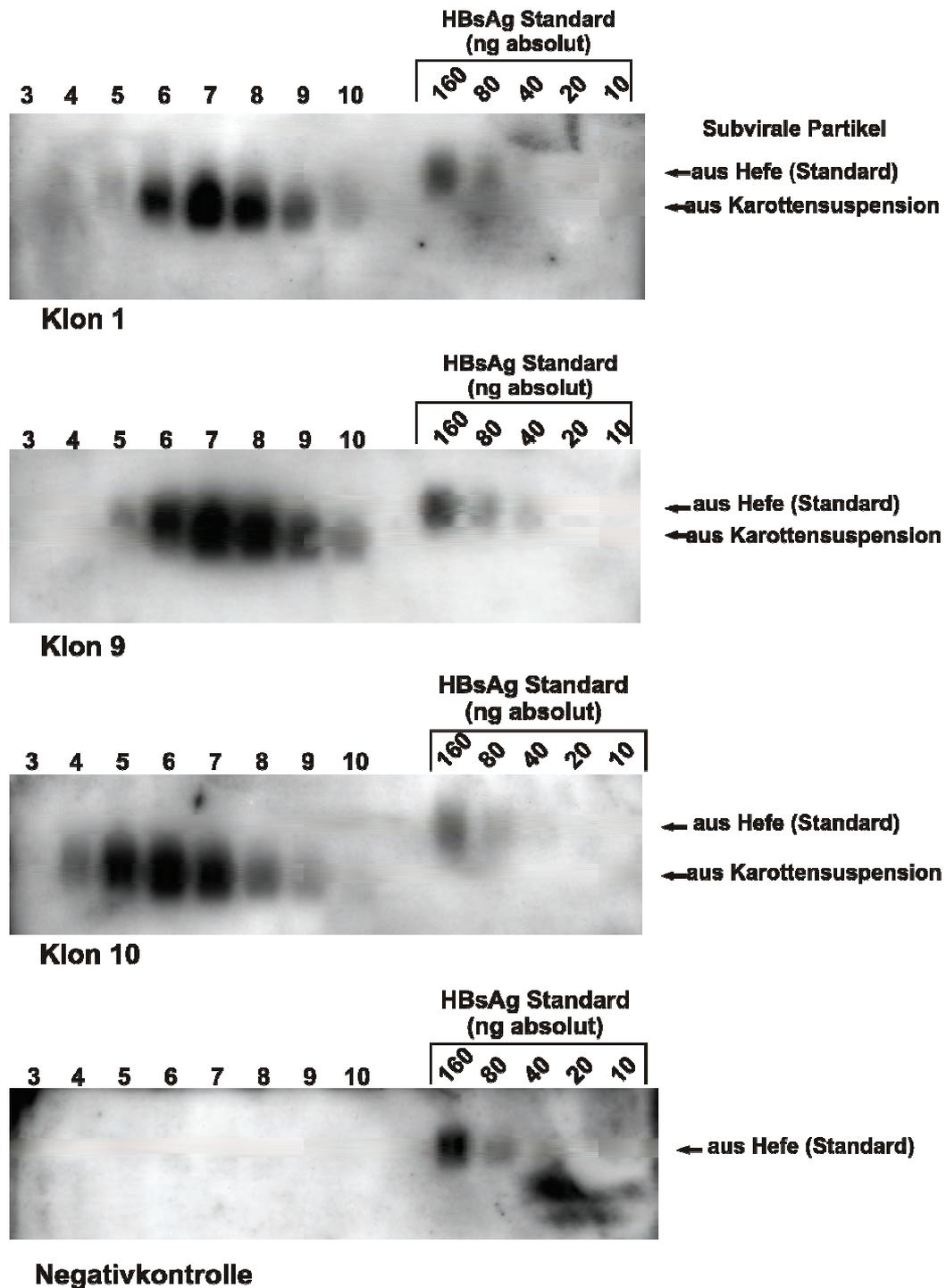
**Tabelle 6 A: Quantifizierung von HBsAg (µg/ml) mit Hilfe der PC-Software Image Quant**

Grundlage dieser Auswertung ist die densitometrische Berechnung der Stärke jedes einzelnen Chemilumineszenzsignals. Durch eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen wird die Quantifizierung ermöglicht.

Fraktion	HBsAg (µg/ml)		
	Klon 1	Klon 9	Klon 10
4			19,7
5	0	12,2	32,2
6	23,4	24,6	35,8
7	47,9	29,2	31,6
8	35,2	27,4	19,5
9	15,2	19,7	13
10	1,7	11,8	

**Tabelle 6 B: HBsAg (µg/g Karottenzellpellet aus Suspensionskultur)**

Klon	HBsAg gesamt (µg) pro g Karottenzellpellet
1	12,3
9	12,5
10	15,2



**Abb. 38: Nachweis von HBsAg-Partikeln aus transgenen Karotten-Suspensionskulturen**  
 Elektrophoretische Auftrennung der Proteine im nativen Agarosegel und anschließende Detektion der subviralen Partikel mittels Immunoblot. Als Proben wurden die Fraktionen 3 – 10 der Dichtegradienten der SHBs-Klone 1, 9 und 10 sowie der Negativkontrolle (unbehandelte Karottenzellsuspension) eingesetzt. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe hochreiner, in Hefe generierter HBsAg-Partikel aufgetragen.

Es ist auffällig, dass die Banden von Standard-HBsAg und Karotten-HBsAg in ihrer Höhe differieren. Dabei wanderten die in Pflanzen generierten HBsAg-Partikel schneller im Agarosegel als die in Hefe generierten HBsAg-Partikel.

#### 4.2.1.4 Detektion des HBsAg mittels ELISA

Mit Hilfe eines HBsAg-spezifischen Sandwich-ELISA konnte das Ergebnis des Immunoblot bestätigt werden. Die Bindung der HBsAg-Partikel an die stationäre Phase erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper C 20/2 (W. H. Gerlich, Gießen). Zur Detektion des HBsAg wurde der Antikörper anti-HBs-POD (Dade Behring, Marburg) verwendet. Getestet wurden die Fraktionen 3–14 der vier Gradienten, wobei die Fraktionen 5/6 – 9 der Klone 1, 9 und 10 HBsAg positiv waren (Tabelle 7). Als Standard dienten aus HBV-positivem Plasma gereinigte subvirale Partikel. Das Detektionslimit lag bei 0,5 ng HBsAg pro ml.

**Tabelle 7: Detektion von HBsAg (ng/ml) mittels ELISA**

Die Fraktionen 3 -14 der Dichtegradienten der SHBs-Klone 1, 9, 10 und der Negativkontrolle wurden im ELISA getestet. Die HBsAg positiven Fraktionen sind farbig markiert.

Fraktion	HBsAg (ng/ml)			
	Klon 1	Klon 9	Klon 10	Negativkontrolle
3	0,1	0	0,1	0
4	0,05	0,07	0,4	0,05
5	0,73	0,21	4,2	0,12
6	4,27	5,12	7,4	0,08
7	3,02	3,75	4,1	0,1
8	1,22	3,06	2	0,01
9	0,54	0,94	0,6	0,1
10	0,08	0,21	0,2	0,29
11	0,07	0,06	0	0
12	0,05	0,1	0	0,1
13	0,02	0,06	0	0,12
14	0,05	0,02	0	0,07

#### 4.2.2 Nachweis der Expression von WHsAg in Tabakpflanzen

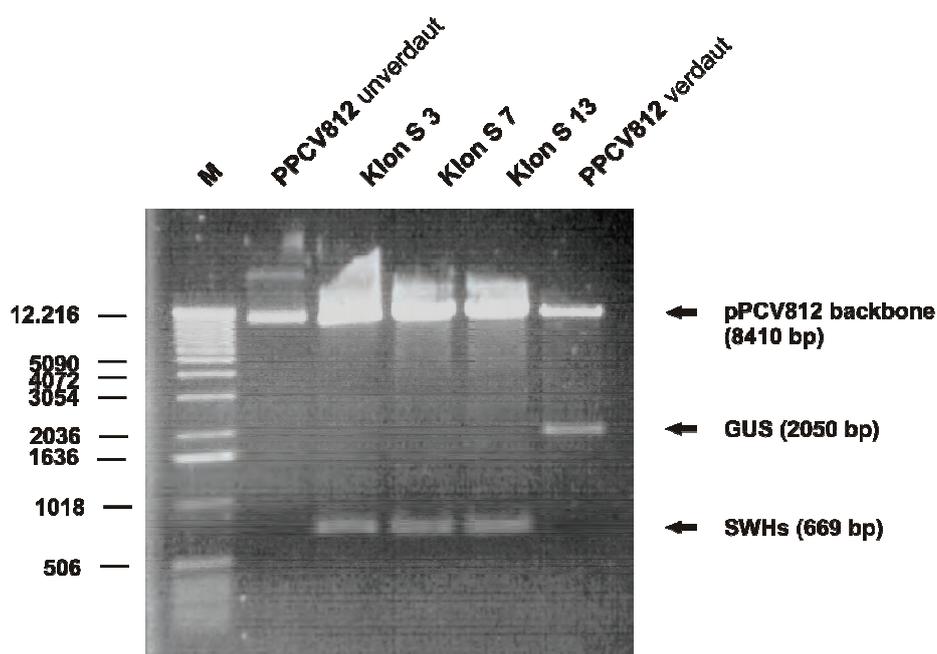
Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich HBsAg in transgenen Karottenzellen relativ gut exprimieren ließ, sollten diese Versuche nun auf der Woodchuck-Tiermodell-Ebene mit der Expression von WHsAg in transgenen Pflanzen fortgeführt werden. Dafür mussten zunächst Plasmide generiert werden, die die für

die drei WHV-Oberflächenproteine (SWHs, MWHs, LWHs) codierenden Gene enthielten.

#### 4.2.2.1 Klonierung der für die Oberflächenproteine SWHs-, MWHs- und LWHs-codierenden Gene des Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) in den Vektor pPCV812

Für die Klonierung wurde der Vektor pPCV812 verwendet, der einen durch das Pflanzenhormon Auxin induzierbaren Promotor besitzt (3.2.1.1). Die der Nährlösung zugefügte Hormonkomponente steigert die Expression des jeweiligen Proteins, welches durch das hinter dem Promotor liegende Gen codiert wird.

Die für die drei WHV-Oberflächenproteine codierenden Gene wurden aus dem Plasmid WHV2-Dimer (Referenzgenom: Kodama et al., 1985), welches zwei hintereinander geschaltete WHV-Genome beinhaltet, amplifiziert (3.2.2.1) und jeweils anstelle des Glucuronidase-Gens (GUS) in den Vektor pPCV812 integriert (3.2.3.1).



**Abb. 39: Nachweis der Integration der SWHs-Expressionskassette (669 bp) in den Vektor pPCV812.**

Es wurden drei verschiedenen Klone mittels Kontrollverdau getestet (S 3, S 7, S 13). Die SWHs-Expressionskassette wurde mit den Restriktionsenzymen *Sma*I und *Sac*I aus der multiple cloning site des Vektors herausgeschnitten. Als Kontrolle diente der Verdau des Vektors pPCV812. Das zwischen den Restriktionsschnittstellen von *Sma*I und *Sac*I liegende Glucuronidase-Gen (GUS) (2050 bp) wurde bei der Klonierung durch das SWHs-Gen ersetzt. [M: Marker 1kb DNA Ladder (in bp)]

Nach der Transformation der drei Plasmide in kompetente *E. coli*-Zellen wurde aus jeweils 20 Klonen pro Transformationsansatz die DNA der klonierten Plasmide mittels Minipräparation (3.2.4.2) isoliert. Um zu überprüfen, ob die jeweiligen Konstrukte in den Vektor integriert worden waren, wurde mit den Restriktionsenzymen *Sma*I und *Sac*I ein Kontrollverdau der Plasmid-DNA durchgeführt. Durch elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel, ließen sich mit einem DNA-Längenstandard die einzelnen Konstrukte zuordnen. Dies ist exemplarisch für das SWHs- Plasmid in Abb. 39 dargestellt.

Von jeweils drei ausgesuchten Klonen pro Transformationsansatz wurden noch einmal größere Mengen Plasmid-DNA mittels Maxipräparation (3.2.4.2) isoliert und gereinigt. Folgende Plasmide wurden nach Sequenzanalyse der einklonierten Expressionskassetten an Dr. J. Imani gegeben, um diese in Karottenzellen zu transformieren:

1. SWHs-pPCV812 (Klon 13)
2. MWHs-pPCV812 (Klon 9)
3. LWHs-pPCV812 (Klon 3)

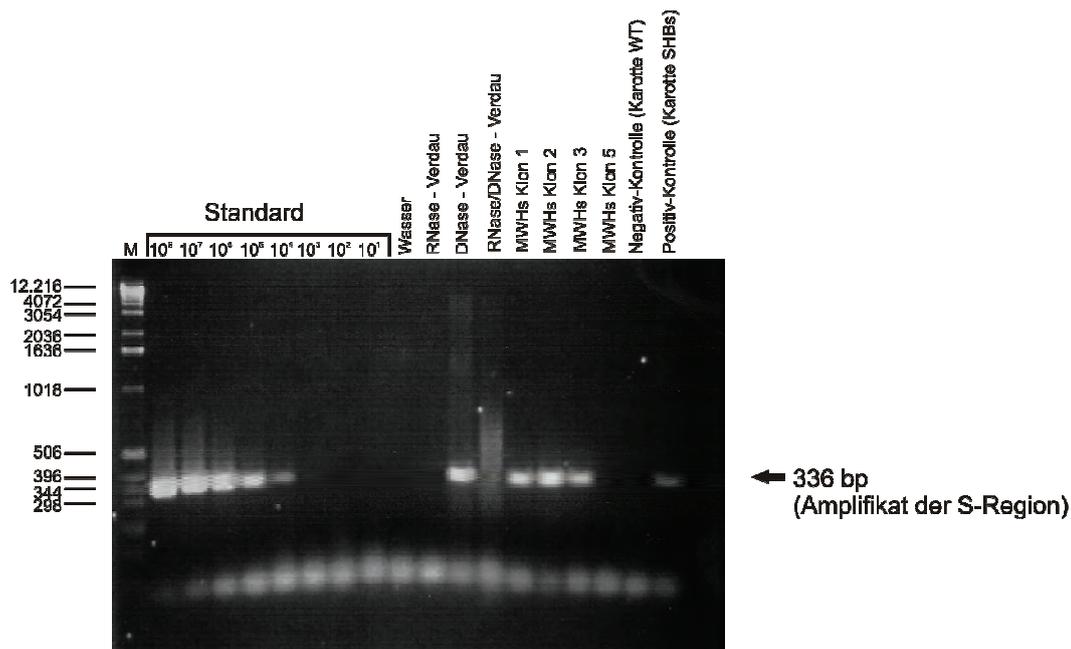
#### **4.2.2.2 Transformation der Oberflächenprotein-exprimierenden Plasmide in Karotten- und Tabakzellen**

Die drei klonierten Plasmide wurden von Dr. J. Imani unter Verwendung des pflanzenpathogenen Bakteriums *Agrobacterium tumefaciens* in Pflanzenzellen transformiert (1.7.1). Aus der Pflanzenzellkultur wurden anschließend mehrere Einzelklone selektiert.

Die Kultivierung der transgenen Karottenzellen erwies sich allerdings als sehr schwierig. Laut Dr. Imani schlugen mehrere Transformationsversuche fehl, da die transformierten Karottenzellkulturen immer wieder abstarben. Dabei gab es keinen Unterschied zwischen den S-, M- bzw. LWHs codierenden Plasmiden. Nachdem die Karottenzellen sich als ungeeignetes Zellsystem für die WHsAg-codierenden Plasmide erwiesen, wurde als nächstes auf das besser etablierte Tabakzellensystem zurückgegriffen. Es wurden nur die MWHs-codierenden Plasmide in Tabakzellen transformiert, was erfolgreich durchgeführt werden konnte. Dr. J. Imani selektierte jeweils zehn Klone, die mittels PCR positiv auf die Integration der MWHs-DNA in die genomische Tabak-DNA getestet wurden. Aus den einzelnen Klonen wurden Suspensions- und Kalluskulturen sowie ganze Tabakpflanzen generiert.

#### 4.2.2.3 Nachweis von MWHs-mRNA in Zellen transgener Tabakpflanzen mittels RT-PCR

Vier Tabakzellklone (1, 2, 3 und 5) wurden für die Isolierung und den Nachweis des WHsAg-Partikel (MWHs) ausgewählt. Vor der eigentlichen Isolierung und Aufreinigung der Partikel mittels Dichtegradientenzentrifugation wurde in den jeweiligen Klonen MWHs-mRNA mittels RT-PCR detektiert.



**Abb. 40: Agarosegel-Elektrophorese der Amplifikate der RT-PCR, zum Nachweis der Synthese spezifischer MWHs mRNA.**

Als Standard wurde ein in vitro transkribiertes HBV-RNA Fragment der präS2-S-Region (MHBs) in einer Verdünnungsreihe ( $10^8$  -  $10^1$  Kopien) verwendet. Die mRNA Aufreinigung wurde mit einer HBsAg produzierenden (Positiv-Kontrolle) sowie einer nicht-transformierten Karottenzelllinie (Negativ-Kontrolle) kontrolliert. RNase- und DNase Verdau sowie das Wasser dienten als Kontaminationskontrolle der RT-PCR. (M: Marker 1 kb DNA Ladder (in bp))

Dafür wurde die gesamte, in den Tabakzellen enthaltene mRNA mit magnetischen Kügelchen (Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit, Dynal) aufgereinigt (3.2.5). Anschließend wurde die MWHs-mRNA mittels RT-PCR im LightCycler amplifiziert (3.2.6). Für den spezifischen Nachweis der MWHs-mRNA wurden die bereits erwähnten all ortho-Primer (2.6.1 / 3.1.1.2) verwendet, mit denen ein 336 bp langes DNA-Fragment aus der S-Region aller Orthohepadnaviren amplifiziert wird.

Als Positivkontrolle wurde eine HBsAg produzierende Karottenzelllinie verwendet, da sich HBsAg-DNA und WHsAg-DNA mit den all ortho-Primern gleichermaßen nachweisen lassen (3.1.1.2). Als Kontaminationskontrolle wurden ein

RNase- und DNase-Verdau durchgeführt. Durch den negativen RNase-Verdau wurde DNA-Fremdkontamination ausgeschlossen. Die Färbung der RT-PCR-Produkte mit Ethidiumbromid im Agarosegel beweist, dass in den Tabakzellklonen 1, 2 und 3 MWHs mRNA transkribiert wurde, während sich in Klon 5 keine MWHs-mRNA nachweisen ließ (Abb. 40).

#### **4.2.2.4 Extraktion und Aufreinigung von WHsAg-Partikeln aus Tabakpflanzen mittels Dichtegradientenzentrifugation**

Die Extraktion und Isolierung der WHsAg-Partikel aus den Tabakpflanzen erfolgte nach demselben Prinzip wie die Isolierung der HBsAg-Partikel aus Karotensuspensionskulturen (4.2.1.1). Die einzelnen Pflanzen der jeweiligen MWHs-Klone hatten ein Gewicht von durchschnittlich 3 g. Von den ersten 20 Fraktionen wurden refraktometrisch die Saccharosedichte und photometrisch die Proteinverteilung ermittelt. Exemplarisch sind die Daten für Klon 2 und die Negativkontrolle dargestellt. Die Diagramme (Abb. 45 A+B/Tabellen 13 A+B, Anhang) verdeutlichen, dass sich bei beiden Gradienten die Hauptproteinkonzentration in den Fraktionen 5 oder 6 befand, was einer Saccharosedichte von 30-40 % entsprach. Der spezifische Nachweis des WHsAg (MWHs) erfolgte im Western Blot.

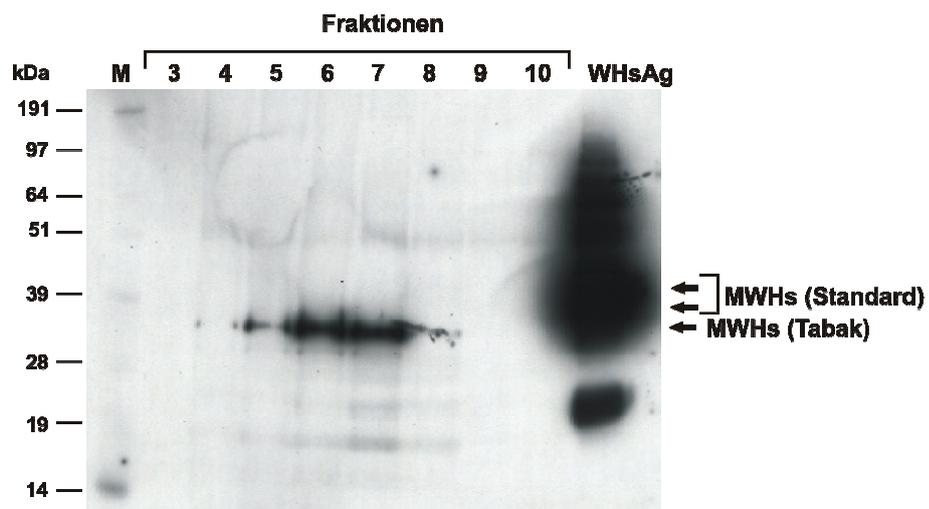
#### **4.2.2.5 Nachweis von WHsAg (MWHs) im Western Blot nach denaturierender SDS-PAGE**

Die Detektion des MWHs erfolgte mit dem Antiserum anti-WHs 2722 (Tolle et al., 1998), welches das M-Protein spezifisch bindet. Für den Nachweis wurden die Fraktionen 3 -10 der Gradienten des Klons 2 und der Negativkontrolle in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und das M-Protein anschließend mittels Immunoblot nachgewiesen. Als Standard wurde gereinigtes WHsAg (0,5 µg) aus WHV positivem Serum eingesetzt.

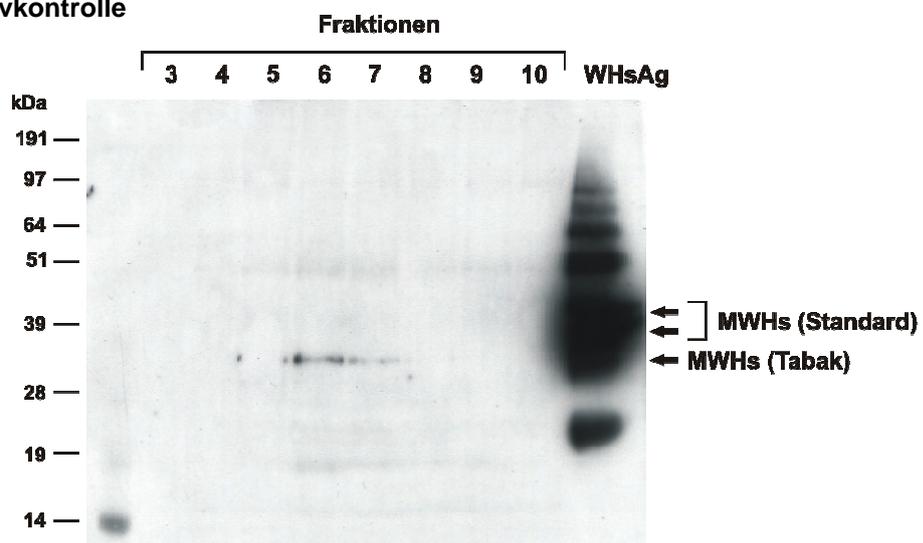
Bei beiden Gradienten reagierten die Fraktionen 6 und 7 positiv mit dem Antiserum (Abb. 41). Jedoch unterschieden sich die Chemilumineszenzsignale der positiven Fraktionen des transformierten und des nicht-transformierten Tabaks bei gleicher Expositionszeit deutlich in ihrer Intensität. In den Fraktionen des Klons 2 konnte wesentlich mehr Antigen nachgewiesen werden. Da eine Kontamination mit WHsAg in der Negativkontrolle während der Aufreinigung ausgeschlossen werden kann, stellt sich die Frage, ob es sich bei dem nachgewiese-

nen Protein eventuell um eine Kreuzreaktion des Antiserums handelt, die die eigentliche Bande des M-Proteins teilweise überlagert. Da die detektierte Bande etwas unterhalb der dem M-Protein des WHsAg zugeordneten Bande liegt (siehe Standard), ist anzunehmen, dass das von der Pflanze exprimierte M-Protein nicht das gleiche Glykosilierungsmuster wie das virale M-Protein aufweist.

### A Tabakklon 2



### B Negativkontrolle



### Abb. 41 : Nachweis von in transgenen Tabakpflanzen sekretierten WHsAg (MWHs) mittels Immunoblot.

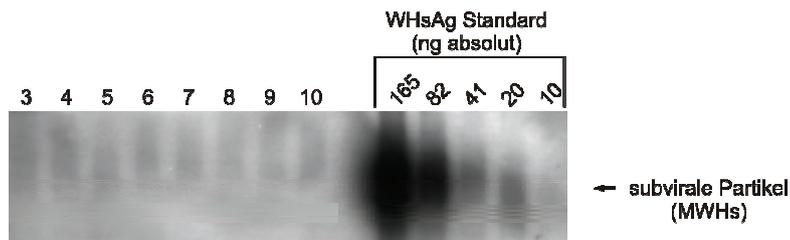
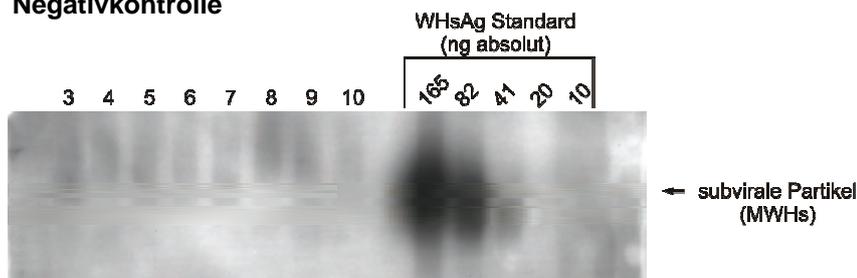
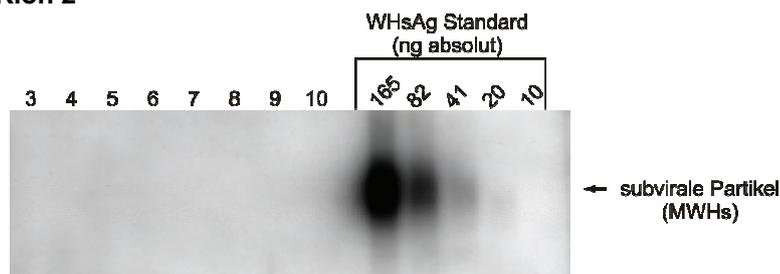
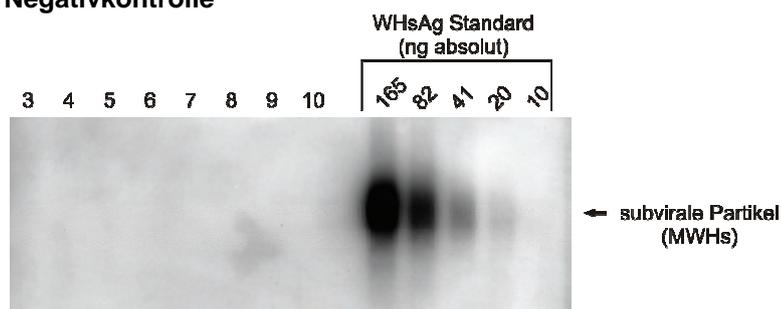
Getestet wurden die Fraktionen 3 – 10 der jeweiligen Dichtegradienten (A: Klon 2 und B: Negativkontrolle). Als Standard wurden 0,5 µg hochreines WHsAg aufgetragen. M: SeeBlue® (In-vitrogen)

#### 4.2.2.6 Nachweis von WHsAg-Partikeln im Western Blot nach nativer Agarosegel-Elektrophorese

Da der Nachweis der Expression von WHsAg durch SDS-PAGE und Western Blot, aufgrund der Kreuzreaktion des Antiserums, zu keinem eindeutigen Ergebnis führte, wurden die Fraktionen 3-10 in eine native Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt und die Proteine anschließend mittels Kapillarblot auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Vorteil dieser Methode liegt im Nachweis nativer, in ihrer Struktur unbeeinflusster Partikel. Die Detektion des WHsAg erfolgte mit zwei verschiedenen gegen das M-Protein gerichteten Antikörpern (anti-WHs 2722 und anti-WHs 31; siehe 2.3.7.4.). Als Standard wurden gereinigte subvirale Partikel aus WHV+ Plasma in einer Verdünnungsreihe von 10–165 ng eingesetzt, wobei Antigenmengen ab 40 ng sicher detektierbar waren.

Sowohl mit dem polyklonalen Antiserum anti-WHs 2722 (Abb. 42 A+B) als auch mit dem monoklonalen Antikörper anti-WHs 31 (Abb. 42 C+D) ließen sich keine WHsAg-Partikel in den einzelnen Fraktionen nachweisen, was darauf schließen läßt, dass in der transgenen Tabakpflanze keine subviralen Partikel sekretiert wurden.

Die Fraktionen 3-10 wurden außerdem mittels ELISA auf die Expression von WHsAg-Partikeln untersucht, wobei sich diese Untersuchungsmethode als sehr unspezifisch erwies.

**A Klon 2****B Negativkontrolle****C Klon 2****D Negativkontrolle**

**Abb. 42: Nachweis von WHsAg-Partikeln mittels Immunoblot nach elektrophoretischer Auftrennung der partikulären Proteine in einer nativen Agarosegel-Elektrophorese.**

Der Nachweis wurde mit zwei verschiedenen Detektionsantikörpern geführt: dem polyklonalen Antiserum 2722 (A+B) sowie dem monoklonalen Antikörper 31 (C+D). Es wurden jeweils die Fraktionen 3-10 der Gradienten einer transformierten (Klon 2) sowie einer untransformierten (Negativkontrolle) Tabakkultur getestet. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe aus Plasma gereinigter subviraler Partikel eingesetzt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Experimentelle Infektion von adulten Amerikanischen Waldmurmeltieren (Woodchucks) mit WHV

Trotz gleicher Inokulationsdosis verliefen die Infektionen bei den einzelnen Tieren sehr heterogen. Zu Beginn der replikativen Phase des Virus waren die individuellen Unterschiede im Infektionsverlauf noch nicht sehr ausgeprägt. Bereits in der ersten Serumprobe p.i. (eine Woche p.i. in der ersten Versuchstiergruppe und zwei Wochen p.i. in der zweiten) ließ sich bei allen Tieren WHV-DNA nachweisen. Vergleicht man die DNA-Konzentrationen, die in Woche 2 p.i. gemessen wurden, so ist festzustellen, dass alle Tiere in etwa den gleichen Virustiter aufwiesen. Danach verlief die Virämie jedoch bemerkenswert verschieden. Während bei zwei Tieren (# 3553, # 3540) das Virus bereits eliminiert wurde, lag der Zeitpunkt der maximalen Replikation bei den anderen Tieren 4-5 Wochen p.i.. Die maximalen WHV-DNA-Konzentrationen -gemessen im Serum- variierten von  $4 \times 10^4$  bis  $10^{10}$  GE/ml. Zwei von sechs Tieren (# 3538, # 3539) zeigten einen hochvirämischen Verlauf mit maximal  $2 \times 10^9$  GE/ml bzw.  $10^{10}$  GE/ml, ein Tier (# 3524) erreichte mit maximal  $3 \times 10^7$  GE/ml mittlere Virus-konzentrationen und die restlichen drei Tiere (# 3391, # 3553, # 3540) wiesen einen vergleichsweise geringen maximalen Virustiter mit  $4 \times 10^4$  bis  $4 \times 10^5$  GE/ml auf.

Nur bei den beiden hochvirämischen Tieren ließ sich freies WHsAg mittels Laurell-Elektrophorese im Serum nachweisen. Der Zeitpunkt der maximalen Antigenämie, bei der WHsAg-Konzentrationen von 367 bzw. 414  $\mu\text{g/ml}$  gemessen wurden, war identisch mit dem Zeitpunkt der maximalen Virämie. Zu beachten ist, dass die Nachweisgrenze für WHsAg bei der Laurell-Elektrophorese bei etwa 2  $\mu\text{g}$  liegt und geringere Mengen an Antigen außerhalb des Detektionsbereiches lagen. Mit einem WHsAg-spezifischen ELISA, dessen Detektionslimit bei 30 ng/ml lag, ließ sich desweiteren bei Tier 3524, welches den dritthöchsten Virustiter aufwies, durch Dr. S. Menne WHsAg detektieren (Daten nicht gezeigt). Die restlichen Tiere blieben jedoch auch mit dieser Nachweismethode während des gesamten Untersuchungszeitraums WHsAg-negativ. Nimmt man das Verhältnis von WHV-Partikeln zu subviralen Partikeln als annähernd konstant an

wird verständlich, dass bei den niedrig virämischen Tieren aufgrund der geringeren Nachweisempfindlichkeit der Laurell-Elektrophorese kein WHsAg detektierbar war.

Im Gegensatz zur WHV-DNA war das freie WHsAg bei den beiden hochvirämischen Tieren nur über einen kurzen Zeitraum von 2-3 Wochen nachweisbar und wurde sehr rasch eliminiert. Die Konzentrationen der Virus-DNA hingegen fielen bei diesen beiden Tieren kontinuierlich über einen Zeitraum von 9 Wochen (# 3538) bis 4 Monaten (# 3539) ab. Bei # 3538 kann aufgrund der verkürzten Beobachtungsdauer jedoch nicht mit Sicherheit die vollständige Eliminierung des Virus aus dem Serum postuliert werden. Aufgrund einer allgemeinen Kontamination der Serumproben der ersten Untersuchungsgruppe sind besonders die Serumproben, deren DNA-Gehalt sich am Rande des Detektionslimit bewegt, schwierig zu bewerten. Was für eine unvollständige Elimination bei # 3538 zum Zeitpunkt der Woche 14 p.i. spricht ist die Tatsache, dass # 3539 zu genau jenem Zeitpunkt mit  $4 \times 10^2$  GE/ml eine ähnliche Viruskonzentration wie # 3538 aufweist ( $3 \times 10^2$  GE/ml). Diese verbleibt bei # 3539 noch für vier weitere Wochen auf demselben Niveau, bis sie endgültig unter das Detektionslimit fällt. Bei den anderen vier Tieren variiert die Dauer der Elimination des Virus von 2 Wochen (# 3391) bis 7 Wochen (# 3524). Generell lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Virustiters und der Dauer der Viruselimination beobachten. Je höher die Viruskonzentration zum Zeitpunkt der maximalen Virämie ist, desto länger dauert es, bis das Virus aus dem Organismus eliminiert ist.

Faktoren, die den Verlauf einer Infektion beeinflussen, differenziert man in virale Faktoren und Wirtsfaktoren. Zu den viralen Faktoren zählen die Höhe der Infektionsdosis, die Eintrittspforte des Erregers (experimentell: i.v., s.c.; natürlich: parenteral, mukokutan) sowie der Virusstamm bzw. Genotyp. Der Immunstatus sowie das Alter determinieren den Infektionsverlauf von Seiten des Wirts. Wie effizient das Virus an seiner Ausbreitung gehindert und letztendlich eliminiert wird, hängt besonders von dem Gleichgewicht zwischen Viruslast und Qualität der antiviralen Immunantwort ab (Chisari & Ferrari, 1995).

Trotz einer identischen und insgesamt sehr hohen Inokulationsdosis von  $10^7$  GE Virus verliefen die Infektionen der sechs Tiere dieser Studie hinsichtlich Dauer und Ausprägung der Virämie individuell sehr verschieden. Das bedeutet,

dass besonders die Qualität der antiviralen Immunantwort jedes Individuums ausschlaggebend für den Verlauf und die Terminierung der Infektion sein muss. Bei allen sechs Tieren konnte in Übereinstimmung mit früheren Studien (Kajino et al., 1994; Guo et al., 2000) das Virus aus dem Serum eliminiert werden. Wie bei akut HBV-infizierten Schimpansen (Murray et al., 2005), ließ sich bei den Woodchucks bereits ein Abfall der Serum-DNA beobachten, bevor das Maximum der Leberzellzerstörung -gemessen am Anstieg des leberspezifischen Enzyms Sorbitol-Dehydrogenase (SDH)- zu verzeichnen war. Die Reduktion der Virus-DNA vom Zeitpunkt der maximalen Virämie bis zum Zeitpunkt der maximalen Leberschädigung variierte zwischen 50% (# 3539) und 70% (# 3524). Das deutet darauf hin, dass zu Beginn der Viruseliminierung nicht-zytotoxische Immunmechanismen dominieren. Verantwortlich für die initiale Reduktion der Virus-DNA sind die Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , deren Produktion CD8 T-Zell-abhängig ist (1.5.3). Diese in transgenen Mäusen und Schimpansen nachgewiesenen Mechanismen, konnten im Woodchuck-Modell bestätigt werden (Kajino et al., 1994; Guo et al., 2000). Die WHV-spezifische T-Zell-Antwort während der akuten Infektion richtet sich insbesondere gegen das WHsAg und das WHcAg (Cote et al., 1995; Menne et al., 1997a/b). Dabei lassen sich zuerst WHsAg-spezifische T-Zellen nachweisen, die zeitgleich mit dem Erscheinen von WHV-DNA und WHsAg detektierbar sind (Menne et al., 1998). Die WHcAg-spezifische T-Zell-Antwort folgt etwas später, fällt dagegen aufgrund der höheren Immunogenität des Core Proteins stärker aus (Menne et al., 1998). Durch die zytotoxische T-Zell-Antwort wird die WHV-Infektion schließlich terminiert. Sie induziert die Apoptose infizierter Hepatozyten und führt so zur Eliminierung des Virus. In akut infizierten Woodchucks konnte gezeigt werden, dass die Rekonvaleszenz mit der Zerstörung infizierter Hepatozyten und der Regeneration der Leber assoziiert war (Kajino et al., 1994; Guo et al., 2000). Diese Beobachtung lässt sich in der vorliegenden Studie anhand des vergleichenden Verlaufs der WHV-DNA und des Leberenzym SDH grundsätzlich bestätigen. Bei allen Tieren war ein Anstieg der SDH in unterschiedlichem Ausmaß zu verzeichnen, was auf pathologische Vorgänge in der Leber schließen lässt. Dabei war die Leberzerstörung umso größer, je höher die Viruslast war. Auffällig ist, dass die SDH-Konzentrationen selbst bei kurzzeitig starker Erhöhung wieder rasch auf Normalwerte sanken. Das lässt zum einen eine hohe Regenerations-

fähigkeit, zum anderen aber auch eine vergleichsweise geringe Schädigung der Leber vermuten. Das wiederum lässt Rückschlüsse darauf zu, dass der Hauptimmunpathomechanismus der Viruseliminierung die nicht-zytotoxische T-Zell-Antwort zu sein scheint. Dafür sprechen auch die z.T. sehr geringgradigen SDH-Erhöhungen während der Viruseliminierung (# 3540, # 3553). Möglicherweise ist die Regulation der Zytokinexpression, als Folge der Antigenerkennung durch das Immunsystem, der Schlüssel für die individuellen Infektionsverläufe. Um diesbezüglich eine Aussage zu treffen, müsste allerdings eine quantitative Bestimmung des Interferons während der Virämie erfolgen. Parallel zu der zellulären Immunantwort wurde die humorale Immunantwort induziert. Im Rahmen dieser Studie wurden Oberflächenantigen- und Core-Antigen spezifische Antikörper untersucht. Die B-Zell-Antwort richtete sich wie die T-Zell-Antwort bei der WHV-Infektion erst gegen das WHsAg, wie die Detektion von WHsAg-anti-WHs-Immunkomplexen zum Zeitpunkt des Viruspeaks bzw. kurz danach in vier von sechs Tieren zeigt. Insbesondere in den drei WHsAg-positiven Tieren (3538, 3524, 3539) waren Immunkomplexe über einen längeren Zeitraum von 4-5 Wochen präsent. Der abrupte Abfall des freien WHsAg und der Nachweis erster Immunkomplexe direkt im Anschluss daran verdeutlicht, dass während der akuten WHV-Infektion anti-WHs-Antikörper direkt an der Neutralisation viraler sowie subviraler Partikel beteiligt sein müssen. Bei der HBV-Infektion des Menschen ist die Neutralisation des Virus eindeutig mit Antikörpern gegen die Oberflächenproteine verknüpft.

Ein bis zwei Wochen nach der Detektion erster WHsAg-Immunkomplexe ließen sich anti-WHc-Antikörper detektieren, die im Unterschied zu anti-WHs bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes (also mindestens 7 Monate) persistierten. Während bei allen sechs akut infizierten Tieren Antikörper gegen das WHcAg gebildet wurden, fand die Serokonversion zu anti-WHs nicht immer statt. Dies mag am höheren immunogenen Potential des Core-Proteins als Antigen liegen. Freie anti-WHs-Antikörper, die ein Zeichen für den kurativen Verlauf der Infektion sind, tauchen -sofern vorhanden- erst zum Ende der Infektion auf, welches durch die fast vollständige Reduktion der Virus-DNA und die Normalisierung der Leberparameter (SDH) angekündigt wird.

Möglicherweise spielen neutralisierende Antikörper eine wichtige Rolle bei der Prävention der Reinfektion regenerierter Hepatozyten innerhalb der infizierten

Leber (Guo et al., 2000). Die vorliegenden Daten könnten den Schluss nahelegen, dass an diesem Prozess insbesondere anti-WHc beteiligt sein könnte. Dafür spräche, dass erste WHcAg-spezifische Antikörper direkt im Anschluss an den Viruspeak auftreten und im Gegensatz zu anti-WHs über den gesamten Zeitraum der Viruseliminierung präsent sind. Jedoch ist anti-WHc eher als Indikator für die einsetzende Immunreaktion zu werten.

Die Untersuchung der Virämie und die Beurteilung der verschiedenen Infektionsverläufe im Rahmen dieser Studie stützen sich insbesondere auf die Messung der Virus-DNA mit Hilfe der realtime-PCR (LightCycler). Dieses Nachweissystem hat sich als äußerst sensitiv in der spezifischen Detektion von Virusreplikaten erwiesen. Selbst extrem niedrige WHV-DNA-Konzentrationen von 100 GE/ml waren noch nachweisbar. In bisher veröffentlichten Studien wurde die WHV-DNA mit der Dot Blot-Technik bestimmt, deren Sensitivität mit einem Detektionslimit von bestenfalls  $10^5$ , eher  $10^7$  GE/ml relativ gering ist. Doch insbesondere in der Evaluierung neuer antiviraler Therapien, die im Woodchuck-Modell untersucht werden, ist eine sensitive Nachweismethode von entscheidender Bedeutung. Nur sie ermöglicht es, das Potential eines Medikaments oder eines Behandlungsregimes bei der Supprimierung der Virämie, zu bewerten.

## **5.2 Experimentelle Infektion von adulten Woodchucks mit GSHV und ASHV**

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal die spezieübergreifende Infektion von adulten Woodchucks mit GSHV und ASHV gezeigt werden. Jeweils drei Tiere wurden mit je  $10^7$  GE des entsprechenden Virus i.v. inokuliert. Drei weitere Tiere, denen WHV appliziert wurde, dienten als Kontrollgruppe. Bei jedem Tier führte die Virusinokulation zur Virämie. Die Infektionen mit GSHV und ASHV verliefen wie die Infektionen mit WHV individuell sehr heterogen.

In der GSHV-Gruppe variierten die maximalen Virustiter zwischen  $10^3$  und  $10^9$  GE/ml. Die Dauer der Virämie betrug zwischen 3 und 18 Wochen. Oberflächenantigen ließ sich nur bei dem Tier mit den höchsten Virustitern nachweisen (# 3545). Die Eliminierung des Virus verlief entsprechend der akuten WHV-Infektion. Nachdem das Maximum der Virämie erreicht worden war, ließ sich bereits ein Absinken der Virus-DNA-Konzentrationen feststellen, bevor es zu

einem deutlichen Anstieg der SDH als Zeichen der hepatozellulären Apoptose kam. Daraus lässt sich folgern, dass die Eliminierung von GSHV, wie auch die von HBV und WHV, initial durch die nicht-zytotoxische T-Zell-Antwort mittels Zytokinen erfolgt. Erst durch die Zerstörung infizierter Hepatozyten durch die zytotoxische T-Zell-Antwort wird eine vollständige Elimination des Virus aus dem Serum erreicht. Mit der Normalisierung der SDH-Konzentrationen war das Virus bei allen drei Tieren vollständig eliminiert. Entsprechend den Immunpathomechanismen bei der WHV-Infektion, wurden auch im Rahmen der GSHV-Infektion Antikörper gegen das Core- und Oberflächen-Antigen gebildet. GSHs-Immunkomplexe ließen sich bei zwei Tieren zum Zeitpunkt des Viruspeaks detektieren. Im Gegensatz zur WHV-Infektion war freies Antigen länger als in Immunkomplexen gebundenes Antigen nachweisbar. Der Grund dafür liegt jedoch vermutlich in der verminderten Sensitivität des im Immunoblot verwendeten Detektionsantiseraums gegenüber GSHsAg, da ein primär gegen WHsAg generiertes Antiserum bei dem Nachweis der GSHsAg-Immunkomplexe verwendet wurde. Interessanterweise ließen sich bei # 3533 weder anti-GSHc noch anti-GSHs nachweisen, obwohl es für kurze Zeit zur Virämie kam. Dass das Virus vom Immunsystem erkannt wurde, beweist allerdings die rasche Eliminierung des Virus nach kurzzeitigem SDH-Anstieg.

Die ASHV-Infektionen verliefen grundsätzlich nach demselben Muster wie die Infektionen mit WHV und GSHV. Die Virämie dauerte zwischen 15 und 20 Wochen, wobei maximale Viruskonzentrationen von  $5 \times 10^6$  und  $3 \times 10^{10}$  Ge/ml erreicht wurden. Eine Antigenämie ließ sich nur bei dem hochvirämischen Tier (# 3537) beobachten. Freies Oberflächenantigen war über einen Zeitraum von vier Wochen nachweisbar, wobei der rasche Anstieg und Abfall des Antigens trotz hoher Konzentrationen von ca. 400 µg/ml auffällig ist. Die detektierbaren ASHs-Immunkomplexe im Anschluss an das freie Antigen zeigen deren Bedeutung bei der Neutralisation viraler und subviraler Partikel auf. Auch für das ASHsAg gilt wie für das GSHsAg eine reduzierte Sensitivität des im Immunoblot verwendeten Detektionsantiseraums, so dass ASHsAg-Immunkomplexe möglicherweise über einen längeren Zeitraum im Serum zirkulieren, als sie im Immunoblot nachweisbar sind.

Markant bei allen Tieren dieser Gruppe war der deutliche SDH-Anstieg eine Woche nach Inokulation. Der Zeitpunkt sowie der parallele Anstieg des Enzyms

bei allen drei Tieren (Daten des dritten Tieres nicht gezeigt), lassen eine Kontamination des Inokulums mit einem hepathotropen Pathogen vermuten. Das erklärt möglicherweise auch den Tod des dritten Tieres. Ein Artefakt in der Messung kann ausgeschlossen werden, da auch die anderen leberspezifischen Enzyme deutlich anstiegen (Daten nicht gezeigt). Selbst das Enzym Alkalische Phosphatase (AP), welches bei den Woodchucks der GSHV- und WHV-Gruppe nicht ein einziges Mal erhöht war, erreichte pathologische Konzentrationen. Dies könnte ein Hinweis auf eine nicht hepadnaviral-assoziierte Hepatitis sein. Eine weitere interessante Beobachtung im SDH-Verlauf ließ sich bei # 3537 machen. Im Gegensatz zu den Infektionsverläufen der anderen Tiere kam es bei diesem Tier während der Eliminationsphase des Virus zu keiner pathologischen SDH-Erhöhung. Daraus lässt sich folgern, dass wahrscheinlich allein die nicht-zytotoxische T-Zell-Antwort zur viralen Clearance geführt hat, was deren dominierende Bedeutung bei der Viruseliminierung unterstreicht.

Unterschiede zwischen den Infektionsverläufen der GSHV-, ASHV- und WHV-Kontrollgruppe bestanden vor allem hinsichtlich des Erscheinens erster Virusreplikate im Serum und des Maximums der Virämie. Während in der GSHV- und WHV-Kontrollgruppe bei allen Tieren bereits 2 Wochen p.i. erste Virusreplikate detektierbar waren, ließ sich bei den Tieren der ASHV-Gruppe erst 6-8 Wochen p.i. Virus-DNA im Serum nachweisen. Bezüglich des Zeitpunktes der maximalen Virämie war eine Verschiebung in allen drei Gruppen zu beobachten. In der WHV-Kontrollgruppe wurde das Maximum 2-4 Wochen p.i. erreicht, in der GSHV-Gruppe vier Wochen später in Woche 6-8 und in der ASHV-Gruppe letztendlich erst in den Wochen 10-14.

Es stellt sich die Frage, welche Determinanten für die wirtsspezifische Aufnahme und die Manifestation des Virus im natürlichen bzw. Fremdwirt entscheidend sind. Hepadnaviridae sind streng wirtsspezifisch und nur phylogenetisch sehr eng verwandte Arten lassen sich mit demselben Virus infizieren. Bereits Mitte der achtziger Jahre wurde die Übertragung von GSHV auf Streifenbackenhörnchen (engl.: Chipmunk) gezeigt (Trueba et al., 1985). Die experimentelle Inokulation von kloniertem GSHV-Genom führte bei intrahepatischer Applikation auch in neonatalen Woodchucks zur Infektion (Seeger et al., 1991). Auf der anderen Seite schienen Ground Squirrels interessanterweise resistent gegenüber der Infektion mit WHV zu sein. In 14 mit WHV inokulierten Ground Squirrels ließ sich

keine Virämie nachweisen (Seeger et al., 1987). Da der Nachweis der Infektion nur mit der Bestimmung von Oberflächenantigenen sowie Core-spezifischen Antikörpern (anti-C) verifiziert wurde und nicht mittels des Nachweises von Virus-DNA, könnte es jedoch möglich sein, dass die Virämie aufgrund niedriger Titer unentdeckt blieb. Einen Hinweis für diese These liefert der Infektionsverlauf des GSHV-inokulierten Woodchucks # 3533, bei dem mit Ausnahme der Virus-DNA kein weiterer Infektionsparameter erhöht und keine Serokonversion zu anti-S und anti-C nachweisbar war. Die Messung der Virus-DNA mittels realtime-PCR ist somit der sensitivste und sicherste Nachweis einer erfolgten Infektion und zeigt die Grenzen der bisher gängigen Nachweisverfahren (Antikörper- und Oberflächenantigenbestimmung; Virus-DNA-Nachweis mittels Dot blot-Technik) auf.

Im Gegensatz zu GSHV wurden mit ASHV noch keine experimentellen Infektionsstudien im natürlichen Wirt oder Fremdwirt durchgeführt. Bisher evaluierte Daten wurden nur aus wild gefangenen, ASHV infizierten Arctic Ground Squirrels gewonnen (Testut et al., 1996).

Um den die Wirtsspezifität determinierenden Genombereich zu eruieren, wurden Infektionsversuche mit rekombinanten Viren an Ground Squirrels durchgeführt (Seeger et al., 1987). Dabei wurde der größte Teil der S-Domäne im GSHV-Genom durch die entsprechende WHV-Sequenz ersetzt. Insgesamt konnten bei 2 von 8 mit rekombinantem Virus inokulierten Tieren serologische Merkmale (sAg) einer Infektion festgestellt werden. Die Zahl der positiven Tiere war allerdings unter Umständen höher, da die verwendete Nachweismethode (HBsAg ELISA) für die Detektion von WHV-GSHV-sAg relativ insensitiv war. Im Unterschied zu der natürlichen GSHV-Infektion der Kontrollgruppe, war die Infektiosität der rekombinanten Viren geringer und der Beginn der Virämie verzögert. Durch die Infektionsversuche mit den rekombinanten Viren konnte die S-Domäne als beeinflussender Faktor für die Wirtsspezifität ausgeschlossen werden. Größere Bedeutung scheint der präS1-Domäne zuzukommen (Neurath et al., 1986; Jin et al., 1996).

Der im Rahmen dieser Studie beobachtete zeitlich verschobene Beginn der Virämie von GSHV und insbesondere ASHV im Vergleich zu WHV lässt vermuten, dass erst eine Phase der Adaptation des Virus an den Fremdwirt mittels punktueller Mutation des für die Wirtsspezifität entscheidenden Genomberei-

ches erfolgt, bevor das Virus erfolgreich repliziert. Um diese Annahme zu verifizieren, wurde die virale DNA-Sequenz der präS1-Domäne von GSHV und ASHV vor und während der Infektion analysiert. Mit spezifischen Primern (2.6.2) wurde die präS1-Domäne der entsprechenden Virus-DNA einerseits aus dem Inokulum, andererseits aus den Serumproben zum Zeitpunkt der maximalen Virusreplikation amplifiziert und sequenziert. Der Vergleich der DNA-Sequenzen zeigte, dass die präS1-Sequenz des Virusreplikats identisch mit der des Inokulums war. Eine denkbare Adaptation des Virus an den Fremdwirt durch Mutation des Genoms im präS1-Bereich lag also nicht vor. Möglicherweise gibt es genetische Informationen für die Wirtsspezifität in einem anderen Genombereich. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass Fremdwirt und natürlicher Wirt aufgrund enger phylogenetischer Verwandtschaft sehr ähnliche Rezeptorstrukturen aufweisen und es keiner Adaptation des Virus bedarf. Fraglich bleibt in dem Zusammenhang, weshalb sich Woodchucks mit GSHV, aber Ground Squirrels nicht mit WHV infizieren lassen.

### **5.3 Die Bedeutung der WHV-Infektion von Woodchucks als Modell für die HBV-Infektion des Menschen**

Die WHV-Infektion von Woodchucks dient als wichtiges Versuchsmodell zur Erforschung der Patho- und Immunmechanismen der HBV-Infektion des Menschen. Desweiteren liegt die Bedeutung dieses Tiermodells in der Evaluierung neuer Strategien für die Therapie und Prävention der HBV-Infektion und deren Folgen (chronische Hepatitis, Leberzirrhose, Hepatozelluläres Karzinom). Aus diesem Grund ist es von entscheidender Bedeutung, Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Infektionsverläufe von WHV und HBV im jeweiligen Wirt zu analysieren. Sicherlich ist die Zahl der infizierten Tiere dieser Studie zu gering um pauschale Schlussfolgerungen zu ziehen, aber sie lassen eine Tendenz erkennen. Die Untersuchung der akuten Hepatitis B beim Menschen ist vergleichsweise schwierig, da sie erst mit den ersten Symptomen während der Prodromalphase festgestellt wird. Die Zeit der Inkubationsphase kann deshalb meistens nur im Tiermodell untersucht werden. Es ist noch immer nicht geklärt, welche Determinanten bestimmen, ob eine Infektion klinisch manifest, subklinisch oder chronisch verläuft und welche Faktoren die Schwere des Verlaufs entscheidend beeinflussen.

Der Infektionsverlauf von WHV bei adulten Woodchucks ist dem HBV-Verlauf sehr ähnlich und in der Art der Ausprägung sehr variabel. Wie beim Menschen lassen sich klinische und subklinische Verläufe unterscheiden, die wahrscheinlich vor allem von der Immunkompetenz des jeweiligen Wirts und der Infektionsdosis determiniert werden.

Unterschiede bestehen vor allem hinsichtlich des Auftretens, der Konzentration und der Eliminierung der subviralen Partikel. In einer Vergleichsstudie mit akut HBV-infizierten Personen waren 90% der Patienten in der ersten verfügbaren Serumprobe seropositiv für HBsAg (Chulanov et al., 2003), wohingegen bei den akut WHV-infizierten Woodchucks nur jedes 2. Tier WHsAg-positiv war. Es ist jedoch noch einmal darauf hinzuweisen, dass die Zahl der untersuchten Tiere zu gering ist, um repräsentativ zu sein. Desweiteren waren die WHsAg-Serumkonzentrationen beim Woodchuck ca. 4-10 x so hoch wie die HBsAg-Konzentrationen. Während beim Menschen durchschnittlich 30-100 µg/ml HBsAg im Serum gemessen werden (Gerlich et al., 2003), wurden beim Woodchuck Serumkonzentrationen von bis zu 400 µg/ml WHsAg erreicht. Hinsichtlich der Elimination erwies sich das HBsAg als sehr stabil im Serum und blieb über mehrere Wochen nachweisbar (Chulanov et al., 2003). Dagegen wurde das WHsAg trotz hoher Antigenkonzentrationen sehr rasch innerhalb einer Woche eliminiert. Bei der akuten WHV-Infektion spielen dabei sicherlich anti-WHs-Antikörper eine Rolle, wie der Nachweis von Immunkomplexen im Anschluss an das freie WHsAg zeigt. Sogar bei Tieren, wo kein freies WHsAg mittels Laurell-Elektrophorese und ELISA detektiert werden konnte, ließen sich WHsAg-Immunkomplexe nachweisen. Im Gegensatz zur HBV-Infektion des Menschen, wo anti-HBs erst sehr spät im Verlauf der Infektion, oft sogar erst nach Rekonvaleszenz erscheint, wird anti-WHs vergleichsweise schnell gebildet. Immunkomplexe erscheinen bereits zum Zeitpunkt des Viruspeaks, freies anti-WHs kurz vor bzw. zeitgleich mit dem Infektionsende.

Bei der HBV-Infektion scheint anti-HBs jedoch keine wesentliche Rolle bei der Eliminierung der subviralen Partikel zu spielen. Die Bindungskapazität von 1 IU anti-HBs beträgt 0,9 µg HBsAg (Stamm et al., 1980). In der Studie von Chulanov (2003) wurden in den meisten Verläufen anti-HBs-Konzentrationen von  $\leq 0,1$  IU ermittelt, die nicht für die Neutralisation der subviralen Partikel mit bis zu 40 µg/ml gereicht hätten. Wie das HBsAg letztendlich aus dem Organismus e-

liminiert wird, ist nicht geklärt. Allerdings wurde bei der Studie von Chulanov (2003) nur freies anti-HBs berücksichtigt und keine in Immunkomplexen gebundenen Antikörper. Möglicherweise lassen sich auch während der akuten HBV-Infektion Immunkomplexe detektieren, die einen Hinweis auf die Eliminierung subviraler Partikel geben. Überzeugende Daten zum Auftreten von HBsAg-Immunkomplexen bei der akuten Hepatitis B des Menschen liegen jedoch bisher nicht vor. Nur bei der chronischen HBV-Infektion sind Immunkomplexe bekannt (Madalinski et al., 1991), wobei kein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an freiem HBsAg im Serum und der Menge von HBsAg-Immunkomplexen zu bestehen scheint. Dieser Befund entspricht den Daten, die im Rahmen dieser Arbeit bei chronisch WHV-infizierten Woodchucks erhoben werden konnten. Bei annähernd gleicher WHsAg-Konzentration ließen sich bei einem Tier keine, bei einem anderen Tier sehr viele WHsAg-Immunkomplexe nachweisen. Bei chronischen HBV-Trägern konnte allerdings ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von HBsAg-Immunkomplexen und dem HBeAg-/anti-HBe-Status der Patienten aufgezeigt werden (Madalinski et al., 1991). Während die meisten HBeAg-positiven Patienten Immunkomplexe aufwiesen, konnten in anti-HBe-positiven Patienten meistens keine, und wenn nur sehr wenige detektiert werden.

Ein wichtiger Unterschied zwischen der chronischen WHV- und HBV-Infektion sind die wesentlich stärkere Virämie und Antigenämie bei Woodchucks, die jegliche Therapieversuche schwieriger gestaltet und möglicherweise manches beim Menschen brauchbare Konzept im Woodchuck nicht erkennen läßt.

#### **5.4 Isolierung von subviralen Partikeln von WHV, GSHV und ASHV aus positiven Woodchuckseren und Charakterisierung der Struktur der Oberflächenproteine von GSHV und ASHV**

Im Gegensatz zum WHsAg, welches hinsichtlich Proteinstruktur und Glykosilierungsmuster bereits charakterisiert werden konnte (Tolle et al., 1998), sind GSHsAg und ASHsAg nur unzureichend analysiert worden. Bisher konnte nur das S-Protein beider Viren eindeutig detektiert werden. Aufgrund der teilweise bestehenden Kreuzreaktivität der Oberflächenantigene von HBV, WHV und GSHV (Gerlich et al., 1980; Cote et al., 1983; Feitelson et al., 1981, 1983) gelang es mit gegen WHsAg und HBsAg generierten Antiseren jeweils zwei Ban-

den im Western Blot nachzuweisen. Diese entsprachen mit Größen von 23 kDa und 27 kDa beim GSHsAg (Gerlich et al., 1980) und 24 kDa und 27 kDa beim ASHsAg (Testut et al., 1996) dem kleinen Oberflächenprotein.

Die elektrophoretische Auftrennung und Silberfärbung von gereinigtem GSHsAg im SDS-Gel führte zur Identifikation mehrerer GSHsAg-assoziiierter Polypeptide (Persing et al., 1986). Ein Komplex zweier Proteine mit Größen von 33 kDa und 36 kDa wurde dabei fälschlicherweise dem M-Protein zugewiesen. Drei weitere Polypeptide mit Größen von 40 kDa bis 49 kDa schienen L-Protein assoziiert zu sein. Mit einem präS1-Peptidantiserum konnte allerdings nur ein 43 kDa großes Produkt im Western Blot nachgewiesen werden, was somit eindeutig dem L-Protein zugeordnet werden konnte (Persing et al., 1986). Ferner gelang der immunologische Nachweis weiterer präS1-assoziiierter Polypeptide mit Größen von 45 kDa und 47 kDa (Schaeffer et al., 1986).

Die Analyse des ASHsAg mit einem anti-präS1(HBV)-Antikörper führte zur Detektion eines 45 kDa großen Proteins, während sich ein anti-präS2(WHV)-Antiserum als ineffektiv in der Erkennung M- und L-Protein assoziierter Polypeptide erwies (Testut et al., 1996). Eine vollständige Analyse der Oberflächenproteine von GSHV und ASHV konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Durch die elektrophoretische Auftrennung der gereinigten, virusspezifischen Oberflächenproteine mit anschließender Silberfärbung und immunologischer Detektion im Western Blot, konnten im Rahmen dieser Studie die Proteinmuster für GSHsAg und ASHsAg aufgeklärt werden. Die glykosilierte und unglykosilierte Form des S-Proteins bildeten jeweils die stärkste Fraktion der aufgereinigten subviralen Partikel. Sowohl das S-Protein von GSHV als auch ASHV bandierten im silbergefärbten SDS-Gel auf gleicher Höhe wie das S-Protein von WHV. Das lässt zu einem Rückschlüsse auf dieselbe Struktur, zum anderen auf dasselbe Glykosilierungsmuster der drei hepadnaviralen S-Proteine zu. Aus dem errechneten Vergleich der Bandenhöhen ergeben sich Proteingrößen von 24 kDa für die unglykosilierten Formen und 27 kDa für die glykosilierten Formen.

Das M-Protein der drei Hepadnaviren konnte aufgrund der Kreuzreaktivität mit einem anti-WHs Antiserum im Western Blot detektiert werden, auch wenn die Sensitivität für GSHsAg und ASHsAg im Blot etwas geringer war. Sowohl das MGSHs als auch das MASHs bandierten auf derselben Höhe wie das MWHS. Demzufolge müssten die beiden Formen des M-Proteins Größen von 41 und 45

kDa entsprechen (Tolle et al., 1998). Die von Persing (1986) postulierten Größen von 33 und 36 kDa konnten nicht bestätigt werden. Dabei weist das Bandenmuster des M-Proteins von ASHV eine Besonderheit auf, da sich anstelle der beiden Einzelbanden von MWHs und MGSHs zwei Doppelbanden detektieren ließen. Da die drei virusspezifischen M-Proteine nicht in der Anzahl der Aminosäuren differieren (282 AS) ist wahrscheinlich, dass es sich um ein spezielles Glykosilierungsmuster des MASHs handelt. Eine genaue Analyse in der Hinsicht müsste biochemisch erfolgen. Vom MWHs ist bekannt, dass die beiden Formen mehrfach N- und O-glykosiliert sind (Tolle et al., 1998). Man kann aus dem visuellen Vergleich der virusspezifischen M-Proteinbandenmuster davon ausgehen, dass die M-Proteine von GSHV und ASHV ähnlich stark glykosiliert sind.

Um das L-Protein von GSHV und ASHV zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit ein anti-(WHV)präS1-Peptidantiserum verwendet, welches gegen die AS 126-146 der (WHV)präS1-Domäne generiert wurde. Aufgrund der fast identischen Zielsequenz der drei virusspezifischen präS1-Domänen konnte damit auch das L-Protein von GSHV und ASHV detektiert werden. Das L-Protein von WHV liegt sowohl in einer unglykosilierten (45 kDa) als auch einer einfach N-glykosilierten (49 kDa) Form vor, wobei die glykosilierte Form vorherrscht (Tolle et al., 1998). In der AS-Anzahl der präS1-Domäne unterscheiden sich die drei virusspezifischen L-Proteine geringfügig, wobei das LWHs 3 (LGSHs) bzw. 4 AS (LASHs) länger ist. Der direkte Vergleich der drei hepadnaviralen L-Proteine zeigt, dass LGSHs und LASHs ebenfalls in einer unglykosilierten und glykosilierten Form derselben Größe wie das LWHs vorzuliegen scheinen, wobei immer die glykosilierte Form dominiert. Bei dem präS1-assoziierten Protein von ASHV, mit einem Molekulargewicht von 45 kDa, was durch Testut (1996) gezeigt werden konnte, könnte es sich möglicherweise um die unglykosilierte Form des LASHs handeln. Gleiches gilt für die bereits veröffentlichten Daten bezüglich der Größen des L-Proteins von GSHV. Bereits Persing (1986) konnte drei Proteinbanden zwischen 40 und 49 kDa detektieren, die sich im Immunoblot allerdings nur sehr ungenau zuordnen ließen. Die zwei von Schaeffer (1986) präS1-assoziierten Polypeptide mit 45 und 47 kDa konnten somit in dieser Arbeit eindeutig dem L-Protein von GSHV zugeordnet werden. Der visuelle Vergleich der Bandenhöhen von LGSHs und LASHs mit LWHs sowie die fast

identische AS-Anzahl der drei L-Proteine lässt die Aussage zu, dass sowohl das L-Protein von GSHV als auch das von ASHV in einer 45 kDa (wahrscheinlich unglykosiliert) und 49 kDa (wahrscheinlich glykosiliert) großen Form existieren.

Neben der Charakterisierung der Oberflächenproteine von GSHV und ASHV war eine weitere interessante Fragestellung, ob sich das Verhältnis der drei Oberflächenproteine während des chronischen Verlaufs im Gegensatz zur akuten Verlaufsform änderte. Der Vergleich der Proteinmuster beider Verläufe im silbergefärbten SDS-Gel zeigte keine differenten Strukturen. In beiden Verlaufsformen dominierte deutlich das S-Protein. Auch das Glykosilierungsmuster schien von der Verlaufsform unbeeinflusst, wie sich aus dem Vergleich der Bandenhöhen im SDS-Gel schließen lässt,

### **5.5 Evaluierung der therapeutischen Effizienz von DNA- und Immunkomplex-Vakzinen in Kombination mit Lamivudin gegen die chronische Hepatitis B anhand des Woodchuck-Tiermodells**

Die WHV-Infektion von Woodchucks als Tiermodell für die humane HBV-Infektion findet wie bereits erwähnt u.a. bei der Evaluierung neuer Therapie- und Prophylaxeschemata Anwendung. Hinsichtlich der präventiven und therapeutischen Vakzinierung existieren diverse Erfolg versprechende Strategien, die im Woodchuck-Modell in Bezug auf ihre Effizienz und Sicherheit untersucht werden können (1.5.4).

Für eine Studie, in der die Effizienz von therapeutischen DNA- und Immunkomplex-Vakzinen in Kombination mit Lamivudin (Lu et al., zur Publikation eingereicht) zur Therapie der chronischen Hepatitis bewertet werden sollte, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Beeinflussung der Antigenämie durch die verschiedenen Kombinationstherapien untersucht. Dafür wurde das WHsAg in den Serumproben von chronisch WHV infizierten Woodchucks über den Zeitraum der Untersuchung von 30 Wochen mit Hilfe der Laurell-Elektrophorese quantifiziert. Von zehn Tieren wurden zwei nur mit Lamivudin behandelt. Vier Woodchucks erhielten Lamivudin und drei Injektionen einer kombinierten, aus drei verschiedenen Plasmiden bestehenden DNA-Vakzine. Und weiteren vier Tieren wurden Lamivudin und drei Injektionen einer Immunkomplex-/DNA-Vakzine verabreicht.

Die ausschließliche Behandlung mit Lamivudin führte nur zu einer geringen Beeinflussung der Antigenämie. Zwar war bei beiden Tieren eine leichte Reduktion der WHsAg-Konzentrationen nachweisbar, allerdings schien das Medikament nur von sehr kurzer Wirkdauer zu sein. Bei einem Tier war bereits unter der Therapie ein erneuter Anstieg des WHsAg-Titers nachweisbar. Diese Beobachtung bestätigt das geringe antivirale Potential von Lamivudin bei Woodchucks, das schon in früheren Studien belegt wurde (Hervas-Stubbs et al., 2001). Bei chronischen HBV-Patienten dagegen wurde durch die Applikation von Lamivudin eine gesteigerte T-Zell-Antwort hervorgerufen (Boni et al., 1998).

Die Kombinationstherapie von Lamivudin und DNA-Vakzinen hatte nur bei zwei von vier Tieren einen reduzierenden Effekt auf den Verlauf der Antigenämie. Während bei einem Tier (# 17491) bereits kurz nach der ersten Injektion der Vakzine in Woche 9 ein leichtes Absinken des Antigentiters erkennbar war, schien bei dem zweiten Tier (# 17502) erst die Boosterung in Woche 13 eine Reduktion der WHsAg-Konzentrationen zu bewirken. In diesem Fall war die Beeinflussung der Antigenämie allerdings wesentlich signifikanter als bei dem ersten Tier. Während bei Tier # 17491 die erste Boosterimpfung nur zu einer Reduktion der Antigenkonzentration um 29% bis zur 20. Woche führte, wurde der Antigentiter bei Tier # 17502 bereits bis zur 18. Woche um 71% gesenkt. Nach der zweiten Boosterimpfung in Woche 18 kam es bei beiden Tieren allerdings wieder zu einem leichten Anstieg der WHsAg-Konzentration. Gegen Ende des Untersuchungszeitraumes war jedoch ein erneutes Absinken des Antigentiters nachweisbar.

Die Kombinationstherapie von Lamivudin und Immunkomplex-/DNA-Vakzinen hatte den größten Effekt auf den Verlauf der Antigenämie. Bei allen vier Tieren war eine deutliche Reduktion der WHsAg-Konzentration nachweisbar. Während bei zwei Tieren (# 17497 und # 17492) der Antigentiter bereits allein durch das Lamivudin zu sinken schien, war bei den anderen beiden Woodchucks (# 17493 und # 17494) eine deutliche Beeinflussung des Antigenverlaufs durch die therapeutische Impfung erkennbar. Bereits die erste Injektion in Woche 9 bewirkte ein Absinken des Antigenspiegels, das sich nach der ersten Boosterung in Woche 13 fortsetzte. So konnte bei diesen beiden Tieren insgesamt eine Reduktion der WHsAg-Konzentration von 72% und 76% erzielt werden. Bei den anderen beiden Tieren konnte der Antigentiter ebenfalls stark gesenkt werden (90

bzw. 92%), wobei in diesen Fällen der Zusammenhang zwischen der therapeutischen Impfung und dem Abfall des Antigens nicht klar erkennbar und eher auf die Lamivudinbehandlung zurückzuführen ist. Letztendlich führte diese Kombinationstherapie jedoch zu keiner dauerhaften Senkung des Antigentiters. Bereits nach der zweiten Boosterung in Woche 18 kam es zu einem erneuten Anstieg des Antigenspiegels, wobei bei drei Tieren am Ende des Untersuchungszeitraums wieder die ursprünglichen Ausgangskonzentrationen erreicht wurden. Insgesamt zeigte sich, dass am ehesten die therapeutische Impfung mit Immunkomplex-Vakzinen einen Therapieansatz bei der chronischen Hepatitis B darstellt. Bereits in einer anderen Studie konnte der antivirale Effekt von Immunkomplex-Vakzinen bei HBV infizierten Patienten gezeigt werden (Wen et al., 1995). Hier kam es bei 64% der Patienten zu einer signifikanten Reduktion der Serum-DNA-Konzentrationen, wobei diese Patienten trotzdem HBsAg positiv und anti-HBs negativ blieben. In HBV-transgenen Mäusen bewirkte die Vakzinierung mit Immunkomplexen sogar die Serokonversion zu anti-HBs (Zheng et al., 2001), was deren immunstimulatorisches Potential unterstreicht. Inwieweit jedoch Immunkomplexe das Immunsystem anregen ist unklar. Möglicherweise werden sie durch antigenpräsentierende Zellen (APC) aufgenommen und bewirken so die Induktion der spezifischen T-Zell-Antwort (Wen et al., 1999). Die Versuche mit Immunkomplex-Vakzinen im Rahmen dieser Studie verdeutlichen jedoch, dass die Effizienz des in diesem Versuch angewandten Therapie-schemas noch unzureichend ist. Möglicherweise könnte durch eine Erhöhung der Injektionsdosis oder durch frequentere Applikation des Impfstoffs eine dauerhafte Supprimierung der Infektion erreicht werden.

Im Gegensatz zu der Vakzinierung mit Immunkomplexen erwies sich die DNA-Vakzinierung als weniger effizient. Trotz dreier verschiedener Plasmide, von denen sowohl WHsAg, WHcAg als auch Woodchuck-IFN- $\gamma$  translatiert wurden, wurde nur bei zwei von vier Tieren eine Immunantwort induziert. Durch die präventive Immunisierung mit DNA-Vakzinen konnte im Tiermodell eine Hepadnavirusinfektion verhindert werden (Lu et al., 1999, Siegel et al., 2001). Das Potential der therapeutischen Vakzinierung mit Plasmiden scheint das Immunsystem jedoch nicht effektiv genug zu beeinflussen, um eine etablierte Infektion zu supprimieren.

## 5.6 Expression von HBsAg- und WHsAg-Partikeln in transgenen Pflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Expression von HBsAg-Partikeln in transgenen Karottenzelllinien nachgewiesen werden. Aus drei verschiedenen Karottenzellkonen (Nr. 1, 9, 10) wurden mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation HBsAg-Partikel isoliert und gereinigt.

Der Nachweis des HBsAg erfolgte mittels Immunoblot nach denaturierender SDS-PAGE sowie nach nativer Agarosegel-Elektrophorese mit jeweils unterschiedlichen Detektionsantikörpern. Während sich denaturiertes HBsAg aufgrund der Komplexität der Chemilumineszenzsignale nicht eindeutig detektieren ließ, konnten unter nativen Bedingungen subvirale Partikel in den Fraktionen 5/6-9 des Saccharosegradienten sehr deutlich nachgewiesen werden. Die HBsAg-positiven Fraktionen wiesen Saccharosedichten von 30-40% auf. HBsAg-Partikel aus Plasma HBV positiver Patienten reichern sich ebenfalls bei etwa 30% Saccharose an. Allerdings differierten im nativen Immunoblot die Bandenhöhen der subviralen Partikel aus Karotte und Hefe (Standard). Da das Laufverhalten von Partikeln bei der nativen Agarosegel-Elektrophorese durch ihre Ladung und Größe beeinflusst wird, lässt sich aus den verschiedenen Bandenhöhen ableiten, dass sich die HBsAg-Partikel aus Hefe und Karotte in einem oder beiden Parametern geringfügig unterscheiden. Durch Smith et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass in Kartoffeln und Sojabohnen produziertes SHBs unter denaturierenden Bedingungen im Western Blot eine andere Proteinstruktur als das in Hefe generierte SHBs aufwies. Während bei dem in transgenen Pflanzen exprimierten Protein zwei Monomere mit 24 und 27 kDa detektiert werden konnte, ließ sich bei dem in Hefe generierten SHBs nur ein Monomer mit 24 kDa nachweisen. Der Grund dafür sind vermutlich verschiedenartig glykosilierte Formen des Proteins.

Mit Hilfe der Software „Image Quant“ wurden die Chemilumineszenzsignale im Western Blot densitometrisch quantitativ ausgewertet, wobei Expressionsraten von 12-15 µg HBsAg pro g Karottenzellpellet (Suspensionskultur) ermittelt wurden. Die Expressionsraten sind im Vergleich zu bisher publizierten Daten relativ hoch. Während in Versuchen mit transgenen Kartoffeln ähnlich große Mengen HBsAg von 8,5 +/- 2,1 µg/g Kartoffel nachgewiesen werden konnten (Thanavala

et al., 2005), ließen sich in Tomaten nur etwa 90-300ng HBsAg pro g detektieren (Gao et al., 2003).

Die Expression von HBsAg in transgenen Karotten wurde mittels ELISA bestätigt. Da es sich um einen Standard-ELISA zur Quantifizierung von HBsAg im Plasma HBV-positiver Patienten handelte, war dessen Sensitivität bei der Detektion der transgenen HBsAg-Partikel jedoch vermindert und eignete sich nur bedingt zur Bestimmung der Expressionsraten subviraler Partikel in den transgenen Karotten. Im Gegensatz zum Immunoblot, wo eine Standardreihe aus Hefe generierter subviraler Partikel die Quantifizierungsgrundlage bildete, wurde im ELISA eine Standardreihe gereinigter subviraler Partikel aus Patientenserum für die Quantifizierung verwendet. Aufgrund der strukturellen Unterschiede von subviralen Partikeln aus Plasma und transgenen Pflanzen (Smith et al., 2003) ist es sehr wahrscheinlich, dass mit diesem Nachweissystem nur ein Bruchteil der exprimierten Proteine nachgewiesen werden konnte. Um die Sensitivität des ELISA zu steigern, müsste als Standard zumindest in Hefe generiertes HBsAg verwendet werden. Insgesamt zeigte sich, dass transgene Karotten ein effizientes Expressionssystem für HBsAg-Partikel darstellen.

Die Expression von WHsAg-Partikeln in transgenen Karotten und Tabak gelang leider nicht. Schon die Transformation der klonierten Plasmide gestaltete sich als äußerst schwierig, wobei die Transformationseffizienz für Karottenzellen weitaus geringer als für Tabakzellen war. Meist starben die transformierten Karottenzellkulturen innerhalb kürzester Zeit ab, wobei über die Gründe nur spekuliert werden kann. Möglicherweise wurden durch die Integration der WHV-DNA in das Genom der Karottenzelle Apoptosefaktoren induziert, die zum Absterben der Zelle führten. Vielleicht war auch das exprimierte WHsAg im Gegensatz zu den Tabakzellen für die Karottenzellen toxisch. Die Transformation der Plasmide in Tabakzellen war erfolgreicher. Mittels RT-PCR konnte in drei von vier Klonen MWHs-mRNA nachgewiesen werden, wodurch bewiesen wurde, dass zumindest in einem Teil der transgenen Pflanzen die integrierte MWHs-DNA transkribiert wurde. Warum letztendlich kein WHsAg detektiert werden konnte, bleibt unklar. Möglicherweise eigneten sich die verwendeten Detektionsantikörper nicht für den Nachweis. Vergleichbar mit der differentiellen Struktur von in Pflanzen exprimierten HBsAg-Partikeln gegenüber HBsAg aus Hefe oder Plasma (Smith et al., 2003), könnte auch das in Tabak exprimierte WHsAg verän-

dert sein. Mutmaßlich ist die Glykosilierung der WHsAg-Partikel in Pflanzenzellen anders als in Säugerzellen. Da die verwendeten Nachweisantikörper jedoch sehr glykosidabhängig sind, ist ein Versagen der Nachweisteknik erklärlich. Eine andere These wäre, dass vielleicht die Expression von WHsAg in der Pflanze stattfindet, aber die Assemblierung der Proteine zu subviralen Partikeln unvollständig bleibt. Da beide Antikörper konformationell binden, wäre demzufolge die Detektion nicht möglich gewesen. Ein Hinweis für die unvollständige Assemblierung der subviralen Partikel ist die Detektion von WHsAg im Western Blot nach denaturierender SDS-PAGE. Allerdings ist die Aussagekraft dieses Ergebnisses eingeschränkt, da auch in der negativen Tabakkontrolle ein zwar schwaches aber trotzdem positives Signal erhalten wurde. Hierbei handelt es sich möglicherweise jedoch um eine Kreuzreaktion.

Es bestehen Möglichkeiten, die Expression von WHsAg-Partikeln in transgenen Pflanzen zu optimieren, da Pflanzen und Tiere unterschiedliche Basentriplets bei der Translation nutzen, die dieselbe Aminosäure codieren. Über gezielte Anpassung der Nukleotidsequenz des WHsAg an das Codierungssystem der Pflanze, könnte eventuell die möglicherweise vorhandene Toxizität der Gene bzw. Translationsprodukte aufgehoben werden. Dafür wäre allerdings eine Neusynthese des gesamten Leserahmens für das WHsAg nötig.

Der Nachweis der Expression subviraler Partikel in transgenen Karotten zeigt das große Potential, das in diesem Expressionssystem steckt. Das Ziel ist letztendlich die Produktion von Subunit-Vakzinen in transgenen, essbaren Pflanzen zur Prävention der HBV-Infektion. Insbesondere die Entwicklungsländer könnten von der Weiterentwicklung dieser Art der Impfstoffproduktion profitieren. Die Vorteile der oralen Applikation gegenüber dem systemisch zu verabreichenden Impfstoff, wären neben der erheblichen Kostenreduktion, eine logistisch bessere Handhabung und eine höhere Anwendersicherheit (1.7). Eine Hürde bei der oralen Applikation von Impfstoffen stellt jedoch die Magenpassage dar, bei der die Gefahr besteht, dass das Antigen durch die im Magensaft vorhandene Säure sowie die Verdauungsenzyme denaturiert wird bzw. seine Antigenität verliert. Eine weitere wichtige Fragestellung ist natürlich, ob das Antigen potent genug ist, eine systemische Immunantwort zu erzeugen, nachdem es über die Darmmukosa aufgenommen wurde. Die Antigenpräsentation im Verdauungstrakt erfolgt über die sogenannten M-Zellen der Dünndarmschleimhaut, die Makropha-

gen und B-Lymphozyten spezifisch stimulieren und somit T-Zell-Antwort und Antikörperbildung induzieren. Entscheidend für die immunogene Wirkung des HBsAg, ist dessen ausgeprägte Vernetzung über Disulfidbrücken (Vyas et al., 1972; Sukeno et al., 1972). Durch biochemische und elektronenmikroskopische Analyse konnte gezeigt werden, dass subvirale Partikel aus Pflanzen eine komplexe tubuläre Struktur mit ausgedehnten Disulfidbrückenbindungen aufweisen, die sich im ER der Pflanzenzelle anreichern (Smith et al., 2003). Versuche mit bereits HBV-geimpften Probanden (Antikörper-Titer  $\leq 115$  mIU/ml), die 2-3x durch die orale Aufnahme HBsAg produzierender Kartoffeln geboostert wurden (Dosis: 100g Kartoffel mit 8,5  $\mu$ g/g HBsAg), zeigten bei 60% der Studienteilnehmer eine spezifische Immunantwort. Dabei wurden z.T. finale Antikörper-Titer von  $\geq 1000$  mIU/ml erreicht, ohne dass ein orales Adjuvans verwendet wurde (Thanavala et al., 2005). Zwar ist das Erzeugen der spezifischen Immunantwort schon ein wichtiger Beweis dafür, dass HBsAg produzierende Pflanzen immunogen wirken, doch insbesondere im Hinblick auf das Risiko statt Immunität, Immuntoleranz zu erzeugen sowie zur Bestätigung, dass die erworbene Immunität vor dem Virus schützt, wären Tierversuche wichtig.

## 6 Zusammenfassung

Die Infektion von Waldmurmeltieren der USA (woodchucks) mit Hepadnaviren ist ein wichtiges Modell für die Hepatitis B Infektion des Menschen. Hepadnaviren sind sehr speziesspezifisch, z.B. kann das Virus des Menschen nicht Woodchucks infizieren. Daher war es von Interesse zu prüfen, ob Hepadnaviren aus verwandten Nagetieren in Woodchucks eine Infektion auslösen und wie diese verlaufen würde.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal die speziessübergreifende Infektion von adulten Amerikanischen Waldmurmeltieren (Woodchucks, *Marmota monax*) mit den artfremden Virusspezies GSHV des Erdhörnchens (Ground Squirrels, *Spermophilus beecheyi*) sowie ASHV des Arktischem Hörnchens (Arctic Squirrel, *Spermophilus parryi kennicotti*) gezeigt werden. Mit Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) inokulierte Woodchucks dienten als Kontrollgruppe. Trotz gleicher Inokulationsdosis und unabhängig von der Virusspezies variierten die individuellen Infektionsverläufe stark hinsichtlich Intensität und Dauer der Virämie und Antigenämie. Bei den hoch replikativen Tieren wurden noch höhere Virus- und Antigenkonzentrationen als bei der akuten Hepatitis B des Menschen erreicht. Im Gegensatz zur menschlichen Hepatitis B war eine sehr rasche Eliminierung des Antigens aus dem Serum innerhalb von 1-2 Wochen und eine langsame Eliminierung des Virus, die bis zu vier Monate dauerte, zu beobachten. Bei allen Tieren konnte während der Viruselimination eine Reduktion der Virus-DNA im Serum um einige Zehnerpotenzen detektiert werden, bevor ein deutlicher Anstieg der leberspezifischen Enzyme (Sorbitol-Dehydrogenase, SDH) eine hepatozelluläre Schädigung erkennen ließ. Die vollständige Eliminierung des Virus war mit der Normalisierung der pathologischen SDH-Konzentrationen assoziiert. Die Detektion von Oberflächenantigen-Immunkomplexen kurz nach Erreichen der maximalen Virämie und Antigenämie zeigt, dass Antikörper gegen die viralen Hüllproteine (S, M, L) direkt an der Eliminierung viraler und subviraler Partikel beteiligt sind. Die individuellen Infektionsverläufe bei gleicher Inokulationsdosis lassen vermuten, dass ähnlich wie beim Menschen der Zeitpunkt und die Qualität der antiviralen Immunantwort jedes Individuums den Verlauf der Virusreplikation und letztendlich die Terminierung der Infektion determinieren.

Desweiteren konnten die Proteinmuster der Oberflächenproteine von GSHV und ASHV charakterisiert werden. Sowohl das S-, M- als auch L-Protein der beiden Virusspezies erwiesen sich hinsichtlich ihrer Proteinstruktur als nahezu identisch mit den Oberflächenproteinen von WHV. Lediglich das M-Protein von ASHV wies eine differente Struktur auf, welche möglicherweise mit einem speziellen Glykosilierungsmuster assoziiert ist.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die therapeutische Applikation von kombinierten DNA- und Immunkomplexvakzinen einen deutlich reduzierenden Effekt auf die Antigenämie bei chronisch WHV-infizierten Woodchucks hat. Während der Therapie war eine Abnahme der WHsAg-Konzentration um 70-90% zu verzeichnen. Die Applikation von DNA-Vakzinen allein beeinflusste den Antigenverlauf ebenfalls, wenn auch weniger effizient.

Ein weiteres Impfstoffkonzept zur Prävention der HBV-Infektion sieht die Generierung von Subunit-Vakzinen in essbaren Pflanzen vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurden HBsAg- und WHsAg-codierende Plasmide in Karotten- und Tabakzellen transformiert und anschließend die Expression der subviralen Partikel in den Pflanzen untersucht. Während sich HBsAg-Partikel eindeutig in Karottenzellkulturen nachweisen ließen, konnten WHsAg-Partikel weder in Karotten- noch in Tabakzellkulturen detektiert werden. Jedoch ließ sich in einzelnen Tabak-Klonen MWHs-mRNA nachweisen. In den HBsAg-Karottenzellkulturen konnten Expressionsraten von 12-15 µg HBsAg pro g Karottenzellpellet ermittelt werden.

## 7 Summary

The infection of woodchucks with hepadnaviruses is an important model for the human hepatitis B virus infection. Hepadnaviruses are very species-specific, e.g. does the human virus not infect woodchucks. Therefore, it was of interest to study whether and how hepadnaviruses from related rodents could establish an infection in woodchucks.

In the present work, the infection of adult woodchucks (*Marmota monax*) with two viruses that naturally infect other species (GSHV from ground squirrels, *Spermophilus beecheyi* and ASHV from arctic squirrels, *Spermophilus parryi kennicotti*) was demonstrated for the first time. Woodchucks experimentally infected with Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) served as controls. Despite using the same dose of inoculum, and independent of the virus species inoculated, the course of infection varied strongly in individual woodchucks in regard to the intensity and duration of viremia and antigenemia. Very high concentrations of virus and antigen were reached in the highly replicating animals, higher than in acute HBV infected humans. In contrast to human Hepatitis B a very rapid occurring clearance of antigen from serum within 1-2 weeks and a slow elimination of virus from serum that lasted up to 4 months were obvious. In all animals a reduction of viral DNA from serum by several decades was detected during the clearance phase, before a significant rise of liver-specific enzymes such as sorbitol dehydrogenase (SDH) indicated hepatocellular impairment. The complete elimination of virus was associated with a decline of SDH activity to normal serum titers. The detection of surface antigen bound to immuno complexes shortly after the peak of viremia and antigenemia in most animals demonstrates the involvement of anti-surface antibodies (anti-s) in the elimination process of viral and subviral particles. The variation in the individual infection courses despite the use of the same dose of inoculum suggests that especially the time point and the quality of the individual immune response determines inhibition of virus replication leading to the termination of infection.

Furthermore the pattern of GSHV and ASHV surface proteins was characterized. The protein structure of the S-, M- and L-proteins from both virus species was nearly identical to the surface proteins of WHV. Only the M-protein

of ASHV revealed a different structure that perhaps is associated with a special form of glycosylation of this protein.

Moreover, it was reported recently that the combined therapeutic application of DNA- and immuno complex-based vaccines reduced significantly the serum antigen concentration in chronic WHV carrier woodchucks. During the above therapy, a reduction of serum WHsAg of approximately 70-90% was observed. The application of DNA-based vaccines alone also had an effect on antigen concentration but this was less pronounced.

Another vaccination concept for the prevention of HBV infection is the generation of subunit vaccines in edible plants. In the present work, plasmids encoding for HBsAg or WHsAg were transformed into plant cells derived from carrots and tobacco and the expression of subviral particles in these cells was tested subsequently. While particles containing HBsAg could be clearly detected in cell cultures of carrot, WHsAg particles were undetectable in cell cultures of carrot and tobacco. However, in individual clones of tobacco the expression of MWHS mRNA was demonstrated. In cell cultures of carrot expressing HBsAg, protein expression rates between 12 to 15 µg HBsAg per g carrot cell pellet were obtained.

## 8 Literaturverzeichnis

- Almeida, J.D., Rubinstein, D. und Stott, E.J. (1971).** *New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis.* Lancet II: 1225-1227
- Arakawa, T., Chong, D.K. und Langridge, W.H. (1998).** *Efficacy of a food plantbased oral cholera toxin B subunit vaccine.* Nat. Biotechnol. 16: 292-297
- Barker, L.F., Chisari, F.V., McGrath, P.P. und Dalgard, D.W. (1973).** *Transmission of type B viral hepatitis to chimpanzees.* J. Infect. Dis. 127:648-662
- 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.
- 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
- Biemelt S., Sonnewald U., Galmbacher P., Willmitzer L. und Müller M. (2003).** *Production of Human Papillomavirus Type 16 virus-like particles in transgenic plants.* J. Virol. 77:9211–9220
- 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.
- Boni, C., Bertoletti, A., Penna, A., Cavalli, A., Pilli, M., Urbani, S., Scognamiglio, P., Boheme, R., Panebianco, R., Fiaccadori, F. und Ferrari, C. (1998).** *Lamivudine treatment can restore T cell responsiveness in chronic hepatitis B.* J Clin Invest. 102(5):867-8.
- 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, S.F., Netter, H.J., Hildt, E., Schuster, R., Schaefer, S., Hsu, Y.C., Rang, A. und Will, A. (2001).** *Duck hepatitis B virus expresses a regulatory HBx-like protein from a hidden open reading frame.* J. Virol. 75:161–170.
- Chikwamba, R., Cunnick, J., Hathaway, D., McMurray, J., Mason, H. und Wang, K. (2001).** *A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against Escherichia coli heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT).* Transgenic Res 11: 479-493

- Chisari, F. V. und Ferrari, C. (1995).** *Immunopathogenesis of viral hepatitis* Annu. Rev. Immunol. 13, 29–60.
- Chulanov, V.P., Shipulin, G.A., Schaefer, S und Gerlich, W.H. (2003).** *Kinetics of HBV DNA and HBsAg in acute hepatitis B patients with and without coinfection by other hepatitis viruses.* J. Med. Virol. 69: 313-323
- Cohen, J. I., R. H. Miller, B. Rosenblum, K. Denniston, J. L. Gerin und R. H. Purcell (1988).** *Sequence comparison of woodchuck hepatitis virus replicative forms.* Virology 162:12–20.
- Cote, P. J., und J. L. Gerin (1983).** *Nonoverlapping antigenic sites of woodchuck hepatitis virus surface antigen and their cross-reactivity with ground squirrel hepatitis virus and hepatitis B virus surface antigens.* J. Virol. 47:15–23.
- Cote P. J., Korba B. E., Steinberg H., Ramirez-Meija C., Baldwin B. H., Hornbuckle W.E., Tennant B. C. und Gerin J. L. (1991).** *Cyclosporin A modulates the course of woodchuck hepatitis virus infection and induces chronicity.* J. Immunol. 146:3138–3144.
- Cote P. J., Korba B. E., Baldwin B. H., Hornbuckle W. E., Tennant B. C. und Gerin J. L. (1992).** *Immunosuppression with cyclosporine A during the incubation period of experimental woodchuck hepatitis virus infection increases the frequency of chronic infection in adult woodchucks.* J. Infect. Dis. 166:628–631.
- Cote P.J. und Gerin J.L. (1996).** *The woodchuck as a model of hepadnavirus infection, pathogenesis and therapy.* FORUM Trends Exp. Clin. Med. 6:131–159.
- Cote P. J., Korba B. E., Miller R. H., Jacob J. R., Baldwin B. H., Hornbuckle W. E., Purcell R. H., Tennant B. C. und Gerin J. L. (2000a).** *Effects of age and viral determinants on chronicity as an outcome of experimental woodchuck hepatitis virus infection.* Hepatology 31:190–200.
- Cote P. J., Toshkov I., Bellezza C., Ascenzi M., Roneker C., Graham L. A., Baldwin B. H., Gaye K., Nakamura I., Korba B. E., Tennant B. C. und Gerin J. L. (2000b).** *Temporal pathogenesis of experimental neonatal woodchuck hepatitis virus infection: Increased initial viral load and decreased severity of acute hepatitis during the development of chronic viral infection.* Hepatology 32:807–817.
- Creighton, W.D., Lambert, P.H. und Miescher, P.A. (1973).** *Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with PEG.* J. Immunol. 111:1219
- 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.

- Daniell, H., Lee, S.B., Panchal, T. und Wiebe, P.O. (2001).** *Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts.* J. Mol. Biol. 311: 1001-1009
- Davis, H. L., Schirmbeck, R. und Reimann, J. (1995).** *DNA-mediated immunisation in mice induces a potent MHC class I restricted cytotoxic T lymphocyte response to the HB envelope protein.* Human Gene Therapy 6:1447-1456
- Davis, H. L., McCluskie, M. J., Gerin, J. L. und Purcell, R. H. (1996).** *DNA vaccine for hepatitis B: Evidence for immunogenicity in chimpanzees and comparison with other vaccines.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7213-7218
- Doerr, H. W. und Gerlich, W. H. (2002).** *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder.* Thieme Verlag
- Feitelson, M. A., P. L. Marion und W. S. Robinson (1981).** *Antigenic and structural relationships of the surface antigens of hepatitis B virus, ground squirrel hepatitis virus, and woodchuck hepatitis virus.* J. Virol. 39:447-454.
- Feitelson, M. A., Marion, P. L. und Robinson, W. S. (1982).** *Core particles of hepatitis B virus and Ground Squirrel hepatitis virus.* J. Virol. 43: 687-696.
- Feitelson, M.A., P.L. Marion und W.S. Robinson (1983).** *The nature of polypeptides larger in size than the major surface antigen components of hepatitis B like viruses in ground squirrels, woodchucks and ducks.* Virology 130:76-90.
- Feitelson, M. A., Millman, I. und Blumberg, R. (1986).** *The hepadnavirus family: animal hepadnaviruses.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2994-2997.
- Frommel, D., D. Crevat, L. Vitvitsky, C. Pichoud, O. Hantz, M. Chevalier, J. A. Grimaud, J. Lindberg und C. G. Trépo (1984).** *Immunological aspects of woodchuck hepatitis.* Am. J. Pathol. 115:125-134.
- Galibert, F., T. N. Chen und E. Mandart (1982).** *Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: comparison with the hepatitis B virus sequence.* J. Virol. 41:51-65.
- Ganem, D., B. Weiser, A. Barchuk, R. J. Brown, und H. E. Varmus (1982).** *Biological characterization of acute infection with ground squirrel hepatitis virus.* J. Virol. 44:366-373
- Ganem, D. und Varmus, H. E. (1987).** *The molecular biology of hepatitis B viruses.* Ann. Rev. Biochem. 56: 651-693.
- Gao, Y., Ma, Y., Li, M., Cheng, T., Li, S.W., Zhang, J. und Xia, N.S. (2003).** *Oral immunization of animals with transgenic cherry tomatillo expressing HBsAg.* World J. Gastroenterol. 9(5):996-1002
- Gerin, J.L. (1990).** *Experimental WHV infection of woodchucks: an animal model of hepadnavirus-induced liver cancer.* Gastroenterol Jpn. Suppl 2:38-42

**Gerlich, W.H. und Thomsson, R. (1975).** *Standardized detection of hepatitis B surface antigen: determination of its serum concentration in weight units per volume.* Develop. Bio. Standard. 30: 78-87.

**Gerlich, W. H., Feitelson M.A., Marion P.L., und Robinson W.S. (1980).** *Structural relationships between the surface antigens of ground squirrel hepatitis virus and human hepatitis B virus.* J. Virol. 36:787-795

**Gerlich, W. H. und Robinson, W. S. (1980).** *Hepatitis B virus contains protein attached to the 5'terminus of its complete DNA-strand.* Cell 21: 801-809.

**Gerlich, W. H., Wendt, U. und Glebe, D. (2003).** *Quantitative assay of hepatitis B surface antigen in serum or plasma using Laurell Electrophoresis* Methods in Molecular Medicine vol. 95: Hepatitis B and D Protocols, volume 1 Edited by: R.K. Hamatake and J.Y.N. Lay

**Girones, R., Cote, P.J., Hornbuckle, W.E., Tennant, B.C., Gerin, J.L., Purcell, R.H. und Miller, R.H. (1989).** *Complete nucleotide sequence of a molecular clone of woodchuck hepatitis virus that is infectious in the natural host.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1846–1849.

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

**Guidotti, L.G., Ando K., Hobbs, M.V., Ishikawa T., Runkel L., Schreiber, R.D. und Chisari, F.V.. (1994).** *Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3764–3768

**Guidotti, L.G., Ishikawa, T., Hobbs, M.V., Matzke, B., Schreiber, R. und Chisari, F.V. (1996).** *Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes.* Immunity 4:25–36

**Guidotti, L.G., Rochford, R., Chung, J., Shapiro, M., Purcell, R., und Chisari, F.V. (1999).** *Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection.* Science 284:825–829

**Guo, J.T., Zhou, H., Liu, C., Aldrich, C., Saputelli, J., Whitaker, T., Barrasa, M.I., Mason, W.S. und Seeger, C. (2000).** *Apoptosis and regeneration of hepatocytes during recovery from transient hepadnavirus infections.* J. Virol. 74:1495–1505.

**Heise, T., Guidotti, L.G., Chiari, F.V. (2001).** *Characterization of nuclear RNases that cleave hepatitis B virus RNA near the La protein binding site.* J Virol. 75(15):6874-83.

**Heermann, K.H., und Gerlich, W.H. (1991).** *Surface proteins of hepatitis B viruses.* CRL Press, Boca Raton

- Heermann, K.H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H. und Gerlich, W.H. (1984).** *Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence.* J. Virol. 52: 396-402.
- Hermann L., Jacobs A., VanMontagu M. und Depicker A. (1990).** *Plant maker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integration events.* Mol. Gen. Genet. 224:248-256
- Hervas-Stubbs, S., Lasarte, J.J., Sarobe, P., Vivas, I., Condreay, L., Cullen, J.M., Prieto, J. und Borrás-Cuesta, F. (2001).** *T-helper cell response to woodchuck hepatitis virus antigens after therapeutic vaccination of chronically-infected animals treated with lamivudine.* J Hepatol. 35(1):105-11.
- Heß, D. (1992).** *Biotechnologie der Pflanzen. Eine Einführung.* UTB Verlag Ulmer
- Hillemann, M.R. (1993).** *Plasma-derived hepatitis B vaccine: a breakthrough in preventive medicine.* In: Hepatitis B Vaccines in Clinical Practice. 2:17-39
- Hornbuckle, W.E., Graham, E.S., Roth, L., Baldwin, B.H., Wickenden, C. und Tennant, B.C. (1985).** *Laboratory assessment of hepatic injury in the woodchuck (Marmota monax).* Lab. Anim. Sci. 35:376–381.
- 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.
- Imani J., Berting A., Nitsche S., Schaefer S., Gerlich W. H. und Neumann K.-H. (2002).** *The integration of a major Hepatitis B virus gene into cell-cycle synchronized carrot cell suspension cultures and its expression in regenerated carrot plants.* Plant Cell 71:157-164
- Jilbert, A.R., Wu, T.-T., England, J.M., Hall, P.d.I.M., Carp, N.Z., O'Connell, A.P. und Mason, W.S. (1992).** *Rapid resolution of duck hepatitis B virus infections occurs after massive hepatocellular involvement.* J Virol 66:1377-88.
- Jilbert, A.R., Botten, J.A., Miller, D.S., Bertram, E.M., Hall, P.d.I.M., Kotlarski, I. und Burrell, C.J. (1998).** *Characterization of age- and dose-related outcomes of duck hepatitis B virus infection.* Virology 243:273-82
- Jilbert A. R. und Kotlarski I. (2000).** *Immune response to duck hepatitis B virus infection.* Development and Comparative Immunology 24:285-302
- Jin, Y.M., Churchill, N.D. und Michalak, T.I. (1996).** *Protease-activated lymphoid cell and hepatocyte recognition site in the preS1 domain of the large woodchuck hepatitis virus envelope protein.* J. Gen. Virol. 77 (Pt 8):1837-1846

- Jones, C.D., Page, M., Bacon, A., Cahill, E., Bentley, M. und Chatfield, S.N. (2000).** *T cell and antibody response characterization of a new recombinant Pre-S1, Pre-S2 and SHBs antigen containing hepatitis B vaccine; demonstration of superior anti-SHBs antibody induction in responder mice.* Vaccine 17:2528–37.
- Kajino K., Jilbert A. R., Saputelli J., Aldrich C. E., Cullen J. und Mason W. S. (1994).** *Woodchuck hepatitis virus infections: Very rapid recovery after a prolonged viremia and infection of virtually every hepatocyte.* J. Virol. 68:5792–5803.
- Kann, M. und Gerlich, W. H. (2005).** *Hepatitis B.* In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. (in press).
- 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.
- Kapusta, J., Modelska, A., Figlerowicz, M., Pniewski, T., Letellier, M., Lisowa, O., Yusibov, V., Koprowski, H., Plucienniczak, A. und Legocki, A.B. (1999).** *A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus.* FASEB J. 13: 1796-1799
- 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: 1009–19
- Kodama, K., Ogasawara, N., Yoshikawa, H. und Murakami, S. (1985).** *Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: evolutionary relationship between hepadnaviruses.* J. Virol. 56:978–986
- Kong, Q.X, Richter, L., Yang, Y.F., Arntzen, C.J., Mason, H.S. und Thanavala, Y. (2001).** *Oral immunization with Hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 11539-11544
- Laemmli, U.K. (1970).** *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature. 227(5259): 680-5
- Landers, T. A., Greenberg, H.B. und Robinson, W. S. (1977).** *Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction.* J. Virol. 23: 368-376.
- 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
- Lauterslager, T.G., Florack, D.E., Wal, T.J., Molthoff, J.W., Langeveld, J.P., Bosch, D., Boersma, W.J. und Hilgers, LA. (2001)** *Oral immunization of naïve and primed animals with transgenic potato tubers expressing LT-B.* Vaccine 19: 2749-2755

- Lok, A.S., Lai, C.L., Leung, N., Yao, G.B., Cui, Z.Y., Schiff, E.R., Dienstag, J.L., Heathcote, E.J., Little, N.R., Griffiths, D.A., Gardner, S.D. und Castiglia, M. (2003).** *Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B.* Gastroenterology. 126(7):1932-3
- Lu, M., Hilken, G., Kruppenbacher, J., Kemper, T., Schirmbeck, R., Reimann, J. und Roggendorf, M. (1999).** *Immunization of woodchucks with plasmids expressing woodchuck hepatitis virus (WHV) core antigen and surface antigen suppresses WHV infection.* J Virol. 73(1):281-9
- Lu, M., Yao, X., Xu, Y., Lorenz, H., Dahmen, U., Chi, H., Dirsch, O., Kemper, T., He L., Glebe, D., Gerlich, W.H., Wen, Y. und Roggendorf M. (zur Publikation eingereicht).** *Combination Therapy with Antiviral Drug and Immunomodulation against Chronic Hepatitis B Virus Infection: Evaluation in the Woodchuck Model.* Hepatology
- Madalinski, K. und Bragieli, I. (1979).** *HBsAg immune complexes in the course of infection with hepatitis B virus.* Clin. Exp. Immunol. 36:371
- Madalinski, K., Burczynska, B., Heermann, K.H., Uy, A. und Gerlich, W.H. (1991).** *Analysis of viral proteins in circulating immune complexes from chronic carriers of hepatitis B virus.* Clin Exp Immunol 84:493-500
- 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., Knight, S.S., Salazar, F.H., Popper, H. und Robinson, W.S. (1983).** *Ground squirrel hepatitis virus infection.* Hepatology 3:519-527.
- Marion, P.L., Knight, S.S., Ho, B.K., Guo, Y.Y., Robinson, W.S. und Popper, H. (1984).** *Liver disease associated with duck hepatitis B virus infection of domestic ducks.* Proc Natl Acad Sci USA 81:898- 902
- Marion, P.L., Van Davelaar, M.J., Knight, S.S., Salazar, F.H., Garcia, G., Popper, H. und Robinson, W.S. (1986).** *Hepatocellular carcinoma in ground squirrels persistently infected with ground squirrel hepatitis virus.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4543-4546.
- 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.
- 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, H.S, Lam, D.M.K. und Arntzen, C.J. (1992).** *Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants.* Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 11745-11749

- Mason, H.S., Ball, J.M., Shi, J.J., Jiang, X., Estes, M.K. und Arntzen, C.J. (1996).** *Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice.* Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 5335-5340
- Mason, H.S., Haq, T.A., Clements, J.D. und Arntzen, C.J. (1998).** *Edible vaccine protects mice against Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene.* Vaccine 16: 1336- 1343
- Mason, W.S., Burrell, C.J., Casey, J., Gerlich, W.H., Howard, C.R., Kann, M., Lanford, R., Newbold, J., Schäfer, S., Taylor, J.M. und Will, H. (2005).** **Hepadnaviridae** in Virus Taxonomy (Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses): 373-384
- McGarvey, P.B., Hammond, J., Dienelt, M.M., Hooper, D.C., Fu, Z.F., Dietzschold, B., Koprowski, H. und Michaels, F.H. (1995).** *Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes.* Biotechnology 13: 1484-1487
- Meier, P., Scougall, C.A., Will, H., Burrell, C.J. und Jilbert, A.R. (2003).** *A duck hepatitis B virus strain with a knockout mutation in the putative X ORF shows similar infectivity and in vivo growth characteristics to wild-type virus.* Virology 317:291–298.
- Menne, S., Ronecker, C.A., Korba, B.E., Gerin, J.L., Tennant, B.C. und Cote, P.J. (2002b).** *Immunization with surface antigen vaccine alone and after treatment with 1-(2-fluoro-5-methyl-b-L-arabinofuranosyl)-uracil (L-FMAU) breaks humoral and cell-mediated immune tolerance in chronic woodchuck hepatitis virus infection.* J Virol 76:5305–5314.
- Menne, S., Maschke, J., Tolle, T.K., Lu, M. und Roggendorf, M. (1997).** *Characterization of T-cell response to woodchuck hepatitis virus core protein and protection of woodchucks from infection by immunization with peptides containing a T-cell epitope.* J. Virol. 71:65–74
- Menne, S., Maschke, J., Tolle, T.K., Kreuzfelder, E., Grosse-Wilde, H. und Roggendorf, M. (1997).** *Determination of peripheral blood mononuclear cell responses to mitogens and woodchuck hepatitis virus core antigen in woodchucks by 5-bromo-29-deoxyuridine or 2[3H]adenine incorporation.* Arch. Virol. 142: 511–521.
- Menne, S., Maschke, J., Lu, M., Grosse-Wilde, H. und Roggendorf, M. (1998).** *T cell response to woodchuck hepatitis virus (WHV) antigens during acute self-limited WHV infection and convalescence and after viral challenge.* J. Virol. 72:6083–6091
- Michel, M.L., Davis, H.L. und Schleff, M. (1995).** *DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice: aspects of the humoral response mimic HBV infections in humans.* Proc. Natl. Acad. Sci. 92:5307-5311
- Minuk, G.Y., Shaffer, E.A., Hoar, D.I. und Kelly, J. (1986).** *Ground squirrel hepatitis virus (GSHV) and hepatocellular carcinoma in the Canadian Richardson ground squirrels.* Liver 6:350–356.

- Mouliia-Pelat, J.P., Spiegel, A., Martin, P.M., Cardines, R., Boutin, J.P., Roux, J.F., Excler, J.L. und Saliou, P. (1994).** *A 5 year immunization field trial against hepatitis B using CHO cell recombinant vaccine in French Polynesian newborns.* Vaccine 12:499–502.
- Murray, J.M., Wieland, S.F., Purcell, R.H. und Chisari, F.V. (2005).** *Dynamics of hepatitis B virus clearance in chimpanzees.* Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 17780–17785
- 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 (2002)
- Neurath, A. R., S. B. H. Kent, N. Strick und K. Parker (1986).** *Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus.* Cell 46:429–436.
- Omata, M., Yokosuka, O., Imazeki, F., Matsuyama, Y., Uchiumi, K., Ito, Y., Mori, J. und Okuda, K. (1984).** *Transmission of duck hepatitis B virus from Chinese carrier ducks to Japanese ducklings: a study of viral DNA in serum and tissue.* Hepatology 4(4):603-7
- Persing, D.H., Varmus, H.E. und Ganem, D. (1987).** *The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid.* J. Virol. 61:1672–1677.
- Poland, G.A., Murray, D. und Bonilla-Guerrero, R. (2002).** *New vaccine development.* Clinical review BMJ 324:1315-1319
- Popper, H., Roth, L., Purcell, R.H., Tennant, B.C. und Gerin, J.L. (1987).** *Hepatocarcinogenicity of the woodchuck hepatitis virus.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:866-870.
- 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
- 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
- Rehermann, B., Chang, K.M., McHutchinson, J., Kokka, R., Houghton, M., Rice, C.M. und Chisari, F.V. (1996a).** *Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients.* J. Virol. 70:7092–7102.
- Rehermann, B., Lau, D., Hoofnagle, J.H., und Chisari, F.V. (1996b).** *Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection.* J. Clin. Investig. 97:1655–1665.

- Richter, L.J., Thanavala, Y., Arntzen, C.J., Mason, H.S. (2000).** *Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization.* Nat. Biotechnol. 18: 1167-1171
- 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: 1231-6.
- Robinson, W.S. (1977).** *The genome of hepatitis B virus.* Ann. Rev. Microbiol. 31: 357-377.
- Robinson, W.S. (1991).** *Hepadnaviridae and their replication.* In: Fundamental Virology 2<sup>nd</sup> Ed pp. 989-1021, Fields, B.N. and Knipe, D.N., Raven Press, New York.
- Sattler, F. und Robinson, W.S. (1979).** *Hepatitis B viral DNA have cohesive ends.* J. Virol. 32: 226-233.
- Schaefer S., Glebe D., Wend U., Oyunbileg J. und Gerlich W.H. (2003).** *Universal primers for real-time amplification of DNA from all known Orthohepadnavirus species.* J. Virol. 27:30 - 37
- Schaefer, S., Tolle, T., Lottmann, S. und Gerlich, WH. (1998).** *Animal models and experimental systems for the study of hepadnaviruses.* In: Koshy R und Caselmann WH (Herausgeber): Hepatitis B Virus: molecular mechanisms in disease and novel strategies for therapy. p. 51-74, Imperial College Press, London
- Schaeffer, E., Snyder, R.L. und Sninsky, J.J. (1986).** *Identification and localization of pre-S-encoded polypeptides from woodchuck and ground squirrel hepatitis viruses.* J. Virol. 57:173–182.
- Schmitt, S., Glebe, D., Alving, K., Tolle, T.K., Linder, M., Geyer, H., Linder, D., Peter-Katalinic, J., Gerlich, W.H. und Geyer, R. (1999).** *Analysis of the PreS2 N- and O-linked glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus.* J. Biol. Chem. 274: 476-482.
- Schmitt, S., Glebe, D., Tolle, T.K., Lochnit, G., Linder, D., Geyer, R. und Gerlich, W.H. (2004).** *Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus.* J Gen Virol. 85(Pt 7): 2045-53.
- Schödel, F., Sprengel, R., Weimer, T., Fernholz, D. Schneider, R. und Will, H. (1991).** *The biology of avian hepatitis B viruses.* CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Seeger, C., D. Ganem und H. E. Varmus (1984).** *The cloned genome of ground squirrel hepatitis virus is infectious in the animal.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5849-5852.

- Seeger, C., Ganem D. und Varmus H.E. (1984).** *The nucleotide sequence of an infectious molecularly cloned genome of ground squirrel hepatitis virus.* J. Virol. 51:367-375.
- Seeger, C., Ganem, D. und Varmus, H.E. (1986).** *Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy.* Science 232: 477-484.
- Seeger C., Marion P. L., Ganem D. und Varmus H. E. (1987).** *In vitro recombinants of ground squirrel and woodchuck hepatitis viral DNAs produce infectious virus in squirrels.* J. Virol. 61:3241-3247
- Seeger C., Baldwin B., Hornbuckle W. E., Yeager A. E., Tennant B. C., Cote P., Ferrell L., Ganem D. und Varmus H. E. (1991).** *Woodchuck hepatitis virus is a more efficient oncogenic agent than ground squirrel hepatitis virus in a common host.* J. Virol. 65:1673–1979
- 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.
- Siegel, F., Lu, M. und Roggendorf, M. (2001).** *Coadministration of gamma interferon with DNA vaccine expressing woodchuck hepatitis virus (WHV) core antigen enhances the specific immune response and protects against WHV infection.* J. Virol. 75(11):5036-42
- Smith M. L., Keegan M. E., Mason H. S. und Shuler M. L. (2002).** *Factors important in the extraction, stability and in vitro assembly of the Hepatitis B surface antigen derived from recombinant plant systems.* Biotechnol. Prog. 18:538-550
- Smith, M., Richter, L., Arntzen, C., Shuler, M. und Mason, H. (2003).** *Structural characterization of plant-derived hepatitis B surface antigen employed in oral immunization studies.* Vaccine 21, 4011–4021.
- Soulie, J.C., Devillier, P., Santarelli, J., Goudeau, A., Vermeulen, P. und Geullier, M. (1991).** *Immunogenicity and safety in newborns of a new recombinant hepatitis B vaccine containing the S and pre-S2 antigens.* Vaccine. 9(8): 545-8.
- 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
- Stamm B., Gerlich W.H. und Thomssen R. (1980).** *Quantitative determination of antibody against hepatitis B surface antigen: measurement of its binding capacity.* J. Biol. Stand. 8:59-68

- Stuyver, L.J., Locarnini, S.A., Lok, A., Richman, D.D., Carman, W.F., Dienstag, J.L. und Schinazi, R.F. (2001).** *Nomenclature for Antiviral-Resistant Human Hepatitis B Virus Mutations in the Polymerase Region.* Hepatology 33(3):751-7.
- Sukeno, N., Shirachi, R., Yamaguchi, J., Ishida, N. (1972).** *Reduction and re-oxidation of Australia antigen: loss and reconstitution of particle structure and antigenicity.* J. Virol. 9(1):182–3.
- Summers, J.A., O’Connell, A. und Millman, I. (1975).** *Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 4597-4601.
- Summers, J., 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.
- Suzuki, H. Iino, S. Shiraki, K., Akahane, Y., Okamoto, H. und Domoto, K. (1994).** *Safety and efficacy of a recombinant yeast-derived pre S<sub>2</sub> + S-containing hepatitis B vaccine (TGP-943): phase 1, 2 and 3 clinical testing.* Vaccine. 12: 1090-6.
- Tacket C. O. und Mason H. S. (1999).** *A review of oral vaccination with transgenic vegetables.* Microbes and infection 1:777-783
- Tacket, C.O., Mason, H.S., Losonsky, G., Estes, M.K., Levine, M.M., Arntzen, C.J. (2000).** *Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes.* J. Infect. Dis. 182: 302-305
- Tagawa, M., Omata, M., Yokosuka, O., Uchiumi, K., Imazeki, F. und Okuda, K. (1985).** *Early events in duck hepatitis B virus infection: Sequential appearance of viral deoxyribonucleic acid in the liver, pancreas, kidney, and spleen.* Gastroenterology 89:1224-9.
- Tennant, B. C. und J. L. Gerin (1994).** *The woodchuck model of hepatitis B virus infection, p. 1455–1466.* In I. M. Arias et al. (ed.), *The liver: biology and pathobiology.* Raven Press, New York, N.Y.
- Testut P., C. A. Renard, O. Terradillos, L. Vitvitski-Trepo, F. Tekaia, C. Degott, J. Blake, B. Boyer und M. A. Buendia (1996).** *A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska.* J. Virol 70:4210-19
- Thanavala, Y., Yang, Y.-F., Lyons, P., Mason, H.S. und Arntzen, C.J. (1995).** *Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 3358–3361.

- Thanavala, Y., Mahoney, M., Pal, S., Scott, A., Richter, L., Natarajan, N., Goodwin, P., Arntzen, C.H. und Mason, H.S. (2005).** *Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 3378–3382.
- Thimme, R., Wieland, S., Steiger, C., Ghayeb, J., Reimann, K. A., Purcell, R. H. und Chisari, F. V. (2003).** *CD8<sup>+</sup> T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B Virus infection.* J. Virol. 77, 68–76.
- Tolle, T.K., Glebe, D., Linder, M., Linder, D., Schmitt, S., Geyer, R. und Gerlich, W.H. (1998).** *Structure and glycosylation patterns of surface proteins from woodchuck hepatitis virus.* J Virol 72, 9978–9985.
- Trueba D., Phelan M., Nelson J., Beck F., Pecha B. S., Brown R. J., Varmus H. E. und Ganem D. (1985)** *Transmission of ground squirrel hepatitis virus to homologous and heterologous hosts.* Hepatology, 5, 435-9
- Urban, M.K., O'Connell, A.P. und London, W.T. (1985).** *Sequence of events in natural infection of Pekin duck embryos with duck hepatitis B virus.* J Virol 55:16±22
- Vyas, G.N., Rao, K.R. und Ibrahim, A.B. (1972).** *Australia antigen (hepatitis B antigen): a conformational antigen dependent on disulfide bonds.* Science 178:1300–1
- Wang, Y., Menne, S., Baldwin, B.H., Tennant, B.C., Gerin, J.L. und Cote, P.J. (2004).** *Kinetics of viremia and acute liver injury in relation to outcome of neonatal Woodchuck Hepatitis Virus infection.* J. Med. Virol. 72:406–415
- Warzecha H., Mason H. S., Lane C., Tryggvesson A., Rybicki E., Williamson A., Clements J. D. und Rose R. C. (2003).** *Oral Immunogenicity of Human Papillomavirus-Like Particles Expressed in Potato.* J. Virol 77:8702-11
- Wen, Y.M., Wu, X.H., Hu, D.C., Zhang, Q.P. und Guo, S.Q. (1995).** *Hepatitis B vaccine and anti-HBs complex as approach for vaccine therapy.* Lancet.17;345(8964):1575-6
- Wen, Y.M., Qu, D. und Zhou, S.H. (1999).** *Antigen-antibody complex as therapeutic vaccine for viral hepatitis B.* Int Rev Immunol. 1999;18(3):251-8.
- Werner, B.G., Smolec, J.M., Snyder, R. und Summers, J. (1979).** *Serological relationship of woodchuck hepatitis virus to human hepatitis B virus.* J Virol. 32(1):314-22.
- Westhoff, T.H., Jochimsen, F., Schmittel, A., Stoffler-Meilicke, M., Schafer, J.H., Zidek, W., Gerlich, W.H. und Thiel, E. (2003).** *Fatal hepatitis B virus reactivation by an escape mutant following rituximab therapy.* Blood. 1;102(5):1930.

**Wieland, S. F., Spangenberg, H. C., Thimme, R., Purcell, R. H. und Chisari, F. V. (2004).** *Expansion and contraction of the Hepatitis B Virus transcriptional template in infected chimpanzees.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 2129–2134.

**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.

**Zambryski P. (1988).** *Basic process underlying Agrobacterium-mediated DNA transfer to plant cells.* Annu. Rev. Genet. 22:1-30

**Zheng, B.J., Ng, M.H., He, L.F., Yao, X., Chan, K.W., Yuen, K.Y. und Wen YM. (2001).** *Therapeutic efficacy of hepatitis B surface antigen-antibodies-recombinant DNA composite in HBsAg transgenic mice.* Vaccine 20;19(30):4219-25.

**Zuckerman, J.N. (1999).** *Hepatitis B third generation vaccines: improved response and conventional vaccine non-response.* Vaccine 17: 330–9.

**Zuckerman, J.N. (2006).** *Protective Efficacy, Immunotherapeutic Potential, and Safety of Hepatitis B Vaccines.* J. Med. Virol. 78:169–177

## 9 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
ALT	Alanin-Amino-Transferase (alt: GPT)
anti-ASHc	Antikörper gegen das ASHV Core Antigen
anti-ASHs	Antikörper gegen das ASHV Surface Antigen
anti-c	anti-core (Antikörper gegen das Core Protein)
anti-GSHc	Antikörper gegen das GSHV Core Antigen
anti-GSHs	Antikörper gegen das GSHV Surface Antigen
anti-HBc	Antikörper gegen das HBV Core Antigen
anti-HBs	Antikörper gegen das HBV Surface Antigen
anti-s	anti-surface (Antikörper gegen das Oberflächenprotein)
anti-WHc	Antikörper gegen das WHV Core Antigen
anti-WHs	Antikörper gegen das WHV Surface Antigen
AP	Alkalische Phosphatase; Antarktische Phosphatase
AS	Aminosäure
ASHsAg	Arctic Squirrel Hepatitis Surface Antigen
ASHV	Arctic Squirrel Hepatitis Virus
AST	Aspartat-Amino-Transferase (alt: GOT)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines (Rinder-) Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cccDNA	covalently closed circular DNA
CHO	chinese hamster ovary – Zelllinie (Hamster-Eierstockzen)
CsCl	Caesiumchlorid
c-terminal	carboxyterminal
DAB	Diaminobenzidin
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser

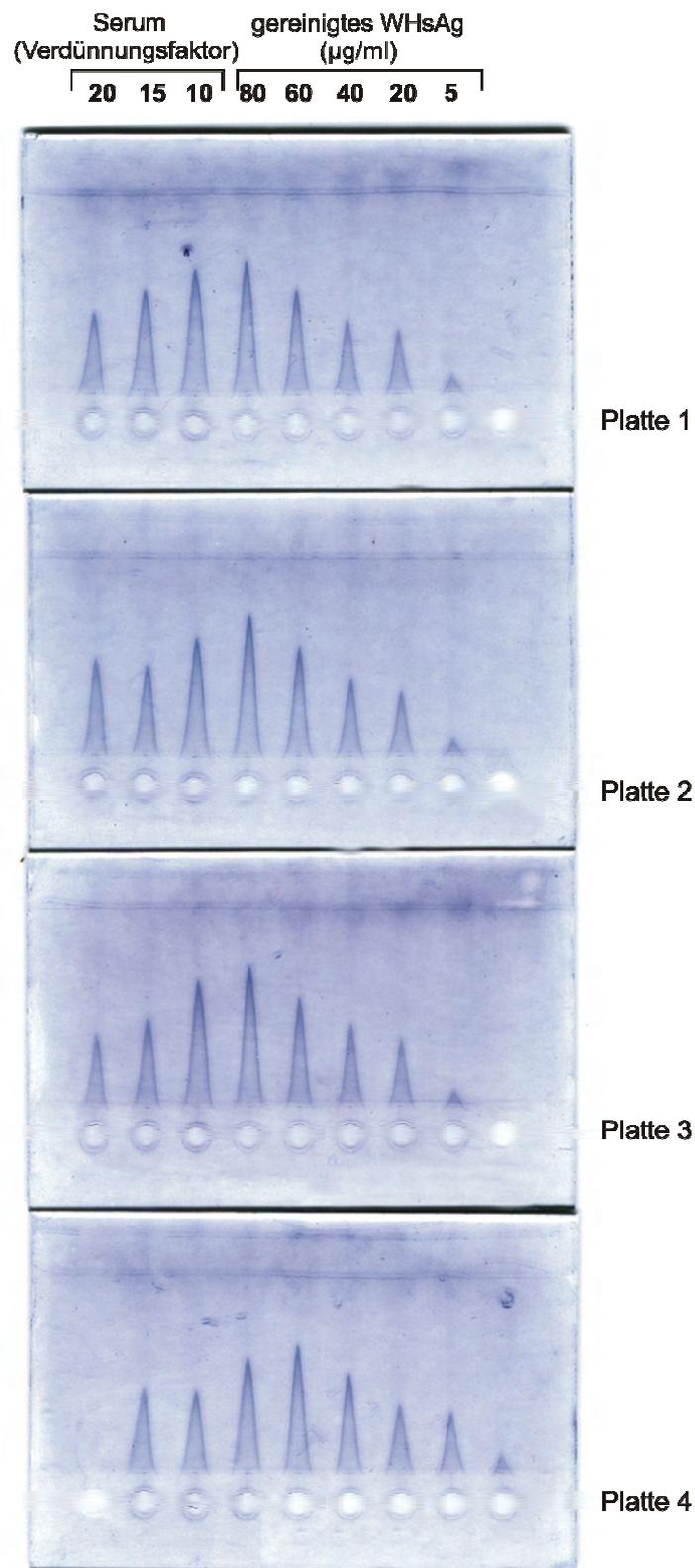
DHBV	Duck Hepatitis B Virus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	verstärkte (enhanced) Chemilumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fa.	Firma
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
	Einheit der relativen Zentrifugalbeschleunigung
GE	Genomequivalente
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GSHsAg	Ground Squirrel Hepatitis Surface Antigen
GSHV	Ground Squirrel Hepatitis Virus
h	Stunde
HBcAg	Hepatitis B Core Antigen
HBeAg	Hepatitis B e-Antigen
HBsAg	Hepatitis B Surface Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
i.m.	intramuskulär
IU/l	Internationale Einheit pro Liter (international unit per liter)
i.v.	intravenös

kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LASHs	L-Protein von ASHV
LE	Laurell Elektrophorese
LGSHs	L-Protein von GSHV
L-Protein	large surface protein (Großes Oberflächenprotein)
LWHs	L-Protein von WHV
$\mu$	mikro
m	milli
M	molar
mA	Mili-Ampère
mab	monoclonal antibody (monoklonaler Antikörper)
MASHs	M-Protein von ASHV
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MGSHs	M-Protein von GSHV
min	Minute
ml	Milliliter
M-Protein	middle surface Protein (Mittleres Oberflächenprotein)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MWHs	M-Protein von WHV
NaPP	Natriumphosphat-Puffer
ng	Nanogramm
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ODU	optical density unit
OPD	o-Phenylendiamin
ORF	open reading frame

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
p.i.	post inoculationem /post infectionem
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
sAg	surface antigen (Oberflächenantigen)
SASHs	S-Protein von ASHV
SDH	Sorbit-Dehydrogenase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SGSHs	S-Protein von GSHV
SHBs	S-Protein von HBV
S-Protein	small surface protein (Kleines Oberflächenprotein)
SSC	sodium saline citrate (Natriumzitat)
SWHs	S-Protein von WHV
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TNE	Tris-Natrium-EDTA
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrosefaktor $\alpha$
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt

WHcAg	Woodchuck Hepatitis Core Antigen
WHsAg	Woodchuck Hepatitis Surface Antigen
WHO	World Health Organisation
WHV	Woodchuck Hepatitis Virus
Wo	Woche
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
w/w	weight per weight (Gewicht pro Gewicht)
$\gamma$ -GT	$\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase
z.B.	zum Beispiel

## 10 Anhang



**Abb. 43: Eichung des WHV-Serums 5413 als Standard für die Laurell-Elektrophorese**  
Insgesamt wurden vier LE-Platten mit demselben Verdünnungsschema angefertigt und zusammen in einer Elektrophorese eingesetzt. Auf eine Platte wurden je 3 Verdünnungen des WHV+ Serums 5413 (1:10, 1:15; 1:20) sowie 5 Verdünnungen von gereinigten WHsAg (5, 20, 40, 60, 80 µg/ml) aufgetragen.

**Tabellen 8 A-C: Quantitative Bestimmung des WHsAg ( $\mu\text{g/ml}$ ) mittels Laurell-Elektrophorese bei chronisch WHV-infizierten Woodchucks**

Untersuchung des Verlaufs der Antigenämie bei Lamivudin-Therapie (A), bei therapeutischer Vakzinierung mit DNA-Vakzinen in Kombination mit Lamivudin (B) sowie bei therapeutischer Vakzinierung mit Immunkomplex-/DNA-Vakzinen in Kombination mit Lamivudin (C)

**A**

Woche	WHsAg ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	# 17496	# 17498
-2	437,9	239,1
0	457,3	244,9
2	396,9	256,6
4	457,3	259,5
6	435,7	242
8	360,3	259,5
10	329	239,1
12	329	282,6
14	376,9	245,6
16	449,8	192,8
18	412,3	140
20	281,1	155,8
22	345,7	179,6
24	348,8	155,8
26	516,5	177
28	451,7	210
30	424,9	179,1

**B**

Woche	WHsAg ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	# 17490	# 17491	# 17495	# 17502
-2	528,9	778,8	80	383
0	586,1	778,8	85	383
2	486,1	891	191,2	383
4	571,8	778,8	134,9	473
6	595,7	896,3	229,9	432
8	483,5	996,7	231,2	435
10	532,6	949,8	261,1	442
12	644,7	896,3	233,7	469
14	517,7		194,1	386
16	531,3	882,9	133,3	139
18	395,1	755,9	117,8	115
20	388,3	635,5	132	174
22	504,7	635,5	173,4	225
24	479,8	666,3	132	249
26	504,7	706,2	112,6	225
28	598,1	484,1	234,3	145

C

Woche	WHsAg ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	# 17492	# 17493	# 17494	# 17497
-2	158,9	556,5	534,7	250
0	121,5	612,6	611,6	337,3
2	87,2	755	699	391,6
4	99,7	673	258,6	394,6
6	99,7	729,1	796,8	265,1
8	49,8	724,8	719,9	114,5
10	49,8	806,7	699	81,3
12	37,4	720,4	443,1	54,2
14	49,8	667,6	346,9	56,6
16	28	454,8	279,9	53,4
18	12,5	341,1	230,3	37,7
20	49,8	198,3	314,9	62,9
22	74,8	230,3	198,3	81,7
24	74,8	344	381,9	198
26	124,6	513,1	317,8	267,1
28	130,8	536,4		267,1
30	142,4	590,6		163,3

**Tabellen 9 A-F: Experimentelle Infektion von adulten Woodchucks mit Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)**

Quantifizierung der WHV-DNA mittels real-time PCR (LightCycler); Quantifizierung des WHsAg mittels Laurell-Elektrophorese; Detektion von WHsAg-Immunkomplexen im Western Blot (Intensität der Chemilumineszenzsignale: + schwach, ++ mittel, +++ stark); Quantifizierung von anti-WHs und anti-WHc mittels ELISA (ODU: optical density unit, Messung der Extinktion); Quantifizierung der Sorbit-Dehydrogenase (SDH) mittels ELISA (IU/l: international unit per liter). Wöchentliche Bestimmung der Serumkonzentrationen (n.d.: not done, keine Messung erfolgt).

**A: WHV # 3538 (2 Jahre)**

Wo	log WHV-DNA (GE/ml Serum)	WHsAg ( $\mu\text{g/ml}$ Serum)	Immunkomplexe	anti-WHs (ODU)	anti-WHc (ODU)	SDH (IU/l)
-2	1,5	0		0,000	0,035	45
0	1,49	0		n.d.	n.d.	28
1	4,37	0		0,000	0,000	31
2	5,48	0		0,000	0,002	43
3	7,18	3		0,000	0,000	48
4	8,93	117		0,000	0,000	31
5	9,23	367		0,000	0,023	17
6	7,25	0	++	0,000	0,037	39
7	8,12	0	+++	0,001	0,053	14
8	7,75	0	+++	0,000	0,074	50
9	7,32	0	++	0,000	0,100	132
10	6,15	0	+	0,002	0,062	173
11	4,24	0		n.d.	n.d.	112
12	3,25	0		0,241	0,134	725
13	4,16	0		0,367	0,202	474
14	2,26	0		0,296	0,160	123
15	2,41	0		n.d.	n.d.	n.d.

**B: WHV # 3524 (3 Jahre)**

Wo	log WHV-DNA (GE/ml Serum)	WHsAg (µg/ml Serum)	Immun- komplexe	anti-WHs (ODU)	anti-WHc (ODU)	SDH (IU/l)
-2	2,29	0		0,004	0,001	29
0	2,22	0		n.d.	n.d.	23
1	4,3	0		0,000	0,000	22
2	5,17	0		0,000	0,000	32
3	6,12	0		0,000	0,003	30
4	6,98	0		0,000	0,003	48
5	7,26	0	++	0,002	0,016	16
6	7,16	0	+++	0,004	0,013	57
7	6,42	0	+	0,009	0,057	43
8	6,12	0	+	0,000	0,067	61
9	5,25	0	+	0,000	0,116	73
10	4,18	0		0,034	0,027	168
11	3,55	0		n.d.	n.d.	171
12	2,21	0		0,102	0,143	222
13	2,35	0		0,116	0,193	43
14	2,63	0		0,085	0,196	109
15	0	0		n.d.	n.d.	n.d.

**C: WHV # 3540 (1,5 Jahre)**

Wo	log WHV-DNA (GE/ml Serum)	WHsAg (µg/ml Serum)	Immun- komplexe	anti-WHs (ODU)	anti-WHc (ODU)	SDH (IU/l)
-1		0		0,000	0,000	43
0	3,11	0		n.d.	n.d.	36
1	4,58	0		0,000	0,000	31
2	4,14	0		0,002	0,001	27
3	4,35	0		0,000	0,006	49
4	3,21	0		0,059	0,004	91
5	2,19	0		0,000	0,050	21
6	3,12	0		0,000	0,079	30
7	2,53	0		0,009	0,073	26
8	2,54	0		n.d.	n.d.	32
9	3,12	0		0,000	0,098	8
10	2,17	0		n.d.	n.d.	31
11	2,15	0		n.d.	n.d.	37
12	2,21	0		0,006	0,195	41
13	2,22	0		0,010	0,228	16
14	0,00	0		0,002	0,289	59
15	2,16	0		n.d.	n.d.	n.d.

## D: WHV # 3539 (3 Jahre, weiblich)

Wo	log WHV-DNA (GE/ml Serum)	WHsAg (µg/ml Serum)	Immun- komplexe	anti-WHs (ODU)	anti-WHc (ODU)	SDH (IU/l)
-2	0	0		0,000	0,000	240
0	0	0		0,000	0,000	79
1				0,000	0,010	137
2	6,62	0		0,000	0,014	98
3		74		0,000	0,002	70
4	10,1	414	++	0,000	0,008	176
5		0	+++	0,011	0,088	45
6	8,42	1,6	++	0,000	0,162	92
7			++	0,000	0,161	159
8	7,15	0	+	0,003	0,167	344
9			+	0,017	0,216	326
10	6,17	0		0,092	0,225	355
11				0,207	0,223	429
12	5,1	0		0,430	0,263	632
13				0,390	0,225	541
14	2,44	0		0,500	0,222	69
15				0,497	0,205	31
16	2,68	0		0,267	0,194	13
17				0,219	0,189	22
18	2,19	0		0,197	0,167	4
19				0,179	0,202	16
20	0	0		0,141	0,233	18
21				0,125	0,238	19
22	0	0		0,116	0,225	4
23				0,048	0,217	18
24	0	0		0,043	0,204	43
25				0,041	0,237	24
26	0	0		0,060	0,201	12
27				0,104	0,194	27
28	0	0		0,080	0,232	34

## E: WHV # 3391 (6 Jahre, weiblich)

Wo	log WHV-DNA (GE/ml Serum)	WHsAg (µg/ml Serum)	Immun- komplexe	anti-WHs (ODU)	anti-WHc (ODU)	SDH (IU/l)
-2	0	0		0,000	0,000	43
0	0	0		0,000	0,000	25
1				0,000	0,007	51
2	4,82	0		0,000	0,000	79
3				0,000	0,000	64
4	5,24	0	+	0,000	0,000	36
5				0,005	0,022	195
6	1,33	0		0,012	0,163	56
7				0,016	0,155	31
8	0	0		0,025	0,145	47
9				0,011	0,192	46
10	0	0		0,013	0,188	40
11				0,011	0,181	34
12	0	0		0,010	0,188	52
13				0,000	0,193	41
14	0	0		0,009	0,181	25
15				0,007	0,195	4
16	0	0		0,004	0,188	27
17				0,005	0,190	20
18	0	0		0,004	0,192	17
19				0,000	0,211	17
20	0	0		0,000	0,237	17
21				0,000	0,203	13
22	0	0		0,000	0,236	21
23				0,002	0,207	10
24	0	0		0,000	0,203	17
25				0,002	0,201	16
26	0	0		0,003	0,176	20
27				0,013	0,168	35
28	0	0		0,005	0,216	48

## F: WHV # 3553 (2 Jahre, männlich)

Wo	log WHV-DNA (GE/ml Serum)	WHsAg (µg/ml Serum)	Immun- komplexe	anti- WHs (ODU)	anti- WHc (ODU)	SDH (IU/l)
-2	0	0		0,000	0,000	69
0	0	0		0,000	0,000	84
1				0,000	0,008	105
2	5,4	0		0,006	0,023	111
3				0,016	0,041	108
4	4,11	0		0,024	0,052	128
5				0,053	0,148	153
6	2,11	0		0,073	0,180	143
7				0,064	0,180	108
8	1,36	0		0,061	0,165	130
9				0,057	0,224	36
10	1,25	0		0,058	0,215	62
11				0,058	0,196	64
12	0	0		0,078	0,248	70
13				0,039	0,220	26
14	1,32	0		0,068	0,200	24
15				0,053	0,207	17
16	0	0		0,028	0,212	12
17				0,037	0,182	20
18	0	0		0,054	0,190	16
19				0,075	0,200	18
20	0	0		0,062	0,221	21
21				0,074	0,208	15
22	0	0		0,093	0,199	14
23				0,072	0,211	31
24	0	0		0,068	0,217	47
25				0,046	0,205	39
26	0	0		0,061	0,216	34
27				0,065	0,183	41
28	0	0		0,052	0,260	49

**Tabellen 10 A-C: Experimentelle Infektion von adulten Woodchucks mit Ground Squirrel Hepatitis Virus (GSHV)**

Quantifizierung der GSHV-DNA mittels real-time PCR (LightCycler); Quantifizierung des GSHsAg mittels Laurell-Elektrophorese; Detektion von GSHsAg-Immunkomplexen im Western Blot (Intensität der Chemilumineszenzsignale: + schwach, ++ mittel, +++ stark); Quantifizierung von anti-GSHs und anti-GSHc mittels ELISA (ODU: optical density unit, Messung der Extinktion); Quantifizierung der Sorbit-Dehydrogenase (SDH) mittels ELISA (IU/l: international unit per liter). Wöchentliche bzw. zweiwöchentliche Bestimmung der Serumkonzentrationen

**A: GSHV # 3545 (2 Jahre, männlich)**

Wo	log GSHV-DNA (GE/ml Serum)	GSHsAg (µg/ml Serum)	Immun- komplexe	anti- GSHs (ODU)	anti- GSHc (ODU)	SDH (IU/l)
-2	0	0		0,000	0,000	136
0	0	0		0,000	0,006	94
1				0,000	0,000	122
2	4,32	0		0,000	0,007	99
3				0,000	0,000	89
4	7,15	9		0,000	0,000	103
5		322		0,000	0,000	108
6	8,86	354	+	0,000	0,000	357
7		365	+	0,000	0,000	93
8	8,96	365	++	0,000	0,046	238
9		365		0,000	0,102	512
10	7,51	44		0,000	0,146	269
11		54		0,000	0,140	343
12	7,16	0		0,000	0,196	516
13				0,000	0,181	263
14	5,17	0		0,012	0,167	310
15				0,046	0,155	202
16	4,1	0		0,034	0,165	165
17				0,089	0,146	75
18	2,21	0		0,099	0,150	60
19				0,076	0,138	47
20	0	0		0,078	0,157	32
21				0,070	0,140	29
22	0	0		0,077	0,155	34
23				0,022	0,163	40
24	0	0		0,015	0,178	52
25				0,020	0,196	60
26	1,36	0		0,026	0,141	29
27				0,064	0,149	44
28	1,6	0		0,055	0,211	38

## B: GSHV # 3372 (6 Jahre, weiblich)

Wo	log GSHV-DNA (GE/ml Serum)	GSHsAg (µg/ml Serum)	Immun- komplexe	anti- GSHs (ODU)	anti- GSHc (ODU)	SDH (IU/l)
-2	0	0		0,000	0,000	69
0	0	0		0,000	0,002	83
1				0,000	0,002	81
2	3,31	0		0,000	0,001	104
3				0,000	0,000	118
4	6,42	0		0,000	0,000	49
5				0,000	0,000	175
6	7,21	0		0,000	0,000	116
7				0,000	0,000	51
8	7,23	0	+	0,000	0,000	96
9				0,003	0,025	124
10	5,25	0		0,004	0,082	544
11				0,021	0,142	457
12	4,27	0		0,092	0,187	490
13				0,073	0,174	238
14	4	0		0,169	0,161	186
15				0,225	0,164	124
16	2,25	0		0,132	0,171	61
17				0,151	0,167	56
18	0	0		0,152	0,147	22
19				0,128	0,184	19
20	0	0		0,103	0,182	25
21				0,082	0,196	9
22	0	0		0,076	0,178	25
23				0,020	0,171	20
24	0	0		0,013	0,167	25
25				0,014	0,193	22
26	0	0		0,026	0,134	13
27				0,032	0,149	14
28	0	0		0,020	0,219	22

## C: GSHV # 3533 (3 Jahre, weiblich)

Wo	log GSHV-DNA (GE/ml Serum)	GSHsAg (µg/ml Serum)	Immun- komplexe	anti- GSHs (ODU)	anti- GSHc (ODU)	SDH (IU/l)
-2	0	0		0,000	0,000	49
0	0	0		0,000	0,006	36
1				0,000	0,000	36
2	3,12	0		0,000	0,000	37
3				0,000	0,000	272
4	0	0		0,000	0,000	20
5				0,000	0,014	32
6	0	0		0,000	0,019	49
7				0,000	0,000	36
8	0	0		0,000	0,000	49
9				0,000	0,012	104
10	0	0		0,000	0,005	17
11				0,000	0,000	40
12	0	0		0,000	0,006	41
13				0,000	0,011	24
14	0	0		0,000	0,000	30
15				0,000	0,000	35
16	0	0		0,000	0,008	11
17				0,000	0,012	28
18	0	0		0,000	0,013	15
19				0,000	0,009	24
20	0	0		0,000	0,008	19
21				0,000	0,002	16
22	0	0		0,000	0,010	5
23				0,000	0,015	5
24	0	0		0,000	0,013	37
25				0,000	0,012	17
26	0	0		0,000	0,010	8
27				0,000	0,000	15
28	0	0		0,000	0,008	11

**Tabellen 11 A-B: Experimentelle Infektion von adulten Woodchucks mit Arctic Squirrel Hepatitis Virus (ASHV)**

Quantifizierung der GSHV-DNA mittels real-time PCR (LightCycler); Quantifizierung des GSHsAg mittels Laurell-Elektrophorese; Detektion von GSHsAg-Immunkomplexen im Western Blot (Intensität der Chemilumineszenzsignale: + schwach, ++ mittel, +++ stark); Quantifizierung von anti-GSHs und anti-GSHc mittels ELISA (ODU: optical density unit, Messung der Extinktion); Quantifizierung der Sorbit-Dehydrogenase (SDH) mittels ELISA (IU/l: international unit per liter). Wöchentliche bzw. zweiwöchentliche Bestimmung der Serumkonzentrationen

**A: ASHV # 3537 (3 Jahre, weiblich)**

Wo	log ASHV-DNA (GE/ml Serum)	ASHsAg (µg/ml Serum)	Immun- komplexe	anti- ASHs (ODU)	anti- ASHc (ODU)	SDH (IU/l)
-2	0	0		0,000	0,000	112
0	0	0		0,000	0,000	64
1				0,000	0,000	274
2	0	0		0,000	0,000	148
3				0,000	0,000	119
4	0	0		0,000	0,000	584
5				0,000	0,000	156
6	0	0		0,000	0,000	45
7				0,000	0,000	26
8	2,42	0		0,000	0,000	47
9				0,000	0,000	28
10	5,37	0		0,000	0,000	33
11				0,000	0,000	31
12	8,29	15		0,000	0,000	39
13		391		0,000	0,000	36
14	10,29	273	++	0,000	0,000	41
15		45	++	0,004	0,000	63
16	9,42	0	++	0,003	0,062	48
17			(+)	0,003	0,124	47
18	8,64	0		0,002	0,164	49
19				0,000	0,181	72
20	5,12	0		0,018	0,185	85
21				0,056	0,136	27
22	2,68	0		0,057	0,148	22
23				0,011	0,139	45
24	2,34	0		0,006	0,149	54
25				0,003	0,158	40
26	1,97	0		0,003	0,126	19
27				0,002	0,146	28
28	0	0		0,004	0,202	34

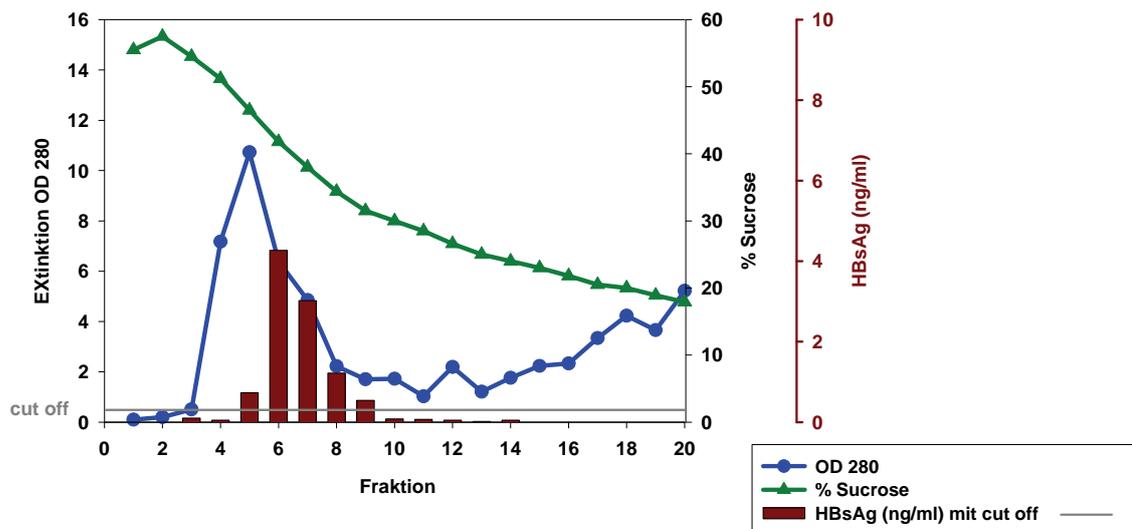
**B: ASHV # 3366** (6 Jahre, weiblich)

Wo	log ASHV-DNA (GE/ml Serum)	ASHsAg (µg/ml Serum)	Immun- komplexe	anti- ASHs (ODU)	anti- ASHc (ODU)	SDH (IU/l)
-2	0	0		0,000	0,000	44
0	0	0		0,000	0,000	37
1				0,000	0,000	313
2	0	0		0,000	0,000	132
3				0,000	0,000	213
4	0	0		0,000	0,000	190
5				0,000	0,000	177
6	3	0		0,000	0,000	68
7				0,000	0,000	45
8	4,53	0		0,000	0,000	47
9				0,000	0,000	37
10	6,41	0		0,000	0,000	37
11				0,000	0,000	25
12	6,48	0		0,000	0,000	30
13				0,000	0,000	72
14	5,15	0		0,015	0,085	250
15				0,025	0,151	195
16	2,32	0		0,022	0,196	109
17				0,014	0,168	15
18	2,23	0		0,014	0,187	3
19				0,006	0,167	17
20	0	0		0,000	0,179	25
21				0,000	0,176	37
22	0	0		0,000	0,182	3
23				0,000	0,178	21
24	1,53	0		0,000	0,185	32
25				0,000	0,178	26
26	1,54	0		0,000	0,145	16
27				0,002	0,151	23
28	0	0		0,002	0,200	14

**Tabellen 12 A-D: Extraktion und Aufreinigung subviraler Partikel (HBsAg-SHBs) aus Zellsuspensionskulturen transgener Karotten**

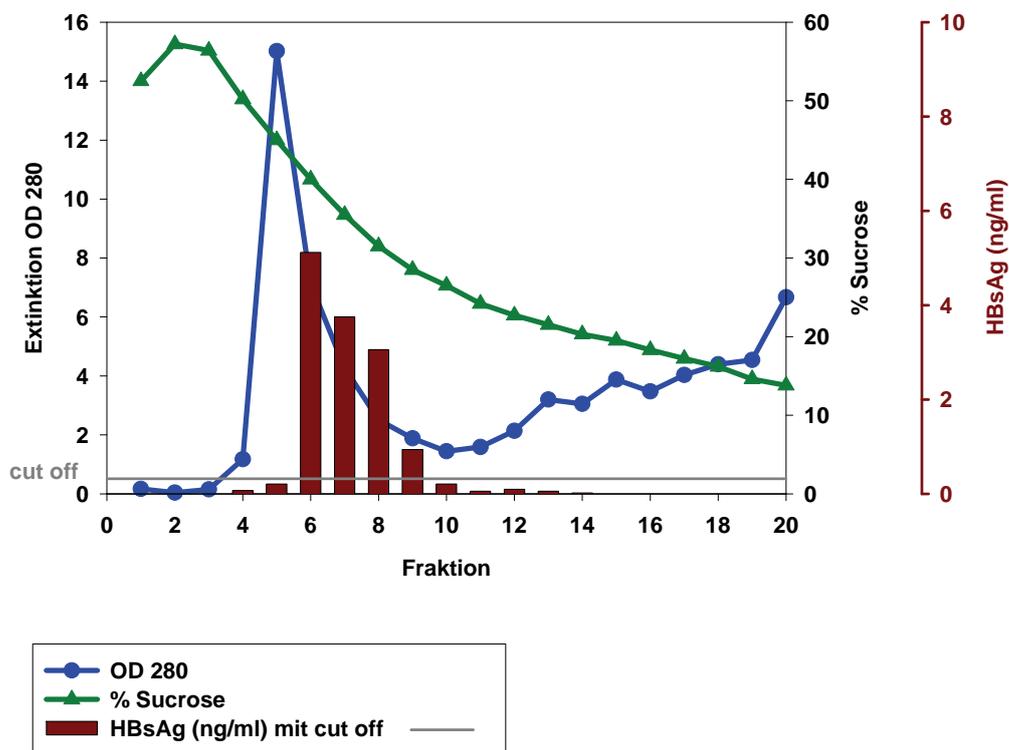
**Abb. 44 A-D:** Die Extraktion erfolgte aus 10 g Zellpellet der SHBs-Klone 1 (A), 9 (B) und 10 (C). Eine nicht-transformierte Karottensuspensionskultur (D) diente als Negativkontrolle. Die Aufreinigung der Partikel wurde über einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten in der Ultrazentrifuge durchgeführt. Refraktrometrische Bestimmung der Saccharosedichte (in Abb. grün) sowie photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration (OD 280) (in Abb. blau) der Fraktionen 1-20 der einzelnen Saccharosegradienten. Die Quantifizierung des HBsAg (ng/ml) (in Abb. braune Balken) in den Fraktionen 3 -14 erfolgte mit einem HBsAg-spezifischen Sandwich-ELISA (Detektionslimit: 0,5 ng HBsAg pro ml)

**A Klon 1**



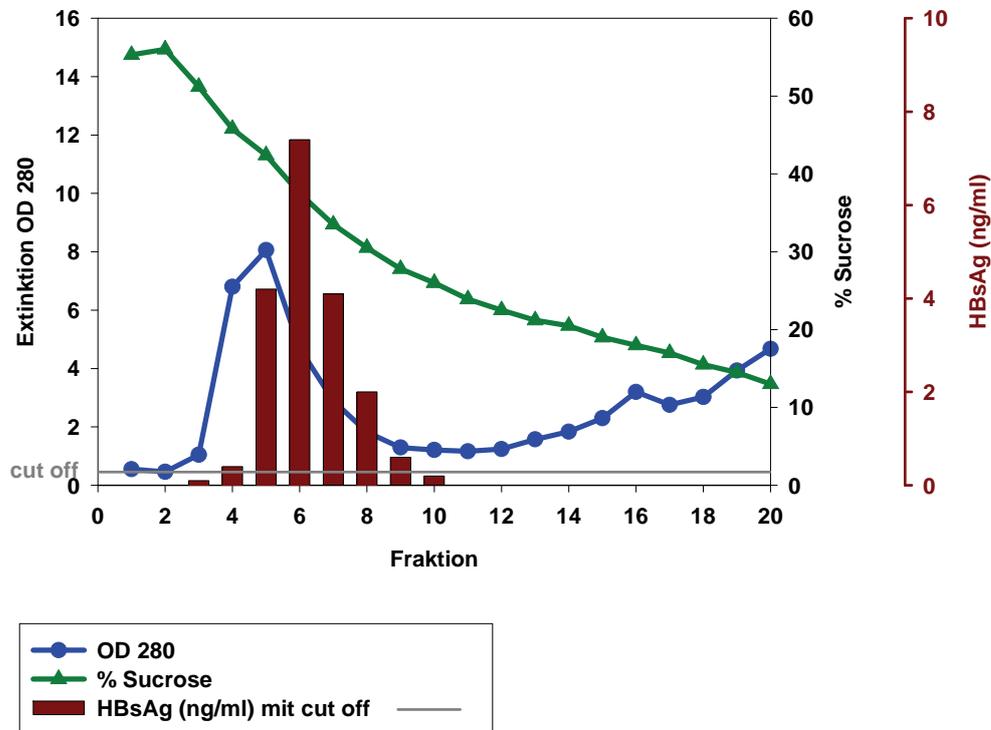
Fraktion	OD 280	% Saccharose	HBsAg (ng/ml)
1	0,099	55,5	
2	0,197	57,5	
3	0,507	54,5	0,1
4	7,174	51,2	0,05
5	10,729	46,5	0,73
6	6,382	41,8	4,27
7	4,851	38	3,02
8	2,224	34,4	1,22
9	1,704	31,5	0,54
10	1,720	30	0,08
11	1,026	28,5	0,07
12	2,191	26,6	0,05
13	1,210	25	0,02
14	1,762	24	0,05
15	2,231	23	
16	2,330	21,8	
17	3,340	20,5	
18	4,226	20	
19	3,658	18,9	
20	5,217	17,9	

## B Klon 9



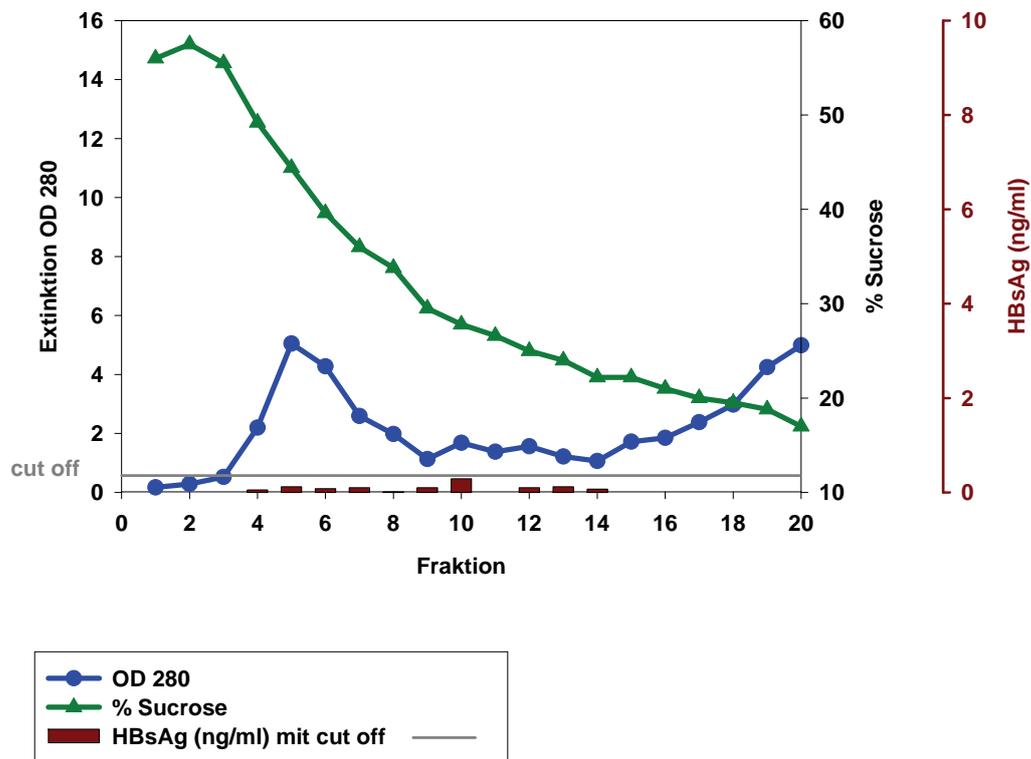
Fraktion	OD 280	% Saccharose	HBsAg (ng/ml)
1	0,169	52,5	
2	0,045	57,2	
3	0,154	56,4	-0,01
4	1,171	50,2	0,07
5	15,015	45	0,21
6	7,115	40	5,12
7	4,271	35,5	3,75
8	2,514	31,5	3,06
9	1,880	28,5	0,94
10	1,449	26,5	0,21
11	1,588	24,2	0,06
12	2,137	22,7	0,1
13	3,200	21,5	0,06
14	3,050	20,3	0,02
15	3,876	19,5	
16	3,476	18,3	
17	4,033	17,2	
18	4,397	16,2	
19	4,541	14,6	
20	6,667	13,8	

## C Klon 10



Fraktion	OD 280	% Saccharose	HBsAg (ng/ml)
1	0,550	55,3	
2	0,461	56	
3	1,044	51,2	0,1
4	6,801	45,8	0,4
5	8,057	42,4	4,2
6	4,696	37,5	7,4
7	2,891	33,5	4,1
8	1,822	30,5	2
9	1,292	27,8	0,6
10	1,207	26	0,2
11	1,164	23,9	0
12	1,241	22,5	0
13	1,570	21,2	0
14	1,835	20,5	0
15	2,296	19	
16	3,199	18	
17	2,753	17	
18	3,022	15,5	
19	3,930	14,5	
20	4,674	13	

## D Negativkontrolle

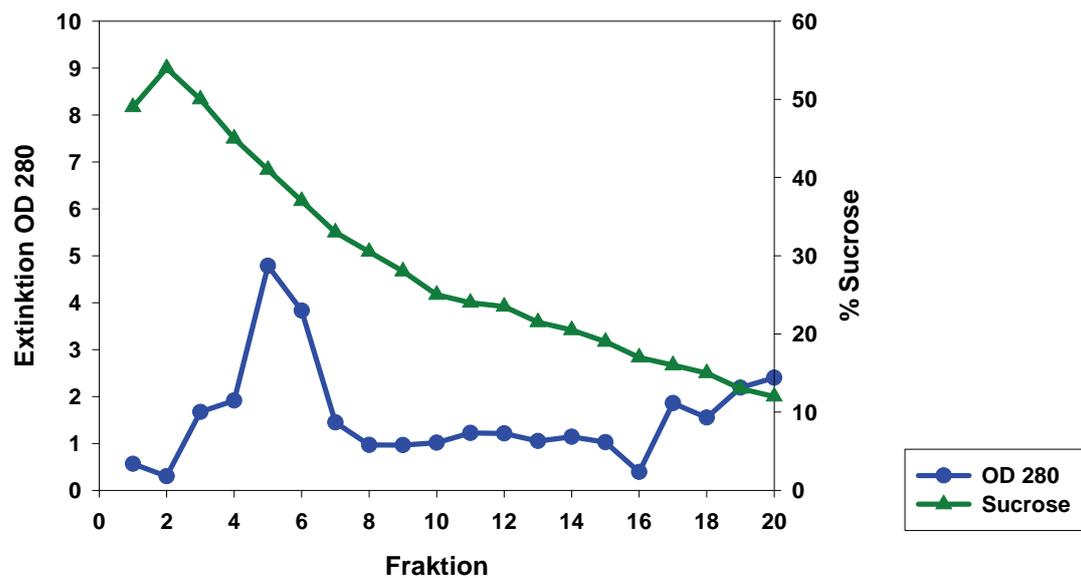


Fraktion	OD 280	% Saccharose	HBsAg (ng/ml)
1	0,168	56	
2	0,282	57,5	
3	0,523	55,5	0
4	2,195	49,2	0,05
5	5,046	44,4	0,12
6	4,274	39,6	0,08
7	2,589	36	0,1
8	1,979	33,8	0,01
9	1,128	29,5	0,1
10	1,678	27,8	0,29
11	1,379	26,6	0
12	1,562	25	0,1
13	1,213	24	0,12
14	1,064	22,2	0,07
15	1,715	22,2	
16	1,848	21	
17	2,378	20	
18	2,972	19,5	
19	4,243	18,8	
20	4,988	17	

**Tabellen 13 A-B: Extraktion und Aufreinigung subviraler Partikel (WHsAg-Abb. 45 A-B: MWHs) aus transgenen Tabakpflanzen**

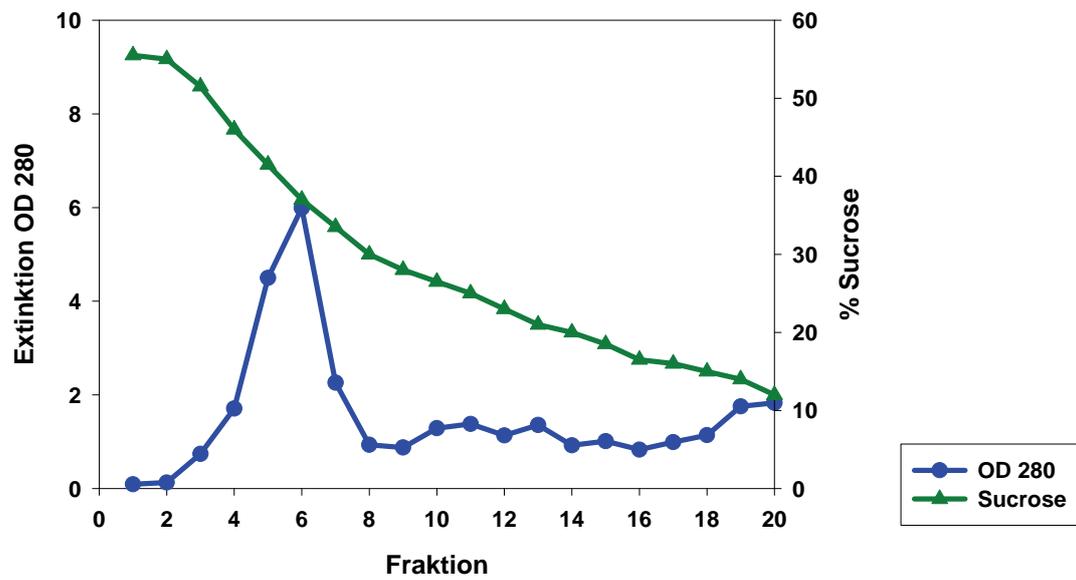
Die Extraktion erfolgte aus jeweils 3 g Pflanzengewebe einer transformierten (A: Klon 2) sowie einer nicht-transformierten Tabakpflanze (B: Negativkontrolle). Die Aufreinigung der Partikel wurde über einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten in der Ultrazentrifuge durchgeführt. Refraktrometrische Bestimmung der Saccharosedichte (in Abb. grün) sowie photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration (OD 280) (in Abb. blau) der Fraktionen 1-20 der einzelnen Saccharosegradienten.

**A Klon 2**



Fraktion	OD 280	% Saccharose
1	0,565	49
2	0,302	54
3	1,669	50
4	1,914	45
5	4,783	41
6	3,830	37
7	1,447	33
8	0,967	30,5
9	0,964	28
10	1,015	25
11	1,221	24
12	1,213	23,5
13	1,051	21,5
14	1,141	20,5
15	1,024	19
16	0,390	17
17	1,859	16
18	1,549	15
19	2,187	13
20	2,400	12

## B Negativkontrolle



Fraktion	OD 280	% Saccharose
1	0,089	55,5
2	0,128	55
3	0,739	51,5
4	1,706	46
5	4,495	41,5
6	5,991	37
7	2,259	33,5
8	0,932	30
9	0,877	28
10	1,287	26,5
11	1,380	25
12	1,132	23
13	1,356	21
14	0,921	20
15	1,011	18,5
16	0,830	16,5
17	0,990	16
18	1,139	15
19	1,753	14
20	1,829	12

**Eigene Publikationen:**

Teile der vorgelegten Arbeit wurden auf 2 internationalen Kongressen präsentiert und sind zur Publikation eingereicht.

**Glebe, D., Lorenz, H., Gerlich, W.H., Tennant, B.C. und Menne S. (2006).** *Acute infection of woodchucks with californian and arctic ground squirrel hepatitis virus.* 12<sup>th</sup> International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Paris, France.

**Glebe, D., Lorenz, H., Gerlich, W.H., Tennant, B.C. und Menne S. (2005).** *Acute infection of woodchucks with californian and arctic ground squirrel hepatitis virus.* International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Heidelberg, Germany.

**Lu, M., Yao, X., Xu, Y., Lorenz, H., Dahmen, U., Chi, H., Dirsch, O., Kemper, T., He L., Glebe, D., Gerlich, W.H., Wen, Y. und Roggendorf M. (zur Publikation eingereicht).** *Combination Therapy with Antiviral Drug and Immunomodulation against Chronic Hepatitis B Virus Infection: Evaluation in the Woodchuck Model.* (J.Virol.)



édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5147-5



9 783835 195147 1