

**Etablierung eines Maus-Modells der akuten Hepatitis B:
Charakterisierung der HBV-spezifischen Immunantwort**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Miriam Svorcova

aus Partizanske

Köln, April 2008

Berichterstatter: Prof. Dr. Jens C. Brüning

Prof. Dr. Dagmar Knebel-Mörsdorf

Prof. Dr. Ulrike Protzer

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Ansgar Büschges

Tag der Disputation: 26. Juni 2008

Zusammenfassung

Das Hauptproblem bei der Entwicklung neuer, alternativer Ansätze für Therapie und Prophylaxe der Hepatitis B ist das Fehlen geeigneter Tiermodelle. Ziel dieser Arbeit war, ein Maus-Modell zu etablieren, indem man das HBV-Genom effizient mittels adenoviraler Vektoren - d.h., unabhängig von hepadnaviralen Rezeptoren- in die Leber adulter, immunkompetenter C57Bl/6 Mäuse transferiert, die sonst nicht permissiv für HBV sind. In diesem Modell sollte der Verlauf der akuten Hepatitis B und die Faktoren, die diesen beeinflussen, sowie die HBV-spezifische Immunantwort studiert werden. Mit dem Ad-HBV Vektor, der ein 1,3-faches Überlängen-Genom des HBV enthält, wurde eine akute, selbstlimitierende Hepatitis in der Maus imitiert. Der Ad-HBV-k/o Vektor, diente als Kontrollvektor, da alle Gene des 1,3-fachen HBV Überlängen-Genoms ausgeschaltet waren. Durch die Ad-HBV Infektion wurde eine Leberentzündung ausgelöst, die zweiphasig verlief und in vielen Aspekten dem Bild einer natürlichen akuten, selbstlimitierenden Hepatitis B entsprach. Die adenoviralen HBV-Vektoren dienten in der Leber der Tiere als Transkriptions-Matrizen für die HBV-RNAs. Die Persistenz der HBV-Infektion wurde durch die Bestimmung der Virämie und Antigenämie bestätigt, mit einer über vier Wochen anhaltenden HBV-Replikation, die parallel zur Ausbildung von Anti-HBs Antikörpern als Zeichen einer HBV-spezifischen Immunantwort kontrolliert wurde. Kurz nach der Ad-HBV Infektion wurde die Einwanderung von HBV-spezifischen CD8+T-Zellen in die Leber beobachtet, sowie die Expression antiviraler Zytokine. Die HBV-spezifische CD8+T-Zellantwort, gegen das HBV-Kapsid, sowie gegen virale Hüll-Proteine verlief in der Leber zweiphasig, genau parallel zum Leberschaden. Diese CD8+T-Zellantwort war HBV- und nicht Adenovirus-spezifisch. Die Ad-HBV Infektion wurde ebenfalls benutzt, um HBV-Replikation in Anwesenheit und Abwesenheit von CD8+T-Zellen sowie NK-T-Zellen zu induzieren, um die Bedeutung dieser Zellen für den Verlauf und die Dauer der Leberentzündung und ihrer Rolle während der Viruskontrolle zu untersuchen. Die Blockade der CD8+T-Zellen resultierte in einer einphasigen, akuten und verzögerten Hepatitis, mit einer früh einsetzenden Replikation, die trotz der CD8+T-Zell Depletion kontrolliert wurde. Das Fehlen der NK-T-Zellantwort hingegen resultierte im Verlust einer regulatorischen Funktion, die den entstehenden Leberschaden durch CD8+T-Zellen begrenzte. Diese Arbeit zeigte, dass die AdHBV-Infektion ein sehr gutes Modell darstellt, um weiter die Bedeutung der HBV-spezifischen T-Zellantwort für die Kontrolle der HBV-Replikation und ihrer Beteiligung am akuten Leberschaden, in einem Kleintiermodell zu studieren.

Abstract

The high number of patients chronically infected with HBV requires the development of new treatment and prevention strategies but is hindered by the lack of suitable infection models. The aim of this work was to develop a suitable mouse model to study factors influencing the course of HBV infection. In this study, adenoviral vectors were designed, which initiates HBV replication from an HBV 1.3-fold overlength genome (Ad-HBV), and a control vector, in which all HBV genes have been knocked out (Ad-HBV-k/o). These vectors were used to infect adult, male C57Bl/6 mice, and analysed HBV-replication, liver damage, intrahepatic and peripheral HBV-specific immune responses in a time course. Mice replicating HBV, showed a bi-phasic acute transient liver damage, with typical signs of acute hepatitis. Adenoviral-vectors persisted in the livers of transduced animals and served as transcription templates for HBV-RNAs. Ad-HBV infection induced an acute antigenemia and viremia. HBV-replication was controlled early after Ad-HBV infection when IFN-gamma expressing cells infiltrated the liver, but HBV started to replicate again, when IFN-gamma expression ceased, and was finally cleared from the circulation by anti-HBs antibodies and from the liver probably by cytotoxic T cells. Ad-HBV vector were used to initiate HBV-replication in the presence and absence of CD8⁺T-cells to investigate the meaning of CD8⁺T-cells and NK-T-cells for course and duration of hepatitis and their role during viral clearance. When CD8⁺T-cells were blocked, a delayed acute hepatitis was observed. In the absence of CD8⁺T-cells, HBV initially replicated at higher levels, but HBV-replication was efficiently controlled despite the lack of CD8⁺T-cells. Early after Ad-HBV transduction in all mice highest CD8, IFN-gamma and IL-10 expression was detected in the liver, but not, when CD8⁺T-cells were blocked. The early control of HBV by IFN-gamma secretion as well as the late clearance of HBV infection by liver infiltrating T-cells in our mice resembles the dynamics observed during acute hepatitis B in chimpanzees. Specific CD8⁺T-cell responses to HBV-core and S-proteins were monitored by an IFN-gamma secretion assay. HBV-specific CD8⁺T-cells infiltrated the liver in a bi-phasic course in parallel to liver damage and the CD8⁺T-cell immune response were truly HBV and not adenovirus-specific.

Taken together, we established a small animal model of HBV infection, which allows studying the onset and clearance of HBV infection, in which liver disease and kinetics of the immune response resemble that of acute hepatitis B.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Abstract.....	IV
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Das Hepatitis B Virus.....	1
1.1.1 Partikelbau des HBV	1
1.1.2 Genomorganisation des HBV.....	3
1.1.3 Replikationszyklus	5
1.2 Epidemiologie	7
1.3 Pathogenese und Verlauf der HBV-Infektion.....	8
1.3.1 Diagnostik der akuten und der chronischen HBV-Infektion.....	10
1.3.2 Therapiemöglichkeiten	12
1.4 Modelle der Hepadnaviralen Infektion	13
1.4.1 Zellkultur-Modelle	13
1.4.2 Tiermodelle.....	13
1.5 Immunpathogenese	18
1.5.1 Die adaptive Immunantwort.....	18
1.5.2 Die zelluläre Immunantwort gegen Hepadnaviren.....	22
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	25
2 Ergebnisse	27
2.1 Charakterisierung des Ad-HBV Maus-Modells als Krankheitsmodell der akuten Hepatitis B.....	27
2.1.1 Adenovirale Vektoren für den hepadnaviralen Genomtransfer.....	27
2.1.2 Optimierung der Effizienz des HBV-Genomtransfers	28
2.1.3 Verlauf und Charakterisierung der akuten HBV-Infektion in C57Bl/6 Mäusen nach Ad-HBV Injektion	30
2.1.4 Verlauf und Pathogenese der akuten HBV-Infektion im Ad-HBV Maus – Modell	31

2.1.4.1	Verlauf der Leberentzündung	31
2.1.4.2	Histopathologie	32
2.1.5	Verlauf der HBV-Replikation	36
2.1.5.1	Dynamik der Antigenämie	36
2.1.5.2	Dynamik der Virämie.....	37
2.1.5.3	Transkription der HBV-RNAs	38
2.1.5.4	Verlauf der Replikation nach dem HBV-Genomtransfer.....	39
2.1.5.5	Charakterisierung der induzierten Immunantwort im Ad-HBV Maus - Modell	41
2.2	Charakterisierung der zellulären Immunantwort gegen HBV im Ad-HBV Maus- Modell.....	44
2.2.1	Verlauf und Effizienz der CD8+T-Zell Depletion in C57Bl/6 Ad-HBV transduzierten Mäusen.....	46
2.2.2	Verlauf der Leberentzündung nach CD8+T-Zell Depletion und Ad-HBV Injektion in C57Bl/6 und CD1-k/o Mäusen	48
2.2.3	Histopathologische Zeichen des Leberzellschadens in C57Bl/6 Mäusen nach CD8+T-Zell Depletion und Ad-HBV Genomtransfer.....	49
2.2.4	Antigenämie nach CD8+T-Zell Depletion	51
2.2.5	Virämie nach CD8+T-Zell Depletion.....	53
2.2.6	Einfluss der CD8+T-Zell Depletion auf die HBV-Transkription in C57Bl/6 Mäusen	54
2.2.7	Einfluss der CD8+T-Zell Depletion auf die HBV-Replikation.....	55
2.2.8	Einfluss der CD8+T-Zell Depletion auf die Immunantwort in Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäusen	57
2.2.9	Einfluss der CD8+T-Zell Depletion auf die Immunantwort in Ad-HBV transduzierten CD1-k/o Mäusen.....	59
2.3	HBV-spezifische CD8+T-Zell Immunantwort im Ad-HBV Maus-Modell.....	61
2.3.1	Nachweis der HBV-spezifischen CD8+T-Zellantwort nach der Ad-HBV Injektion.....	61
2.3.2	Nachweis der HBV-spezifischen CD8+T-Zellantwort in Ad-HBV und Ad- HBV-k/o transduzierten OT-I-transgenen (tg) Mäusen	63
3	Diskussion.....	66
3.1	Das Ad-HBV Maus-Modell als Krankheitsmodell der akuten Hepatitis B	69

3.1.1	Verlauf der Leberentzündung.....	69
3.1.2	Verlauf der HBV-Transkription	71
3.1.3	Expression der HBV-Antigene.....	71
3.1.4	Verlauf der HBV-Replikation	73
3.1.5	Charakterisierung der Immunantwort.....	74
3.2	Die zelluläre Immunantwort gegen HBV	77
3.3	Die HBV-spezifische CD8+T-Zell Antwort	79
4	Material und Methoden	83
4.1	Material	83
4.1.1	Verbrauchsmaterial.....	83
4.1.2	Chemikalien.....	84
4.1.3	Kits	85
4.1.4	Eukaryote Zelllinien und adenovirale Vektoren.....	86
4.1.5	Medien und Reagenzien für Zellkulturen.....	87
4.1.5.1	Medien für murine-Leber-assoziierte Lymphozyten (LAL).....	87
4.1.5.2	Medien für murine-Milzzellen	88
4.1.5.3	Medien für Bakterienkulturen.....	88
4.1.6	Puffer und Lösungen	88
4.1.7	Enzyme	90
4.1.8	Oligonukleotide	91
4.1.9	Gewichts- und Längenstandards.....	92
4.1.10	Antikörper	92
4.1.11	HBV-Antigene	93
4.1.12	Radioaktives [32P] dCTP	93
4.1.13	Bakterienstämme	93
4.1.14	Vektoren und Plasmide.....	93
4.1.14.1	Vektoren.....	93
4.1.14.2	Adenovirale Verpackungsplasmide	93
4.1.15	Verwendete Mauslinien	94
4.1.16	Synthetische Peptide	94
4.1.17	Geräte und Software	95
4.1.17.1	Geräte	95
4.1.17.2	Software	96

4.1.17.3 Statistik.....	97
4.2 Methoden.....	97
4.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	97
4.2.1.1 Rekombination von DNA aus den <i>entry</i> -Vektoren in die <i>destination</i> - Vektoren mit Hilfe des Gateway Systems	97
4.2.1.2 Transformation.....	98
4.2.1.3 Kultivierung von Bakterien	98
4.2.1.4 Plasmidpräparation	98
4.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	99
4.2.1.6 Restriktionsverdau	100
4.2.1.7 Ligation.....	100
4.2.1.8 Agarosegelelektrophorese.....	100
4.2.1.9 Polymerasekettenreaktion.....	101
4.2.1.10 Quantitative Light Cycler [®] PCR.....	102
4.2.1.11 HBV-und Ad-DNA-Messung mittels quantitativer PCR	104
4.2.1.12 Präparation genomischer DNA.....	104
4.2.1.13 Southern-Blot Analyse.....	104
4.2.1.14 Gesamt-RNA-Präparation mit Trizol [®] Reagenz.....	105
4.2.1.15 Northern-Blot Analyse.....	106
4.2.1.16 Herstellung von radioaktiv markierten Sonden	106
4.2.1.17 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden	107
4.2.1.18 cDNA-Synthese	107
4.2.2 Zellbiologische Methoden.....	108
4.2.2.1 Kultivierung von Zellen	108
4.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl	108
4.2.2.3 Kultivierung von 293-Zellen.....	108
4.2.2.4 Produktion und Amplifikation von rekombinanten Adenoviren	109
4.2.2.5 Produktion von hochkonzentrierten Adenovirusstocks	109
4.2.2.6 Aufreinigung mittels Cäsiumchlorid (CsCl) Gradienten	110
4.2.2.7 Dialyse von Adenovirusstocks.....	110
4.2.3 Biochemische Methoden	110
4.2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford-Assay)	110
4.2.3.2 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page).....	111

4.2.3.3	Western-Blot	112
4.2.3.4	Ponceaufärbung von Proteinen auf Blots	113
4.2.3.5	Immundetektion von Proteinen auf der Nitrocellulose-Membran	113
4.2.4	<i>In vivo</i> und immunologische Methoden	114
4.2.4.1	Injektion von Mäusen mit adenoviralen-HBV-Vektoren.....	114
4.2.4.2	Entnahme von Blut und Herstellung von Serum.....	114
4.2.4.3	Bestimmung der Lebertransaminasenaktivität.....	114
4.2.4.4	Bestimmung von HBsAg, HBeAg und anti-HBs-Antikörper im Serum	114
4.2.4.5	Histologische Gewebearbeitungen.....	114
4.2.4.6	Depletion von CD8+T-Zellen in C57Bl/6 und CD1-k/o Mäusen.....	115
4.2.4.7	Isolierung von primären murinen Zellen.....	115
4.2.4.7.1	Isolierung von Milzzellen.....	115
4.2.4.7.2	Isolierung von Leber-assoziierten Lymphozyten (LAL).....	115
4.2.4.8	Maus IFN- γ Sekretion-Assay (Miltenyi Biotec).....	116
4.2.4.9	Durchflusszytometrische Analyse.....	117
5	Literaturverzeichnis	119
6	Abkürzungsverzeichnis.....	134
	Danksagung	137
	Erklärung	138
	Lebenslauf.....	139

1 Einleitung

1.1 Das Hepatitis B Virus

Das Hepatitis B Virus (HBV) ist ein nicht-zytopathisches DNA-Virus und gehört zur Familie der Hepadnaviridae (Blumberg *et al.*, 1964). Es handelt sich um eine Familie membranumhüllter DNA-Viren. Das HBV und seine Verwandten haben ein sehr enges Wirtsspektrum und einen hohen Lebertropismus. HBV infiziert nur Hominoides, d.h. Menschenaffen oder den Menschen selbst. Unter die nahen Verwandten des HBV zählen das Walddarmtortier Hepatitis Virus (*Marmota monax*, Woodchuck Hepatitis B virus (WHV) (Summers *et al.*, 1978)), das Wollaffen Hepatitis Virus (*Lagothrix lagotricha*, Woolly Monkey Hepatitis B virus (WMHV) (Lanford *et al.*, 1998)), das Erdhörnchen Hepatitis Virus (*Xerus inauris*, Groundsquirrel Hepatitis B virus (Marion *et al.*, 1980)) und innerhalb der Vögel das Pekingtonen Hepatitis Virus (*Anas platyrhynchos*, Duck Hepatitis B Virus (DHBV) (Mason *et al.*, 1980)), das Reiher Hepatitis Virus (*Ardeidae*, Heron Hepatitis B virus (Sprengel *et al.*, 1988)) und das Schneegans Hepatitis Virus (*Anser caerulescens*, Snow Goose Hepatitis B virus (Schettler, 1971)).

1.1.1 Partikelbau des HBV

HBV infizierte Zellen sezernieren verschiedene Formen viraler Partikel. Zum einen werden 42 nm große, infektiöse Dane-Partikel (Dane *et al.*, 1970), und zum anderen, nicht infektiöse subvirale Partikel sezerniert. Zu den subviralen Partikeln gehören die morphologisch unterschiedlich aufgebaute sphärischen und die filamentösen Partikel, die einen Durchmesser von 15 bis 22 nm haben (Abb. 1.1). In den infektiösen Partikeln umschließt eine vom Wirt stammende Lipiddoppelmembran das Nukleokapsid. In diese Lipidmembran sind die drei verschiedenen HBV-Hüllproteine eingelagert, die vom viralen Genom exprimiert werden und sich in ihrer Länge unterscheiden. Das längste ist das L (large)-Protein, gefolgt vom M (middle)-Protein und das kürzeste ist das S (small)-Protein (Heermann und Gerlich, 1991; Neurath *et al.*, 1985). Sie besitzen alle denselben, stark hydrophoben C-Terminus. Sie werden durch vier transmembranäre α -Helices in der Membran verankert (Berting *et al.*, 1995). Das Nukleokapsid ist aus 180 bzw. 240 Untereinheiten des Kapsid-Proteins (core, C) aufgebaut und besitzt die Form eines Ikosaeders. Es enthält neben dem 3,2 kb großen viralen Genom auch die

virale Polymerase, welche über ein terminales Protein kovalent an den negativen DNA-Strang des viralen Genoms gebunden ist (Bartenschlager und Schaller, 1992).

Die genaue Funktion der subviralen Partikel ist bis heute unklar. Die Länge der filamentösen Partikel kann variieren und sie bestehen aus L-, M-, und S-Proteinen. Die sphärischen Partikel dagegen bestehen hauptsächlich aus S- und geringen Mengen an M-Protein (Abb. 1.1). Sphärische und filamentöse Partikel enthalten weder HBV-DNA noch Kapside, weshalb sie nicht infektiös, aber stark immunogen sind. Es wird angenommen, dass sie aufgrund des hohen Anteils des S-Proteins auf ihrer Oberfläche (ca. 100 HBsAg (*Hepatitis B surface antigen*)-Monomere pro Partikel, Mangold *et al.*, 1993), neutralisierende Antikörper binden und abfangen. Neutralisierende Antikörper sind überwiegend gegen das S-Protein gerichtet, weshalb es auch die Bezeichnung HBsAg erhalten hat. Die infektiösen Partikel können so einer Neutralisation durch die Immunantwort des Wirtes entgehen.

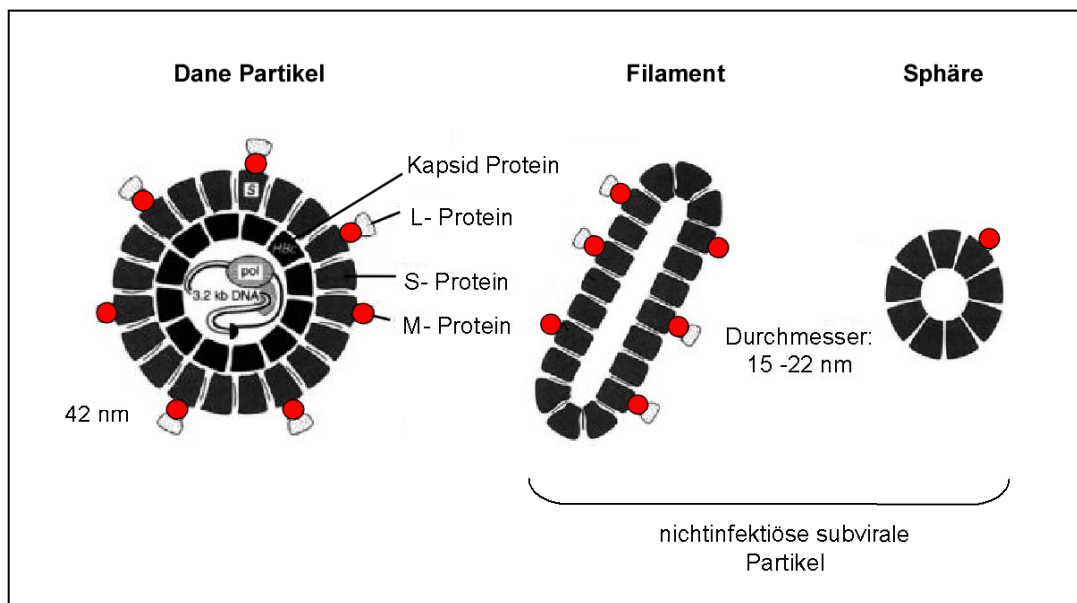


Abb. 1.1: Aufbau der infektiösen Dane Partikel und subviralen Partikel

Die subviralen Partikel liegen in filamentöser oder sphärischer Form vor und unterscheiden sich in ihrer Hüllproteinzusammensetzung. Sie enthalten weder Kapside noch HBV-DNA. Die Dane Partikel stellen die infektiösen Virionen dar. Die von der Wirtszelle stammende Lipiddoppelmembran, mit den eingelagerten HBV-Oberflächenproteinen (L-, M- und S-Protein) umschließt das aus Kapsidproteinen (Core Protein) aufgebaute Nukleokapsid. In diesem ist das HBV-DNA-Genom mit dem gebundenen Komplex aus Polymerase (pol) und terminalem Protein eingeschlossen. (aus Bundesgesundheitsblatt, 43:240–248, 2000; modifiziert)

Die sphärischen subviralen Partikel besitzen eine für Proteinkomplexpartikel sehr ungewöhnliche oktahedrische Form. Die darin enthaltenen Lipide scheinen nicht in

einer typischen, semifluiden Lipiddoppelmembran, sondern unmobil auf der Oberfläche der Partikel lokalisiert zu sein (Gilbert *et al.*, 2005; Satoh *et al.*, 2000). In infektiösem Serum von Patienten sind die sphärischen Partikel mit durchschnittlich 10^{13} /ml am häufigsten nachzuweisen, während die filamentösen Partikel mit 10^{10} /ml und die Dane-Partikel mit 10^9 /ml in geringeren Konzentrationen vorkommen.

1.1.2 Genomorganisation des HBV

Das HBV Genom besteht aus einer zirkulären, partiell doppelsträngigen DNA und besitzt eine Länge von weniger als 3.2 kb. Es ist somit das kleinste bekannte, voll replikationsfähige Virusgenom unter den Tierviren. HBV hat vier offene Leseraster (ORF), die ganz oder teilweise überlappen und auf diese Weise die geringe Genomgröße der Viren ermöglichen. Jedes Nukleotid im HBV-Genom kodiert für eines der HBV-Proteine und mehr als 50% sind in mindestens zwei simultanen Leserastern organisiert (Abb. 1.2). Als Konsequenz daraus sind alle wichtigen cis-aktiven Sequenzen Teil eines ORF, wie z.B. die Promotor- und Verstärker- (Enhancer) Elemente oder das ε -Verpackungssignal. Der Plusstrang variiert am 3'-Ende in der Länge, wodurch ein Teil des Genoms einzelsträngig bleibt. Da die entstandenen Enden nicht ligiert werden, sondern nur durch kohäsive Enden verbunden sind, liegt das virale Genom in entspannter, nicht verdrillter Form vor, der sog. rcDNA (*relaxed circular DNA*). Nachdem das virale Genom in den Zellkern der infizierten Wirtszelle gelangt ist, wird es durch wirtszelleigene DNA-Reparaturenzyme zu einem Doppelstrang vervollständigt und liegt anschließend in kovalent geschlossener, zirkulärer Form cccDNA (*covalently closed circular DNA*) vor. Die cccDNA dient als Transkriptionsmatritze für die prägenomische und die subgenomischen mRNAs. Das HBV Genom besteht aus vier mehrfach überlappenden Leserastern (preC/C, preS/S, P, X) auf dem negativ orientierten DNA-Strang. Diese komplizierte Überlappung der Leseraster, und die relativ geringe Anzahl an Virusproteinen, ermöglicht die geringe Größe des HBV Genoms. Insgesamt hat HBV vier Promotoren: der Core-, preS1 (L)-, preS2 (S)- und der X-Promotor. Beginnend von diesen Promotoren endet die Transkription der mRNAs immer am einzigen vorhandenen Polyadenylierungssignal, was zur Synthese der verschiedenen subgenomischen RNAs führt (Cattaneo *et al.*, 1984).

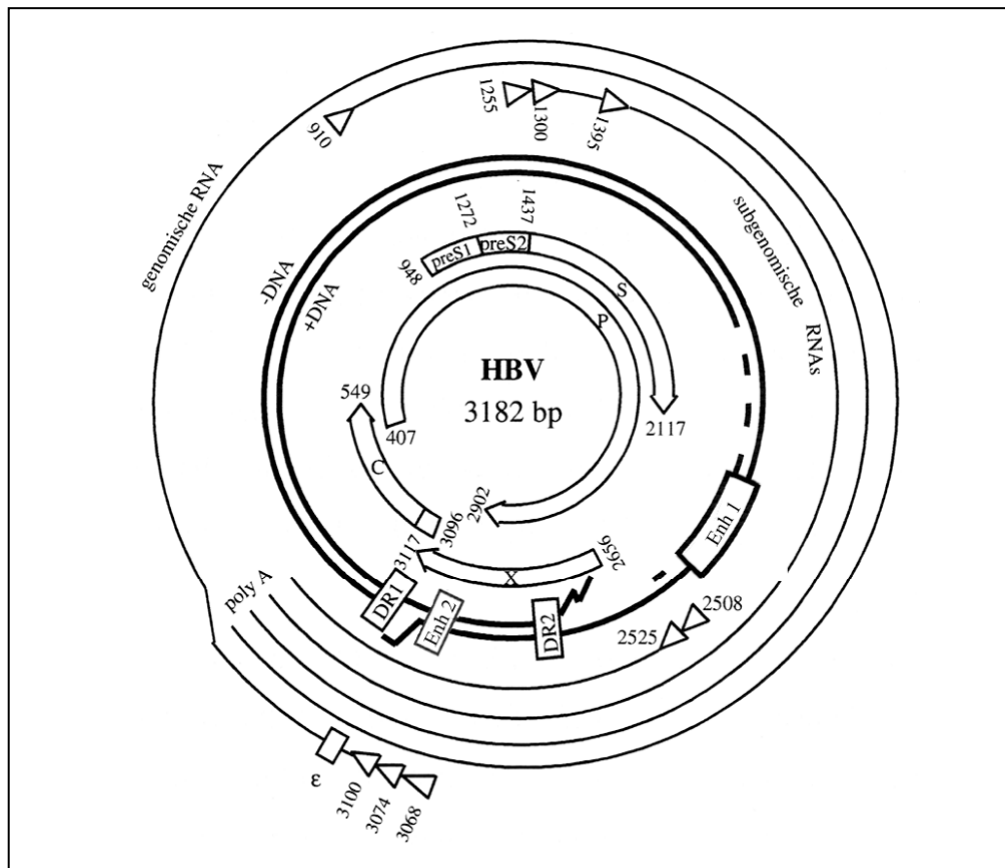


Abb. 1.2: Genomorganisation von HBV

Die äußeren Kreise stellen die Transkripte der genomischen und subgenomischen RNAs dar, die aufsitzenden Dreiecke symbolisieren die Transkriptionsstartstellen und der Kästen die ϵ -Verpackungssequenz. Die dicker linierten Kreise stellen das partiell doppelsträngige Genom dar, die Kästen zeigen Verstärkerelemente (Enh) und posttranskriptionale Regulationselemente (direct Repeats, DR1+2). Die pfeilartigen Kreise im Inneren der Abbildung zeigen die vier offenen Leseraster (ORF) und die translatierten Produkte X-, Kapsid (C)- und Polymerase (P)-Protein und die Hüllproteine S, M (preS2) und L (preS1). (Protzer *et al.*, 1999).

Die mRNAs für die Hüllproteine werden von einem einzigen ORF transkribiert und besitzen rasterinterne Startkodons. Dies hat zur Folge, dass die drei translatierten Proteine S, M und L unterschiedlich lange N-terminale Domänen besitzen (Berting *et al.*, 1995). Auf die Promotoren wirken zwei Verstärkungselemente – Enhancer (Enh) ein, Enh 1 und Enh 2 (Abb. 1.2, als Box auf dem mittleren Kreis dargestellt). Enh 1 erhöht die Transkription aller vier Promotoren, während Enh 2 in erster Linie die Transkription des Promotors preS2/S erhöht (Ganem und Schneider, 2001). Die Funktion des X-Protein ist noch immer unklar. Es wird vom X-Promotor aus transkribiert. In Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, dass das X-Protein als Transaktivator wirkt und die Infektiosität des Virus ohne das X-Protein verloren geht (Rossner *et al.*, 1992). Es wird vermutet, dass es bei der Tumorentstehung eine Rolle spielt (Seeger *et al.*, 2000).

Die virale Polymerase und das Kapsid-Protein werden, ausgehend von unterschiedlichen Startkodons, von dem 3,5 kb großen prägenomischen Überlängentranskript translatiert. Diese prägenomische mRNA dient zusätzlich als Matrize für die reverse Transkription des RNA-Prägenoms und wird zusammen mit dem Komplex aus viraler Polymerase und terminalem Protein in das Nukleokapsid verpackt.

1.1.3 Replikationszyklus

Die Replikation erfolgt aufgrund des strengen Lebertropismus ausschließlich in den Hepatozyten des Wirtsorganismus und ähnelt wegen der Beteiligung eines reversen Transkriptionsschrittes der Replikation bei Retroviren. Deshalb wird HBV auch als Pararetrovirus bezeichnet (Ganem und Schneider, 2001). Allerdings ist hier im Gegensatz zur retroviralen Replikation keine Integration der DNA in das Wirtsgenom zu beobachten. Die frühen Schritte der HBV Infektion, die Anlagerung des Viruspartikels an die Wirtszelle, das Eindringen, die Freisetzung des Kapsids und der Transport des genetischen Materials in den Zellkern sind nicht vollständig aufgeklärt. Die vorhandenen Daten zeigen, dass der Anlagerung, die maßgeblich durch das L-Protein vermittelt wird, eine rezeptorvermittelte Endozytose folgt. Diese Schritte werden wahrscheinlich von den HBV-Oberflächenproteinen, der Zellmembran, spezifischen Rezeptoren und der extrazellulären Matrix gesteuert (Abb. 1.3). Der Replikationszyklus wurde aufgrund des Fehlens eines tierischen Infektionsmodells für HBV hauptsächlich im DHBV System studiert (Cooper *et al.*, 2003).

Nach Eintritt in die Zelle wird das DNA-enhaltende Kapsid ins Zytoplasma entlassen und transloziert zum Nukleus, wobei das Kapsidprotein eine Interaktion mit dem Kernporenkomplex vermittelt (Bock *et al.*, 1996). Es ist noch unklar, ob das HBV-Genom als partiell doppelsträngige DNA an der Kernmembran freigesetzt oder das intakte Nukleokapsid in den Nukleus transloziert wird (Ganem und Prince, 2004). Im Zellkern wird der unvollständige DNA-Strang durch die Wirtzeigene Polymerase vervollständigt. So entsteht ein zirkulär geschlossener DNA-Doppelstrang (cccDNA). Die cccDNA persistiert im Nukleus der Wirtszelle und da ihr ein Replikationsstartpunkt fehlt, wird das Genom ausschließlich durch die reverse Transkription und den Reimport vervielfältigt (Tuttleman *et al.*, 1986). Die cccDNA dient im Zellkern der Wirtszelle als Matrize für die Synthese aller viraler Transkripte, die in virale Proteinproduktion und Replikation involviert sind (Werle-Lapostolle *et al.*, 2004). Im Gegensatz zur

natürlichen Infektion, etablieren HBV-transgene Mäuse keine episomale cccDNA im Zellkern (Chisari *et al.*, 1985).

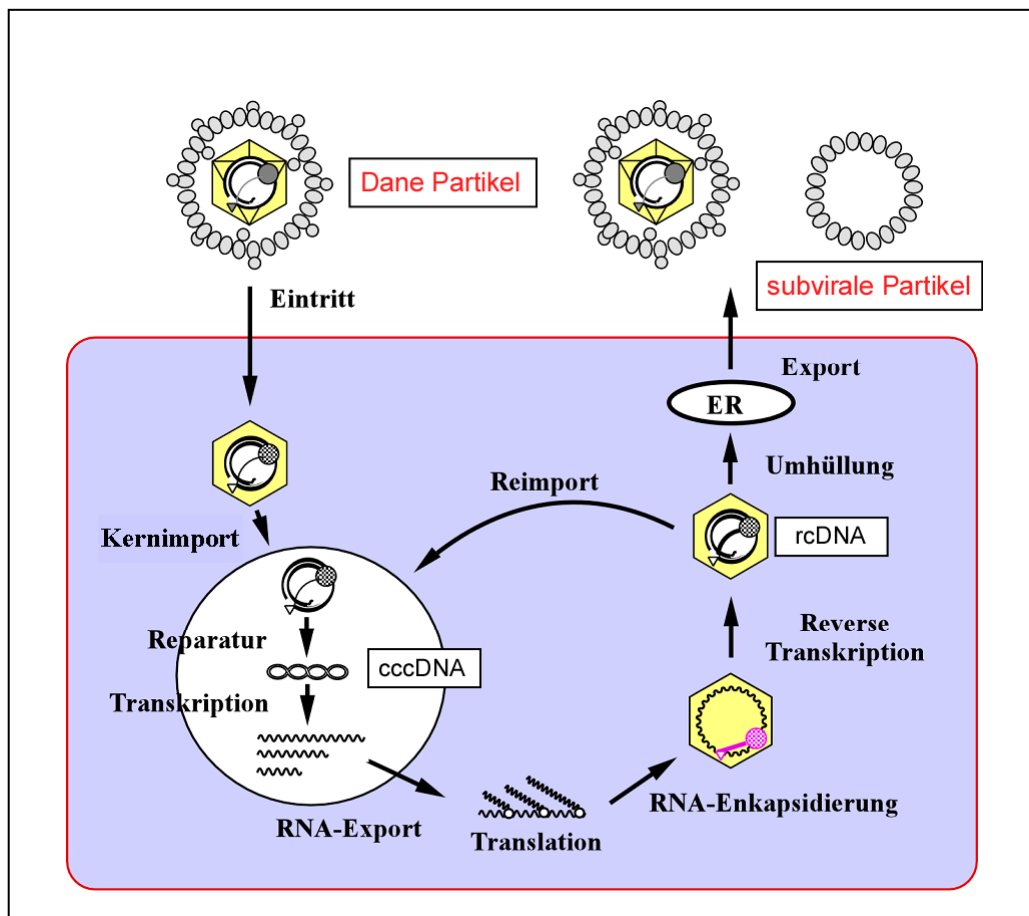


Abb. 1.3: Schema des Replikationszyklus des HBV

Das HBV wird mittels rezeptorvermittelter Endozytose in die Zelle gebracht. Nach dem Entfernen der Lipidmembran durch Membranfusion mit dem Endosom wird das Kapsid zum Nukleus transloziert, die rcDNA in den Zellkern transportiert und durch zelleigene Reparaturenzyme zur cccDNA vervollständigt. Die cccDNA dient als Matritze für die Synthese aller viraler Transkripte (sub- und prägenomische RNAs), die in die Produktion aller strukturellen und nichtstrukturellen Proteine involviert sind. Nach der Zusammensetzung des Nukleokapsids beginnt die reverse Transkription des RNA-Genoms zur partiell doppelsträngigen, reifen DNA. Erst nach diesem Prozess wird das Kapsid entweder durch Sekretion ins ER-Lumen mit einer Lipiddoppelmembran, in die die HBV-Hüllproteine eingelagert sind, umhüllt oder zurück zum Zellkern transportiert, um einen Pool an cccDNA aufzubauen. Die reifen HBV-Partikel werden über den Sekretionsweg aus der Zelle ausgeschieden (modifiziert nach Protzer und Schaller, 1999).

Die Transkription der cccDNA in prägenomische und subgenomische RNA erfolgt mittels der zelleigenen RNA-Polymerase II im Zellkern. Danach werden die RNAs ungespleißt ins Zytoplasma transportiert (Kock und Schlicht, 1993). Dort findet die Translation der viralen Hüllproteine L, M, S, und des X-Protein an den Ribosomen der Wirtszelle, basierend auf den subgenomischen RNAs statt. Die Hüllproteine werden

direkt in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert. Von der prägenomischen RNA wird die virale Polymerase translatiert und, unter Verwendung unterschiedlicher Startkodons, werden von diesem Transkript auch das Kapsid-Protein und das sekretierte HBeAg (*Hepatitis B envelope Antigen*) translatiert. Innerhalb des neugebildeten Nukleokapsids erfolgt, vermittelt durch die virale reverse Transkriptase, die Synthese des negativ orientierten DNA-Stranges. Für die Synthese des positiv orientierten DNA-Stranges dient die Haarnadelstruktur am 5'-Ende der prägenomischen RNA als Primeranlagerungsstelle. Mit dem Voranschreiten der Strangsynthese erfolgt gleichzeitig über die RNaseH-Aktivität der viralen reversen Transkriptase der Abbau der RNA-Matrize (Ganem *et al.*, 2001). Der Plusstrang des HBV Genoms wird mit dem DNA-Minusstrang als Vorlage synthetisiert. Wegen komplementärer Sequenzen am 5'-Ende des Plus- bzw. am 3'-Ende des Minusstrangs kann die Zirkularisierung des Genoms stattfinden, bevor der Überhang des Plusstrangs synthetisiert wird (Lien *et al.*, 1986). Dadurch entsteht das partiell doppelsträngige virale Genom (rcDNA).

Die entstandenen Nukleokapside werden entweder in den Nukleus reimportiert, wo sie die Kopienzahl der bereits vorhandenen cccDNA weiter erhöhen, oder verlassen die Zelle als reife Virionen. Dazu werden die Nukleokapside zuvor in das Lumen des ER sezerniert, wobei sie von einer Lipiddoppelmembran umhüllt werden (Huovila *et al.*, 1992; Patzer *et al.*, 1986). Nach der Passage des Golgi-Apparats werden die reifen Partikel auf sekretorischem Weg aus der Wirtszelle geschleust. Neben den infektiösen Virionen, die nach ihrer Freisetzung weitere Hepatozyten infizieren können, verlassen auch nicht infektiöse, subvirale Partikel die Leberzellen. Subvirale Partikel assemblieren spontan durch die inter- und intramolekulare Quervernetzung von Cysteinresten des S-Proteins in der ER-Membran. Diese Reifung erfolgt ohne die Hilfe zellulärer Proteine (Heermann und Gerlich, 1991).

1.2 Epidemiologie

Dem Ethnologen B.S. Blumberg gelang 1966 der erste Schritt zur Identifizierung des Erregers. Er wies bei australischen Ureinwohnern das sog. Australien-Antigen (*australia antigen*) nach, das später mit einer Hepatitis in Verbindung gebracht wurde (Blumberg *et al.*, 1966). Die Entdeckung und Charakterisierung dieses Antigens, später HBsAg (*Hepatitis B surface antigen*) genannt, waren bedeutende Meilensteine in der Hepatitis B-Forschung. Sie bahnten den Weg zu intensiven Studien der Natur des

infektiösen Agens und der assoziierten Krankheit. Heute stellt die Virusinfektion durch Hepatitis B weiterhin ein ernstes globales Gesundheitsproblem dar. Mehr als 2 Milliarden Menschen weltweit haben schon einmal eine Infektion durchgemacht. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO, *World Health Organization*) sind darunter etwa 350 Millionen chronische Träger des Virus. Die Zahl der chronisch infizierten Patienten steigt trotz der Möglichkeit einer effizienten Impfung jährlich und hat zur Folge, dass ungefähr eine Million Menschen im Jahr an einer von dem Virus verursachten Krebserkrankung sterben.

1.3 Pathogenese und Verlauf der HBV-Infektion

HBV wird durch sexuellen Kontakt, Blut oder andere Körperflüssigkeiten übertragen und ist 50- bis 100-fach infektiöser als HIV (*humanes Immundefizienzvirus*). Die Infektion findet entweder horizontal zwischen Erwachsenen oder vertikal von der infizierten Mutter auf das Neugeborene Kind statt (Ganem *et al.*, 1982). In endemischen Gebieten erfolgt die Übertragung meist vertikal und führt in über 90% der Fälle zu einer chronisch persistierenden Infektion. Zu diesen Gebieten zählen vor allem Ostasien sowie Zentral- und Westafrika. Hier sind 20% bis 80% der Bevölkerung mit HBV infiziert. Im Gegensatz dazu kommt das Virus in den Industrieländern nur sporadisch vor, hier sind etwa 0,5% bis 1% der Bevölkerung chronisch infiziert (WHO, 2000).

HBV infiziert fast ausschließlich Hepatozyten und kann eine akute oder chronische Leberentzündung (Hepatitis) hervorrufen. Die Inkubationszeit beträgt dabei zwischen zwei und sechs Monaten. In bis zu 65% der Fälle verläuft die Infektion symptomlos und eine neutralisierende Immunität wird entwickelt. Bei 25% der Fälle kommt es zu einer akuten Hepatitis mit dem typischen Symptom der Gelbsucht (Ikterus). Diese Leberentzündung klingt in der Regel nach zwei bis drei Wochen ab. Nach der akuten Phase der Infektion kann je nach Alter und Immunstatus des Patienten eine chronische Hepatitis B entstehen. Diese ist mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung von lebensbedrohlichen Krankheiten wie Leberzirrhose, hepatozellulärem Karzinom (HCC) assoziiert und kann im Verlauf mehrerer Jahre zum Tod führen (Abb. 1.4). Eine chronische Erkrankung entwickelt sich bei etwa 10% der infizierten Erwachsenen, bei 30% der Kleinkinder und bei etwa 90% der infizierten Neugeborenen, wobei hier die neonatale Toleranzbildung eine Rolle spielen könnte (Chisari und Ferrari, 1995). In Deutschland leben ca. 500.000 Patienten mit chronischer Hepatitis B (0,4-0,7%; Robert Koch Institut, Epidemiologisches Bulletin, Januar 2006), welche durch eine aktive

Replikation des HBV in den Hepatozyten und nachweisbaren HBs-Antigenkonzentrationen im Serum gekennzeichnet ist. Dies führte auch zu der Bezeichnung HBsAg-Träger (Ganem und Prince, 2004). Der persistierende Virus im Blut des Patienten ist dabei über mehr als 20 Wochen nachweisbar (Robinson *et al.*, 1996).

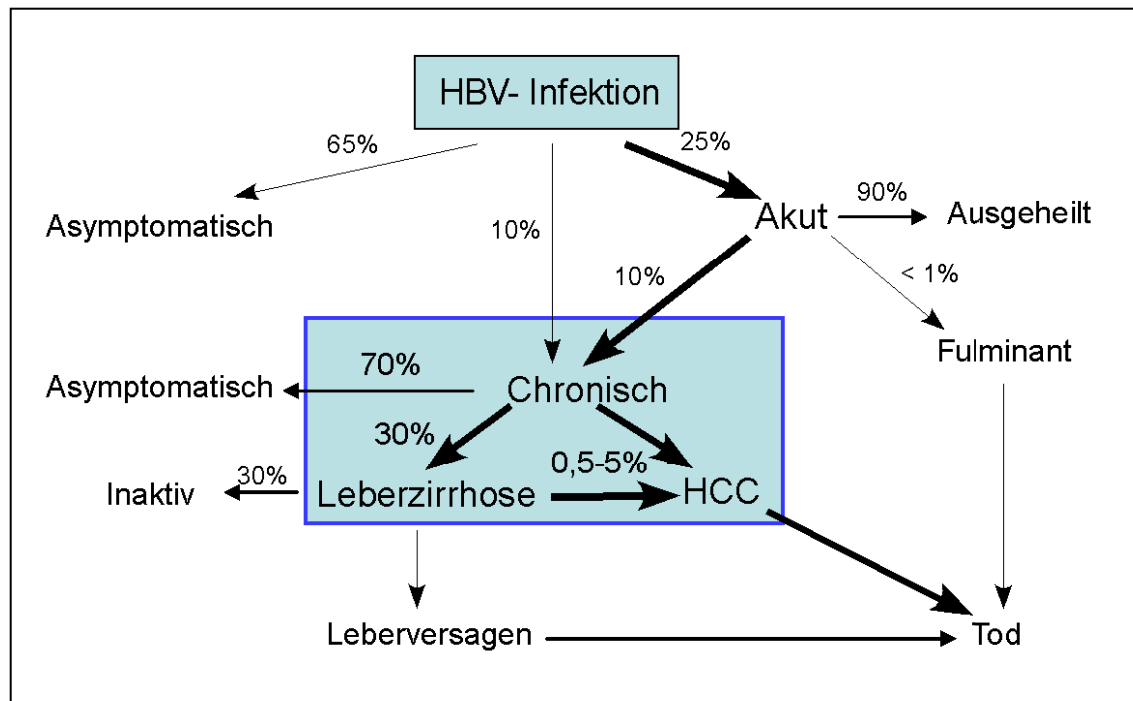


Abb. 1.4: Verlauf einer HBV-Infektion

Zwar existieren inapparente Formen der Infektion, jedoch wird ein hoher Anteil der akuten Infektion chronisch und führt zur Leberzirrhose, Leberkrebs und Tod.

Die Entwicklung des Infektionsverlaufes ist stark von der Immunantwort des Wirts abhängig. Die zytotoxische T-Zellantwort des Wirts wird sowohl für die Elimination des Virus als auch für die entzündliche Schädigung der Leber bei der persistierenden HBV-Infektion verantwortlich gemacht. Die chronische Leberentzündung und die daraus folgenden massiven regenerativen Prozesse, erzeugen einen mutagenen und mitogenen Einfluß. Dieser kann zu DNA-Schädigungen und somit zur Entwicklung eines hepatozellulären Karzinomes führen (Chisari und Ferrari, 1995).

Während in Patienten mit ausgeheilter Hepatitis B eine starke und polyklonale T-Zellantwort beobachtet wurde (Bertoletti *et al.*, 1991; Rehmann *et al.*, 1995), wurde bei Patienten mit einer chronischen Infektion nur eine schwache und oligoklonale T-Zellantwort beschrieben (Penna *et al.*, 1991; Penna *et al.*, 1996). Dies scheint der

maßgebliche Unterschied in der Kontrolle der HBV-Infektion zu sein. In verschiedenen klinischen Studien mit immundefizienten Patienten wurden relativ milde Leberentzündungen nach einer HBV-Infektion beobachtet, verbunden mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer persistierenden Infektion (Stevens *et al.*, 1975).

1.3.1 Diagnostik der akuten und der chronischen HBV-Infektion

Zur Diagnostik der akuten und chronischen HBV-Infektion wird eine Reihe serologischer Marker bestimmt (Abb. 1.5). Der erste serologisch nachweisbare Marker ist das HBsAg, welches nach zwei bis zehn Wochen in nachweisbaren Mengen vorhanden ist. Kurz danach können spezifische Antikörper gegen das HBV Kapsid-Protein (HBcAg) detektiert werden (Abb. 1.5), die im frühen Verlauf hauptsächlich einen IgM-Isotyp besitzen (Hoofnagle *et al.*, 1981). Bei chronischen Infektionen persistiert das HBsAg. Es ist somit in der Inkubationszeit, in der Akutphase und bei einer chronischen Infektion im Serum nachweisbar. Der direkte Nachweis von HBV-DNA im Serum mittels quantitativer PCR ist ein Marker für die Höhe der Virämie und damit ein Maß für die Infektiosität. Nach der Primärinfektion kann, nach einer Inkubationszeit von ca. vier Wochen, HBV-DNA nur in geringen Konzentrationen von 10^2 bis 10^4 Genomäquivalenten pro Milliliter Blut nachgewiesen werden (Rehermann und Nascimbeni, 2005). Etwa fünf bis 15 Wochen nach der Primärinfektion beginnen die Konzentrationen der Alaninaminotransferasen (ALT) im Serum anzusteigen, was die zytotoxische Leberentzündung durch die einsetzende adaptive Immunantwort anzeigt. ALT werden von apoptotischen Hepatozyten freigesetzt und dienen der klinischen Diagnostik zur Einschätzung der Leberschädigung. Der Nachweis von HBeAg ist als ein Hinweis auf eine aktive Virusvermehrung mit hoher Virämie zu werten. Mit Beginn der akuten Hepatitis-B-Symptomatik ist anti-HBc nachweisbar, wobei die IgM- und IgG- Antikörperanteile je nach Schweregrad verschieden hohe Titer erreichen. Mit Abklingen der Symptome verschwindet anti-HBc-IgM im Verlauf von Monaten, während anti-HBc-IgG jahrelang, oft lebenslang, persistiert (Abb. 1.5).

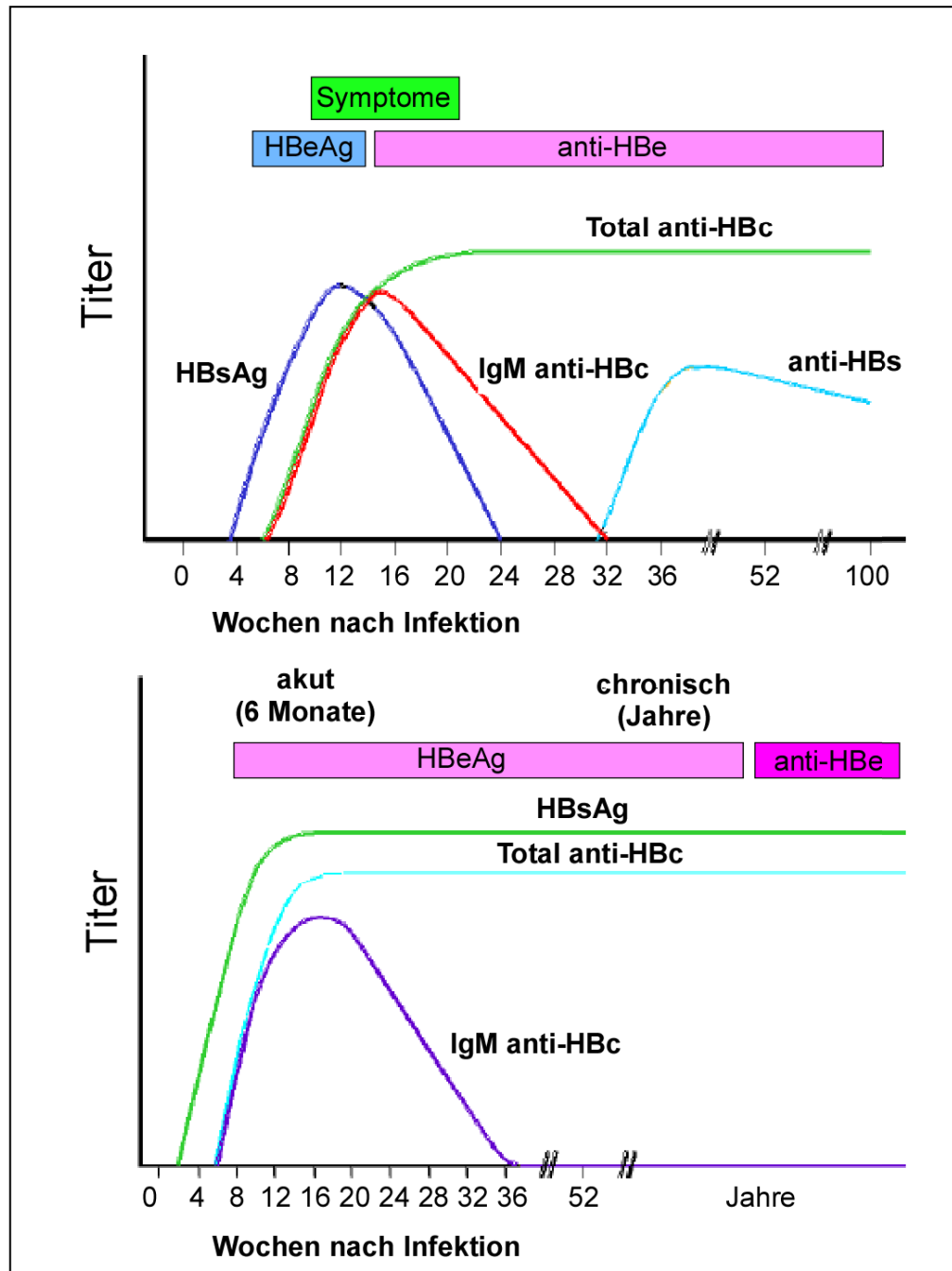


Abb. 1.5: Serologischer Verlauf einer akuten (oben) und einer chronischen HBV-Infektion (unten). (Grafik modifiziert nach F. Mahoney, Clinical Microbiology Reviews, 1999)

Bei ca. 90% der infizierten Erwachsenen kommt es nach der akuten Infektion zu einem Ausheilen der Infektion, begleitet von der Bildung HBe-, HBs- und HBcAg spezifischer IgG-Antikörper, die eine lebenslange, protektive Immunität vermitteln (Rehermann und Nascimbeni, 2005). In Patienten mit ausgeheilter Hepatitis B konnte gezeigt werden, dass noch Jahrzehnte nach der Erkrankung eine minimale Virusreplikation nachweisbar ist. Diese wird von einer aktiven und antigenspezifischen T-Zellantwort kontrolliert (Rehermann *et al.*, 1996).

Bei Entwicklung einer chronischen Hepatitis B kann anti-HBc-IgM in hohen Konzentrationen nachweisbar bleiben, anti-HBc-IgG bleibt immer hoch positiv. Im chronischen Verlauf kommt es zwar zur Bildung HBeAg-spezifischer, nicht aber HBsAg-spezifischer Immunglobuline. Typisch ist neben einer persistierenden Produktion des HBsAg, auch eine lange Nachweisbarkeit des HBeAg (Abb. 1.5).

1.3.2 Therapiemöglichkeiten

Im Gegensatz zu einer erfolgreichen Immunprophylaxe, fehlt immer noch eine sichere und effektive Therapie der chronischen HBV Infektion (Hoofnagle und di Bisceglie 1997). Die Behandlung der chronisch infizierten Patienten erfolgt heute mit Interferon- α , welches einen antiviralen Effekt auf die HBV Infektion hat und das körpereigene Immunsystem durch Aktivierung der T-Zell-Antwort stimuliert. Leider ist die Verträglichkeit und Effizienz dieser Behandlung begrenzt. Die Behandlung führt in einigen Fällen zu einer Reduktion der Viruslast, ist allerdings bei bis zu 50 % der Patienten ineffektiv (Hoofnagle *et al.*, 1997; Lammert, *et al.*, 2000). Eine komplette Ausheilung der Hepatitis B ist nicht möglich, da die cccDNA nicht komplett eliminiert werden kann. Moderne Ansätze zur Therapie der Hepatitis B wurden in den letzten Jahren in Form sog. Nukleosidanaloga entwickelt (Lau *et al.*, 2000). Diese stören die virale Replikation und blockieren so die Entstehung neuer Virionen. Da die Wirts-DNA-Synthese nicht beeinträchtigt wird, sind diese Medikamente gut verträglich. Diese Medikamente wurden bereits erfolgreich bei der Behandlung der HIV-Infektion eingesetzt und manche sind auch bei der Therapie der Hepatitis B wirksam. Das erste zugelassene Medikament dieser Substanzgruppe war das Lamivudine, welches genauso häufig wie Interferon zur bleibenden Hemmung der Virusvermehrung führt, aber deutlich nebenwirkungsärmer ist. Ein Problem der Therapie mit Lamivudine ist die Möglichkeit von Resistenzentwicklungen des Hepatitis B Virus, die bei einer 4-jährigen Therapie immerhin bis zu 60 % betragen kann. Jedoch gibt es auch hier neuere Therapieansätze wie das Entecavir oder Adefovir, welches auch bei Lamivudine-resistenten Viren noch wirksam ist (Kumar *et al.*, 2004). Weitere Substanzen wie Tenofovir, Emtricitabine und Telbivudine sind bereits mit der Indikation zur Behandlung der HIV Infektion zugelassen, befinden sich derzeit kurz vor der Zulassung oder werden derzeit in grossen Studien geprüft. Die Zukunft der Behandlung der Hepatitis B wird sehr wahrscheinlich ähnlich wie bei der HIV-Infektion in einer Kombinationstherapie verschiedener Nukleosidanaloga und ähnlicher Medikamente

bestehen. Neuere Interferone wie z.B. pegylierte-Interferone sind zur Behandlung der Hepatitis B ebenfalls vor kurzem zugelassen worden. Sie werden derzeit allerdings nur zur Behandlung des sog. Wildtyps des Hepatitis B, also der HBsAg positiven Hepatitis, hinzugezogen. Alternative Ansätze wie DNA-Impfung und Antisense-Nukleotide haben derzeit noch rein experimentellen Charakter.

1.4 Modelle der Hepadnaviralen Infektion

Zur Untersuchung der Pathogenese der hepadnaviralen Infektion wurde eine Reihe von Zellkultur- und Tier-Modellsystemen etabliert.

1.4.1 Zellkultur-Modelle

Zwar konnten *in vitro* Zelllinien hergestellt werden, die durch Transkription von episomal vorliegender oder stabil integrierter viraler DNA infektiöse Dane-Partikel bilden (z.B. in HuH7, HepG2), keine dieser Zelllinien ist jedoch infizierbar (Sureau *et al.*, 1986; Chang *et al.*, 1987; Sells *et al.*, 1987). In Zellkultur waren lange lediglich primäre humane Hepatozyten (PHH) infizierbar mit HBV. Problematisch ist bei diesem Modell jedoch die begrenzte Verfügbarkeit von humanen Zellen, sowie deren Unterschiedlichkeit aufgrund verschiedener Spender und der unterschiedlichen Qualität. Das beste derzeit verfügbare *in vitro* Infektions-Modellsystem ist die kürzlich beschriebene Hepatom Zelllinie HepaRG (Gripon *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu anderen Zelllinien können diese Zellen im ausdifferenzierten Zustand infiziert werden. Für eine produktive HBV-Infektion *in vitro* sind die Zellkultur-Bedingungen bzw. der Status der Zelle außerordentlich wichtig (Gripon *et al.*, 2002; Schulze-Bergkamen *et al.*, 2003). Trotz optimaler Bedingungen und der Verwendung einer hohen „Multiplicity of Infection (MOI)“ gelingt es aber nicht, mehr als 10-30% der Zellen zu infizieren. *In vivo* ist die HBV Infektion hingegen sehr effektiv (Jilbert *et al.*, 1996; Will *et al.*, 1985), schon ein bis zehn Viruspartikel reichen für die Infektion aus.

1.4.2 Tiermodelle

Das Hauptproblem bei der Erforschung vom HBV-Lebenszyklus und Entwicklung neuer, alternativer Ansätze für Therapie und Prophylaxe der Hepatitis B ist das Fehlen geeigneter Tiermodelle.

Das einzige vollwertige Tiermodell für das Studium der HBV Infektion sind die Schimpansen. Schimpansen sind ideal für die Analyse der immunologischen Vorgänge

in der Frühphase einer akuten Infektion, da sie neben dem Menschen die einzigen natürlich mit HBV infizierbare Spezies sind (Barker *et al.*, 1975). In diesem Modell durchgeführte Depletionsexperimente zeigten die Rolle der T-Zellantwort für den Verlauf einer akuten Infektion (Thimme *et al.*, 2003). Da ihre Verwendung als Versuchstiere ethisch problematisch ist und zudem mit sehr hohen Kosten verbunden ist, werden sie als Modellsystem nur sehr eingeschränkt verwendet.

Das Tupaia-System ist ein Modell, dem in den letzten Jahren zunehmend Aufmerksamkeit gewidmet wurde. Tupaia (*Tupaia belangeri*) sind kleine, in den Regenwäldern Südostasiens lebende Säuger. Obwohl sie nicht zu den Primaten zählen, können sie experimentell *in vivo* mit dem humanen HBV infiziert werden. Die Infektion ist jedoch selbst limitierend und führt nicht zur Etablierung einer chronischen Infektion (Walter *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1996). Attraktiv macht das Modell die Verfügbarkeit von primären Hepatozyten und die Tatsache, dass diese *in vitro* mit HBV und Wollaffen (WMHBV) (Lanford *et al.*, 1998), nicht jedoch mit WHV infiziert werden können (Kock *et al.*, 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Infektion spezifisch ist und die Tupaia-Hepatozyten damit einen authentischen Aufnahmeapparat für HBV besitzen (Glebe *et al.*, 2003; Glebe *et al.*, 2005; Macrae *et al.*, 1991). Die primären-Tupaia Hepatozyten können in einem Xenotransplantationsmodell in immundefizienten uPA/RAG-2-Mäusen die Leber repopulieren, deren endogene Hepatozyten durch die toxische Wirkung eines leberspezifisch exprimierten Urokinase Plasminogenaktivators zerstört wurden (Dandri *et al.*, 2005). Dieses Infektionsmodell ist aber experimentell sehr aufwendig und selbstlimitierend.

Eines der am besten untersuchten Modellsysteme zur Untersuchung der Molekularbiologie der Hepatitis-B-Viren ist die Infektion von chinesischen Haus- und amerikanischen Pekingtonen mit dem Enten-HBV (DHBV). Die Infektion mit DHBV erfolgt über eine vertikale Übertragung von der infizierten Mutterente auf die Eier. Das Virus vermehrt sich im Dottersackgewebe des sich entwickelnden Embryos und wird ab dem sechsten Tag der Embryonalentwicklung auf die Hepatozyten übertragen, was in den meisten Fällen eine chronische Infektion zur Folge hat, die allerdings nicht zur Schädigung der Leber führt. Da auch primäre Hepatozyten von Enten in Kultur leicht zu handhaben sind und mit DHBV infiziert werden können, war es lange Zeit das wichtigste Modell für die Erforschung der frühen Schritte der hepadnaviralen Infektion

und der Replikationsstrategien des Virus. Für die Erprobung antiviraler Therapien und neuer Impfstoffe hat sich dieses Tiermodell ebenfalls bewährt (Jilbert *et al.*, 2005).

Die experimentelle Infektion von nordamerikanischen Murmeltieren mit dem Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) wurde auch als Modell für die hepadnavirale Infektion beschrieben. Dies lässt sich mit der starken Ähnlichkeit von WHV zu HBV erklären. Die Homologie auf Nukleotidebene zwischen WHV und HBV liegt bei 70%. Im Gegensatz dazu besteht zwischen HBV und DHBV lediglich eine Sequenzhomologie von 40% (Tiollais *et al.*, 1985). Die Pathogenese einer WHV-Infektion ist der einer humanen HBV-Infektion vergleichbar. Die Krankheitsverläufe reichen von einer subklinischen oder akuten bis hin zu einer chronischen Infektion mit der Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC). Das Risiko einer Chronifizierung ist ebenso wie bei der HBV-Infektion altersabhängig. Der Chronifizierungsgrad beträgt bei infizierten Neugeborenen etwa 90-95%, während lediglich 5-10% der infizierten erwachsenen Tiere eine chronische Hepatitis entwickeln. Im Woodchuck-Modell wurden bereits einige Aspekte einer Infektion mit Hepadnaviren studiert, u.a. die Immunpathogenese (Menne *et al.*, 1997; Menne *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2004) und Faktoren für die Entwicklung der chronischen Infektion oder von HCC (Miller *et al.*, 1990; Cote *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003). Auch das Auftreten und die Bedeutung viraler Mutanten in der akuten und chronischen Infektion wurden bereits analysiert (Chen *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1996; Botta *et al.*, 2000). Lebertransplantationsstudien erlaubten die Untersuchung des adoptiven Immuntransfers im Woodchuck-Modell (Dahmen *et al.*, 2004). Aus klinischer Sicht wurde das Tiermodell verwendet, um Impfstoffe zum Schutz vor einer Infektion zu entwickeln (Lu *et al.*, 1999; Garcia-Navarro *et al.*, 2001). Auch antivirale Therapieformen mit neuen Nukleosidanaloga (Cullen *et al.*, 1997 und 2001), Nicht-Nukleosidanaloga (Block *et al.*, 1998; Donello *et al.*, 1998) oder therapeutischer Vakzinierung (Hervas-Stubbs *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2001) wurden im Woodchuck-Modell getestet. Als Modellsystem für die frühen Schritte der Infektion wie z.B. Rezeptorstudien erscheint es jedoch ungeeignet, da es zu deutlichen Unterschieden bei Oberflächenproteinen von WHV im Vergleich zu denen von HBV gibt, zum anderen (Tolle *et al.*, 1998), da primäre Woodchuck-Hepatozyten *in vitro* nicht infizierbar sind.

Peking-Enten und Woodchucks sind als Versuchstiere problematisch, da ihre Haltung sehr aufwendig ist, und es damit kaum möglich ist, große Versuchsreihen

durchzuführen. Die Woodchucks werden meist in der Wildbahn gefangen und leiden daher häufig an multiplen, vor allem parasitären Infektionen. Zudem sind sie genetisch nicht vollständig definiert, und viele molekularbiologische und immunologische Untersuchungs-Methoden fehlen. Für immunologische Untersuchungen sind diese beiden Modelle daher nur eingeschränkt geeignet.

Um die Immunpathogenese der Hepatitis B besser verstehen zu können und Therapie, sowie Prophylaxe der chronischen HBV-Infektion verbessern zu können, ist es unbedingt notwendig, ein geeignetes Tiermodell für die HBV-Infektion zu haben. Optimal erscheint hierfür ein kleines Säugetier, wie z.B. die Maus, die genetisch exakt definiert und einfach zu halten und zu züchten ist.

Da Mäuse mit HBV nicht infiziert werden können, da sie den bisher unbekanntem Rezeptor nicht tragen, wurden HBV-transgene Mäuse entwickelt. Wegen ihrer in der Embryonalentwicklung erworbenen Toleranz gegen HBV dienen sie als Modell für die chronische Hepatitis B und haben wesentlich zum Verständnis der Immunbiologie und Pathogenese von HBV beigetragen (Chisari *et al.*, 1985; Guidotti *et al.*, 1995). Das nicht-zytopathische HBV selbst ruft weder schwerwiegende Leberzellschäden, noch starke Entzündungsreaktionen in den Tieren hervor. In diesem transgenen Maus-Modell sind auch zahlreiche Faktoren beschrieben worden, die die HBV-Replikation beeinflussen (Guidotti und Chisari, 2001). Die Limitation dieses Modells ist, dass diese Tiere dem HBV gegenüber tolerant sind, da es nicht als erworbenes Agens vorliegt, sondern als Transgen vererbt wird und dass das Virus nicht eliminiert werden kann. Dieses Modell ist also nur geeignet, Faktoren zu untersuchen, die die HBV-Replikation beeinflussen, aber nicht dafür, Faktoren zu identifizieren, die die Anti-HBV Immunantwort oder die Elimination des Virus beeinflussen. Ideal wäre es, ein Maus-Modell zu etablieren, das erlaubt, den Verlauf und die Dynamik der akuten HBV-Infektion zu studieren und Faktoren, die die Kontrolle durch das Immunsystem beeinflussen (Protzer und Schaller, 2000) und damit zu einer Chronizität der Infektion führen, zu untersuchen. Seit Kurzem gibt es mehrere Ansätze, HBV-Genome unabhängig von den HBV-Rezeptoren in die Leber adulter Mäuse zu transferieren, und damit eine Anti-HBV Immunantwort und eine akute Hepatitis zu induzieren.

Eine Möglichkeit stellt die hydrodynamische Injektion dar. Es wurde gezeigt, dass die hydrodynamische Injektion replikationsfähiger HBV-DNA eine akute Hepatitis B in der Maus imitiert (Yang *et al.*, 2002). Bei dieser Methode injiziert man intravenös (*i.v.*) sehr

schnell ein großes Volumen (1,6 ml/20 g Maus) an Plasmid-DNA. Bereits am Tag 1 nach der Injektion kann ein beträchtlicher initialer Leberschaden nachgewiesen werden. Die HBV-Replikation ist auf sieben Tage limitiert (Yang *et al.*, 2002). Dieser kurze Verlauf der HBV-Replikation nach der hydrodynamischen Injektion ist ein wesentlicher Nachteil dieser Methode. In einer neuen Studie wurden Adeno-assoziierte viralen (AAV)-basierte Plasmide für den Transfer von HBV-DNA in die Leber der Maus mittels hydrodynamische Injektion genutzt. Dies stellt ein neues Modell für eine HBV-Infektion in einer immunkompetenten Maus mittels Injektion von replikationskompetenten pAAV-HBV-DNA dar. Die hydrodynamische Injektion von pAAV/HBV-1.2 in die immunkompetenten C57Bl/6 (H-2^b Haplotyp) Mäuse resultierte in einer persistierenden HBV-Infektion, die länger als ein Jahr andauerte. In BALB/c (H-2^d Haplotyp) Mäusen war dies nicht der Fall (Huang *et al.*, 2006). Wenn HBV-DNA in ein anderes Vektorsystem kloniert wurde, wurden nach 28 Tagen Anti-HBs-Antikörper gebildet, was ein Zeichen für die Ausheilung der Hepatitis war. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur der genetische Hintergrund einer Maus, sondern auch die Wahl eines viralen-Vektors (AAV) einen Einfluss auf die Klärung der HBV-Infektion hat (Huang *et al.*, 2006).

Es konnte ebenso gezeigt werden, dass mithilfe der adenoviraler Vektoren HBV-Genome unabhängig von den HBV-Rezeptoren in die Leberzellen eingebracht werden können, dort effizient replizieren und infektiöse HBV-Partikel produzieren. Dadurch kann die Speziesgrenze für das HBV überwunden werden und eine HBV-Replikation in Maus Hepatozyten erreicht werden (Sprinzl *et al.*, 2001). Da der Transfer in gesunde, erwachsene, vollständig immunkompetente Tiere erfolgt, war ein Krankheitsverlauf ähnlich dem einer akuten Hepatitis B zu erwarten. Der HBV-Genomtransfer mittels adenoviraler Vektoren ist ein vielversprechendes Werkzeug, um den Einfluß von Wirtsfaktoren auf die HBV-Replikation zu untersuchen. Adenovirale Vektoren erlauben einen effizienten HBV-Genom Transfer *in vivo* in die Leber von Versuchstieren mit hoher Reproduzierbarkeit und zeigen einen längeren Verlauf der HBV-Replikation. Diese Eigenschaften zeichnen den adenoviralen Genomtransfer gegenüber der hydrodynamischen Injektion aus. Die hydrodynamische Injektion ist zwar mit geringerem experimentellem Aufwand verbunden, es wurde aber gezeigt, dass diese Methode sehr toxisch ist und mit einer hohen Belastung für die Tiere verbunden ist.

1.5 Immunpathogenese

1.5.1 Die adaptive Immunantwort

Bei Säugetieren gibt es mit der angeborenen und der erworbenen (adaptiven) Immunantwort zwei unterschiedliche, aber eng miteinander verbundene Abwehrsysteme gegen eine virale Infektion.

Die angeborene Immunantwort reagiert innerhalb kürzester Zeit nach Eintritt des Pathogens und vermittelt einen nicht erregerspezifischen Schutz gegen die Infektion. Die erworbene spezifische Immunität wird durch die Zellpopulation der Lymphozyten vermittelt. Diese antigenspezifischen Zellen üben verschiedene Effektorfunktionen gegen virusinfizierte Zellen aus und sind maßgeblich an der Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses beteiligt. Lymphozyten entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen und befinden sich in großer Anzahl im Blut, in der Lymphe sowie in lymphoiden Geweben. Sie werden nach dem Ort ihrer Reifung in B- und T-Lymphozyten unterschieden. Die B-Zellen entwickeln sich direkt aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks (*engl. bone marrow*), während die T-Zellen vom Knochenmark in den Thymus wandern und dort ausreifen (Janeway und Travers, 1997).

B-Lymphozyten sind für die humorale Immunität verantwortlich, welche durch Antikörper vermittelt wird. Die Moleküle für die Erkennung von Antigenen sind bei B-Zellen die Immunglobuline (Ig). Diese werden als membrangebundene Rezeptoren (B-Zellrezeptor) sowie als sezernierte Antikörper produziert. Die Aufnahme eines löslichen Antigens in die B-Zelle erfolgt nach Bindung an den B-Zellrezeptor durch Internalisierung des Antigen-Antikörperkomplexes. Nach der intrazellulären Prozessierung werden Peptide des Antigens auf der B-Zelloberfläche präsentiert und dadurch T-Helferzellen aktiviert. Infolge der Stimulation durch die Antigen-Bindung und durch die T-Helferzellen proliferiert die B-Zelle und differenziert zu einer Plasmazelle, welche spezifische Antikörper sezerniert. Diese Antikörper schützen vor einer Infektion, indem sie unter anderem die toxischen Effekte oder die Infektiosität eines Pathogens durch Bindung inhibieren. D.h., sie haben eine neutralisierende Wirkung. Neutralisierende Antikörper, die gegen die HBV-Hüllproteine gerichtet sind (anti-HBs), spielen eine entscheidende Rolle bei der Eliminierung des Virus und vermitteln zugleich den Schutz vor einer Reinfektion. Anti-HBs komplexiert freie

Virionen und durch die Entfernung dieser Immunkomplexe aus der Zirkulation wird die Infektion weiterer Zellen unterbunden. Vermutlich besteht auch ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Immunkomplexe und den späteren extrahepatischen Symptomen, die mit einer HBV-Infektion verbunden sind (Chisari *et al.*, 1997). Die Rolle der gegen das Nukleokapsid gerichteten Antikörper ist dagegen nicht völlig geklärt.

Die T-Lymphozyten (T-Zellen) sind neben NK- und NK-T-Zellen die Haupteffektorzellen der zellvermittelten Immunantwort. Die Funktion der T-Lymphozyten ist die Eliminierung von Pathogenen wie Viren und Bakterien. Voraussetzung dafür ist die direkte Interaktion der T-Zellen mit infizierten oder Antigen-präsentierenden Zellen. Die Erkennung erfolgt durch die Wechselwirkung des T-Zellrezeptors (TCR) und verschiedener Ko-Rezeptoren mit Oberflächenmolekülen der Zielzelle, mittels derer Antigenfragmente des Pathogens präsentiert werden.

Diese Oberflächenproteine sind dem Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) zuzuordnen. Der Haupthistokompatibilitätskomplex besteht aus einer Gruppe von Genen, die für viele an der Antigenpräsentation beteiligte Proteine kodieren. Vorrangig sind dabei die MHC-Glykoproteine der Klasse I und Klasse II zu nennen. MHC-Gene sind die Gene mit dem höchsten bekannten Polymorphismus (Robinson *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2000). Dieser Polymorphismus ist von entscheidender Bedeutung bei der Antigenerkennung durch T-Lymphozyten. Eine T-Zelle erkennt ein Antigen als Peptid, das von einer bestimmten allelischen Variante eines MHC-Moleküls präsentiert wird. Im Kontext eines anderen MHC-Moleküls wird das gleiche Peptid hingegen nicht erkannt. Diese Eigenschaft der T-Zellen wird MHC-Restriktion genannt. MHC Klasse I-Moleküle binden Peptide aus Proteinen, die im Cytosol abgebaut wurden (endogene Prozessierung) und präsentieren diese Peptidfragmente CD8+T-Zellen. MHC Klasse II-Moleküle hingegen präsentieren Peptide den CD4+T-Zellen. Diese Peptide entstammen Antigenen, die in einem endosomal/lysosomalen Antigenprozessierungsweg degradiert wurden (exogene Prozessierung).

Die Verteilung von MHC-Molekülen auf Zielzellen ist unterschiedlich. Die Unterteilung der MHC Moleküle in MHC I und MHC II bezieht sich auf die subzelluläre Struktur, die Lokalisation und die Funktion. MHC Klasse I-Proteine

werden auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert, präsentieren vorwiegend Antigene intrazellulärer Erreger und werden von zytotoxischen T-Lymphozyten (cytotoxic T lymphocytes, CTL) erkannt. Sie dienen außerdem als körpereigener Identitätsnachweis der Zelle. MHC II Moleküle werden dagegen hauptsächlich auf der Oberfläche von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC, *Antigen Presenting Cell*) exprimiert und präsentieren phagozytierte Proteine extrazellulärer Herkunft. Als Ausnahme findet die so genannte Kreuzpräsentation (*cross-presentation*) statt, wobei extrazelluläre Proteine durch rezeptorvermittelte Endo- oder Makropinocytose aufgenommen werden und durch einen unbekanntem Mechanismus ins Zytoplasma transportiert werden. Dort werden sie von Proteasomen zu Peptiden prozessiert, mit Hilfe der TAP Transporter ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums transportiert und auf MHC I Moleküle geladen und präsentiert (Bevan *et al.*, 1976). Dies ermöglicht der professionellen APC, phagozytierte Antigene aus der Körperperipherie oder Antigene von Viren, die keine APC infizieren, zu präsentieren (Sigal *et al.*, 1999). Diese Methode könnte beispielsweise bei viralen Infektionen mit strengem Organotropismus ein entscheidender Vorteil sein (Kurts *et al.*, 2000).

Zytotoxische T-Zellen exprimieren auf der Zelloberfläche den Ko-Rezeptor CD8. Eine wichtige Aufgabe aktivierter CD8⁺T-Lymphozyten besteht in der Erkennung und Eliminierung virusinfizierter Zellen, welche an ihrer Oberfläche virale Peptide mittels MHC I-Proteinen präsentieren. Neben ihrer zytotoxischen Funktion haben CD8⁺T-Zellen durch die Freisetzung verschiedener Zytokine und Chemokine auch einen regulativen Charakter. Zytotoxische T-Zellen exprimieren Interferon- γ (IFN- γ), in geringerem Umfang auch den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) sowie eine Reihe sog. Chemokine wie Makrophagen Inhibierendes Protein (MIP)-1 α , MIP-1 β oder RANTES (Wagner *et al.* 1998; Price *et al.*, 1999). Über einen indirekten Mechanismus kann IFN- γ die Vermehrung von Pathogenen inhibieren, indem es die Expression von MHC I stimuliert (Fruh *et al.*, 1999), Makrophagen aktiviert (Portnoy *et al.*, 1989) oder die Replikation des Pathogens wie z.B. HBV inhibiert (Gregory *et al.*, 1993; Guidotti *et al.*, 1994).

MHC Klasse II-Moleküle, welche von T-Helferzellen erkannt werden, sind auf Antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie B-Lymphozyten, Dendritischen Zellen und Makrophagen zu finden. T-Helferzellen sind durch die Expression des Glykoproteins CD4 charakterisiert. Aktivierte CD4⁺T-Lymphozyten üben drei verschiedene Funktionen aus: Sie aktivieren B-Zellen, unterstützen CD8⁺ T-Zellen in ihrer Funktion

und sezernieren zudem verschiedene Zytokine, welche wichtige immunmodulatorische Eigenschaften haben.

Die antigenspezifische Immunantwort der T-Helferzellen (Th-Zellen) wird in zwei Typen, Typ 1 (Th1) und Typ 2 (Th2), eingeteilt. Diese Th-Zell-Typen unterscheiden sich voneinander in ihrer Effektorfunktion und der Sekretion von Zytokinen (Mosmann *et al.*, 1989; Seder *et al.*, 1994). Th1-Zellen sezernieren Zytokine wie IFN- γ und Interleukin (IL-) 2. Th2-Zellen produzieren IL-4, -5, -10 und -13 und sind auf die Aktivierung von B-Zellen spezialisiert. Eine Th1-dominierte Immunantwort wird vor allem bei einer Infektion mit Viren oder intrazellulären Bakterien beobachtet. Auch durch DNA-Vakzinierung wird vorzugsweise eine Th1-Antwort induziert (Li *et al.*, 1998). Bei einer parasitären oder extrazellulären bakteriellen Infektion ist eine Th2-Immunantwort dominant.

Die NK-T-Zellen unterscheiden sich von konventionellen T-Zellen durch die Expression einer invarianten V α -Kette (V α 14, J α 281 in der Maus) sowie von natürlichen Killerzellmarkern wie NK1.1 und CD49b. Die meisten NK-T-Zellen erkennen Glykolipide, welche von CD1d präsentiert werden. NK-T-Zellen können sowohl thymusabhängig wie auch thymusunabhängig entstehen und synthetisieren charakteristischerweise früh IL-4 und IFN- γ nach Aktivierung. NK-T-Zellen sind in vielen Tiermodellen im wesentlichen protektiv. Der endogene Ligand dieser Zellen ist jedoch unbekannt (Taniguchi *et al* 2003).

T-Zellen können auch regulatorische Funktionen in der adaptiven Immunantwort ausüben, weshalb eine Subpopulation der T-Zellen als regulatorische T-Zellen (Treg) definiert wurde. Sie wurden Mitte der 1990er erstmals beschrieben und sollen ebenfalls Toleranz vermitteln. Die Mechanismen der Toleranzvermittlung sind noch nicht vollständig aufgeklärt, die Treg-Zellen scheinen aber von enormer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz zu sein. Diese Zellen exprimieren entweder CD4 oder CD8 und werden grundsätzlich durch die Expression verschiedener Oberflächenmarker wie CD25, CD45 und FoxP3 unterschieden. CD4 ist allerdings auch auf T-Helferzellen zu finden und CD25 findet sich auch auf der Oberfläche anderer T-Zellen, nach deren Aktivierung im Rahmen einer Immunantwort. Deshalb werden Treg-Zellen heute über die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 (*Forkhead box protein 3*) identifiziert. Man fasst heute die CD4⁺CD25⁺Treg-Zellen als eine Untergruppe der Treg-Zellen auf. Die CD4⁺CD25⁺Treg-Zellen scheinen nach

antigenspezifischer Aktivierung CD4⁺ (Th) und CD8⁺ (CTL)-Zellen über Zellkontakt zu hemmen. Bei den übrigen Treg-Zellen scheint der Hemmmechanismus ohne Zellkontakt, sondern durch Sekretion von Zytokinen (IL-10, TGF- β) zu funktionieren. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass sie an der inhibitorischen Regulation von immunpathologischen Effekten beteiligt sind (Suvas *et al.*, 2004).

1.5.2 Die zelluläre Immunantwort gegen Hepadnaviren

In der Pathogenese einer hepadnaviralen Infektion ist die zelluläre Immunantwort von zentraler Bedeutung. HBV ist während der Replikation und bei der Freisetzung für infizierte Hepatozyten nicht direkt zytotoxisch. In HBV-transgenen Mausmodellen wurde gezeigt, dass die Genprodukte von HBV sowie die eigentliche Virusreplikation nicht direkt zytopathisch für die Hepatozyten waren (Araki *et al.*, 1989; Farza *et al.*, 1988). Chronische Virusträger wiesen trotz einer hohen Replikation des Virus in Hepatozyten einen asymptomatischen Krankheitsverlauf mit minimalen Leberschäden auf (de Franchis *et al.*, 1993). Als Ursache für die hepatozelluläre Schädigung wird die zelluläre Immunantwort des Wirtes gegen virale Antigene, welche auf infizierten Hepatozyten präsentiert werden, angesehen (Chisari *et al.*, 1997). Die Stärke und Spezifität der T-Zellantwort in der Leber und im peripheren Blut chronischer Virusträger unterscheidet sich dabei grundlegend von den Verhältnissen während und nach einer akuten selbstlimitierenden HBV-Infektion. Sowohl die MHC II- als auch die MHC I-restringierte T-Zellantwort spielen dabei eine Rolle (Abb. 1.6).

Die MHC II-restringierte T-Zellantwort (T-Helferzellen):

Für eine akute, selbstlimitierende HBV-Infektion ist eine starke und multispezifische MHC II-restringierte Immunantwort gegen virale Antigene kennzeichnend. Die T-Zellantwort richtet sich dabei vorwiegend gegen die Kapsidproteine (HBcAg und HBsAg). Die gegen HBsAg gerichtete T-Helferzellantwort ist deutlich schwächer ausgeprägt (Ferrari *et al.*, 1990; Jung *et al.*, 1991). Es wird vermutet, dass die T-Zellantwort gegen die Hüllproteine bereits sehr früh im Verlauf der Infektion, möglicherweise bereits in der präklinischen Phase, auftritt und nachfolgend durch hohe Konzentrationen an replizierendem Virus bzw. gebildetem HBsAg unterdrückt wird (Vento *et al.*, 1987).

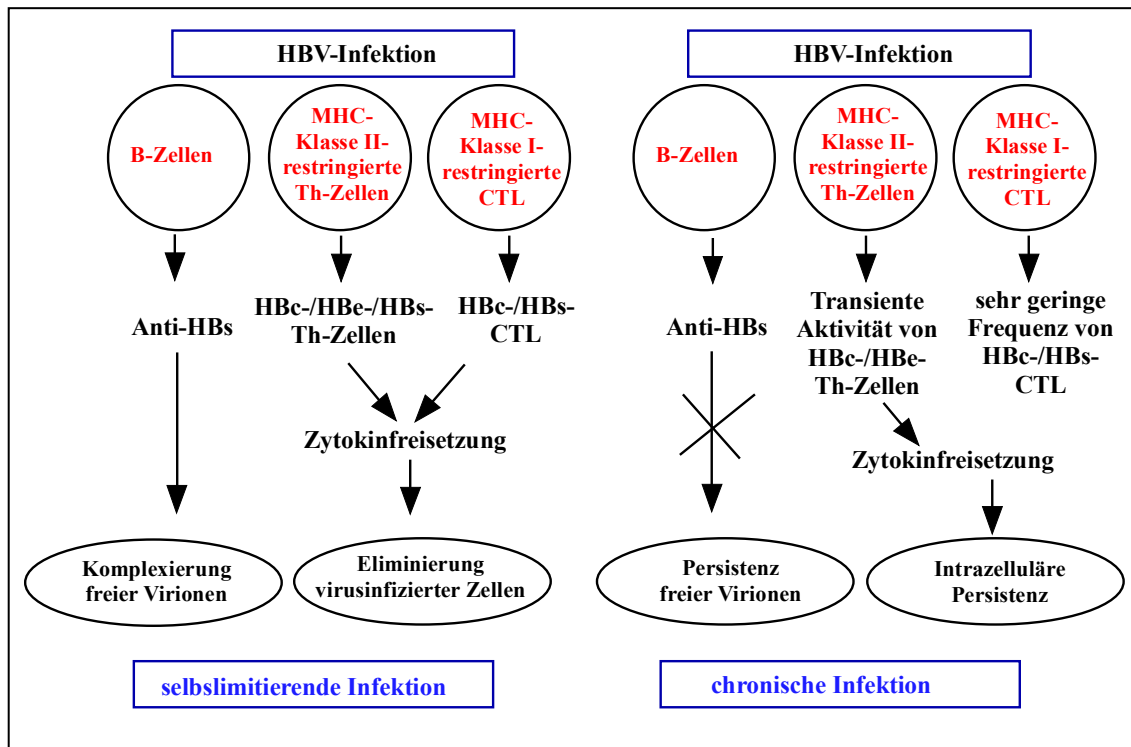


Abb. 1.6: Zelluläre und humorale Immunantwort bei selbstlimitierendem und chronischem Verlauf einer HBV-Infektion. (Grafik modifiziert nach Michel *et al.*, 2001)

Unter den verschiedenen für HBcAg identifizierten Epitopen induziert bei einer akuten Infektion vor allem das HBcAg-Epitop 50-69 bei einer Vielzahl von Patienten, unabhängig von deren MHC-Typ, eine spezifische T-Helferzellantwort. Da dies bei chronischen Virusträgern nicht der Fall ist, wird für dieses Epitop ein kausaler Zusammenhang zwischen Virus-Eliminierung und T-Zellantwort vermutet (Ferrari *et al.*, 1986; Ferrari *et al.*, 1990; Jung *et al.*, 1991). Bei einer chronischen Infektion hingegen ist eine zelluläre Immunantwort gegen dieses Peptid nicht nachweisbar (Menne *et al.*, 1997). Die MHC II-restringierte T-Zellantwort ist insbesondere in der Frühphase der Infektion von Bedeutung. In einer Studie mit einer begrenzten Anzahl von Patienten wurde während der Inkubationszeit eine CD4+T-Zell Antwort detektiert (Webster *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu wurde in Depletionsexperimenten an Schimpansen gezeigt, dass CD4+T-Lymphozyten sechs Wochen nach der Infektion keinen Einfluss mehr auf den Infektionsverlauf haben (Thimme *et al.*, 2003).

Die MHC I-restringierte T-Zellantwort (Zytotoxische T-Lymphozyten):

HBV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) sind verantwortlich für die Reduktion der Viruslast im infizierten Gewebe. Die CD8+ T-Zellen sind wesentlich an der Viruskontrolle beteiligt. Diese erkennen die auf den MHC-I Molekülen der

Hepatozyten präsentierten HBV-Proteine. In Patienten mit einer akuten, selbst-limitierenden Infektion wurden starke polyklonale CTL-Antworten gegen eine Vielzahl von Epitopen des Hüllproteins, des Nukleokapsidproteins und der Polymerase detektiert. Einige dieser CTL-Epitope, insbesondere HBcAg 18-27, HBsAg 183-191 und HBsAg 250-258, werden von der Mehrheit der infizierten Patienten mit HLA-A2 Restriktion erkannt, während andere Epitope nur bei wenigen Patienten eine Immunantwort hervorrufen. Daher kann für HBV eine Hierarchie der CTL-Antwort gegen die viralen Proteine vermutet werden (Penna *et al.*, 1991; Nayersina *et al.*, 1993). Eine chronische Infektion hingegen ist durch eine schwache oder nicht nachweisbare CTL-Antwort gegen alle viralen Antigene im peripheren Blut gekennzeichnet (Rehermann *et al.*, 1996). In der Leber chronischer Virusträger wurde jedoch eine geringe Anzahl HBcAg-spezifischer CTL detektiert (Barnaba *et al.*, 1989). Für die Eliminierung von HBV wird virusspezifischen CD8⁺T-Zellen eine doppelte antivirale Funktion zugeordnet: In der Anfangsphase der Infektion werden Zytokine wie IFN- γ und TNF- α freigesetzt, welche die virale Genexpression und Replikation vollständig inhibieren. Die Eliminierung des Virus aus dem Organismus erfolgt anschließend durch die Induktion der Apoptose der infizierten Zelle aufgrund der zytotoxischen Aktivität der CD8⁺T-Zellen. So wurde der Zytokin-vermittelte inhibitorische Effekt von CTL auf die Virusreplikation nach adoptivem Immuntransfer im HBV-transgenen Mausmodell nachgewiesen (Guidotti *et al.*, 1994). Verantwortlich für den antiviralen Effekt waren hier IFN γ und TNF α , da durch die Gabe von Antikörpern gegen diese Zytokine die Viruseliminierung gehemmt wurde. In HBV-infizierten Schimpansen wurde eine intrahepatische IFN γ -Produktion in Zusammenhang mit der Eliminierung des Virus gezeigt (Thimme *et al.*, 2003). Der zytotoxische Schritt der Viruseliminierung wurde ebenfalls im Mausmodell demonstriert: Der Transfer HBsAg-spezifischer CTL-Klone in HBsAg-positive transgene Mäuse hatte die Entwicklung einer nekroinflammatorischen Leberschädigung zur Folge (Moriyama *et al.*, 1990). In Experimenten an HBV infizierten Schimpansen wurde gezeigt, dass die Eliminierung des Virus durch CD8⁺T-Zellen mit einer deutlichen Reduktion der Anzahl infizierter Hepatozyten einherging. Eine anhaltende Leberzellschädigung wurde biochemisch durch den Anstieg der Lebertransaminaseaktivität im Blut nachgewiesen (Thimme *et al.*, 2003).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war, ein Maus-Modell zu etablieren, um den Verlauf der akuten Hepatitis B in erwachsenen, vollständig immunkompetenten Tieren zu studieren. Das HBV-Genom wurde mittels adenoviraler Vektoren - d.h., unabhängig von hepadnaviralen Rezeptoren- in die Mausleber transferiert. Der adenovirus-vermittelte Transfer von HBV Genomen erlaubte mit hoher Reproduzierbarkeit und sehr effizient die gezielte Etablierung einer HBV-Replikation in der Maus zu einem gewünschten Zeitpunkt. Er wurde daher dazu genutzt, ein Infektions- und Krankheitsmodell der HBV-Infektion zu etablieren, und Faktoren zu analysieren, die den Verlauf beeinflussen.

Diese Arbeit konzentrierte sich auf folgende Punkte:

1. Charakterisierung des AdHBV Maus-Modells als Krankheitsmodell der akuten Hepatitis B.

Für die Charakterisierung des AdHBV Maus-Modells wurden zwei Vektoren verwendet:

- Ad-HBV (enthält ein 1,3-faches Überlängen-Genom des HBV)
- Ad-HBV-k/o (enthält ein 1,3-faches Überlängen-Genom des HBV, in dem alle HBV-Gene ausgeschaltet sind; dient als Kontrollvektor)

Diese zwei Vektoren (Ad-HBV und Ad-HBV-k/o) wurden vergleichend in der C57Bl/6 Maus untersucht. Je drei bis vier Tiere pro Gruppe wurden in einer Zeitkinetik nach der Injektion untersucht. Es wurden Grad der Leberentzündung anhand der Lebertransaminasenaktivität im Blut, die Antigenämie (HBeAg/HBsAg) und die Anti-HBs Antikörper im Serum gemessen. Lebergewebe wurde histopathologisch befundet und das Ausmaß der hepatozellulären Schädigung quantifiziert. Die Höhe und Dauer der HBV-Replikation wurde durch Bestimmung der Virämie mittels quantitativer PCR, sowie replikativer HBV-Intermediate in der Leber mittels Southern- und Northern-Blot Analyse untersucht. Mittels quantitativer PCR wurden außerdem Immunmarker wie CD4, CD8 und NK1.1 und die Sekretion von Zytokinen wie IFN- γ , IL-10, TGF- β und TNF- α bestimmt.

2. Charakterisierung der zellulären Immunantwort gegen HBV.

Die Ad-HBV-Infektion stellt ein sehr gutes Modell dar, um zu überprüfen, welche Bedeutung eine T-Zell-Antwort für die Kontrolle der HBV Replikation hat, da die Tiere im Gegensatz zu HBV-transgenen Mäusen nicht tolerant gegenüber HBV-Proteinen sind. In diesem Modell wurde untersucht, inwieweit eine effiziente T-Zell-Antwort induziert wurde, welche Zellen des Immunsystems (NK-oder T-Zellen) für den Leberschaden verantwortlich sind, und ob HBV-spezifische T-Zellen die Virus-Replikation kontrollieren bzw. infizierte Hepatozyten eliminieren.

Um herauszufinden, welche Zellen für die Entstehung einer Hepatitis verantwortlich sind, wurden zwei verschiedene Mausstämme nach einer Ad-HBV Infektion untersucht. Zum einen im immunkompetenten Maus-Stamm C57Bl/6 und zum anderen im CD1-knockout (k/o) Maus-Stamm. Diese Tiere wurden mit Ad-HBV injiziert und bei einer Subgruppe mittels blockierenden Antikörpers die CD8⁺ T-Zellen inaktiviert. In einer Zeitkinetik wurde anschließend der Krankheitsverlauf und die Immunantwort analysiert.

3. HBV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort.

Um zu erfahren, ob und in welcher Intensität in diesem Modell eine HBV-spezifische T-Zellantwort induziert wird, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Ad-HBV Infektion HBV-spezifische CD8⁺ T-Zellen analysiert. Hierzu wurden murine Milz und Leber-assoziierte Lymphozyten (LAL) isoliert und nach einer Stimulation mit spezifischen HBV-Peptiden, mittels Durchflusszytometrie untersucht. Weiterhin wurde auch der Nachweis erbracht, dass die Immunantwort wirklich HBV- und nicht Adenovirus-spezifisch ist.

2 Ergebnisse

2.1 Charakterisierung des Ad-HBV Maus-Modells als Krankheitsmodell der akuten Hepatitis B

Der HBV-Genomtransfer mittels adenoviraler Vektoren (Ren und Nassal, 2001; Sprinzl *et al.*, 2001) ist ein vielversprechendes Werkzeug, um den Einfluss von Wirtsfaktoren auf die HBV-Replikation zu untersuchen. Die adenoviralen Vektoren erlauben, eine definierte Menge an HBV-Genomen episomal in ein breites Spektrum von Zellen einzubringen, und ermöglichen *in vivo* einen effizienten und reproduzierbaren Gentransfer in die Leber von Versuchstieren (Sprinzl *et al.*, 2001; Isogawa *et al.*, 2005). Zur Etablierung eines Tiermodells der akuten Hepatitis B wurden die HBV-Genome mittels adenoviraler Vektoren- d.h. unabhängig vom hepadnaviralen Rezeptoren-effizient in die Mausleber transferiert. Es wurde gezeigt, dass sowohl DHBV-Genome als auch HBV-Genome mithilfe dieser Vektoren *in vivo* in die Maus-Hepatozyten transferiert werden können, wo sie effizient replizieren und die Bildung von Anti-HBs Antikörpern als Zeichen für eine HBV-spezifische Immunantwort bewirken (Sprinzl *et al.*, 2001; Oberwinkler *et al.*, 2005).

Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage zur Etablierung eines Krankheitsmodells der akuten Hepatitis B im Kleintiermodell.

2.1.1 Adenovirale Vektoren für den hepadnaviralen Genomtransfer

Für diese Arbeit wurden adenovirale Vektoren der ersten Generation verwendet, welche 1,3-fache Überlängengenome des HBV enthalten (Abb. 2.1). Diese Genome replizieren HBV leberspezifisch (Guidotti *et al.*, 1995, Sprinzl *et al.*, 2001). Zur Herstellung dieser Vektoren wurde das Gateway Rekombinationssystem etabliert, das sich eine auf Phagen-Enzymen basierende Rekombination zu Nutze macht. Hierbei findet ein sog. Entry-Plasmid Verwendung, in das das Transgen inseriert wird, sowie ein modifiziertes adenovirales Empfänger-Genom, in welchem neben der adenoviralen E1 auch die E3 Region deletiert ist (Abb. 2.1). Da der Adenovirus Typ 5 die Mäuse nicht infiziert, und der Vektor replikationsdefizient ist, geht man davon aus, dass keine adenoviralen Proteine exprimiert werden. Eine Vermehrung dieser Virenpartikel kann daher nur in einer zellulären Umgebung erfolgen, welche die fehlenden genetischen Informationen komplementiert. Diese Voraussetzung ist in der Zelllinie-293 gegeben.

Für die Charakterisierung des Ad-HBV Maus-Modells wurden zwei Vektoren verwendet: Der Ad-HBV Vektor enthält ein 1,3-faches Überlängen-Genom des HBV und wurde dazu genutzt, die akute, selbstlimitierende Hepatitis in diesem Mausmodell zu imitieren.

Der Ad-HBV-k/o Vektor enthält ein 1,3-faches Überlängen-Genom des HBV, in dem alle HBV-Gene ausgeschaltet sind und diente als Kontrollvektor. Dieser Vektor wurde ausserdem dazu genutzt, mögliche Effekte des adenoviralen Genomtransfers zu untersuchen.

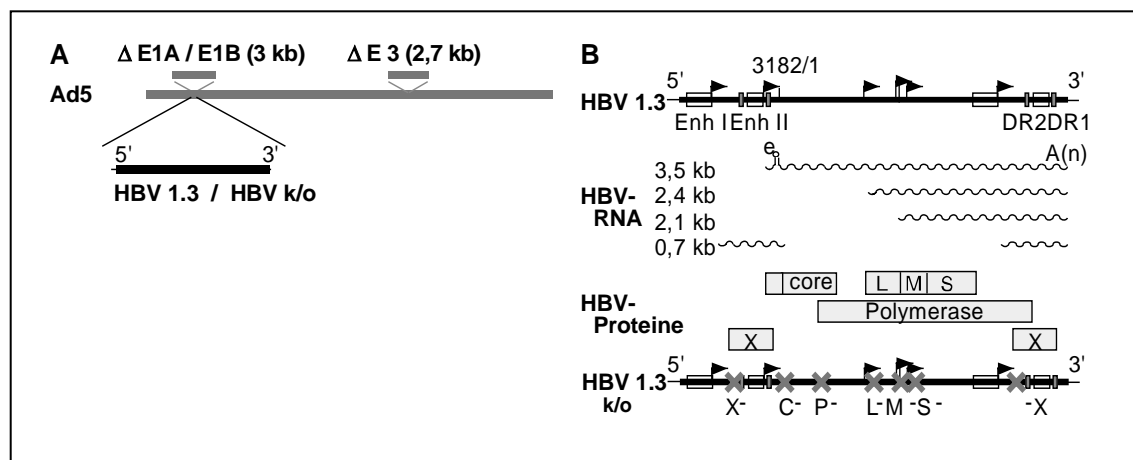


Abb. 2.1: Adenovirale Konstrukte

A) Die entsprechenden 1,3-fachen Überlängen-Genome des HBV wurden in die Region E1A/E1B eines adenoviralen (Ad5) Vektors eingesetzt, wobei neben der adenoviralen E1 auch die E3 Region deletiert wurde. B) Schematische Darstellung eines HBV 1,3-fachen Überlängen-Genoms. Das HBV Genom besteht aus mehrfach überlappenden Leserastern (preC/C, preS/S, P, X). Auf die HBV-Promotoren wirken zwei Verstärkungselemente - Enh 1 und Enh 2. Beginnend von diesen Promotoren endet die Transkription der mRNAs immer am einzigen vorhandenen Polyadenylierungssignal, was zur Synthese der verschiedenen subgenomischen RNAs führt. Im Kontrollkonstrukt HBV 1.3 k/o wurden alle offenen Leseraster ausgeschaltet.

2.1.2 Optimierung der Effizienz des HBV-Genomtransfers

Um den Verlauf der HBV-Replikation in der Maus zu untersuchen, wurde in Vorexperimenten die Herstellung und Aufreinigung hochtitriger adenoviraler Vektorstocks und die intravenöse (*i.v.*) Injektion der Vektoren in die Maus etabliert (Sprinzl *et al.*, 2001; Sprinzl *et al.*, 2004; Oberwinkler *et al.*, 2005). Ebenso wurde die Dosis der adenoviralen Vektoren hinsichtlich einer guten Verträglichkeit und geringer Toxizität optimiert. Diese Vorexperimente wurden von Heike Oberwinkler durchgeführt. Mithilfe eines dritten adenoviralen Vektors Ad-HBV-GFP, der zusätzlich zu dem 1,3-fachen HBV-Überlängen-Genom eine GFP-Expressionskassette enthält, wurde die Effizienz des HBV-Genomtransfers untersucht. Hierfür wurden drei 12 Wochen alte C57Bl/6 Mäuse

mit unterschiedlichen Mengen an Ad-HBV-GFP Virus, 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 und 2×10^9 infection units (i.u.) *i.v.* injiziert und nach sieben Tagen geopfert. Nach der Transduktion wurde der prozentuale Anteil an GFP-positiven Hepatozyten mittels Immunfluoreszenz bestimmt. Die Effizienz des adenoviralen Transfers wurde im Lebergewebe über Menge an adenoviraler (Ad)-DNA mittels PCR nachgewiesen. Außerdem wurde mittels Western-Blot Analyse die Menge an HBV-Kapsid (core) Proteinen bestimmt. Um den Verlauf der Erkrankung zu analysieren, wurden HBe-Ag, HBs-Ag sowie die Transaminasenaktivität im Serum der Mäuse bestimmt.

Die Injektionsdosis 2×10^8 i.u. ergab mehr als 1% GFP-positiver Hepatozyten. Bei diesen Tieren wurden sehr geringe Mengen an Ad-DNA und Kapsid (core)-Protein im Lebergewebe und HBe-/HBs-Ag im Serum nachgewiesen. Mit der Dosis 5×10^8 wurden zwischen 5-10%, mit 1×10^9 80-90% und mit 2×10^9 um die 95% GFP-positiver Zellen nachgewiesen (Abb. 2.2 A). Bei diesen Dosierungen konnten ebenfalls Ad-DNA und Kapsid (core)-Proteine im Lebergewebe nachgewiesen werden. Außerdem wurde bei der Injektion von 1×10^9 und 2×10^9 ein 2- bis 3-facher Anstieg der Lebertransaminasenaktivität und eine erhöhte Sekretion der viralen Antigene im Serum beobachtet (Abb. 2.2 B).

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die adenoviralen Vektoren einen Dosis-abhängigen Transfer der HBV-Genome erlauben und sich gut für das Studium der HBV-Infektion eignen. Die Injektionsdosis von 1×10^9 i.u. Ad-HBV-GFP wurde als die optimale Dosis für die *i.v.* Injektion festgelegt, da sie es ermöglicht, 80-90% der Hepatozyten einer Maus bei geringen Nebenwirkungen zu transduzieren und eine HBV-Replikation zu etablieren. In allen weiterfolgenden Experimenten wurde diese Dosis für die *i.v.* Injektion der adenoviraler Vektoren benutzt.

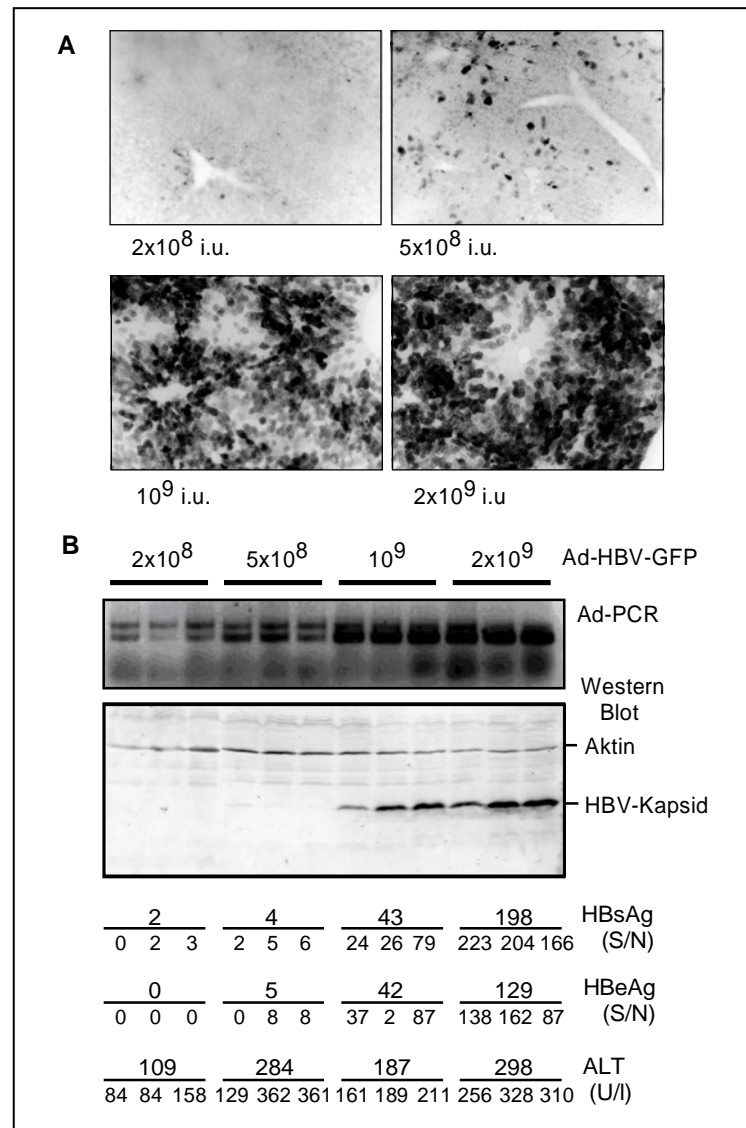


Abb. 2.2: Optimierung der adenoviralen *i.v.* Injektionsdosis

A) Immunhistochemische Untersuchung der GFP-positiven Hepatozyten im Lebergewebe von Ad-HBV-GFP transduzierten Mäusen (200-fache Vergrößerung). B) Nachweis der Ad-DNA und HBV-Kapsid Proteinen im Lebergewebe von Ad-HBV-GFP transduzierten Tieren. Nachweis der Sekretion der viralen Antigene (HBe-Ag, HBs-Ag) und Lebertransaminasen (ALT) wurde im Serum überprüft.

2.1.3 Verlauf und Charakterisierung der akuten HBV-Infektion in C57Bl/6

Mäusen nach Ad-HBV Injektion

Der Ad-HBV Transfer wurde in gesunden, adulten, vollständig immunkompetenten C57Bl/6 Mäusen durchgeführt. Die beiden Vektoren Ad-HBV und Ad-HBV-k/o wurden in diesen Tieren vergleichend untersucht. Hierzu wurden je 3-4 Tiere pro Inokulum und Zeitpunkt *i.v.* in die Schwanzvene mit 1×10^9 i.u. injiziert und in einer Zeitkinetik am Tag 3, 6, 8, 10, 14, 24, 34, 44, 57, 86 und 100 nach der Injektion geopfert und analysiert. Außerdem wurden am Tag 76 die Tiere betäubt und geblutet,

um die Antigenämie und die Leberentzündung im Verlauf dieser Zeitkinetik zu verfolgen. Zusätzlich wurden vier unbehandelte C57Bl/6 Mäuse als Tag Null-Kontrolle geopfert, um einen besseren Vergleich zwischen einer uninfizierten und Ad-HBV bzw. Ad-HBV-k/o infizierten Maus zu haben.

Um den Verlauf und die Pathogenese der Erkrankung in diesem Modell zu untersuchen, wurde im Serum der Grad der Leberentzündung mittels Messung der Lebertransaminasenaktivität im Blut bestimmt. Anschließend wurde das Lebergewebe histopathologisch untersucht und das Ausmaß der hepatozellulären Schädigung quantifiziert. Immunhistochemische Untersuchungen dienten dem Nachweis von HBV-Kapsid-(core)-Antigen (HBcAg) im Lebergewebe.

Die Höhe und Dauer der HBV-Replikation wurde durch Bestimmung der Antigenämie (HBeAg und HBsAg) und der Produktion der Anti-HBs-Antikörper nachgewiesen. Mittels quantitativer PCR wurden zum einen die Virämie und zum anderen die Ad-DNA im Lebergewebe als Marker für die Effizienz des Leber-Targetings gemessen. Außerdem wurden die replikativen HBV-Intermediate in der Leber mittels Northern- und Southern-Blot Analyse untersucht. Um die Induktion der T-Zellantwort nach der Injektion der adenoviraler Vektoren zu bestimmen, wurden ebenso Immunmarker wie CD4, CD8 und NK1.1 und die Expression von mehreren Zytokinen, wie IFN- γ , IL-10 und TNF- α bestimmt.

2.1.4 Verlauf und Pathogenese der akuten HBV-Infektion im Ad-HBV Maus-Modell

2.1.4.1 Verlauf der Leberentzündung

Alaninaminotransferase (ALT) ist ein nur in Leberzellen vorkommendes Enzym, welches von apoptotischen Hepatozyten ins Blut abgegeben wird. Seine Konzentration im Blut ist somit ein hochspezifischer Marker für Leberzellschädigung (Chisari *et al.*, 1989). Die Bestimmung der Transaminasenaktivität im Blut wurde verwendet, um den Grad der Leberentzündung zum jeweiligen Zeitpunkt nach der Injektion zu bestimmen. Die Ad-HBV transduzierten Tiere zeigten am Tag 6 eine ausgeprägte Leberentzündung, die bis zum Tag 24 wieder zurückging. Es wurde ein zweiphasiger Kurs des Leberschadens in den Tieren beobachtet, die mit Ad-HBV transduziert wurden, mit einem zweiten Transaminasen-Anstieg um Tag 70 nach der Injektion (Abb. 2.3).

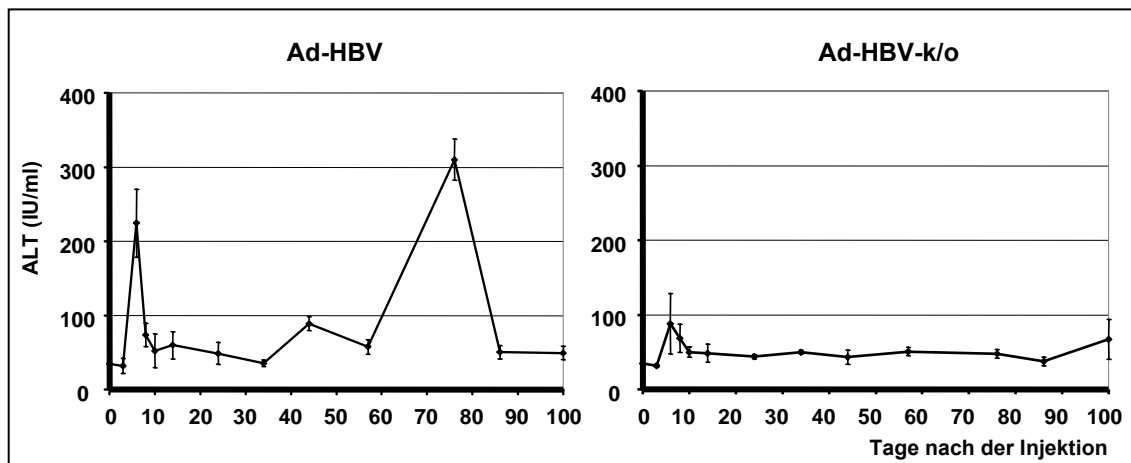


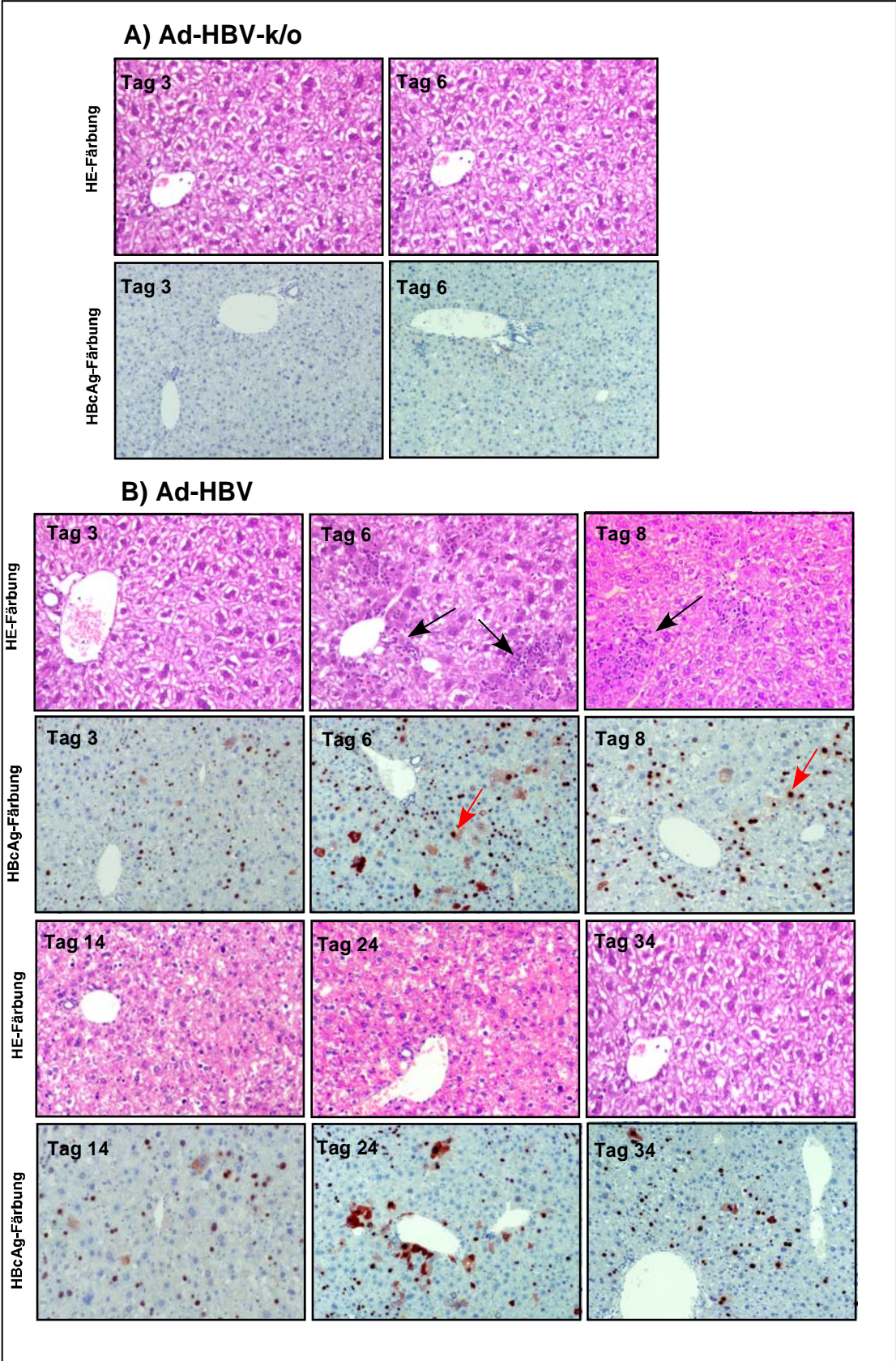
Abb. 2.3: Zeitverlauf der Leberentzündung nach HBV-Genomtransfer

Je 3-4 Tiere pro Gruppe wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV (links) oder Ad-HBV-k/o (rechts) injiziert. In einer Zeitkinetik wurde die Leberentzündung durch die Messung von ALT bestimmt.

Die Ad-HBV-k/o transduzierten Mäuse zeigten nur eine sehr geringe Leberentzündung mit leichtem ALT-Anstieg am Tag 6 (Abb. 2.3).

2.1.4.2 Histopathologie

Unmittelbar nach der Entnahme der Mausleber wurde ein Teil des Gewebes in 4 % gepuffertem Formalin aufbewahrt. Die fixierten Stücke wurden entwässert und in Paraffin eingebettet. Alle histopathologischen (Hämatoxylin-Eosin (HE-) Färbungen) und immunohistochemischen (HBcAg (HBV-Kapsid-(core)-Protein)-Färbungen) Untersuchungen wurden am Institut für Pathologie in Kooperation mit Dr. Uta Drebber durchgeführt. Durch die HE-Färbung gelingt eine gute Darstellung des Gewebes, wobei Zellkerne blau-violett und Zytoplasma rosa erscheinen. Histologisch ist die akute Hepatitis durch Einzelzellnekrosen (sog. *Councilman-Bodies*) gekennzeichnet, die sich bei der Hepatitis B überwiegend läppchenzentral finden. Man kann z.B. Ödeme der Portalfelder, portale Infiltrate durch Lymphozyten, Histiozyten und Plasmazellen identifizieren. Außerdem kommt es zu einer Vermehrung und Aktivierung der Kupfferschen Sternzellen, die die nekrotischen Hepatozyten entfernen.



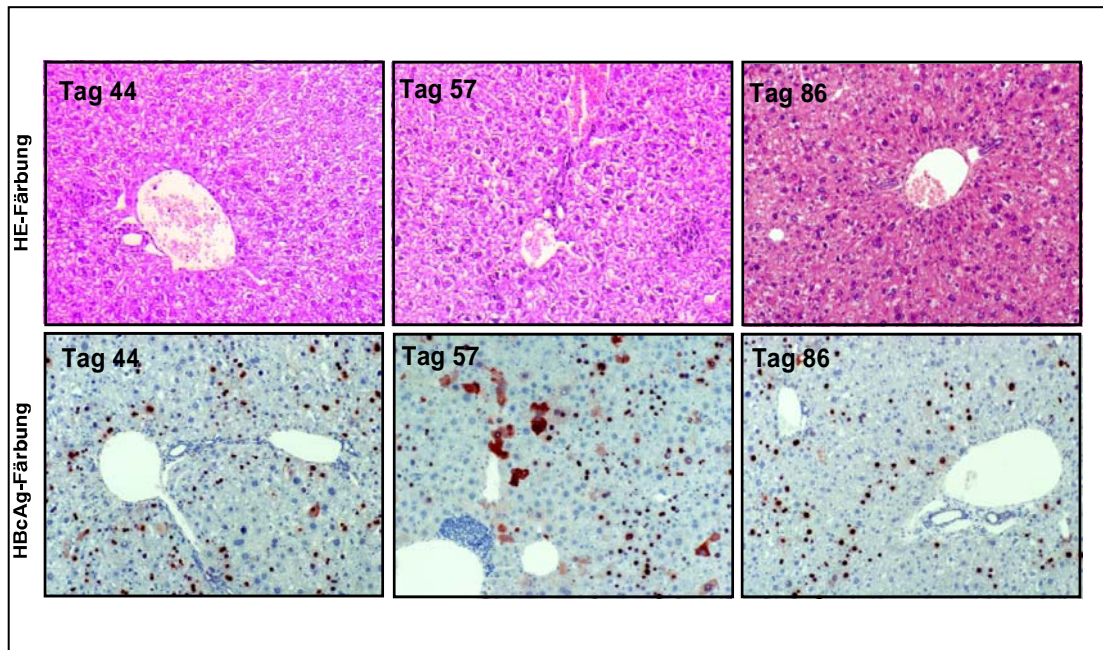


Abb. 2.4: HE- und HBcAg-Färbung von Lebergewebe nach HBV-Genomtransfer.

Das Lebergewebe wurde in einer Zeikinetik nach der adenoviralen Injektion mittels HE-Färbung und HBcAg-Färbung untersucht. A) Gezeigt sind Gewebeschnitte von Ad-HBV-k/o transduzierten Kontroll-Mäusen am Tag 3 und Tag 6 (200-fache Vergrößerung) B) Gezeigt sind Gewebeschnitte von Ad-HBV transduzierten Mäusen in einer Zeitkinetik am Tag 3, 6, 8, 14, 24, 34, 44, 57 und 86 nach der Injektion (100-fache Vergrößerung). Die schwarzen Pfeile in der HE-Färbung markieren exemplarisch die lymphozytären Infiltrate im Lebergewebe der Ad-HBV injizierten Mäuse am Tag 6 und Tag 8. Die roten Pfeile in der HBcAg-Färbung markieren exemplarisch die positiv gefärbten HBcAg (HBV-Kapsid (core) Proteine) in der Leber der Ad-HBV transduzierten Tiere am Tag 6 und Tag 8.

Am Tag 3 nach Injektion waren im Lebergewebe der Ad-HBV transduzierten Mäuse keine Entzündungszeichen sichtbar (Abb. 2.4B und Tab. 1), obwohl 5 bis 10% der Hepatozyten positiv für HBcAg waren. Die histologisch akut hepatitischen Veränderungen mit ausgeprägten lymphozytären Infiltraten der Portalfelder zeigten sich bei den Ad-HBV-Tieren am deutlichsten am Tag 6, die mit einem 5-fachen Anstieg der Lebertransaminasenaktivität im Serum korrelierten (Abb.2.4B und Abb.2.3). Am Tag 6 waren in Ad-HBV transduzierten Mäusen 10 bis 20% der Hepatozyten positiv für HBcAg, während bei allen Ad-HBV-k/o Kontroll-Tieren die Hepatozyten für HBcAg negativ waren und die entzündlichen Veränderungen nur sehr gering am Tag 6 ausgeprägt waren (Abb.2.4A und Tab.1). Wie in der Abbildung 2.4B und Tabelle 1 gezeigt, wurde am Tag 8 nach der Ad-HBV Injektion im Lebergewebe noch eine milde Leberentzündung nachgewiesen, mit einzelnen sichtbaren lymphozytären Infiltraten. Am Tag 34 nach der Infektion war keine entzündliche Aktivität mehr nachzuweisen.

Tab. 1: Histopathologischer Befund von Lebergeweben der infizierten C57Bl/6 Mäuse

Zeitpunkt nach der Injektion	adenoviraler Vektor	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4
Tag 3	Ad-HBV	0	0	0	0
	Ad-HBV-k/o	0	0	0	0
Tag 6	Ad-HBV	+++	+++	+++	++
	Ad-HBV-k/o	+	++	0	+
Tag 8	Ad-HBV	+	+	0	+
	Ad-HBV-k/o	0	+	0	+
Tag 10	Ad-HBV	+	0	+	0
	Ad-HBV-k/o	0	0	+	0
Tag 14	Ad-HBV	+	0	+	<i>n.b.</i>
	Ad- HBV-k/o	0	0	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
Tag 24	Ad-HBV	+	+	0	<i>n.b.</i>
	Ad-HBV-k/o	0	0	0	<i>n.b.</i>
Tag 34	Ad-HBV	0	0	0	0
	Ad-HBV-k/o	0	0	0	0
Tag 44	Ad-HBV	+	+	0	<i>n.b.</i>
	Ad-HBV-k/o	0	0	0	<i>n.b.</i>
Tag 57	Ad-HBV	+	0	0	<i>n.b.</i>
	Ad-HBV-k/o	0	0	0	<i>n.b.</i>
Tag 86	Ad-HBV	+	+	0	<i>n.b.</i>
	Ad-HBV-k/o	0	0	0	<i>n.b.</i>
Tag 100	Ad-HBV	0	0	0	<i>n.b.</i>
	Ad-HBV-k/o	0	0	0	<i>n.b.</i>

n.b.: nicht bestimmt

Ausmaß der hepatozellulären Schädigung von **0** bis **+++** quantifiziert;

0: < 2; **+**: 2 bis 5; **++**: 6 bis 10; **+++**: > 10; Grad der nekroinflammatorischen Aktivität (100-fache Vergrößerung)

Zu späteren Zeitpunkten nach der Ad-HBV Injektion am Tag 44, Tag 57 und Tag 86 wurde bei einzelnen Tieren nur eine milde Leberentzündung festgestellt und am Tag 100 war gar keine Leberentzündung mehr sichtbar (Abb.2.4B und Tab.1). Am Tag 76 wurde ein zweiter Anstieg der Lebertransaminasen im Blut beobachtet (Abb. 2.3), zu diesem Zeitpunkt wurden die Tiere geblutet und nicht geopfert, daher konnte die Leberentzündung histopathologisch nicht bestätigt werden. Bis zum Tag 100 blieben ungefähr 5 bis 10 % der Hepatozyten positiv für das HBV-Kapsid-Protein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei Ad-HBV transduzierten Tieren histopathologisch die typischen Zeichen einer akuten Hepatitis ausgeprägt waren, während Ad-HBV-k/o Kontroll-Tiere nur milden Leberschaden zeigten.

2.1.5 Verlauf der HBV-Replikation

2.1.5.1 Dynamik der Antigenämie

HBeAg und HBsAg sind wichtige serologische Marker, die während einer akuten sowie chronischen HBV-Infektion nachweisbar sind (Takahashi *et al.*, 1976). Das Protein HBeAg wird während der HBV-Infektion ins Blut sekretiert (Milich *et al.*, 1990), und dient als Marker der aktiven viralen Replikation während der HBV-Infektion (Magnius und Espmark, 1972). Das HBsAg ist sowohl in den Dane-Partikeln also auch in den subviralen Partikeln enthalten und dient als Marker für eine anhaltende Virämie (Ganem und Prince, 2004). Anti-HBs sind die Antikörper gegen das HBsAg. Diese anti-HBs vermögen die Infektiosität von HBV *in vitro* zu neutralisieren und *in vivo* vor einer Infektion zu schützen. Anti-HBs Antikörper sind Zeichen einer Ausheilung. Man findet sie auch nach erfolgreicher Hepatitis B Impfung. Die Anti-HBs Antikörper gelten als Marker der Immunität gegen HBV.

Die Bestimmung von HBsAg, HBeAg und anti-HBs Antikörper wurde von Mitarbeitern des Instituts für Virologie der Universität zu Köln durchgeführt.

Die Mengen an HBe-Ag (ng/ml), HBsAg (S/N Ratio) und anti-HBs-Antikörper (IU/ml) wurde in den Seren der Mäuse in einer Zeitkinetik nach der Injektion gemessen. HBeAg und HBsAg wurden am Tag 3 und Tag 6 in allen mit Ad-HBV transduzierten Tieren nachgewiesen. HBe-Ag und HBsAg Werte fielen langsam von Tag 6 zum Tag 34 nach der Ad-HBV Infektion und blieben dann konstant. Am Tag 34 wurde die HBsAg/anti-HBs-Serokonversion beobachtet, indem anti-HBs Antikörper mit einem konstanten Anstieg der Werte nachweisbar wurden. In den Ad-HBV-k/o konnten weder HBe-Ag, HBs-Ag noch anti-HBs-Antikörper im Serum nachgewiesen werden (Abb. 2.5).

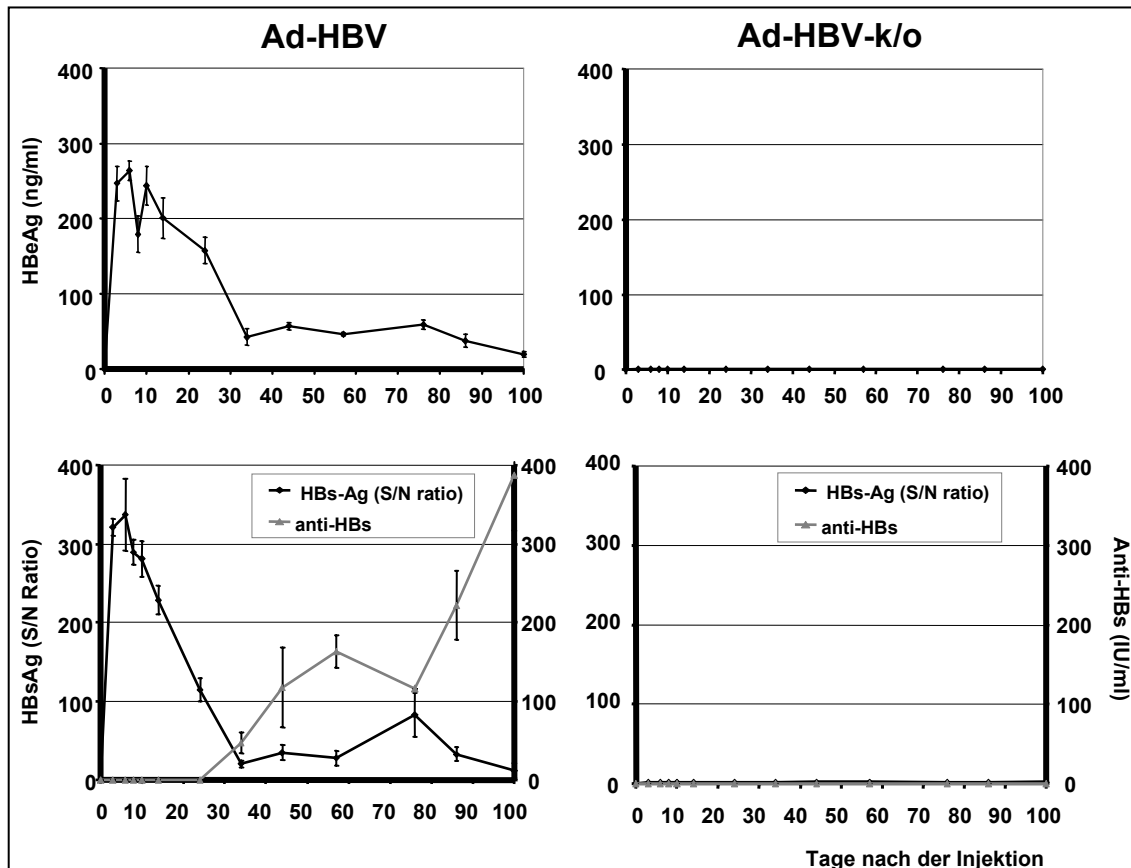


Abb. 2.5: Zeitverlauf der Antigenämie

Je 3-4 Tiere pro Gruppe wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV (links) oder Ad-HBV-k/o (rechts) injiziert. In einer Zeitkinetik wurde die Sekretion von HBe-/HBs-Ag und anti-HBs-Antikörpern im Serum der infizierten Tiere gemessen.

2.1.5.2 Dynamik der Virämie

Als weiterer Marker für den Verlauf der HBV-Infektion in diesem Mausmodell wurde die Virämie bestimmt. Hierfür wurde HBV-DNA aus dem Serum der Ad-HBV und Ad-HBV-k/o transduzierten Mäuse extrahiert. Die Menge an HBV-DNA wurde im Zeitverlauf mittels quantitativer PCR gemessen.

Bei den Ad-HBV transduzierten Tieren war zwischen Tag 3 und 6 eine deutliche HBV-Virämie nachweisbar (1×10^7 HBV-DNA Kopien/ml), die am Tag 8 in den Ad-HBV Tieren rasch auf Werte um 5×10^4 Kopien/ml abfiel und mit einem erneuten Anstieg (2×10^5 HBV-DNA Kopien/ml) am Tag 14 relativ konstant bis zum Tag 86 persistierte. In den Ad-HBV-k/o transduzierten Tieren wurden Werte um die Detektionsgrenze (1 Kopie/ μ l) gemessen und als negativ betrachtet (Abb. 2.6).

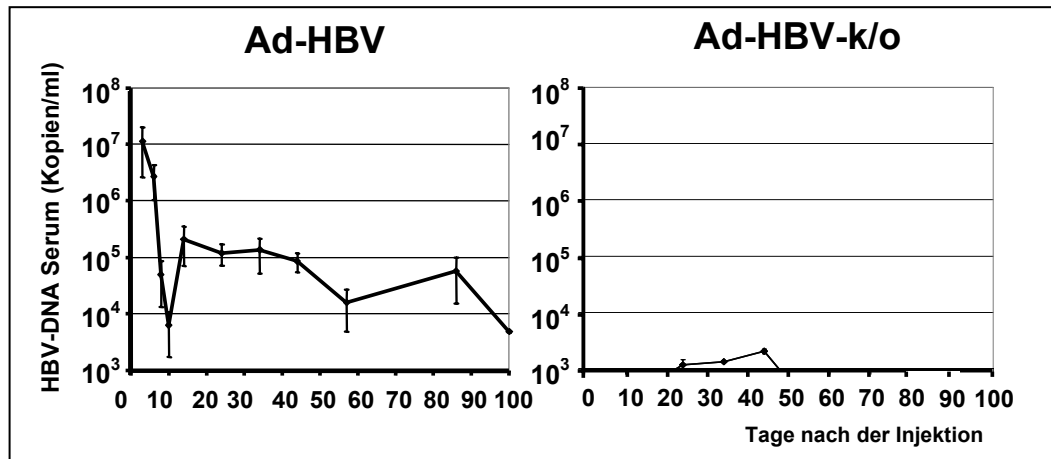


Abb. 2.6: Zeitverlauf der Virämie

Je 3-4 Tiere pro Gruppe wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV (links) oder Ad-HBV-k/o (rechts) injiziert. In einer Zeitkinetik wurde die HBV-DNA (Kopien/ml) im Serum der Mäuse gemessen.

2.1.5.3 Transkription der HBV-RNAs

Zum Nachweis der HBV-Transkription nach dem HBV-Genomtransfer wurde eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Aus dem Lebergewebe der mit Ad-HBV oder Ad-HBV-k/o transduzierten Mäuse wurde zum jeweiligen Zeitpunkt nach der Injektion die Gesamt-RNA extrahiert und 25 μ g der gepoolten Gesamt-RNA-Proben wurden auf ein 1%iges Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen. Nach Hybridisierung mit einer 32 P-radioaktiv markierten HBV-Sonde wurden die gleichmäßigen Beladungen durch eine zweite Hybridisierung mit einer 32 P-radioaktiv markierten-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Sonde überprüft und anschließend die relativen Mengen an HBV-RNA zu GAPDH-RNA quantifiziert.

Die Menge der HBV-Transkripte war am höchsten in Ad-HBV transduzierten Mäusen und am niedrigsten in Ad-HBV-k/o transduzierten Mäusen. Die Quantifizierung der prägenomischen (3,5 kb) und subgenomischen (2,1 kb) HBV-RNAs relativ zu GAPDH zeigte eine erhöhte Menge viraler Transkripte in der Leber der Ad-HBV transduzierten Mäuse am Tag 6 bzw. Tag 14 und Tag 34. Ab Tag 34 fielen die Mengen der prägenomischen und subgenomischen HBV-RNAs ab, waren aber bis zum Tag 100 in allen Tieren, die mit AdHBV transduziert wurden, detektierbar (Abb 2.7).

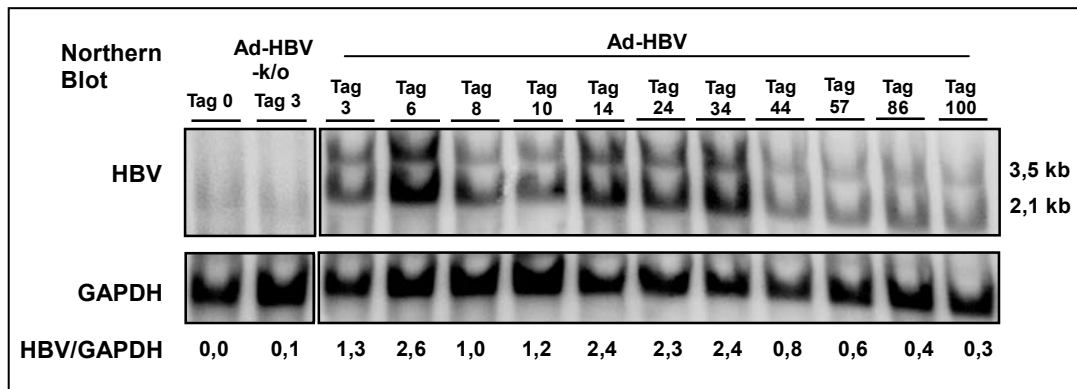


Abb. 2.7: Northern-Blot-Analyse zum Nachweis der HBV-Transkription

Je 3-4 Tiere pro Gruppe wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV oder Ad-HBV-k/o injiziert. Die Gesamt-RNA wurde aus dem Lebergewebe der transduzierten Mäuse zum jeweiligen Zeitpunkt nach der Injektion extrahiert und nach Gruppen gepoolt. 25 μg der gepoolten Proben wurden analysiert. Die prägenomischen (3,5 kb) und subgenomischen (2,1 kb) HBV-RNAs wurden relative zu GAPDH quantifiziert.

Als Kontrolle wurde die Gesamt-RNA der unbehandelten C57Bl/6 und der Ad-HBV-k/o transduzierten Mäuse verwendet. Hier wurde keine HBV-Transkription nachgewiesen (Abb. 2.7).

2.1.5.4 Verlauf der Replikation nach dem HBV-Genomtransfer

Um den Verlauf der HBV-Replikation in der Leber quantitativ zu bestimmen, wurde die Menge von HBV-DNA im Verhältnis zu Ad-DNA (Abb. 2.6) mittels quantitativer PCR gemessen. Das Ermitteln der Ad-DNA diente als Beweis für ein gleiches Targeting der adenoviraler Vektoren in der Leber nach der Injektion von Ad-HBV und Ad-HBV-k/o.

Quantitativ ergab die Ad-DNA im Lebergewebe eine vergleichbare Effizienz des Leber-Targetings für beide adenoviralen Vektoren. Der konstante Abfall ist ein Zeichen für die langsame Elimination Ad-transduzierter Zellen. Am Tag 3 wurden $5,6 \times 10^8$ Kopien/ μl und $3,4 \times 10^8$ Kopien/ μl in Ad-HBV und Ad-HBV-k/o transduzierten Tieren gemessen, mit konstantem Abfall bis zum Tag 44 (4×10^3 Kopien/ μl und 5×10^3 Kopien/ μl in Ad-HBV und Ad-HBV-k/o transduzierten Tieren) (Abb. 2.8).

Die HBV-Replikation wurde bereits früh nach der Infektion mit Ad-HBV unterdrückt. Ab den Tag 10 stieg die HBV-Replikation wieder an, bevor sie am Tag 34 aufhörte. In Ad-HBV-k/o transduzierten Tieren wurde keine HBV-Replikation nachgewiesen (Abb. 2.8).

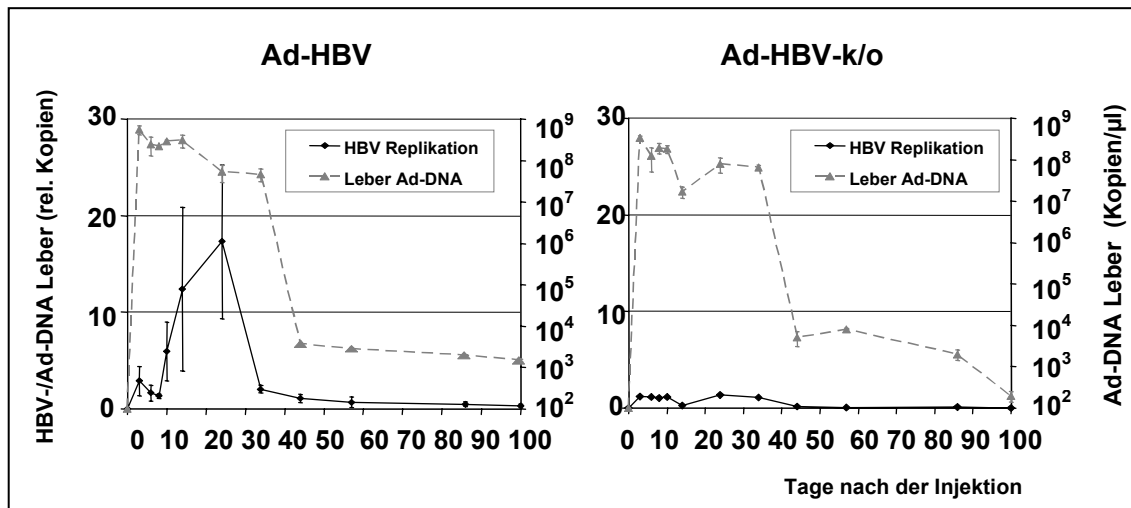


Abb. 2.8: Zeitverlauf der HBV-Replikation

Je 3-4 Tiere pro Gruppe wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV (links) oder Ad-HBV-k/o (rechts) injiziert. In einer Zeitkinetik wurde das Verhältnis von HBV- zu Ad-DNA in der Leber gemessen (schwarze Linie). Gezeigt ist die Effizienz des Leber-Targetings für den adenoviralen HBV-Genomtransfer (graue Linie).

Eine weitere Möglichkeit den Verlauf der HBV-Replikation zu untersuchen, wäre die Analyse der replikativen HBV-Intermediate (rcDNA und ssDNA) in der Leber der transduzierten Mäuse mittels Southern-Blot Analyse. Hierfür wurde die Gesamt-DNA aus dem Lebergewebe der mit Ad-HBV oder Ad-HBV-k/o transduzierten Mäuse zum jeweiligen Zeitpunkt nach der Injektion extrahiert. 40 µg der gepoolten DNA-Proben wurden mit *HindIII* verdaut und auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen. Mit Hilfe einer ³²P-radioaktiv markierter HBV-Sonde wurde die rc- und ss-DNA in der Leber der transduzierten Mäuse untersucht. Die Southern-Blot Analyse wurde mehrmals wiederholt. Durch die geringe Sensitivität der Southern-Blot Analyse war es aber nicht möglich die replikativen HBV-Intermediate in der Leber der Ad-HBV transduzierten Mäuse nachzuweisen.

Es kann zusammengefasst werden, dass die adenoviralen Vektoren für ca. zwei Monate in der Leber der transduzierten Tiere nachgewiesen werden konnten und als Transkriptions-Matrizen für HBV-RNAs dienten. Obwohl die HBV-Replikation in der Initialphase kontrolliert wurde, begann HBV 10 Tage nach der Ad-HBV Infektion wieder zu replizieren. In den Ad-HBV transduzierten Mäusen konnte die HBV-Replikation für mehr als vier Wochen nachgewiesen werden, bevor es am Tag 34 zur HBsAg/anti-HBs-Serokonversion kam und die HBV-Replikation ab dem Tag 44 kontrolliert wurde.

2.1.5.5 Charakterisierung der induzierten Immunantwort im Ad-HBV Maus-Modell

Um die Frage zu beantworten, welche Zellen des Immunsystems in die Leber einwandern und so die HBV-Replikation begleiten und steuern könnten, wurde die relative Gen-Expression von verschiedenen Zelloberflächenmarker wie CD4, CD8 und NK1.1 in der Leber in einem Zeitverlauf nach der HBV-Infektion mittels quantitativer PCR bestimmt.

Eine wichtige Gruppe der Zelloberflächenmarkern sind die verschiedenen CD-Moleküle. CD steht für *cluster of differentiation*, wobei ein solches *cluster* eine Gruppe monoklonaler Antikörper darstellt, welche spezifisch dasselbe Zelloberflächenmolekül erkennen. Die Zelloberflächenproteine CD4 und CD8 spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Funktion der T-Zellen. T-Zellen sind eine Subpopulation von Lymphozyten, welche sich durch ihre Entwicklung im Thymus und durch ihre heterodimeren Antigenrezeptoren definieren. Um die T-Zellen in weitere funktionelle Populationen einzuteilen, bedient man sich der Moleküle CD4 und CD8. Beide sind Korezeptoren für die MHC-Moleküle. CD4 wird auf Th-Zellen, sowie auf antigenpräsentierenden Monozyten und Makrophagen von Mensch und Ratte exprimiert, nicht aber auf Makrophagen von Mäusen (Crocker *et al.* 1987, Chan *et al.* 1988). CD8 hingegen findet man auf zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen. NK1.1 ist ebenfalls ein Zelloberflächenmarker der NK- und NK-T-Zellen.

Somit kann durch Quantifizierung der in die Leber eingewanderten CD8-beziehungsweise CD4-positiven T-Zellen oder NK-T-Zellen, mittels der Expression ihrer Zelloberflächenmarkergene eine immunologische Reaktion auf die HBV-Infektion in diesem Mausmodell genauer charakterisiert werden.

Zusätzlich wurden die relativen Mengen an Zytokinen, wie IFN- γ , IL-10 und TNF- α bestimmt. Alle gemessenen Gene wurden zum „Housekeeping“-Gen GAPDH normalisiert und als Kalibrator wurde cDNA aus den Milzzellen einer uninfizierten C57Bl/6 Maus benutzt. Bei jeder quantitativen PCR wurde cDNA unbehandelter Tiere mitgemessen, die später bei der relativen Berechnung als eins gesetzt wurden. Nach der Normalisierung dieser verschiedenen Gene zu GAPDH wurden folgende Ergebnisse ermittelt.

In allen Ad-HBV transduzierten Tieren wurde ein 50-facher Anstieg der CD8-Genexpression am Tag 6 nach der Infektion beobachtet, während für CD4 nur 6-fach und für NK1.1 2-fach erhöhten Werte ermittelt wurden. Nach der Ad-HBV Injektion

verlief die CD8-Genexpression parallel zum Leberschaden, was durch Messung der Lebertransaminasenaktivität im Blut gezeigt wurde (Abb 2.3). Die Ad-HBV-k/o transduzierten Tiere zeigten nur einen 8-fachen Anstieg für CD8 am Tag 14 (Abb. 2.9).

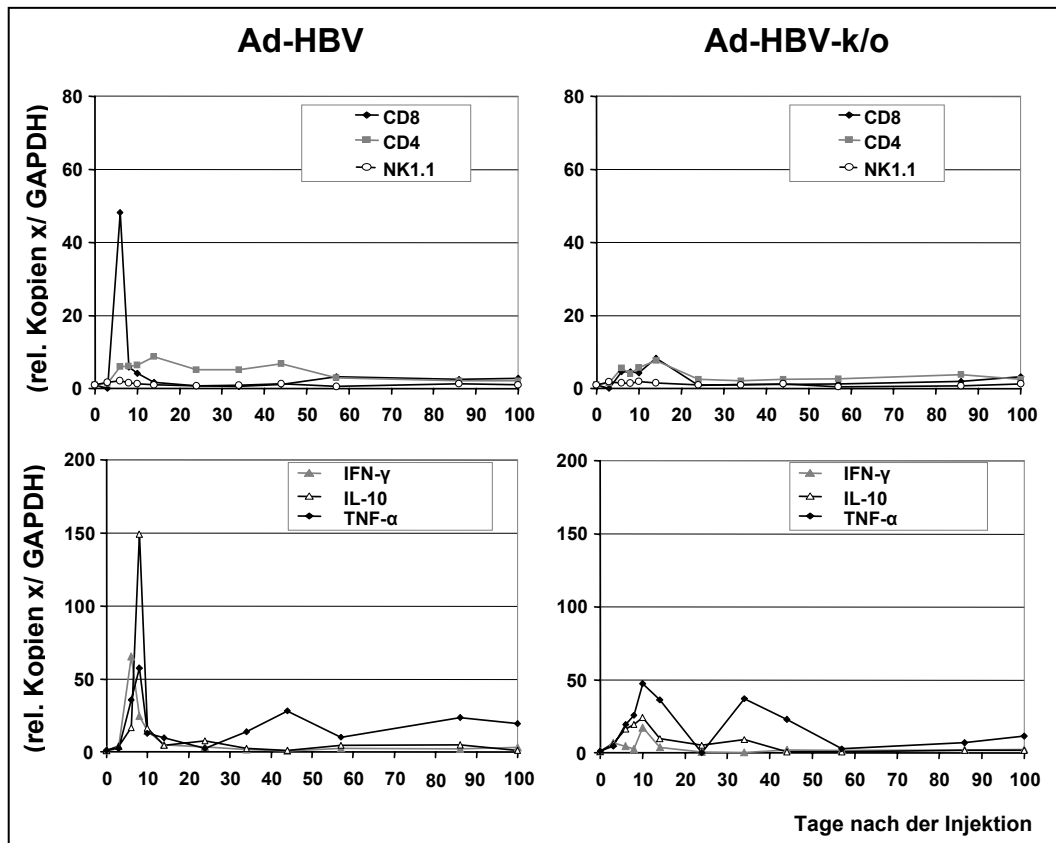


Abb. 2.9: Induktion der Immunantwort und Sekretion von Zytokinen nach dem HBV-Genomtransfer

Je 3-4 Tiere pro Gruppe wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV (links) oder Ad-HBV-k/o (rechts) injiziert und in einer Zeitkinetik geopfert. Aus dem Lebergewebe der Mäuse wurde die Gesamt-RNA extrahiert und pro Gruppe gepoolt. Die CD8, CD4 und NK1.1- Genexpression, sowie die relativen Mengen an IFN- γ , IL-10 und TNF- α wurden relativ zu GAPDH mittels quantitativer PCR gemessen.

Als nächstes wurde die Sekretion verschiedener Zytokin-Gene in der Leber der transduzierten Mäuse gemessen. IFN- γ , das von T-Lymphozyten und NK-Zellen synthetisiert wird, die zuvor durch eine infizierte Zelle bzw. durch Interleukine (IL) aktiviert wurden (Goodbourn *et al.*, 2000), stieg am Tag 6 65-fach in den Ad-HBV bzw. 4-fach in den Ad-HBV-k/o Tieren und fiel danach in beiden Gruppen wieder auf das Anfangsniveau. TNF- α ist ein von Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen gebildetes Zytokin. Es kann verschiedene Entzündungsreaktionen, die Blutbildung, die Angiogenese, die Wundheilung und die Immunabwehr beeinflussen. Darüberhinaus hat TNF- α eine zytostatische und zytolytische Wirkung auf

Tumorzellen. Es stimuliert zusammen mit IL-2 und IL-1 die Produktion von IFN- γ durch NK-Zellen.

Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 wird neben Th2-Zellen von CD8⁺-T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und aktivierten B Zellen exprimiert und freigesetzt (Fiorentino *et al.*, 1991), sowie von regulatorischen-T-Zellen sezerniert und hat eine immunsuppressive Funktion. Die Funktion von IL-10 liegt ebenfalls in der Inhibition der Funktion von Monozyten/Makrophagen, T-Zellen und NK-Zellen (De Waal Malefyt *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991; Berkman *et al.*, 1995).

Abbildung 2.9 zeigt die erhöhte Sekretion von IL-10 und TNF- α am Tag 6 in der Leber der Ad-HBV transduzierten Tieren, welche dicht dem Profil von IFN- γ und CD8 folgte, wobei für TNF- α ein zweiter 13-facher Anstieg am Tag 44 beobachtet wurde. IL-10 wurde am Tag 6 im Vergleich zu IFN- γ und TNF- α ungefähr 2-fach höher in der Leber der Ad-HBV transduzierten Tiere sezerniert. In den Ad-HBV-k/o transduzierten Kontrolltieren wurde im Vergleich zu Ad-HBV transduzierten Tieren eine spätere und viel niedrigere Sekretion von Zytokinen am Tag 10 nach der Injektion beobachtet (Abb 2.9).

Diese Ergebnisse zeigten, dass am Tag 6 überwiegend die CD8⁺-T-Zellen in die Leber der Ad-HBV transduzierten Mäuse einwandern und zu diesem Zeitpunkt IFN- γ , TNF- α und IL-10 sezernierten. Dadurch wurde gezeigt, dass der in Abschnitt 2.1.5.4 beschriebene Verlauf der HBV-Replikation in der Leber der Ad-HBV transduzierten Mäuse von Tag 6 bis Tag 10 genau gegensätzlich zur IFN- γ , TNF- α und IL-10 Sekretion verläuft. Zum Zeitpunkt der maximalen HBV-Replikation von Tag 14 bis Tag 34 wurde die niedrigste IFN- γ , TNF- α und IL-10 Expression beobachtet (Abb. 2.8 und Abb. 2.9).

Aufgrund der starken Sekretion von IL-10 in der Leber der Ad-HBV transduzierten Tiere, wurde der Einfluss von IL-10 auf den Verlauf der HBV-Infektion in Ad-HBV transduzierten IL-10-knockout (-k/o) Mäusen untersucht. Nach der Ad-HBV Injektion wurde in IL-10-k/o Mäusen, im Vergleich zu C57Bl/6 Tieren eine höhere Leberentzündung beobachtet (Abb. 2.10 A). Im Vergleich zum Verlauf der HBV-Replikation in Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäusen, wurde in Ad-HBV transduzierten IL-10-k/o Mäusen gezeigt, dass in Abwesenheit von IL-10 die HBV-Replikation in einer Zeitkinetik von Tag 7 bis Tag 65 6-fach reduziert wurde (Abb. 2.10 B).

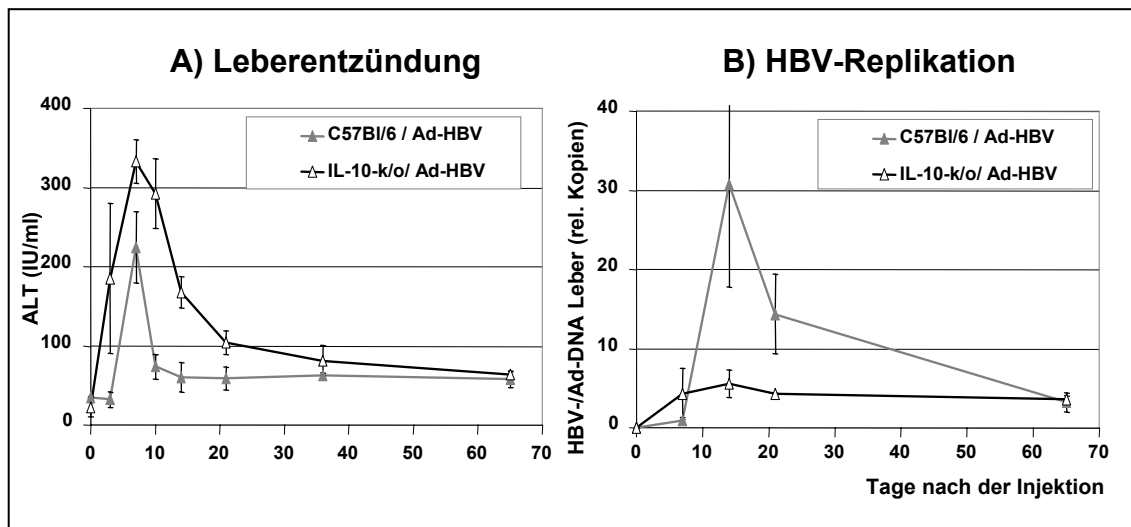


Abb. 2.10: Verlauf der Leberentzündung und der HBV-Replikation nach Ad-HBV Injektion in IL-10-k/o und C57Bl/6 Mäusen.

Je drei C57Bl/6 und IL-10-k/o Mäuse pro Gruppe wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV *i.v.* injiziert. A) In einer Zeitkinetik wurde die Leberentzündung durch die Messung der Lebertransaminasenaktivität im Serum bestimmt. B) In einer Zeitkinetik wurde der Verlauf der HBV-Replikation gezeigt. Dafür wurde das Verhältnis von HBV- zu Ad-DNA (relative Kopien) in der Leber gemessen.

Zusammenfassend lassen diese Daten vermuten, dass die HBV-Replikation in Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäusen durch IFN- γ oder IFN- γ -produzierende Zellen gesteuert werden könnte.

2.2 Charakterisierung der zellulären Immunantwort gegen HBV im Ad-HBV Maus-Modell

Um genauer herauszufinden, welche Zellen des Immunsystems (T-Zellen oder NK/NK-T-Zellen) für die Entstehung einer Hepatitis, dem damit verbundenen Leberschaden und der Kontrolle der HBV-Replikation verantwortlich sind, wurden zwei verschiedene Mausstämme nach einer Ad-HBV Injektion vergleichend untersucht. Zum einen der Wildtyp Maus-Stamm C57Bl/6 und zum anderen in CD1-(k/o) Maus-Stamm, in dem NK-T-Zellen nicht aktiviert werden können. NK-T-Zellen sind lymphatische Zellen, die von konventionellen $\alpha\beta$ T-Zellen abstammen. NK-T-Zellen sind CD3 positiv und exprimieren auf ihrer Oberfläche das CD161 (NKR-P1A) Antigen bzw. das homologe NK1.1 in der Maus. Dieser Oberflächenmarker ist sonst ausschließlich auf sog. natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zu finden. Die NK-T-Zellen unterscheiden sich von gewöhnlichen T-Zellen nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell. Die humanen NK-T-Zellen erkennen ihr Antigen nur, wenn es durch das CD1a-d Molekül

präsentiert wird (Brossay *et al.*, 1998; Porcelli *et al.*, 1992; Sieling *et al.*, 1995), bei Mäusen sind es die Moleküle CD1.1 und CD1.2. Während MHC-Moleküle hochpolymorph sind, handelt es sich bei CD1-Molekülen um nicht-polymorphe Moleküle mit ähnlicher Zellverteilung wie MHC-Klasse-II. Eine Ausnahme ist CD1d, das auf intestinalem Epithel exprimiert wird (Porcelli und Modlin, 1999).

Um die an einer immunologischen Reaktion beteiligten Zellpopulationen identifizieren und untersuchen zu können, wurden je drei Mäuse pro Gruppe *i.v.* mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV injiziert. Anschließend wurden mit Hilfe eines Ratte-anti-Maus-CD8 Antikörpers die CD8+T-Zellen in C57BL/6 Mäusen depletiert und die Effizienz der Depletion mittels Durchflusszytometrischer Analyse quantifiziert. Die Rolle der CD8+T-Zellen wurde in einer Zeitkinetik nach der Ad-HBV Injektion analysiert. Um die Funktion von NK-/ NKT- Zellen zu untersuchen, wurden in CD1-k/o Mäusen nach einer Ad-HBV Injektion ebenfalls mittels des Depletions-Antikörpers Ratte-anti-Maus-CD8 die CD8+ T-Zellen inaktiviert. Im Vergleich wurden je drei C57BL/6 und CD1-k/o Mäuse nur mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV *i.v.* injiziert. In einer Zeitkinetik wurden am Tag 7, 14, 21 und 86 nach der Injektion je drei Tiere geopfert und analysiert. Außerdem wurden am Tag 36, 58 und 76 drei Tiere betäubt und geblutet, um die Antigenämie und die Leberentzündung im Verlauf dieser Zeitkinetik zu verfolgen. Zusätzlich dienten drei unbehandelte C57Bl/6 und CD1-k/o Mäuse als Tag Null-Kontrolle.

Um den Krankheitsverlauf und die Pathogenese der Erkrankung nach der Depletion der CD8+T-Zellen in C57Bl/6 und CD1-k/o Mäusen zu untersuchen, wurde die Leberentzündung mittels Messung der Lebertransaminasenaktivität im Serum bestimmt und im Lebergewebe der C57Bl/6 Mäuse das Ausmaß der hepatozellulären Schädigung histopathologisch quantifiziert und immunhistochemisch der Nachweis von HBcAg (HBV-Kapsid (core)) durchgeführt.

Der Zeitverlauf und die Dauer der HBV-Replikation wurde durch Bestimmung der Antigenämie (HBeAg und HBsAg) und der Produktion der Anti-HBs-Antikörper im Serum bestimmt. Mittels quantitativer PCR wurde der Verlauf der Virämie ermittelt. Außerdem wurden die replikativen HBV-Intermediate in der Leber mittels Northern- und Southern-Blot Analyse untersucht. Um die Induktion der T-Zell Antwort nach der Depletion von CD8+T-Zellen und Injektion von Ad-HBV in C57Bl/6 und CD1-k/o Mäusen zu bestimmen, wurden die Genexpression von CD4, CD8 und NK1.1 in der Leber mittels quantitativer PCR gemessen. Die Sekretion von Zytokinen, wie IFN- γ ,

IL-10 und TGF- β , sowie von FOX Forkhead-Transkriptionsfaktor (TFs) FoxP3 und Oberflächenmolekül Programmed death-1 (PD-1) wurden bestimmt.

FoxP3 spielt eine wichtige Rolle für die Bildung von CD4⁺/CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (Treg) (Ochs *et al.*, 2005) und wurde als zuverlässigster Oberflächenmarker der CD4⁺/CD25⁺ Tregs beschrieben (Hori *et al.* 2003; Fontenot *et al.* 2003). Eine Autoimmunantwort naiver, autoreaktiver T-Zellen wird von Tregs hauptsächlich durch Zell-Zell-Kontakte inhibiert. Die Proliferation und Differenzierung vorhandener Effektor-T-Zellen reprimieren Tregs über die Ausschüttung immunsuppressiver Zytokine, wie z.B. IL-10 und TGF- β , sowie direkten Zell-Zell-Kontakt.

Der negativ regulatorische Korezeptor PD-1 gehört zu der Familie der CD28 kostimulatorischen Oberflächenmoleküle und wird *in vivo* nach Stimulation von CD3 auf peripheren T-Zellen exprimiert (Agata *et al.* 1996). PD-1 wird durch die Bindung an seine Liganden PD-L1 oder PD-L2 stimuliert. Während PD-L1 sowohl auf Makrophagen und Dendritischen Zellen (DCs), als auch auf B- und T-Zellen exprimiert wird, findet man PD-L2 lediglich auf Makrophagen und DCs. Die Bindung von PD-1 an seine Liganden unterbindet die IL-2 Synthese sowie die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen. Die Expression von PD-1 führt zur Herunterregulation der T-Zell-Aktivierung und damit zu einer verminderten Immunantwort (Shin und Rehermann, 2006).

2.2.1 Verlauf und Effizienz der CD8⁺T-Zell Depletion in C57Bl/6 Ad-HBV transduzierten Mäusen

Um zu überprüfen, ob die Depletion der CD8⁺T-Zellen in Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäusen erfolgreich war, wurden je drei Mäuse pro Gruppe in einer Zeitkinetik am Tag 0, 3, 7, 14 und Tag 52 nach der Ad-HBV Injektion und CD8⁺T-Zell-Depletion geopfert und die Effizienz der Depletion in Milzzellen der Mäuse mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Durch den Einsatz von spezifischen, Fluorochrom-markierten Maus-CD8-FITC und Maus-CD4-PE Antikörpern wurde die Expression dieser Moleküle auf der Zellmembran analysiert.

Am Tag Null wurden in der Milz der unbehandelten C57Bl/6 Mäuse 20% CD8⁺ und 22% CD4⁺ T-Zellen gemessen. Am Tag 3 nach der Ad-HBV Injektion wurde eine 2-fache Reduktion der CD8⁺T-Zellen und eine 1,3-fache Reduktion der CD4⁺ T-Zellen beobachtet. Möglich wäre, dass zu diesem Zeitpunkt die CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen in

die Leber einwanderten, wobei diese am Tag 7 wieder in den gleichen Menge, wie am Tag Null in der Milz nachgewiesen wurden.

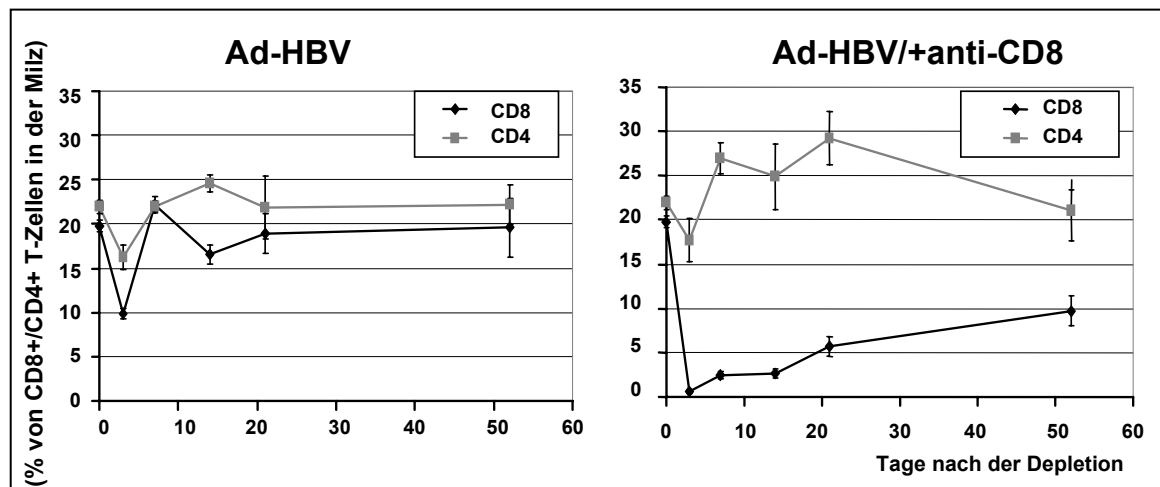


Abb. 2.11: CD8+T-Zell Depletion in C57Bl/6 Ad-HBV transduzierten Mäusen

Je drei C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV oder Ad-HBV/+anti-CD8 Depletions-Antikörper injiziert. Die Zellen wurden aus dem Milzgewebe isoliert und anschließend erfolgte die Färbung der Oberflächenmarker CD4 und CD8 mit Hilfe Fluorochrom-markierter CD8-FITC und CD4-PE Antikörpern. Gezeigt werden die Prozente der Gesamtzahl an CD8+ und CD4+ T-Zellen in der Milz der Ad-HBV (links) und Ad-HBV/+anti-CD8 (rechts) transduzierten Mäuse gemessen mittels Durchflusszytometrie.

Am Tag 3 nach der CD8+T-Zell Depletion fiel die Zahl auf 0,6% CD8+T-Zellen. Die depletierten CD8+T-Zellen in der Milz der Ad-HBV transduzierten Tiere blieben am Tag sieben und 14 konstant um den Wert von 2,2% CD8+T-Zellen und stiegen ab den Tag 21 kontinuierlich wieder an. Bis zum Tag 52 blieben die CD8+ T-Zellen jedoch 2-fach niedriger, als in Ad-HBV transduzierten Mäusen (Abb. 2.11). In Tieren, in denen die CD8+T-Zellen depletiert wurden, konnten etwas höhere Mengen an CD4+T-Zellen nachgewiesen werden, wobei im Vergleich mit Mäusen, die nur mit Ad-HBV transduziert wurden, diese Unterschiede nicht signifikant waren.

Als Schlussfolgerung kann man sagen, dass das Ausschalten der CD8+T-Zellen mittels eines Depletions-Antikörpers in diesen Mäusen nur für eine kurze Zeit sehr effizient durchgeführt wurde und dadurch nicht die optimalen Bedingungen gegeben waren, um den Einfluss von CD8+T-Zellen zu studieren.

2.2.2 Verlauf der Leberentzündung nach CD8+T-Zell Depletion und Ad-HBV Injektion in C57Bl/6 und CD1-k/o Mäusen

Die Transaminasenaktivität gemessen im Serum, wurde als Marker der Leberentzündung zum jeweiligen Zeitpunkt nach der Ad-HBV Injektion und CD8+T-Zell-Depletion in C57Bl/6 und CD1-k/o Mäusen untersucht.

Wie in Abbildung 2.12 gezeigt, wurde bei Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Tieren am Tag 7 eine akute Leberentzündung beobachtet, die bis zum Tag 34 wieder zurückging. Am Tag 76 kam es zu einem zweiten Anstieg der Lebertransaminaseaktivität, was mit dem in Abschnitt 2.1.4.1 beschriebenen Verlauf der Leberentzündung in Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäusen übereinstimmt.

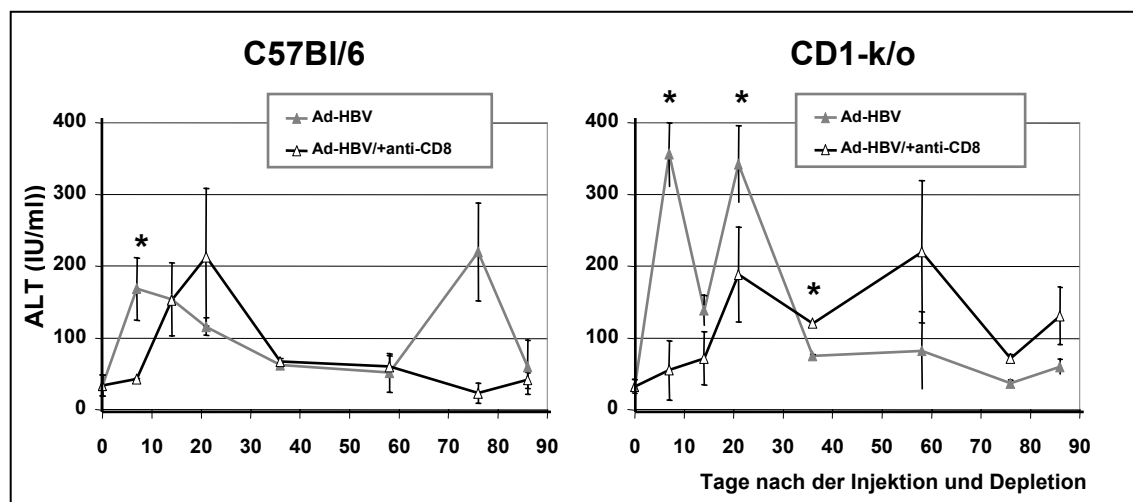


Abb. 2.12: Verlauf der Leberentzündung nach Ad-HBV Injektion und CD8-T-Zell Depletion in C57Bl/6 und CD1-k/o Mäusen

Je drei C57Bl/6 (links) und CD1-k/o (rechts) Mäuse pro Gruppe wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV (graue Linie) oder Ad-HBV/+anti-CD8 Depletions-Antikörper (schwarze Linie) injiziert. In einer Zeitkinetik wurde die Leberentzündung durch die Messung der Lebertransaminasenaktivität im Serum bestimmt. Gezeigt ist die statistische Auswertung der Signifikanz mittels Student-t-Test (* p-Wert < 0,05).

Nach der Depletion der CD8+T-Zellen in C57Bl/6 Mäusen, wurde eine verzögerte Leberentzündung mit Maximum am Tag 14 beobachtet, die bis zum Tag 34 ebenfalls zurückging. Es wurde kein zweiter Anstieg der Lebertransaminaseaktivität am Tag 76 beobachtet (Abb. 2.12). Die Signifikanz wurde mit dem Student-t-Test geprüft. Dabei wurde festgelegt, dass ein statistisch signifikanter Unterschied dann vorliegt, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 ist. Diese Unterschiede in Ad-HBV transduzierten C57Bl/6

Mäusen nach der CD8+T-Zell Depletion waren außer am Tag 7 nicht signifikant (Abb. 2.12).

In Ad-HBV transduzierten CD1-k/o Mäuse, deren NK-T-Zellen nicht aktiviert werden, wurde eine ausgeprägte Leberentzündung am Tag 7 nach der Ad-HBV Injektion beobachtet. Dieser hohen initialen Leberentzündung folgte eine Reduktion der Lebertransaminasen am Tag 14, die jedoch bis zum Tag 21 wieder stark anstiegen, gefolgt von einer annähernden Normalisierung bis zum Tag 36 und einem konstanten Verlauf bis zum Tag 86. In Ad-HBV transduzierten CD1-k/o Mäusen, in denen zusätzlich auch die CD8+T-Zellen ausgeschaltet waren, wurde eine verzögerte und leicht verringerte Leberentzündung am Tag 21 und Tag 58 beobachtet (Abb. 2.12). Signifikante Unterschiede wurden am Tag 7, Tag 21 und Tag 36 im Verlauf der Leberentzündung in Ad-HBV und Ad-HBV/+anti-CD8 transduzierten CD1-k/o Mäuse beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass es nach einer Ad-HBV Injektion durch die Abwesenheit der NK-T-Zellen am Tag 7 und Tag 14 zu einem noch höheren Leberschaden kommt, nicht aber, wenn CD8+ und NK-T-Zellen inaktiv waren.

2.2.3 Histopathologische Zeichen des Leberzellschadens in C57Bl/6 Mäusen nach CD8+T-Zell Depletion und Ad-HBV Genomtransfer

Die typischen Zeichen eines Leberschadens (Einzelzellnekrosen und portale lymphozytären Infiltrate) wurden im Lebergewebe der Ad-HBV und Ad-HBV/+anti-CD8 injizierten C57Bl/6 Mäuse histopathologisch mittels HE-Färbung analysiert und in der Tabelle 2 zusammengefasst. Immunhistochemische Untersuchungen dienten dem Nachweis von HBV-Kapsid-(core) Protein (nukleäre HBcAg-Färbung) in den infizierten Hepatozyten und die Ergebnisse wurden in der Tabelle 3 zusammengefasst. Am Tag 3 nach der Ad-HBV Injektion und CD8+T-Zell Depletion waren im Lebergewebe der C57Bl/6 Mäuse keine Entzündungszeichen sichtbar (Tab.2). Die histologisch akut hepatitischen Veränderungen mit ausgeprägten lymphozytären Infiltraten der Portalfelder, die mit einem 5-fachen Anstieg der Lebertransaminasen im Blut korrelierten, zeigten sich bei den Ad-HBV-Tieren am deutlichsten am Tag 7 (Tab. 2 und Abb.2.12).

Tab. 2: Histopathologische Untersuchung von Lebergewebe der Ad-HBV injizierten C57Bl/6 Mäuse mit oder ohne Depletion von CD8-T-Zellen

Zeitpunkt nach der Injektion und Depletion	adenoviraler Vektor	Maus 1	Maus 2	Maus 3
Tag 3	Ad-HBV	0	0	0
	Ad-HBV/+anti-CD8	0	0	0
Tag 7	Ad-HBV	++	+++	+++
	Ad-HBV/+anti-CD8	0	+	0
Tag 14	Ad-HBV	+	0	0
	Ad-HBV/+anti-CD8	++	++	+
Tag 21	Ad-HBV	+	0	+
	Ad-HBV/+anti-CD8	+	0	+
Tag 52	Ad-HBV	++	+	+
	Ad-HBV/+anti-CD8	++	+	++
Tag 86	Ad-HBV	+	0	0
	Ad-HBV/+anti-CD8	0	0	0

Ausmaß der hepatozellulären Schädigung von 0 bis +++ quantifiziert:
0: < max. 2 Entzündungsherde; **+** : 2 bis 5; **++** : 6 bis 10; **+++** : > 10;

Bei Tieren mit ausgeschalteten CD8⁺T-Zellen wurde, wie schon durch die Bestimmung der Lebertransaminasenaktivität im Blut in der Abb. 2.12 gezeigt wurde, histologisch ebenfalls eine verzögerte Leberentzündung ab den Tag 14 sichtbar (Tab. 2).

Am Tag 21 waren die entzündlichen Veränderungen in beiden Gruppen nur sehr gering ausgeprägt. Am Tag 52 wurde in beiden Gruppen erneut histologisch eine ausgeprägte Leberentzündung festgestellt, die jedoch nicht mit einem Anstieg der Lebertransaminasen korrelierte (Abb. 2.12), welche erst später am Tag 76 zu beobachten war. Die Leberentzündung bildete sich bis Tag 86 weitgehend zurück (Tab. 2).

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass auch das HBcAg im Nukleus der Ad-HBV und Ad-HBV/+anti-CD8 infizierten Hepatozyten nachgewiesen werden konnte. Aus den Auswertungen in der Tabelle 3 geht hervor, dass am Tag 3 und 7 keine deutlichen Unterschiede in der Zahl der HBcAg nukleär positiven Hepatozyten (zwischen 1% und 5%) in Ad-HBV und Ad-HBV/+anti-CD8 transduzierten C57Bl/6 Mäusen, gefunden wurden.

Tab. 3: Nukleäres HBcAg im Lebergewebe der Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäuse mit oder ohne Depletion von CD8-T-Zellen

Zeitpunkt nach der Injektion und Depletion	adenoviraler Vektor	Maus 1 (% HBcAg Nukleär)	Maus 2 (% HBcAg Nukleär)	Maus 3 (% HBcAg Nukleär)
Tag 3	Ad-HBV	1	2	1
	Ad-HBV/+anti-CD8	1	1	2
Tag 7	Ad-HBV	5	1	1
	Ad-HBV/+anti-CD8	5	5	5
Tag 14	Ad-HBV	10	5	20
	Ad-HBV/+anti-CD8	20	10	20
Tag 21	Ad-HBV	20	20	20
	Ad-HBV/+anti-CD8	10	20	5
Tag 52	Ad-HBV	5	10	5
	Ad-HBV/+anti-CD8	5	10	20
Tag 86	Ad-HBV	5	5	2
	Ad-HBV/+anti-CD8	5	10	5

Auch am Tag 14 und Tag 21 waren in beiden Gruppen vergleichbare Mengen an Hepatozyten nukleär positiv für HBcAg (zwischen 10 und 20%) (Tab. 3). Im weiteren Verlauf normalisierte sich die Anzahl der HBcAg-positiven Hepatozyten langsam und blieb konstant zwischen 5 und 10 %.

Zusammenfassend kann man sagen, dass auch histopathologisch ein verzögerter Verlauf der akuten Hepatitis bei Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäusen mit depletierten CD8+ T-Zellen beobachtet wurde, wobei in der Menge an nukleären HBcAg in den Hepatozyten kein großer Unterschied zwischen beiden Gruppe festgestellt wurde.

2.2.4 Antigenämie nach CD8+T-Zell Depletion

Als wichtige serologische Marker einer akuten HBV-Infektion wurden die Mengen an HBe-Ag (ng/ml), HBsAg (S/N Ratio) und anti-HBs-Antikörper (IU/ml) in den Seren der C57Bl/6 und CD1-k/o Mäuse in einer Zeitkinetik nach der Ad-HBV Injektion und CD8+T-Zell Depletion gemessen.

Alle mit Ad-HBV oder Ad-HBV/+anti-CD8 transduzierten C57Bl/6 und CD1-k/o Tiere waren am Tag 7 HBeAg und HBsAg positiv. In Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäusen mit depletierten CD8+ T-Zellen fielen die HBe-Ag und HBsAg Werte zunächst

zwischen Tag 7 und Tag 14 ab, wurden am Tag 21 noch einmal erhöht, fielen rasch wieder ab und blieben ab Tag 36 konstant. In Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäusen wurde ein konstanter Abfall von HBsAg ab den Tag 7 und für HBeAg ab den Tag 21 beobachtet.

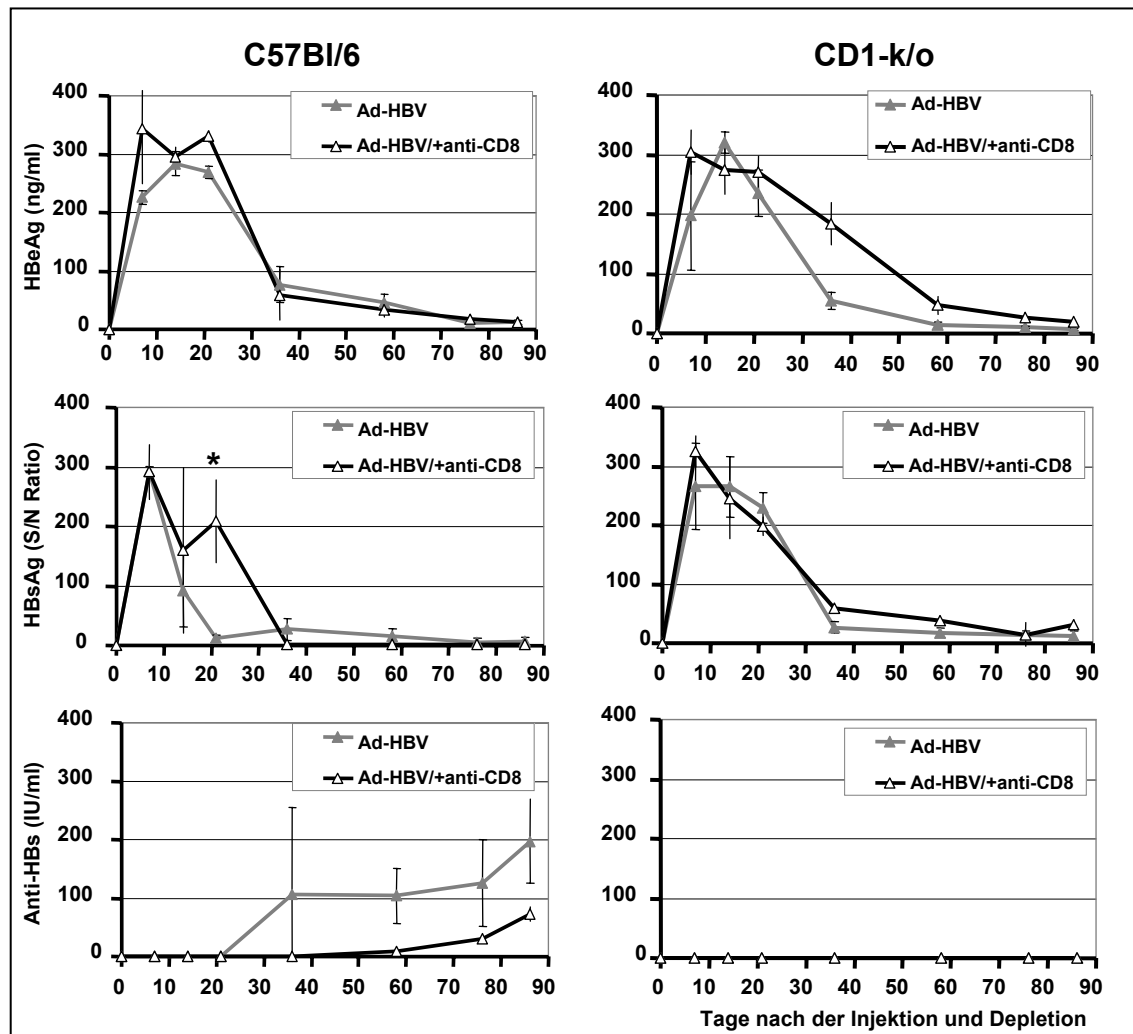


Abb. 2.13 Zeitverlauf der Antigenämie in C57Bl/6 und CD1-k/o Mäusen nach Ad-HBV-Injektion und CD8-T-Zell Depletion

Je drei C57Bl/6 (links) und CD1-k/o (rechts) Mäuse pro Gruppe wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV (graue Linie) oder Ad-HBV/+anti-CD8 Depletions-Antikörper (schwarze Linie) injiziert. In einer Zeitkinetik wurde die Sekretion von HBe-/HBs-Ag und anti-HBs-Antikörpern im Serum der infizierten Tiere gemessen. Gezeigt ist die statistische Auswertung der Signifikanz mittels Student-t-Test (* p-Wert < 0,05).

Ein signifikanter Unterschied für HBsAg wurde in C57Bl/6 Mäusen zwischen beiden Gruppen am Tag 21 ermittelt (Abb. 2.13). In Ad-HBV oder Ad-HBV/+anti-CD8 transduzierten CD1-k/o Tieren wurden keine signifikanten Unterschiede in HBeAg und HBsAg ermittelt. Am Tag 36 wurde die HBsAg/anti-HBs-Serokonversion in Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäusen beobachtet, die durch einen konstanten Anstieg der

Anti-HBs-Antikörper bis zum Tag 86 gekennzeichnet war. Die HBsAg/anti-HBs-Serokonversion wurde in Ad-HBV-transduzierten C57Bl/6 Mäusen, in denen die CD8⁺T-Zellen ausgeschaltet waren, erst später ab Tag 58 weniger ausgeprägt nachgewiesen. Weder in Ad-HBV noch in Ad-HBV/+anti-CD8 transduzierten CD1-k/o Mäusen konnte eine HBsAg/anti-HBs-Serokonversion und die damit verbundene Produktion der Anti-HBs- Antikörper im Serum nachgewiesen werden (Abb. 2.13).

Diese Daten zeigen, dass die CD8⁺T-Zell Depletion keinen Einfluss auf die Antigenämie in Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 und CD1-k/o Mäusen hatte. In Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 mit oder ohne depletierte CD8⁺ T-Zellen, wurde die Bildung der Anti-HBs-Antikörper als Zeichen einer Ausheilung nachgewiesen, nicht aber in CD1-k/o Tieren.

2.2.5 Virämie nach CD8⁺T-Zell Depletion

Um weiter den Einfluss der CD8⁺T-Zell Depletion auf den Verlauf und die Infektiösität der Ad-HBV-Infektion in C57Bl/6 und CD1-k/o Mäusen zu analysieren, wurde die Virämie bestimmt. Hierfür wurde HBV-DNA aus dem Serum der Ad-HBV und Ad-HBV/+anti-CD8 transduzierten C57Bl/6 und CD1-k/o Mäuse extrahiert. Die Menge an HBV-DNA (Kopien/ml) wurde in einer Zeitkinetik mittels quantitativer PCR gemessen.

In den Ad-HBV und Ad-HBV/+anti-CD8 transduzierten C57Bl/6 Mäusen wurde am Tag 7 eine deutliche HBV-Virämie mit $4,20 \times 10^6$ und 1×10^7 HBV-DNA Kopien/ml nachgewiesen. Ab Tag 14, an dem noch 1×10^6 HBV-DNA Kopien/ml im Serum gemessen wurden, wurde ein konstanter Abfall bis zum Tag 86 (6×10^3 HBV-DNA Kopien/ml) beobachtet (Abb. 2.14).

Die CD1-k/o Mäuse mit depletierten CD8⁺T-Zellen wiesen am Tag 7 eine höhere Virämie von 6×10^7 HBV-DNA Kopien/ml auf, im Vergleich zu Ad-HBV transduzierten CD1-k/o Mäusen mit 7×10^5 HBV-DNA Kopien/ml im Serum. Dieser Unterschied der Höhe der Virämie am Tag 7 war aber nicht signifikant. Ab Tag 14 wurde in beiden CD1-k/o Gruppen ebenso wie bei C57Bl/6 Mäusen ein konstanter Abfall der Virämie bis zum Tag 86 beobachtet (Abb. 2.13).

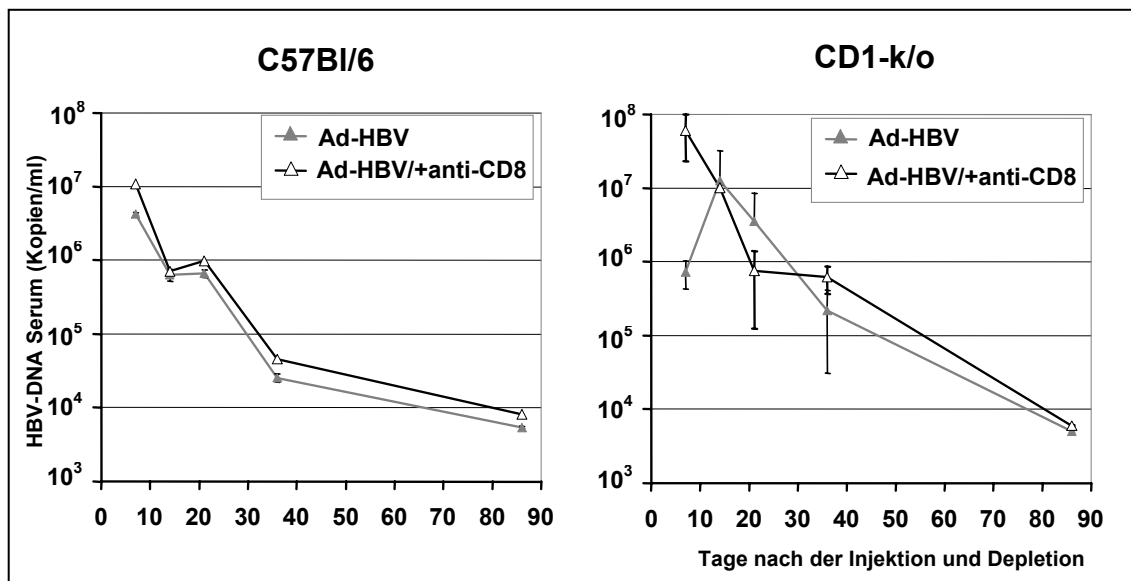


Abb. 2.14 Zeitverlauf und Höhe der Virämie in C57Bl/6 und CD1-k/o Mäusen

Je drei C57Bl/6 (links) und CD1-k/o (rechts) Mäuse pro Gruppe wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV (graue Linie) oder Ad-HBV/+anti-CD8 Depletions Antikörper (schwarze Linie) injiziert. In einer Zeitkinetik wurde die HBV-DNA im Serum mittels quantitativer PCR gemessen.

2.2.6 Einfluss der CD8+T-Zell Depletion auf die HBV-Transkription in C57Bl/6 Mäusen

Der Nachweis der prägenomischen (3,5 kb) und subgenomischen (2,1 kb) HBV-RNAs wurde in C57Bl/6 Mäusen, die mit Ad-HBV oder Ad-HBV/+anti-CD8 transduziert wurden, mittels Northern-Blot Analyse durchgeführt. Dafür wurde die Gesamt-RNA aus je 50 mg Lebergewebe zum jeweiligen Zeitpunkt nach der Injektion extrahiert und 25 μ g RNA von jeder Probe auf ein 1%iges Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen. Nach Hybridisierung mit einer 32 P-radioaktiv markierten HBV-Sonde wurden die Mengen der aufgetragenen Gesamt-RNA durch eine zweite Hybridisierung mit einer 32 P-radioaktiv markierten-GAPDH Sonde auf ihre Gleichmäßigkeit hin überprüft und anschließend die relativen Mengen an HBV-RNA zu GAPDH-RNA quantifiziert.

Die prägenomischen und subgenomischen HBV-RNAs waren bis zum Tag 52 in allen C57Bl/6 Mäusen, die mit Ad-HBV oder Ad-HBV/+anti-CD8 transduziert wurden, detektierbar (Abb. 2.15).

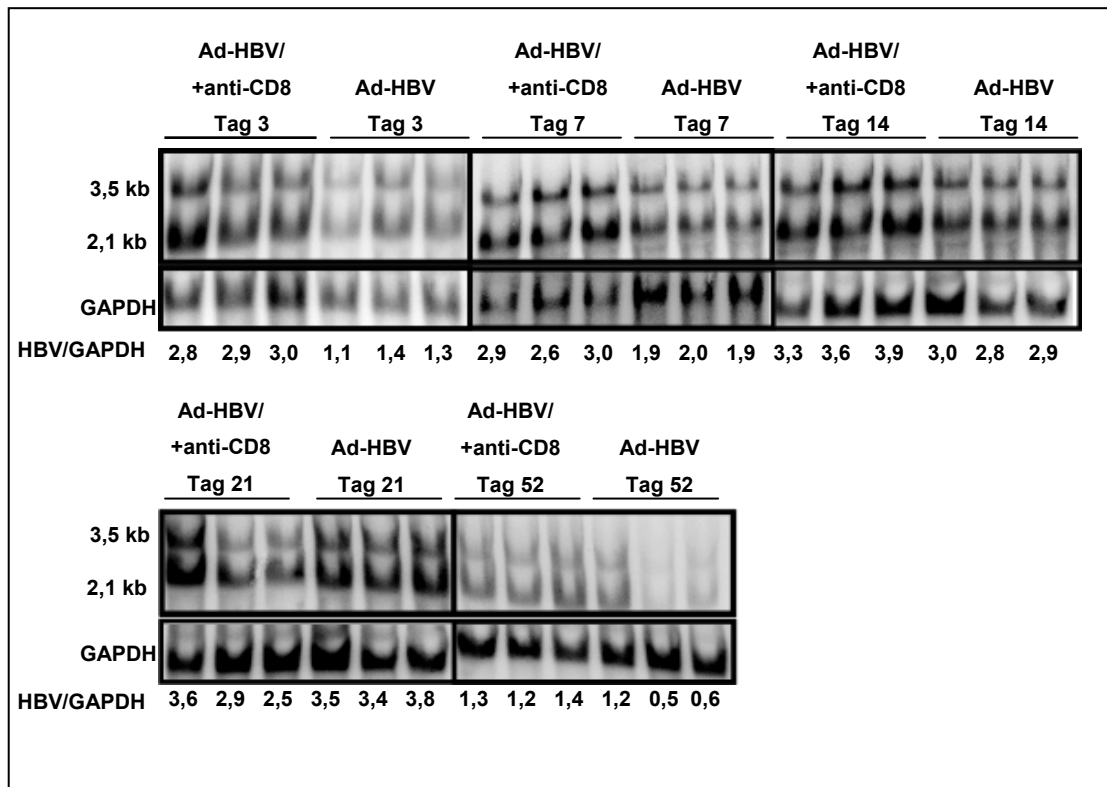


Abb. 2.15 Transkription der HBV-RNAs

Je drei C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV oder Ad-HBV + 500 μ g Ratte-anti-Maus-Depletions Antikörper injiziert. Die Gesamt-RNA wurde aus dem Lebergewebe der transduzierten Mäuse zum jeweiligen Zeitpunkt nach der Injektion und Depletion der CD8-T-Zellen extrahiert und 25 μ g der Proben wurden analysiert. Die prägenomischen (3,5 kb) und subgenomischen (2,1 kb) HBV-RNAs wurden relative zu GAPDH quantifiziert.

Die relative Quantifizierung der prägenomischen (3,5 kb) und subgenomischen (2,1 kb) HBV-RNAs zu GAPDH zeigte, dass am Tag 3, Tag 7 und Tag 14 erhöhte Mengen an viralen Transkripten in der Leber der Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäuse mit depletierten CD8⁺T-Zell waren.

In Ad-HBV transduzierten Mäusen waren die HBV-RNAs dagegen weniger ausgeprägt, wobei ab den Tag 21 ein leichter Anstieg der HBV-Transkripte beobachtet wurde (Abb. 2.15).

2.2.7 Einfluss der CD8⁺T-Zell Depletion auf die HBV-Replikation

In C57Bl/6 und CD1-k/o Ad-HBV transduzierten Mäusen wurde der Einfluss der CD8⁺T-Zell Depletion auf den Verlauf der HBV-Replikation untersucht. Dafür wurde in der Leber die Menge von HBV-DNA im Verhältnis zu Ad-DNA quantitativ mittels quantitativer PCR bestimmt (Abb. 2.16).

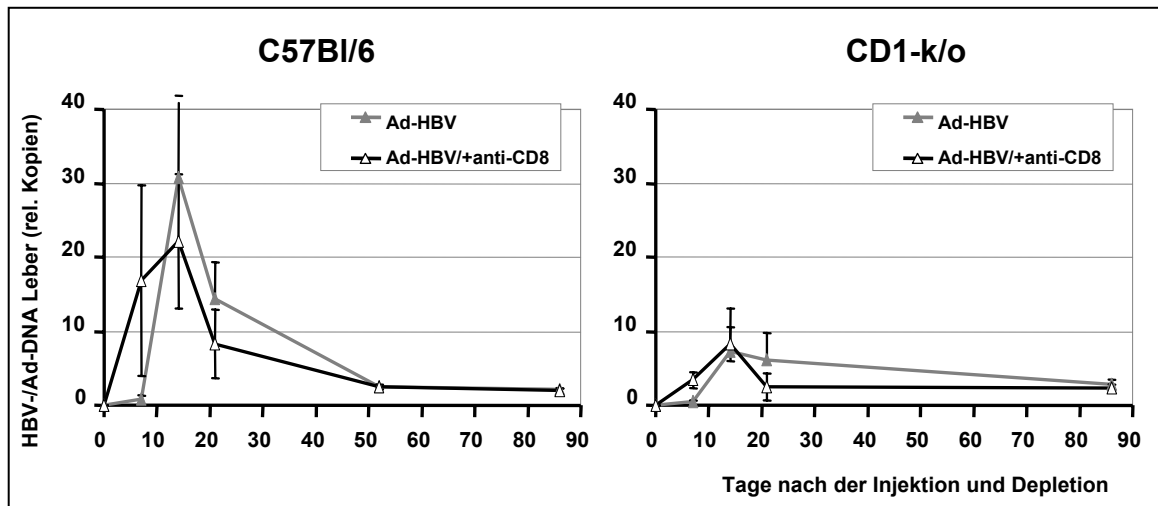


Abb. 2.16: Zeitverlauf der HBV-Replikation

Je drei C57Bl/6 (links) und CD1-k/o (rechts) Tiere pro Gruppe wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV (graue Linie) oder Ad-HBV/+anti-CD8 (schwarze Linie) injiziert. In einer Zeitkinetik wurde der Verlauf der HBV-Replikation ermittelt. Dafür wurde das Verhältnis von HBV- zu Ad-DNA (relative Kopien) in der Leber bestimmt.

Nach der Depletion der CD8+T-Zellen in C57Bl/6 Mäusen begann das Virus früher zu replizieren. Am Tag 7 wurde in diesen Tieren eine erhöhte HBV-Replikation festgestellt, wobei der Unterschied zu nicht depletierten C57Bl/6 Mäusen nicht signifikant war. Am Tag 14 wurde in beiden Gruppen das Maximum der HBV-Replikation in der Leber nachgewiesen, wobei das Virus etwas höher in Ad-HBV transduzierten Tieren replizierte. Ab dem Tag 21 wurde die HBV-Replikation in beiden Gruppen kontrolliert (Abb. 2.16).

Die HBV-Replikation in beiden Gruppen der CD1-k/o Mäuse war um den Faktor 3 niedriger als in C57Bl/6 Mäusen. Im Gesamt-Verlauf der HBV-Replikation in CD1-k/o Mäusen wurde kein Unterschied in der HBV-Replikation zwischen Tieren mit oder ohne CD8+ T-Zellen beobachtet (Abb. 2.16).

Die Analyse der replikativen HBV-Intermediate (rcDNA und ssDNA) in der Leber der transduzierten C57Bl/6 Mäuse wurde mittels Southern-Blot Analyse durchgeführt. Hierfür wurde die Gesamt-DNA aus 50 mg Lebergewebe der mit Ad-HBV oder Ad-HBV/+anti-CD8 transduzierten Mäuse zum jeweiligen Zeitpunkt nach der Injektion extrahiert. 40 µg der gepoolten Leber-DNA-Proben wurden mit *Hind*III verdaut und auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen. Mit Hilfe einer ^{32}P -radioaktiv markierten HBV-Sonde wurde die rc- und ss-DNA in der Leber der transduzierten Mäuse untersucht.

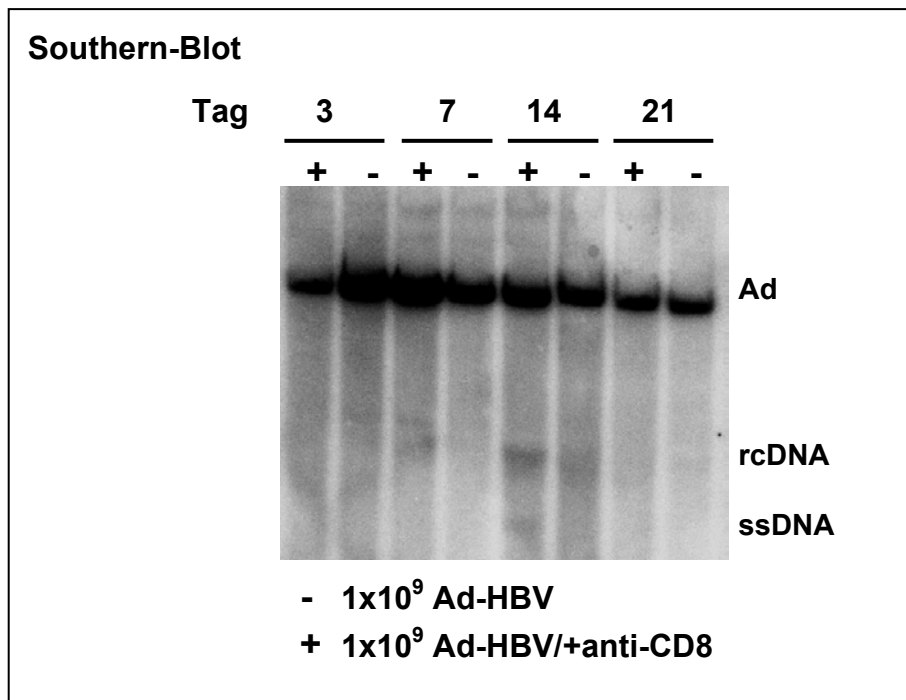


Abb. 2.17: Southern-Blot Analyse

Je drei C57Bl/6 Tiere pro Gruppe wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV (-) oder Ad-HBV/+anti-CD8 (+) injiziert. Die Gesamt-DNA aus dem Lebergewebe der transduzierten Mäuse wurde zum jeweiligen Zeitpunkt nach der Injektion extrahiert und die gepoolten Leber-DNA Proben wurden auf die replikativen HBV-Intermediate (rcDNA und ssDNA) mittels Southern-Blot Analyse untersucht.

Die Southern-Blot Analyse wurde mehrmals wiederholt. Am Tag 14 wurden die replikativen HBV-Intermediate (rc und ssDNA) in der Leber der Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäuse mit depletierten CD8+T-Zellen nachgewiesen (Abb. 2.17). Dieses Ergebniss korreliert genau mit dem Maximum der am Tag 14 mit quantitativer PCR gemessenen HBV-Replikation in der Leber dieser Tiere (Abb. 2.16). Die rc und ssDNA in Ad-HBV transduzierten Tieren konnte mittels Southern-Blot Analyse am Tag 14 nicht nachgewiesen werden, wobei die PCR Ergebnisse zeigen (Abb. 2.16), dass die HBV-Replikation zu diesem Zeitpunkt noch höher war.

2.2.8 Einfluss der CD8+T-Zell Depletion auf die Immunantwort in Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäusen

Nach der Depletion der CD8+T-Zellen in C57Bl/6 wurde die Beteiligung der CD8+T-Zellen am Leberschaden in diesem Ad-HBV-Modell untersucht.

Die Genexpression der Zelloberflächenmarker CD4, CD8 und NK1.1 wurde in der Leber mittels quantitativer PCR bestimmt. Zusätzlich dazu wurden die relativen

Mengen an Zytokinen, wie IFN- γ , IL-10 und TGF- β , sowie von FoxP3 und dem PD-1 in der Leber bestimmt. Alle gemessenen Gene wurden zum „Housekeeping“-Gen GAPDH normalisiert.

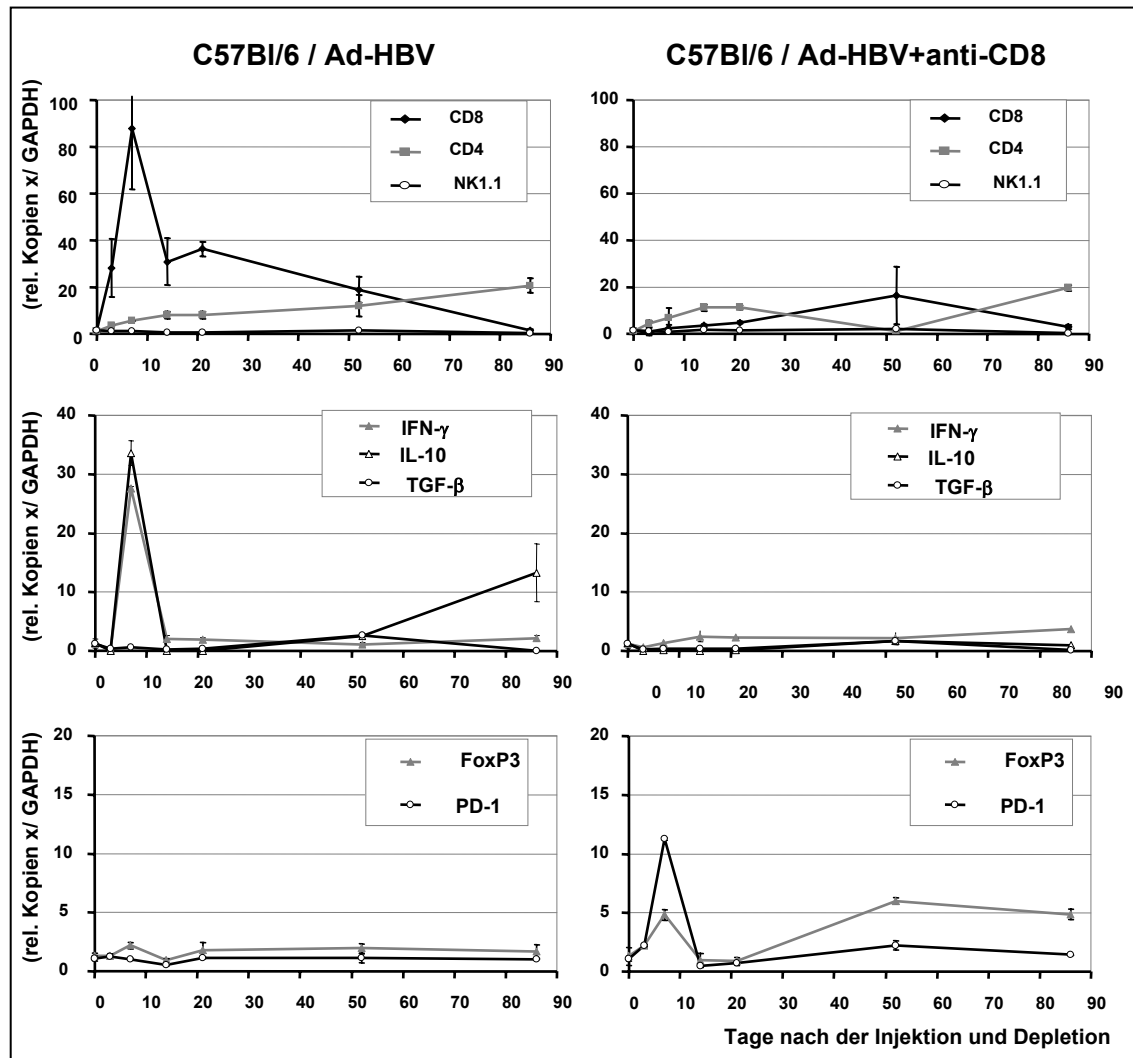


Abb. 2.18: Einfluss der CD8+T-Zell Depletion auf die Immunantwort in Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäusen

Je drei C57Bl/6 Tiere pro Gruppe wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV oder Ad-HBV/+anti-CD8 injiziert und in einer Zeitkinetik geopfert. Aus dem Lebergewebe der Mäuse wurde die Gesamt-RNA extrahiert und pro Gruppe gepoolt. Die CD8, CD4 und NK1.1- Genexpression, sowie die relativen Mengen an IFN- γ , IL-10, TGF- β , FoxP3 und PD-1 wurden relativ zu GAPDH mittels quantitativer PCR gemessen.

In allen Ad-HBV transduzierten Tieren wurde ein 87-facher Anstieg der CD8-Genexpression am Tag 7 nach der Injektion in der Leber beobachtet, während für CD4 und NK1.1 nur 5-fach erhöhte Werte ermittelt wurden. Der Anstieg der CD8-Genexpression am Tag 7 wurde von einer 27- und 33-fachen IFN- γ und IL-10

Sekretion begleitet, für TGF- β wurde keine Korrelation gefunden, die Werte blieben an der Detektionsgrenze. Dies bedeutet, dass nach einer Ad-HBV Injektion die CD8+T-Zellen parallel zum Anstieg der Transaminasenaktivität am Tag 7 in die Leber einwanderten, wobei zum zweiten Zeitpunkt des Anstiegs der Lebertransaminasen um den Tag 70, keine CD8-Genexpression gemessen wurde (Abb. 2.18 und Abb. 2.12). Nach der Depletion der CD8+T-Zellen in diesen Mäusen, wurde bis Tag 21 kaum CD8-Genexpression in der Leber gemessen und für CD4 und NK1.1 wurden konstante Werte um die Detektionsgrenze, ähnlich wie in Ad-HBV transduzierten Mäusen nachgewiesen (Abb. 2.18). Die Sekretion von IFN- γ , IL-10 und TGF- β wurde nach der CD8+ T-Zell Depletion komplett unterdrückt (Abb. 2.18).

FoxP3, als zuverlässigster Marker der CD4+/CD25+Treg-Zellen Marker, wurde verwendet, um die Menge der in die Leber eingewanderten Treg-Zellen zu bestimmen. In Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäusen mit depletierten CD8+T-Zellen wurde am Tag 7 ein 5-facher Anstieg von FoxP3 und ein 12-facher Anstieg von PD-1, einem negativen Regulator der T-Zell Aktivierung, in der Leber, beobachtet (Abb. 2.18).

In Ad-HBV transduzierten Mäusen mit aktiven CD8+T-Zellen wurde eine starke CD8-Genexpression mit einer hohen Sekretion an IFN- γ und IL-10, aber nur eine sehr geringe Expression von FoxP3 und PD-1 auf den T-Zellen beobachtet.

2.2.9 Einfluss der CD8+T-Zell Depletion auf die Immunantwort in Ad-HBV transduzierten CD1-k/o Mäusen

Die Beteiligung der CD8+T-Zellen und NK/NK-T-Zellen am Leberschaden wurde nach der Depletion der CD8+T-Zellen in CD1-k/o Mäusen untersucht. Dieser Mausstamm eignete sich optimal für die Durchführung dieser Experimente, da diese Mäuse aufgrund des ausgeschalteten CD1-Moleküls, keine aktiven NK-T-Zellen besitzen.

In allen Ad-HBV transduzierten CD1-k/o Mäusen wurde ein 30-facher Anstieg der CD8-Genexpression in der Leber am Tag 7 nach der Injektion beobachtet und wurde von einer 100- und 20-fachen IFN- γ und IL-10 Sekretion begleitet, wobei diese Werte unmittelbar danach wieder auf ihr Anfangsniveau abfielen. Für TGF- β wurden Werte um die Detektionsgrenze gemessen. Diese Ergebnisse in CD1-k/o Mäusen zeigen, dass nach einer Ad-HBV Injektion die CD8+T-Zellen parallel zum ersten Anstieg der Transaminasenaktivität am Tag 7 in die Leber einwanderten, wobei zum zweiten Zeitpunkt des Anstiegs der Lebertransaminasen am Tag 21, keine CD8-Genexpression und Sekretion von IFN- γ und IL-10 in der Leber mehr nachgewiesen wurde (Abb. 2.19

und Abb. 2.12). Nach der CD8+T-Zell Depletion blieb in Ad-HBV transduzierten CD1-k/o Tieren die CD8-Genexpression und die Sekretion von IFN- γ , IL-10 und TGF- β in der Leber für den kompletten Zeitverlauf unterdrückt. Der Verlauf der CD4- und NK1.1-Expression in der Leber war in Ad-HBV transduzierten CD1-k/o Mäusen mit oder ohne CD8+T-Zellen vergleichbar (Abb. 2.19).

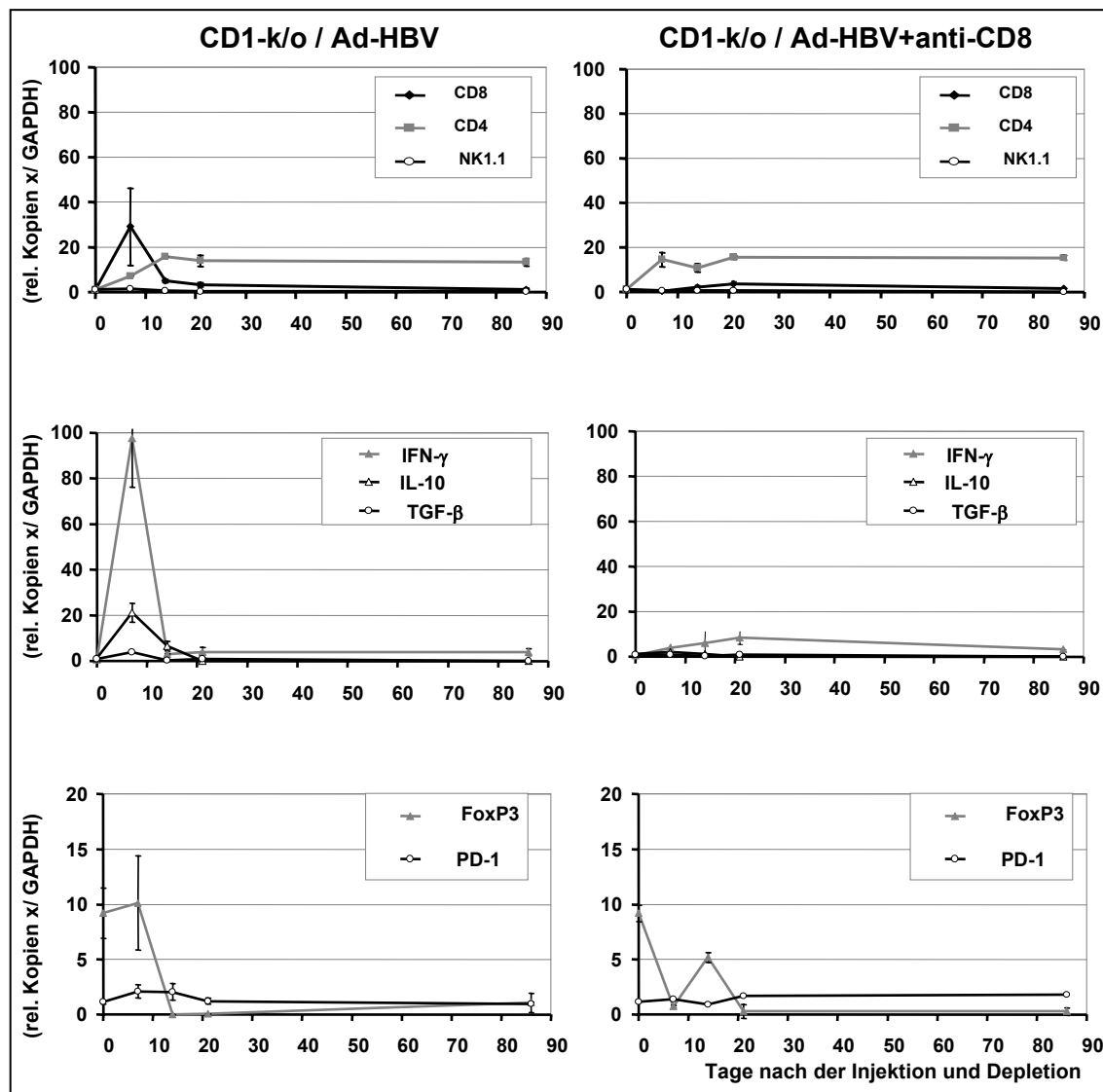


Abb. 2.19: Einfluss der CD8-T-Zell Depletion auf die Immunantwort in Ad-HBV transduzierten CD1-k/o Mäusen

Je drei CD1-k/o Tiere pro Gruppe wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV oder Ad-HBV/+anti-CD8 injiziert und in einer Zeitkinetik geopfert. Aus dem Lebergewebe der Mäuse wurde die Gesamt-RNA extrahiert und pro Gruppe gepoolt. Die CD8, CD4 und NK1.1- Genexpression, sowie die relativen Mengen an IFN- γ , IL-10, TGF- β , FoxP3 und PD-1 wurden relativ zu GAPDH mittels quantitativer PCR gemessen.

FoxP3, als Marker der Tregs, wurde schon am Tag Null in unbehandelten CD1-k/o Tieren nachgewiesen. Diese Anfangswerte hielten am Tag 7 in Ad-HBV transduzierten

CD1-k/o Mäusen an, mit einer anschließenden Reduktion und konstantem Verlauf am Detektionslimit. In CD1-k/o Mäusen mit depletierten CD8+T-Zellen wurde für FoxP3 ein gegensätzlicher Verlauf mit einer anfänglichen Reduktion am Tag 7 und einem erneuten Anstieg am Tag 14 in der Leber detektiert. In allen CD1-k/o Mäusen wurde kein Anstieg von PD-1 in der Leber beobachtet (Abb. 2.19).

2.3 HBV-spezifische CD8+ T-Zell Immunantwort im Ad-HBV Maus-Modell

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte die HBV-spezifische CD8+ T-Zell Immunantwort gegen zwei Peptide des kleinen viralen Oberflächenproteins S (S190-197; S208-215) und ein Peptid des HBV-Kapsid-(core) Proteins (C93-100) nach einer Ad-HBV und Ad-HBV-k/o Injektion in C57Bl/6 Mäusen untersucht werden. Diese S- und core-spezifische Epitope wurden vorher in Mäusen gut charakterisiert (Schirmbeck *et al.*, 2001). Voraussetzung für die Analyse der HBV-spezifischen CD8+T-Zell-Antwort war die Etablierung eines Stimulationsprotokolls zum Nachweis antigenspezifischer CD8+T-Zellen aus der Leber und Milz der Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäuse. Die anschließende Detektion der IFN- γ -produzierenden HBV-spezifischen CD8+T-Zellen wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (IFN γ Sekretion-Assay (Miltenyi Biotec)) durchgeführt. Anschließend wurde durchflusszytometrisch die IFN- γ -Produktion nach Peptidstimulation nachgewiesen.

Dazu wurden je drei zwölf Wochen alte C57Bl/6 Mäuse mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV oder Ad-HBV-k/o *i.v.* injiziert und in einer Zeitkinetik am Tag 7, 14, 24 und 70 nach der Injektion geopfert. Die HBV-spezifische CD8+T-Zellantwort wurde in Leber-assoziierten- sowie peripheren-Lymphozyten analysiert. Zusätzlich wurden Leberschaden anhand der Transaminasenaktivität und der Verlauf der Antigenämie (HBs-/HBe-Ag) im Serum nach der Ad-HBV und Ad-HBV-k/o Injektion überprüft.

2.3.1 Nachweis der HBV-spezifischen CD8+ T-Zellantwort nach der Ad-HBV Injektion

Leber-assoziierte-Lymphozyten (LAL) und Milzzellen wurden zum jeweiligen Zeitpunkt nach dem HBV-Genomtransfer isoliert und *in vitro* mit HBV-spezifischen S- und Core-Peptiden, sowie einem Kontroll-Peptid (OVA257-264) übernachtet stimuliert. Nach der Peptid-Stimulation wurde mittels INF- γ Sekretion-Assays die Anzahl der CD8+T-Zellen, die INF- γ sezernierten, quantitativ nachgewiesen. Für die durchflußzytometrische-Analyse wurden die murinen Milz- und LAL-

Einzellsuspensionen mit Maus-Antikörpern gegen die T-Zellmarker CD8 (CD8-FITC), sowie gegen IFN- γ (IFN- γ -PE) gefärbt. Nach Einstellung des Lymphozytengates für Milz und LALs – gesetzt nach Zellgröße und Granulationsgrad – wurden direkt vor Durchführung der Analyse in allen Proben tote Zellen mit je 1 μ l Propidiumiodid gefärbt und vor der Analyse ausgeschlossen. Anschließend wurden 50000 Ereignisse der vitalen Population aufgenommen.

Die Ergebnisse dieser Messungen zusammengefasst in Abbildung 2.19 zeigten, dass die HBV (S- und core-Peptid)-spezifischen CD8+T-Zellen in einem zweiphasigen Kurs parallel zum Leberschaden (Abb. 2.3) in die Leber der Ad-HBV, nicht aber in Ad-HBV-k/o transduzierten C57Bl/6 Mäusen einwanderten.

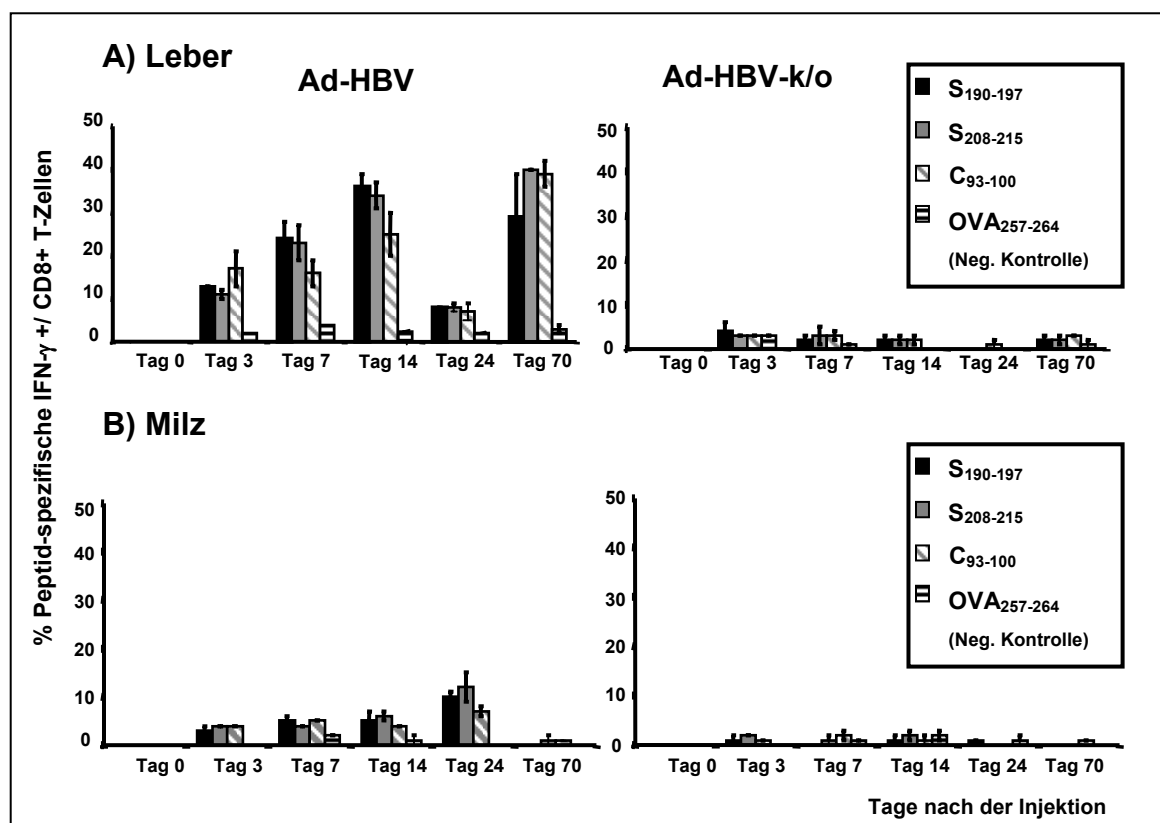


Abb. 2.20: Zeitkinetik der HBV-spezifischen CD8+ T-Zellantwort in der Leber und Milz nach dem HBV-Genomtransfer.

Je drei Tiere pro Gruppe wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV (links) oder Ad-HBV-k/o (rechts) injiziert. In einer Zeitkinetik wurde die HBV-spezifische CD8+ T-Zellantwort in der Leber (A) und in der Milz (B) gegen die HBV-Kapsid (core) (C93-100) und S-Protein (S190-197; S208-215) Peptide, sowie gegen das Kontroll-Peptid (OVA257-264) mittels IFN- γ Sekretion Assay analysiert.

Am Tag 7 und Tag 14, sowie am Tag 70 wurden HBV-peptid-spezifische CD8+/IFN- γ -produzierenden T-Zellen fast ausschließlich in der Leber detektiert (Abb. 2.20 A).

Am Tag 24 hingegen nahm der Anteil HBV-spezifischer T-Zellen an den LAL ab, und stieg in der Peripherie an. Außer am Tag 24 wurden nur wenige HBV-Peptid-spezifische CD8⁺ T-Zellen in der Milz der Ad-HBV transduzierten Tiere ermittelt (Abb. 2.20 B). Die CD8⁺ T-Zellantwort in LALs und Milzzellen der Ad-HBV-k/o transduzierten Tiere, sowie gegen das Negativ-Kontroll-Peptid OVA blieben in allen Mäusen auf Hintergrund-Niveau.

2.3.2 Nachweis der HBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort in Ad-HBV und Ad-HBV-k/o transduzierten OT-I-transgenen (tg) Mäusen

Um herauszufinden, welcher Anteil der CD8⁺T-Zellantwort in diesem Ad-HBV Maus-Modell gegen das Adenovirus gerichtet ist, wurden OT-I-tg Mäuse benutzt. Dieser Mausstamm ist transgen für einen T-Zellrezeptor (TCR), der das Peptid OVA257-264 (SIINFEKL) im Kontext von MHC-Klasse-I H2-K^b erkennt. So konnte ein Ovalbumin-exprimierender adenoviraler-Vektor (Ad-OVA), als Positiv-Kontrolle verwendet werden.

Je drei OT-I Mäuse wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV oder Ad-HBV-k/o *i.v.* injiziert und am Tag 3 und Tag 7 nach der Injektion geopfert. Die LALs und Milzzellen wurden zum jeweiligen Zeitpunkt nach dem HBV-Genomtransfer isoliert und *in vitro* übernacht stimuliert. Da bis jetzt kein H2-K^b- oder H2-K^d-Peptid spezifisch für Adenoviren charakterisiert wurde, wurde für die Stimulation der murinen LALs und Milzzellen eine murine-K^b-positive-Zelllinie C57, die ursprünglich von C57Bl/6 Mäusen abstammt, benutzt. Die murinen C57-Zellen wurden vorab entweder mit Ad-HBV, Ad-HBV-k/o oder Ad-OVA infiziert und für die Stimulation der aus Ad-HBV und Ad-HBV-k/o transduzierten OT-I Mäusen isolierten LALs und Milzzellen benutzt. Als Negativ-Kontrolle wurden bei jeder Stimulation uninfizierte murinen C57-Zellen benutzt (Abb. 2.20 A).

Nach der *in vitro* Stimulation wurden mittels INF- γ Sekretion Assays und durchflußzytometrischen-Analyse die INF- γ +/CD8⁺ T-Zellen in der Leber und in der Milz quantitativ nachgewiesen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Analysesoftware *FlowJo*.

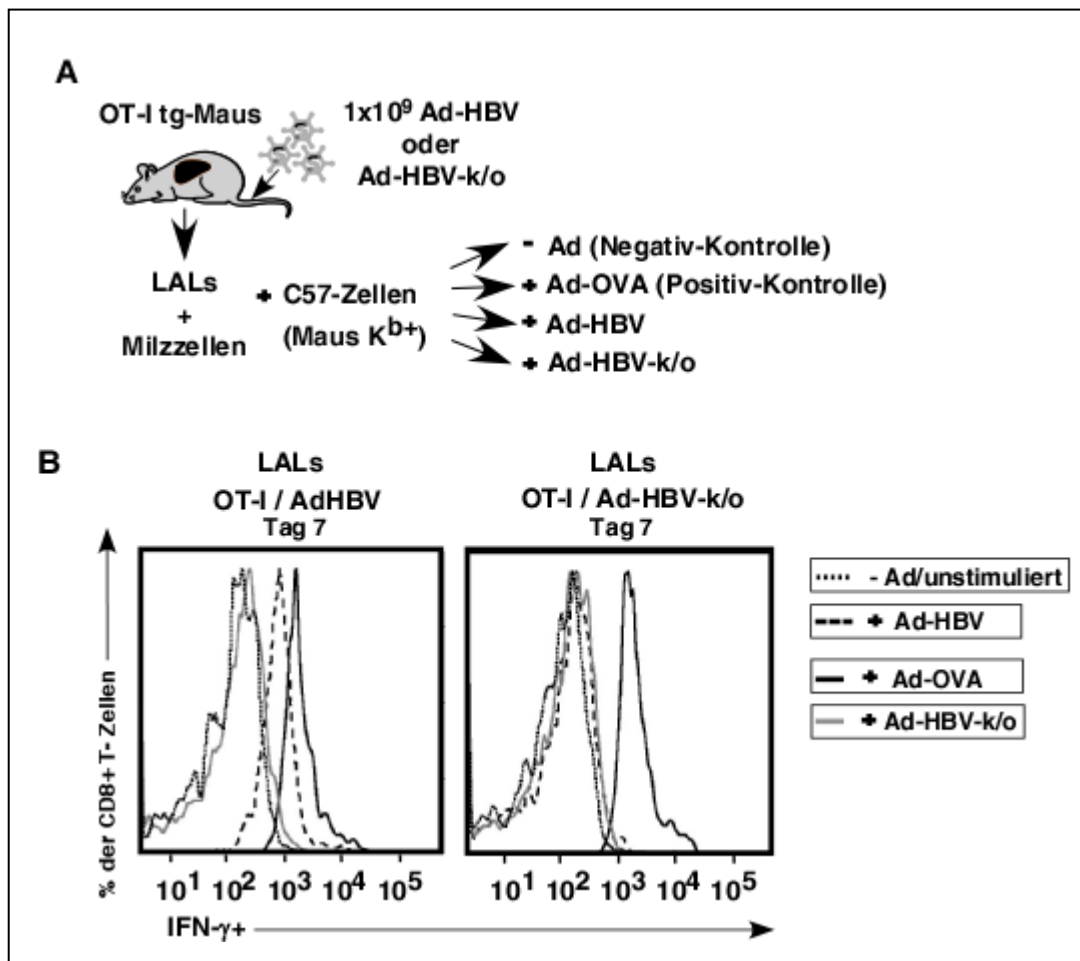


Abb. 2.21: Nachweis der HBV- und nicht Adenovirus-spezifischen CD8+T-Zell-antwort in Ad-HBV und Ad-HBV-k/o transduzierten OT-I Mäusen.

A) Je drei OT-I Mäuse wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV oder Ad-HBV-k/o *i.v.* injiziert und am Tag 3 und Tag 7 nach der Injektion geopfert. Die LALs und Milzzellen wurden zum jeweiligen Zeitpunkt nach dem HBV-Genomtransfer isoliert und *in vitro* mit entweder Ad-HBV, Ad-HBV-k/o oder Ad-OVA infizierten murinen- K^b -positiven C57-Zellen stimuliert. Als Negativ-Kontrolle wurden bei jeder Stimulation uninfizierte murinen C57-Zellen benutzt. B) Nach der *in vitro* Stimulation wurden mittels INF- γ Sekretion Assays und durchflußzytometrischen-Analyse die INF- γ + / CD8+ T-Zellen in der Leber quantitativ nachgewiesen.

Ich konnte zeigen, dass alle T-Zellen OVA-spezifisch aktivierbar waren. Das war zu erwarten, da es sich um TCR-transgene T-Zellen handelt, und dies wurde daher als Positiv-Kontrolle genutzt. Am Tag 7 nach der Injektion von Ad-HBV oder Ad-HBV-k/o reagierten die LALs der OT-I Mäuse weder gegen Ad-HBV-k/o noch gegen uninfizierte C57-Zellen mit einer IFN- γ -Sekretion von CD8+T-Zellen. Nur in LALs Ad-HBV transduzierter OT-I Mäuse wurden IFN- γ -produzierende CD8+ T-Zellen und das nur nach Stimulation mit Ad-HBV infizierten C57-Zellen nachgewiesen (Abb. 2.21 B). Die CD8+T-Zellantwort in den Milzzellen der Ad-HBV oder Ad-HBV-k/o

transduzierten Tiere blieb in allen Mäusen auf Hintergrund-Niveau. Mit diesen Ergebnissen wurde nachgewiesen, dass die CD8⁺T-Zellantwort in diesem Ad-HBV Maus-Modell vorwiegend HBV- und nicht Adenovirus-spezifisch ist.

3 Diskussion

Eine chronische HBV-Infektion ist mit einem hohen Risiko verbunden, eine Leberzirrhose zu entwickeln oder - selbst nach symptomarmem Verlauf - an einem primären Leberzellkarzinom zu erkranken (WHO 2000). Eine chronische Infektion etabliert sich nach 3-5 % der Infektionen im Erwachsenenalter und in ungefähr 90-95% nach der neonatalen Infektion, bei der das Virus meist von der Mutter auf ihr Kind, d.h. vertikal, übertragen wird. Weltweit ist die vertikale Transmission für die meisten chronischen Infektionen verantwortlich (Ganem *et al.*, 2001; Ganem *et al.*, 2004).

Die aktuellen Therapiemöglichkeiten der chronischen Hepatitis B umfaßt das IFN- α das immunstimulatorisch, aber auch direkt antiviral wirkt, sowie verschiedene Inhibitoren der viralen reversen Transkriptase. Dadurch wird die HBV-Replikation zwar unterdrückt, es kommt aber nur in 1-5% der Fälle zu einer vollständigen Eliminierung der Infektion (Ganem und Prince, 2004). Das große Problem bei der Entwicklung neuer, alternativer Therapieansätze ist das Fehlen geeigneter Modelle für das Studium der HBV-Infektion. Eine wichtige Charakteristik von HBV und allen seinen Verwandten ist, dass sie ein sehr enges Wirtsspektrum und einen hohen Lebertropismus besitzen. HBV infiziert nur Hominoides (d.h. Menschenaffen oder den Menschen selbst), und evtl. mit sehr geringer Effizienz Tupaias, kleine, niedrige Primaten. Diese Infektion ist jedoch selbst limitierend und führt nicht zur Etablierung einer chronischen Infektion (Walter *et al.*, 1996). Dem HBV verwandt sind u.a. das DHBV, das Pekingenten infiziert, und das WHV, das Waldmurmeltiere infiziert. Das Enten- und vor allem das Waldmurmeltier-Modell dienen als Ersatz für ein HBV-Infektionsmodell, um molekularbiologische Untersuchungen durchzuführen, aber auch, um neue Therapiestrategien zu testen. Beide Modelle erlauben aber nur die Infektion neugeborener Tiere sowie primärer Hepatozyten in Zellkultur. Das einzige vollwertige Tiermodell für das Studium der HBV Infektion sind Schimpansen. In Schimpansen wurden verschiedene Analysen der immunologischen Vorgänge in der Frühphase einer akuten Infektion durchgeführt (Barker *et al.*, 1975). Ebenfalls wurde in diesem Modell die Rolle der T-Zellantwort für den Verlauf einer akuten Infektion beschrieben (Thimme *et al.*, 2003). Da die Verwendung von Schimpansen als Versuchstiere ethisch problematisch und zudem mit sehr hohen Kosten verbunden ist, werden sie als Modellsystem nur sehr eingeschränkt verwendet. Peking-Enten und Waldmurmeltiere sind als Versuchstiere allerdings auch problematisch, da ihre Haltung sehr aufwendig ist und es sich um Wildfänge bzw. unkontrollierte Zuchten handelt. Zudem sind sie

genetisch nicht vollständig definiert, und viele molekularbiologische und immunologische Untersuchungs-Methoden fehlen. Für immunologische Untersuchungen sind beide Modelle deshalb nur sehr eingeschränkt geeignet.

Um die Immunpathogenese und den Verlauf der Hepatitis B-Erkrankung besser verstehen und damit ggf. auch die Therapie der chronischen HBV-Infektion verbessern zu können, ist ein geeignetes Tiermodell für das Studium von Hepatitis B unbedingt erforderlich. Als attraktives Modell für die *in vivo* Analyse der HBV-Infektion und -Therapie bietet sich die Maus an, deren Haltung einfach ist und deren Genom vollständig sequenziert ist.

Da Mäuse mit HBV nicht infiziert werden können, weil sie die bisher unbekanntenen HBV-Rezeptoren nicht tragen, wurden HBV-transgene Mäuse generiert (Guidotti *et al.*, 1995). Mit diesem Modell wurden große Fortschritte beim Verständnis der Immunologie der HBV-Infektion erzielt und außerdem zahlreiche Faktoren beschrieben, die die HBV-Replikation beeinflussen (Guidotti und Chisari, 2001). Allerdings hat dieses Modell einen Nachteil. Die HBV-transgenen Tiere sind dem HBV gegenüber tolerant, da es nicht als erworbenes pathogenes Agens vorliegt, sondern als Transgen vererbt wird. Außerdem können die HBV-Genome nicht eliminiert werden, da sie in das Genom integriert sind und sich kein cccDNA Pool ausbildet. Unabhängig von der Ausbildung eines cccDNA-Pools kann in den Leberzellen eine normale Virusreplikation stattfinden (Guidotti *et al.*, 1995). Damit handelt es sich um ein gutes HBV-Replikations- aber nicht um ein Krankheitsmodell für die Hepatitis B.

Vor kurzem wurde ein anderes Modell beschrieben, in dem man humane Hepatozyten in immundefiziente Mäuse transferiert, die anschließend mit HBV infiziert werden können (Dandri *et al.*, 2001, Ohashi *et al.*, 2000). Dieses Modell erlaubt zwar antivirale Therapie-Strategien und sogenannte „Entry“-Inhibitoren zu untersuchen, aber aufgrund der fehlenden spezifischen Immunantwort jedoch keine Studien der Immunologie oder der Immunpathogenese der HBV-Infektion.

Da bis jetzt über die hepadnaviralen Rezeptoren, die für den Eintritt des Virus in die Wirtszelle notwendig sind, nichts bekannt ist, wurden mehrere Methoden beschrieben, wie man HBV-Genome in die Leber adulter Mäuse transferieren und damit eine spezifische Immunantwort induzieren kann. Eine Möglichkeit stellt die Transfektion von Hepatozyten nach Hydrodynamischer Injektion von DNA dar (Yang *et al.*, 2002). In dieser Studie wurde gezeigt, dass die hydrodynamische Injektion replikationsfähiger HBV-DNA eine akute Hepatitis B in der Maus imitiert, wenn man sehr schnell ein

großes Volumen an Plasmid-DNA *i.v.* injiziert. Damit muss man allerdings einen zusätzlichen initialen Leberschaden schon am ersten Tag nach der Injektion in Kauf nehmen, mit einem kurzen, auf sieben Tage limitierten Verlauf der HBV-Replikation (Yang *et al.*, 2002). Dieser kurze Verlauf der HBV-Replikation stellt generell einen wesentlichen Nachteil dieser Methode dar. Kürzlich wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass auch Adeno-assoziierte-virale (AAV)-basierte Plasmide für den Transfer von HBV-DNA in die Leber der Maus geeignet sind. Ziel dieser Studie war es, mittels hydrodynamischer Injektion von replikations-kompetenter pAAV-HBV-DNA ein neues Modell für die HBV-Infektion in immunkompetenten C57Bl/6 Mäusen (H-2^b Haplotyp) und BALB/c (H-2^d Haplotyp) Mäusen zu etablieren. Diese Studie zeigte, dass die hydrodynamische Injektion von pAAV/HBV-1.2 in den immunkompetenten C57Bl/6 Mäusen in einer persistierenden HBV-Infektion für mehr als ein Jahr resultierte, nicht aber in BALB/c Mäusen (Huang *et al.*, 2006). Wenn die HBV-DNA in ein anderes Vektorsystem überführt wurde, wurden nach 28 Tagen Anti-HBs-Antikörper im Serum der Mäuse nachgewiesen, was für die Ausheilung der Hepatitis spricht. Die Autoren vermuten, dass nicht nur der genetische Hintergrund einer Maus, sondern auch die Wahl eines Viralen-Vektors (AAV) einen Einfluss auf die Kontrolle der HBV-Infektion hat (Huang *et al.*, 2006).

In mehreren Studien, unter anderem von unserer Gruppe wurde die Verwendung adenoviraler-HBV-Vektoren (Ren und Nassal, 2001; Sprinzl *et al.*, 2001) beschrieben. Adenovirale-Vektoren sind in hohen Mengen bis zu 5×10^{10} Infectious Units (i.u./ml) produzierbar, können Transgene von 7-8 kb tragen und ermöglichen eine effiziente Transduktion von Hepatozyten *in vitro* und *in vivo* (Ballay *et al.*, 1995; Karlsson *et al.*, 1985; Li *et al.*, 1993). Die Infektion der Hepatozyten kommt einer natürlichen Infektion sehr nahe, da Adenoviren die DNA nicht stabil ins Wirtsgenom einbauen und die Replikation von einer extrachromosomalen Matrize aus stattfindet. Der adenovirale HBV-Genomtransfer ist für die Imitation einer akuten Infektion geeignet, da dieser *in vivo* erlaubt, eine definierte Menge an HBV-Genom episomal und mit hoher Effizienz und Reproduzierbarkeit in die Leber von Versuchstieren zu transferieren. Dort replizieren sie effizient und bewirken die Bildung von Anti-HBs Antikörpern als Zeichen für eine HBV-spezifische Immunantwort (Sprinzl *et al.*, 2001, Isogawa *et al.*, 2005).

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe des adenoviralen HBV-Genomtransfers ein Krankheitsmodell der akuten Hepatitis B in C57Bl/6 Mäusen zu etablieren. In einer

Zeitkinetik wurde der Verlauf und die Pathogenese der akuten HBV-Infektion, sowie Faktoren, die diesen beeinflussen und die damit verbundene zelluläre und HBV-spezifische Immunantwort näher analysiert.

3.1 Das Ad-HBV Maus-Modell als Krankheitsmodell der akuten Hepatitis B

Für die Etablierung des Ad-HBV Maus-Modells in vollständig immunkompetenten C57Bl/6 Mäusen wurden in dieser Arbeit zwei adenovirale Vektoren der ersten Generation verwendet, die 1,3-fache Überlängengenome des HBV enthalten und HBV leberspezifisch replizieren. Mit dem Ad-HBV Vektor wurde eine akute, selbstlimitierende Hepatitis in diesem Mausmodell imitiert. Der Ad-HBV-k/o Vektor, in dem alle Gene im 1,3-fachen Überlängen-Genom des HBV ausgeschaltet sind, diente als Kontrollvektor (Abb. 2.1). Die Herstellung und Aufreinigung der hochtitrigen adenoviralen Vektoren, ebenso wie die Dosierung der adenoviralen Vektoren hinsichtlich einer guten Verträglichkeit und geringen Toxizität und *i.v.* Injektion dieser Vektoren wurden weitgehend vor Beginn dieser Arbeit in der Gruppe etabliert (Sprinzl *et al.*, 2001; Sprinzl *et al.*, 2004; Oberwinkler *et al.*, 2005). Experimente in dieser Arbeit bewiesen, dass die adenoviralen Vektoren einen Dosis-abhängigen Transfer der HBV-Genome erlauben und sich ideal für das Studium des Verlaufs der akuten HBV-Infektion in der Maus eignen. Da es mit einer Injektionsdosis von 1×10^9 i.u. möglich war, 80-90% der Hepatozyten einer Maus bei geringen Nebenwirkungen zu transduzieren und eine HBV-Replikation zu etablieren, wurde diese, als die optimale Dosis für die *i.v.* Injektion der Mäuse bestimmt. Um die Toxizität und die angeborene Immunantwort gegen die adenoviralen Vektoren zu begrenzen, war es sehr wichtig, diese vor der Injektion sorgfältig mittels CsCl-Gradienten und einer anschließenden Dialyse zu reinigen und so genau wie möglich zu titrieren.

3.1.1 Verlauf der Leberentzündung

Der klinische Verlauf einer HBV-Infektion ist hochvariabel. Sie kann asymptomatisch verlaufen oder sich klinisch als entzündliche Lebererkrankung manifestieren, die mit einer Leberzellschädigung einhergeht. Man spricht dann von einer Hepatitis B. Diese zeigt sich in einer Erhöhung der Transaminasenaktivität im Serum und/oder typischen histologischen Lebergewebsveränderungen (Ganem und Prince, 2004). Bei einer natürlichen HBV-Infektion beginnen etwa fünf bis 15 Wochen nach der Primärinfektion die Konzentrationen von Alaninaminotransferase im Serum anzusteigen, was eine akute Leberentzündung und Leberschädigung durch die einsetzende adaptive Immunantwort

anzeigt, wobei in ca. 90 % der Fälle die akute Infektion durch Bildung spezifischer Antikörper ausgeheilt wird.

Daher wurde als erstes Indiz einer akuten HBV-Infektion in diesem Maus-Modell das leberspezifische Enzym Alaninaminotransferase bestimmt. Seine Aktivität im Blut ist als ein hochspezifischer Marker für die Leberzellschädigung (Chisari *et al.*, 1989). In diesem Ad-HBV Maus-Modell zeigte sich ein zweiphasiger Verlauf des Leberschadens, mit Anstieg der Transaminasenaktivität im Blut am Tag 6 und am Tag 76 nach der Ad-HBV Injektion, wobei in Ad-HBV-k/o transduzierten Tieren nur am Tag 6 ein leichter Anstieg ermittelt wurde (Abb. 2.3). Als akute Hepatitis wird in der Literatur eine Entzündung der Leber, die durch eine variable Kombination von rundzelliger, vorwiegend lymphozytärer entzündlicher Infiltration, hepatozellulärer Schädigung, sowie Regeneration der Hepatozyten charakterisiert. Unabhängig von den klinischen und serologischen Werten kann die Diagnose einer Hepatitis (d.h. einer manifestierten Leberentzündung) nur dann gestellt werden, wenn ein hepatozellulärer Zellschaden oder zumindest eine adäquate entzündungszellige Infiltration nachzuweisen ist. Der alleinige Nachweis von HBV-DNA oder Antigenen sichert lediglich die virale Infektion, ist jedoch für die Diagnose einer Hepatitis nicht ausreichend. Aufgrund dieser Definition einer akuten Hepatitis B Erkrankung wurde das Lebergewebe der Ad-HBV und Ad-HBV-k/o transduzierten Mäuse histopathologisch untersucht. In diesem Ad-HBV Maus-Modell konnten die typischen Zeichen einer akuten Hepatitis mit Einzelzellnekrosen und ausgeprägten portalen lymphozytären Infiltraten bei den Ad-HBV-Tieren am schwersten am Tag 6 nachgewiesen werden, was mit dem Anstieg der Lebertransaminasen korrelierte. Am Tag 76 wurde der zweite Anstiegs der Transaminasenaktivität im Serum der Ad-HBV transduzierten Tiere beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Tiere nur geblutet, aber nicht geopfert. Deshalb konnte zu diesem Zeitpunkt das Lebergewebe histopathologisch nicht untersucht werden. Zu späteren Zeitpunkten am Tag 86 nach der Injektion war nur eine milde und am Tag 100 gar keine akute Hepatitis mehr sichtbar (Tab. 1). Dies korrelierte mit der niedrigen Transaminasenaktivität im Serum zu diesen Zeitpunkten. In den Kontrolltieren, die mit Ad-HBV-k/o transduziert wurden, waren die entzündlichen Veränderungen nur sehr gering ausgeprägt. Man konnte eindeutig beweisen, dass die Ad-HBV Infektion eine Hepatitis auslöste, die dem Bild einer natürlichen akuten Hepatitis B entsprach.

3.1.2 Verlauf der HBV-Transkription

Die adenoviralen HBV-Vektoren dienen in der Leber der transduzierten Tiere als Transkriptions-Matrizen für die Transkription der HBV-RNAs. Durch die Northern-Blot-Analyse wurde der Nachweis für die HBV-Transkription in diesem Ad-HBV Maus-Modell gezeigt. Die Quantifizierung der prägenomischen (3,5 kb) und subgenomischen (2,1 kb) HBV-RNAs zu GAPDH zeigte, dass am Tag 6 und zwischen Tag 14 und Tag 34 erhöhte Mengen an viralen Transkripten in der Leber der Ad-HBV transduzierten Mäuse vorhanden waren. Ab dem Tag 34 fielen die Mengen der prägenomischen und subgenomischen HBV-RNAs ab, waren aber bis zum Tag 100 in allen gepoolten Leberproben der Ad-HBV transduzierten Tieren nachweisbar (Abb 2.7). Die Überprüfung der Ad-DNA im Lebergewebe mittels quantitativer PCR ergab eine vergleichbare Effizienz des Leber-Targetings für beide adenoviralen Vektoren, mit einem konstanten Abfall von Tag 3 bis zum Tag 44 nach der adenoviraler Injektion (Abb. 2.8). Dies war ein Zeichen für die langsame Eliminierung der Adenovirus-transduzierter Hepatozyten. Trotz dieses Abfalls wurden mit der Northern-Blot Analyse die HBV-Transkripte bis zum Tag 100 in der Leber der Ad-HBV transduzierten Tiere nachgewiesen. Dieser lang anhaltende Verlauf der HBV-Transkription zeigt noch mal einen wesentlichen Unterschied und Vorteil zum HBV-Transfer nach einer hydrodynamischen Injektion. Bei dieser wurden die HBV-RNAs nur für 10 Tage nachgewiesen (Yang *et al.*, 2002).

3.1.3 Expression der HBV-Antigene

Um den Verlauf der Hepatitis B Erkrankung in diesem Modell näher zu charakterisieren, wurden HBeAg und HBsAg bestimmt. Dies sind wichtige serologische Marker, die sowohl während einer akuten als auch einer chronischen HBV-Infektion im Blut nachweisbar sind (Takahashi *et al.*, 1976). HBeAg ist ein Protein, das von HBV-infizierten Zellen sekretiert wird. Es wird von der prägenomischen RNA aus translatiert (Jean-Jean *et al.*, 1989) und gibt Aufschluss über die Transkriptionsaktivität der cccDNA. Die Funktion des HBeAg wurde bis jetzt nicht ganz geklärt. Es wurde jedoch beschrieben, dass HBeAg eine Tarnfunktion haben könnte, da gegen dieses Protein hohe Antikörpermengen gebildet werden (Penna *et al.*, 1991). Der Nachweis von HBeAg ist auch als Hinweis auf eine aktive Verlaufsform der Infektion mit hoher Virämie zu werten.

HBsAg, das aus den viralen Hüllproteinen S, M und L besteht, wird im Gegensatz zu HBeAg von subgenomischen RNAs translatiert. Es wird in Form viraler und subviraler Partikel sekretiert (Gavilanes *et al.*, 1982). Möglicherweise fangen die subviralen Partikel, deren Konzentrationen die der infektiösen Dane-Partikel um ein vielfaches übersteigen, die neutralisierende Antikörper ab (Rehermann und Nascimbeni, 2005). Anti-HBs sind die Antikörper gegen das HBsAg. Sie haben *in vitro* und *in vivo* neutralisierende Eigenschaften und schützen so vor einer Infektion. Die Anti-HBs Antikörper gelten als Marker der Ausheilung und der Immunität gegen HBV.

In diesem Modell wurden HBeAg und HBsAg am Tag 3 und Tag 6 in allen Ad-HBV transduzierten Tieren nachgewiesen, mit einem konstanten Abfall bis zum Tag 34. Dies entspricht dem normalen Verlauf einer Infektion, die durch das Immunsystem erfolgreich bekämpft wird und bei der sezernierte Antigene durch zunehmende Mengen an Antikörpern neutralisiert werden. Ab dem Tag 34 wurde in Ad-HBV transduzierten Tieren eine HBsAg/anti-HBs-Serokonversion beobachtet. Der Nachweis von Antikörpern gegen das HBsAg (anti-HBs) bedeutet beim Menschen die serologische Ausheilung der Infektion und ist meist zwei bis sechs Wochen nach Verschwinden des HBsAg im Serum nachweisbar. In den Ad-HBV-k/o transduzierten Kontroll-Mäusen konnten weder HBe-Ag, HBs-Ag noch anti-HBs-Antikörper im Serum nachgewiesen werden (Abb. 2.5).

Ein Marker für die Höhe der HBV-Replikation und damit für das Maß der Infektiosität, ist die Virämie. Dafür wird die HBV-DNA im Serum mittels quantitativer PCR gemessen. Die HBV-DNA kann bei Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis B nachgewiesen werden und dient bei akuten Infektionen als zusätzlicher Marker der Ausheilung. Bei chronischen Infektion wird HBV-DNA gemessen um die Infektiosität des Patienten und die Therapieplanung zu bestimmen. Bei den Ad-HBV transduzierten Tieren war am Tag 3 und Tag 6 eine HBV-Virämie mit 1×10^7 HBV-DNA Kopien/ml nachweisbar, die am Tag 8 abfiel und mit einem Anstieg auf 1×10^5 HBV-DNA Kopien/ml am Tag 14 relativ konstant bis zum Tag 86 persistierte, bevor sie komplett verschwand (Abb. 2.6). In den Ad-HBV-k/o transduzierten Tieren wurden zwischen Tag 21 und Tag 44 Werte um die Nachweisgrenze der Virämie (10^3 Kopien/ml) gemessen (Quint *et al.*, 1995) und wurden dadurch als negativ betrachtet, wobei es hier um eine Kontamination der Proben handeln könnte.

3.1.4 Verlauf der HBV-Replikation

Die Replikation von HBV erfolgt aufgrund des strengen Lebertropismus ausschließlich in den Hepatozyten des Wirtsorganismus, allerdings ist hier im Gegensatz zur retroviralen Replikation keine Integration der DNA in das Wirtsgenom zu beobachten (Ganem und Schneider, 2001). Der Verlauf des Replikationszyklus wurde aufgrund des Fehlens einer Zelllinie, die mit HBV infizierbar ist, hauptsächlich im DHBV System studiert (Cooper *et al.*, 2003). Nach Eintritt in die Zelle wird das DNA-enthaltende Kapsid ins Zytoplasma entlassen und transloziert zum Nukleus (Bock *et al.*, 1996). Im Zellkern wird der unvollständige DNA-Strang durch die Wirtzeigene Polymerase vervollständigt und so entsteht ein zirkulär geschlossener DNA-Doppelstrang (cccDNA). Die cccDNA persistiert im Nukleus der Wirtszelle und da ihr ein Replikationsstartpunkt fehlt, wird das virale Genom ausschließlich durch die reverse Transkription und den Reimport vervielfältigt (Tuttleman *et al.*, 1986). Die cccDNA dient im Zellkern der Wirtszelle als Matrize für die Synthese aller viraler Transkripte, die in virale Proteinproduktion und Replikation involviert sind (Werle-Lapostolle *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu diesem natürlichen Infektionsverlauf konnte gezeigt werden, dass die HBV-transgenen Mäuse keine episomale cccDNA im Zellkern etablieren (Chisari *et al.*, 1985).

Durch den außergewöhnlichen Replikationszyklus des HBV liegen in infizierten Zellen verschiedene DNA-Formen des HBV-Genoms. Innerhalb des Zellkerns liegt es als doppelsträngige cccDNA vor. In den Virionen findet man hingegen die partiell doppelsträngige rcDNA. Direkt nach der reversen Transkription kann man in den Kapsiden einzelsträngige ssDNA finden (Nassal und Schaller, 1993). In HBV-transgenen Mäusen befindet sich zusätzlich das HBV-Integrat im Genom der Wirtszellen (Chisari *et al.*, 1985).

In diesem Ad-HBV Maus-Modell wurde die HBV-Replikation früh nach der Injektion mit Ad-HBV unterdrückt, obwohl ausreichende prägenomische RNA vorhanden war. Vom Tag 10 an stieg die HBV-Replikation an, bevor sie am Tag 34 aufhörte. In Ad-HBV-k/o transduzierten Tieren wurde dagegen keine HBV-Replikation nachgewiesen (Abb. 2.8). Eine andere Nachweis-Methode der HBV-Replikation, die Southern-Blot-Analyse, bietet den Vorteil, dass die verschiedenen HBV-DNA Moleküle (rcDNA und ssDNA) aufgrund ihrer Größe und der daraus resultierenden Wanderungsgeschwindigkeiten während der Gelelektrophorese unterscheidbar und direkt miteinander vergleichbar sind. Obwohl die Literatur sagt, dass man mittels

Southern-Blot Analyse schon 0,1 pg HBV-DNA nachweisen kann, was der DNA von 30.000 Viruspartikeln entspricht (Schaefer *et al.*, 1993), war es mir nach mehrmaligen Wiederholen des Southern-Blots mit 40 µg Leber-DNA nicht möglich, bei den Ad-HBV transduzierten Mäusen die rc- und ssDNA zu detektieren. Erst als CD8+T-Zellen durch Antikörper blockiert wurden, gelang der Nachweis mittels Southern-Blot Analyse. Das lässt uns vermuten, dass T-Zellen zum Teil durch die Sekretion von IFN- γ die HBV-Replikation kontrollieren.

3.1.5 Charakterisierung der Immunantwort

Daher versuchte ich zu zeigen, inwieweit eine Immunantwort in diesem Ad-HBV Maus-Modell induziert wurde, welche Zellen des Immunsystems daran beteiligt waren und in die Leber einwanderten und die Kontrolle der HBV-Replikation begleiteten. Dafür wurde die CD8, CD4 und NK1.1-Genexpression und IFN- γ , IL-10 und TNF- α Sekretion in der Leber zu jeweiligen Zeitpunkten nach der adenoviralen Injektion analysiert.

Es ist bekannt, dass die Entwicklung des Infektionsverlaufes stark von der Immunantwort des Wirts abhängig ist. Die zytotoxische T-Zellantwort des Wirts wird sowohl für die Elimination des Virus als auch für die entzündliche Schädigung der Leber bei der persistierenden HBV-Infektion verantwortlich gemacht. Während der Infektion der Walddarmtiere mit WHV wurde gezeigt, dass die Klärung der Infektion in den erwachsenen Tieren mit einer erhöhten intrahepatischen Expression von IFN- γ und TNF- α und der T-Zell-Infiltration in der Leber begleitet wurde (Hodgson *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2001). Für CD8+T-Zellen in HBV-infizierten Schimpansen wurde gezeigt, dass diese die Hauptfunktion bei der Kontrolle der akuten HBV-Infektion haben (Thimme *et al.*, 2003). Interessanterweise haben Experimente mit HBV-replizierenden transgenen Mäusen und Schimpansen eindeutig zeigen können, dass inflammatorische Zytokine die virale Replikation durch nicht-zytolytische immunvermittelte Prozesse supprimieren können. Auf der anderen Seite belegen histologische Untersuchungen eindeutig Leberzelltod und Regeneration in transient und chronisch HBV-infizierten Lebern und suggerieren, dass eine vollständige Eliminierung von HBV die Destruktion eines bislang unbekanntem Anteils an infizierten Hepatozyten durch die Immunantwort voraussetzt (Guidotti *et al.*, 1999; Guidotti *et al.*, 2001; Wieland *et al.*, 2004). Ebenfalls wurde gezeigt, dass die HBV-Replikation zuerst durch nicht-zytolytische Mechanismen gesteuert wird, bevor die infizierten Zellen durch

zytolytische CD8+T-Zellen beseitigt werden. Dieser zweiphasige Verlauf der Elimination des Virus bei CD8+T-Zellen könnte notwendig sein, um die Leberentzündung und Gewebeschädigung während der HBV-Elimination bei einer akuten Infektion zu begrenzen (Thimme *et al.*, 2003; Murray *et al.*, 2005). Die in diesem Ad-HBV Maus-Modell gezeigte zweiphasige Leberentzündung der Mäuse könnte durch einen ähnlichen Mechanismus funktionieren, da die histopathologischen Untersuchungen eine deutliche initiale und später, zum Zeitpunkt der zweiten Erhöhung der Lebertransaminasenaktivität milde bis mäßige Zeichen einer akuten Hepatitis belegen.

Bei Isogawa *et al.*, wurde 2005 gezeigt, dass CD8+T-Zellen nach einer Ad-HBV Injektion sehr schnell und gezielt in die Leber einwandern, wo sie direkt IFN- γ exprimieren. Diese Ergebnisse stimmten mit dem gezeigten Verlauf der Immunantwort in diesem Ad-HBV Maus-Modell überein. Es fand sich eine eindeutige Zunahme an CD8-Genexpression im Lebergewebe, mit Expression von IFN- γ , IL-10 und TNF- α am Tag 6 in der Leber der Ad-HBV transduzierten Tiere, was Einwandern der CD8+ T-Zellen in die Leber anzeigt. Dies korrelierte genau mit dem Zeitpunkt des Anstiegs der Lebertransaminasen im Blut und mit der frühen Unterdrückung der HBV-Replikation. Zu diesen Zeitpunkten war die CD4-Genexpression nur sechsfach und NK1.1-Expression zweifach erhöht. Zum Zeitpunkt der maximalen HBV-Replikation wurde die niedrigste IFN- γ , TNF- α und IL-10 Expression beobachtet (Abb. 2.9 und Abb. 2.8). In unserer Gruppe wurde gezeigt, dass die HBV-Replikation durch IFN- γ an einem posttranskriptionalen Schritt gehemmt wird (Dumortier, *et al.*, 2005). Die Tatsache, dass in diesem Ad-HBV Modell die HBV-Replikation nach 34 Tagen geklärt wird, obwohl die viralen Transkripte 100 Tage nach der Injektion in Ad-HBV transduzierten Mäusen nachzuweisen sind, führt zu einer Vermutung, dass es in diesem Modell überwiegend eine nicht-zytolytische Steuerung der HBV-Infektion durch CD8+T-Zellen oder anderen Zellen des Immunsystems, wie NK-T-Zellen sein könnte, die IFN- γ während der ersten 10 Tage exprimieren.

Sehr interessant war die Beobachtung, dass in der Leber der Ad-HBV transduzierten Tiere am Tag 6 auch die Sekretion von IL-10 am höchsten war. Das warf die Frage auf, ob auch das IL-10 oder IL-10-produzierende Zellen an der Kontrolle der HBV-Replikation beteiligt sein könnten. Das von verschiedenen Zelltypen, hauptsächlich Th2-Zellen, aber auch CD8+T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, aktivierten B-Zellen,

sowie von Tregs produzierte Zytokin IL-10 (Fiorentino *et al.*, 1991; Moore *et al.*, 2001), hat potente immunsuppressive Eigenschaften, stimuliert jedoch die Funktion von NK- und CD8+T-Zellen. Es ist denkbar, dass die IL-10-Sekretion aus unterschiedlichen zellulären Quellen ein wesentliches Hemmnis für die immunologische Kontrolle darstellt. In einem weiteren Experiment, habe ich versucht, den Einfluss von IL-10 auf den Verlauf der HBV-Infektion und die Regulation der T-Zellantwort zu untersuchen. Hierzu wurden IL-10-k/o Mäuse mit Ad-HBV infiziert. Hier zeigte sich, dass in Abwesenheit von IL-10 die HBV-Replikation deutlich stärker unterdrückt wurde, und die Ad-HBV transduzierten IL-10-k/o Mäuse einen ausgeprägteren Leberschaden entwickeln, im Vergleich zu Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäusen (Abb. 2.10). Das zeigte deutlich, dass IL-10 nicht für die Unterdrückung der HBV-Replikation verantwortlich war, sondern die Immunpathogenese verminderte. Von welchen Zellen des Immunsystems, die diese Zytokine produzieren, die Kontrolle der HBV-Infektion gesteuert wurde, bleibt aber unklar.

Die genauen Funktionen der NK-T-Zellen sind unbekannt. Es wird vermutet, dass die NK-T-Zellen eine funktionelle Brücke zwischen dem angeborenen, unspezifischen und dem erworbenen, spezifischen Immunsystem darstellen und durch die Bildung von Zytokinen, wie IFN- γ , TNF- α , IL-2 und IL-4 das lokale immunologische Milieu der Leber beeinflussen (Godfrey *et al.*, 2004; Crispe *et al.*, 2003). Im Durchschnitt entfallen 32% der hepatischen CD3+-Zellen auf die NK-T-Zellen. Obwohl der natürliche Ligand für NK-T-Zellen noch nicht identifiziert wurde, ist bekannt, dass die NK-T-Zellen, über ihren Antigenrezeptor das Glykopeptid α -Galactosylceramid (α -GalCer) im Kontext mit CD1d spezifisch erkennen können (Kawano *et al.*, 1997). Es wird vermutet, dass diese Zellen als frühe Regulatoren der spezifischen Immunantwort in der Leber und vielleicht in der Immunpathogenese der Lebererkrankungen eine Rolle spielen (Troboncaja *et al.*, 2001). Ob ein aktiviertes angeborenes Immunsystem auch die HBV-Replikation hemmen könnte, wurde bei Kakimi *et al.*, 2000 und 2001 gezeigt. In diesen Studien wurde beschrieben, dass man in der Leber von HBV-transgenen Mäusen durch Injektion von α -GalCer NK-T-Zellen aktivieren kann und dadurch die HBV-Replikation inhibiert wurde. An dieser Stelle wird aber vermutet, dass die NK-T-Zell Aktivierung nur aufgrund des α -GalCer geschah und nicht als Antwort auf die natürliche Infektion. Bei Baron *et al.* wurde 2002 gezeigt, dass die CD1d-restringierten NK-T-Zellen in HBV-transgenen Mäusen aktiviert werden, aufgrund der Erkennung der

viralen Antigene. In dieser Studie wird vermutet, dass die NK-T-Zellen eine Rolle bei der Entstehung einer akuten Hepatitis B und in der damit verbundenen anti-HBV Immunantwort spielen. Bis jetzt fehlen aber noch die eindeutigen Beweise, die die Rolle der NK/NK-T-Zellen während einer natürlicher HBV-Infektion bestätigen würden.

In den letzten Jahren wurde ebenfalls sehr viel über die Rolle der Treg-Zellen bei akuten und chronischen HBV-Infektionen berichtet. Die Treg-Zellen haben eine immunsuppressive Wirkung, die aber bislang nur unzureichend charakterisiert ist. Viele Arbeiten mit *in vivo* Modellen schreiben inhibitorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF- β eine Rolle bei der Treg-Zell-vermittelten Inhibition zu (Shevach *et al.*, 2002). Kürzlich wurde sowohl im Menschen als auch im Tiermodell gezeigt, dass Treg-Zellen für die Suppression und Dysfunktion virusspezifischer CD8⁺T-Zellen mitverantwortlich sein könnten und im Blut von akut und chronisch HBV-infizierten Patienten stark angereichert sind (Xu *et al.*, 2006; Stoop *et al.*, 2007a; Stoop *et al.*, 2007b). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die Leberentzündung bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis B von einer verstärkten Aktivität der Treg-Zellen begleitet wird (Lin *et al.*, 2007). Die Arbeiten zeigen, dass bei Patienten mit einer starken Transaminaseaktivität im Serum die Dynamik der HBV-spezifischen CD8⁺T-Zellen ausgeprägt war, wenn Treg-Zellen fehlten. Diese Daten belegen ein signifikantes Verhältnis zwischen einer hohen Leberentzündung und der Frequenz/Aktivität der Treg-Zellen (Lin *et al.*, 2007).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher, in diesem Ad-HBV Maus-Modell genauer die Rolle verschiedenen zellulären Populationen, wie z.B. CD8⁺T-Zellen, NK-/NK-T-Zellen oder Treg-Zellen, am Leberschaden und an der Kontrolle der HBV-Replikation in diesem Ad-HBV Maus-Modell zu untersuchen.

3.2 Die zelluläre Immunantwort gegen HBV

Um genauer herauszufinden, welche Zellen für die Entstehung der Hepatitis in diesem Ad-HBV Maus-Modell verantwortlich sein könnten, wurden Kontroll C57Bl/6 und C57Bl/6/CD1-k/o Mäuse mit Ad-HBV injiziert und mittels eines depletierenden anti-CD8 Antikörpers wurden bei beiden Maus-Gruppen die CD8⁺T-Zellen ausgeschaltet. Die spezielle Charakteristik der CD1-k/o Mäuse ist, dass aufgrund des fehlenden CD1-Moleküls NK-T-Zellen in diesem Maus-Stamm nicht aktivieren werden können (Chen *et al.*, 1997; Mendiratta *et al.*, 1997; Smiley *et al.*, 1997). In einer Zeitkinetik wurden

der Krankheitsverlauf, die verbleibende Immunantwort und die Faktoren die diese beeinflussen, analysiert.

Die Depletion der CD8+T-Zellen hatte keinen Einfluss auf die Antigenämie und die Virämie in Ad-HBV transduzierten C57Bl/6-Kontroll und CD1-k/o Mäusen. Der Verlauf entsprach einem normalen Verlauf der HBV-Infektion und wurde in Kontroll-Mäusen durch das Immunsystem erfolgreich bekämpft.

Die Blockade der CD8+T-Zellen in Ad-HBV transduzierten Kontroll-Mäusen resultierte in einer einphasigen akuten und verzögerten Leberentzündung mit Maximum am Tag 14. Zu diesem Zeitpunkt wurden durchflusszytometrisch die ersten zurückkommenden CD8+T-Zellen in der Milz nachgewiesen und es wäre möglich, dass diese wenigen CD8+T-Zellen ausreichen, um sich am Leberschaden zu beteiligen. Ein ähnlicher Mechanismus wurde vorher in den Studien von Isogawa *et al.*, 2005b und in der Studie von Thimme *et al.*, 2003 beschrieben. Die Expression von IFN γ , IL-10 und TGF- β wurde nach der CD8+T-Zell Depletion in diesen Mäusen allerdings komplett unterdrückt (Abb. 2.18). Nur wenn die CD8+T-Zellen ausgeschaltet waren, wurde am Tag 6 ein Anstieg von FoxP3, einem Marker der Treg-Zellen, und von PD-1, einem negativen Regulator der T-Zell Aktivierung, beobachtet. Dies könnte bedeuten, dass das kurzzeitige Ausschalten der CD8+T-Zellen nach der Ad-HBV Injektion, die Treg-Zellen aktiviert. Welche Rolle genau diese in dieser Phase übernehmen, bleibt aber unklar und kann mit den jetzig vorhandenen Daten nicht erklärt werden.

In Ad-HBV transduzierten CD1-k/o Mäusen, die inaktive NK-T-Zellen, aber aktive CD8+T-Zellen besaßen, wurde eine ausgeprägte, deutlich höhere Leberentzündung als in Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäusen beobachtet. In Ad-HBV transduzierten CD1-k/o Mäusen mit inaktiven NK-T- und depletierten CD8+T-Zellen, wurde hingegen eine verzögerte und sehr milde Leberentzündung beobachtet (Abb. 2.12). Daraus wird geschlossen, dass die CD8+T-Zellen und nicht die NK-T-Zellen in diesem Ad-HBV Maus-Modell am Leberschaden beteiligt sind, und die NK-T-Zellen sog. Regulatorische Funktionen haben (Stevenson *et al.*, 2008).

In C57Bl/6 Kontroll-Tieren ohne CD8+T-Zellen wurde von Tag 3 bis Tag 14 eine höhere HBV-Transkription nachgewiesen. Nach der Blockade der CD8+T-Zellen in diesen Mäusen begann das Virus früher zu replizieren, wurde aber ab dem Tag 21 kontrolliert. Wir vermuten, dass repopulierte T-Zellen die Kontrolle der HBV-Replikation übernehmen. Dies muss aber in weiteren Experimenten bewiesen werden.

Diese Experimente mit depletierten CD8⁺T-Zellen in diesen Maus-Modellen waren die ersten Versuche, die Beteiligung der zellulären Immunantwort an der HBV-Infektion und der Kontrolle der HBV-Replikation in diesem Ad-HBV Maus-Modell zu analysieren. Ein eindeutiger Nachweis, welche Zellen des Wirtseigenen Immunsystem an diesem äußerst komplexen Prozeß beteiligt sind, steht noch aus. Als nächstes sollte in diesem Modell der Fokus mehr auf die Treg-Zellen gerichtet werden und es sollte geklärt werden, inwiefern diese Zellen den Verlauf der HBV-Infektion, die HBV-gerichtete Immunantwort und den Leberschaden beeinflussen. Dies könnte in den sog. Dereg (*Depletion of regulatory T-cells*)-Mäusen (Lahl *et al.*, 2007) untersucht werden. Für die weitere Analyse der Rolle der CD8⁺T-Zellen in diesem Ad-HBV Modell würden sich optimal sog. β 2-Mikroglobulin k/o-Mäuse (Koller *et al.*, 1990; Zijlstra *et al.*, 1990) eignen. β 2-Mikroglobulin ist eine Untereinheit des MHC I-Moleküls. Ist β 2-Mikroglobulin nicht vorhanden, so kann das MHC-I Molekül nicht an der Zelloberfläche exprimiert werden. Somit finden sich bei diesen Mäusen keine MHC-I Moleküle an der Zelloberfläche (Zijlstra *et al.*, 1990) und dadurch verfügen diese Mäuse über keine CD8⁺T-Zellen, wodurch auch die CD8⁺T-Zell vermittelte Zytotoxizität defekt ist. Auch die NK-Zell-Funktionalität scheint in diesen Tieren betroffen zu sein (Raulet *et al.*, 1994). Experimente mit diesen Mäusen wären optimal, da hier, nicht wie nach der Depletion der CD8⁺T-Zellen mit einem Antikörper, die CD8⁺T-Zellen dauerhaft weg bleiben.

3.3 Die HBV-spezifische CD8⁺T-Zell Antwort

Im Ad-HBV Maus-Modell habe ich die Kinetik der HBV-spezifischen CD8⁺T-Zellantwort in Leber-assoziierten- sowie peripheren-Lymphozyten analysiert. Die HBV-spezifische CD8⁺T-Zell-Immunantwort wurde gegen zwei Peptide des viralen Oberflächenproteins S (S190-197; S208-215) und ein Peptid des HBV-Kapsid (core) (C93-100), sowie gegen ein Negativ-Kontroll-Peptid OVA257-264 nach einer Ad-HBV und Ad-HBV-k/o Injektion im C57Bl/6-Maus-Modell untersucht. Die S- und core-spezifischen Epitope wurden bereits in Mäusen gut charakterisiert (Schirmbeck *et al.*, 2001 und 2003). Eine wichtige Voraussetzung für die Analyse der HBV-spezifischen CD8⁺T-Zellantwort in diesem Modell war die Etablierung eines HBV-Peptid-Stimulationsprotokolls und die Wahl einer Nachweismethode der antigenspezifischer CD8⁺T-Zellen in der Leber und Milz der Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäuse. Die Detektion der IFN- γ -produzierenden HBV-spezifischen CD8⁺T-

Zellen wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen IFN- γ Sekretion-Assay Kits durchgeführt, da in einer Studie gezeigt wurde, dass diese Methode sich optimal für die quantitative Detektion antigenspezifischer IFN- γ -produzierenden T-Zellen auf Einzelzellniveau eignet (Desombre, *et al.*, 2004). Dabei bindet im ersten Schritt ein bi-spezifischer Antikörper an die Zelloberfläche, dessen einer Arm gegen ein ubiquitäres Lymphozytenantigen gerichtet ist. Somit befindet sich auf jeder T-Zelle eine mit einem zytokinspezifischen „Fangnetz“ vergleichbare Catch-Matrix. Während der Sekretionsphase, bei der sich die Zellen in einer ständigen Rotation befinden, bindet das von der Zelle sezernierte Zytokin (IFN- γ) an den zweiten Arm des Antikörpers. Ein PE-markierter Sekundärantikörper, dessen Bindungsstelle spezifisch für ein zweites Epitop des Zytokins ist, ermöglicht den durchflusszytometrischen Nachweis der INF- γ -positiven Zellen. Diese Methode hatte für mich einen wesentlichen Vorteil gegenüber anderer Nachweismethoden, wie z.B. der Intrazellulären Zytokine Färbung, bei der man die Zellen fixieren und permeabilisieren muss, um in die Zelle einzudringen und dort intrazellulär die Zytokin Sekretion nachzuweisen, da sie erlaubt, die Zellen über Nacht zu stimulieren.

Im Ad-HBV Maus-Modell wurde gezeigt, dass die Einwanderung der HBV (S- und core-Peptid)-spezifischen CD8+T-Zellen zweiphasig, genau parallel zum Leberschaden (Abb. 2.3) verlief. Eine HBV-spezifische CD8+T-Zellantwort fand sich in der Leber der Ad-HBV, nicht aber in der Leber der Ad-HBV-k/o transduzierten C57Bl/6 Mäusen (Abb. 2.20 A). Die HBV-Peptid-spezifischen CD8+/IFN- γ -produzierenden T-Zellen wurden am Tag 7, Tag 14, sowie am Tag 70, d.h. zu Zeitpunkten, an denen die Transaminasenaktivität erhöht war, fast ausschließlich in der Leber detektiert. Nur am Tag 24 wurde eine Reduktion der intrahepatischen HBV-spezifischen CD8+T-Zellen beobachtet, die mit einer erhöhten peripheren HBV-spezifischen CD8+T-Zellantwort in der Milz der Ad-HBV transduzierten C57Bl/6 Mäuse einherging. Die CD8+T-Zellantwort gegen die HBV-Peptide blieb in der Leber und Milz der Ad-HBV-k/o transduzierten Tiere, sowie gegen das Negativ-Kontroll-Peptid OVA in allen Mäusen negativ.

Bis jetzt wurde noch nicht gezeigt, welche Rolle die Adenovirus-spezifische Immunantwort im Ad-HBV Maus-Modell spielt. Es wurde beschrieben, dass Adenovirus Typ 5 Mäuse nicht produktiv infizieren kann, da es in Mauszellen nicht repliziert (Jogler *et al.*, 2006). Da die in dieser Arbeit verwendeten adenoviralen-Vektoren replikationsdefizient sind, wurde davon ausgegangen, dass keine adenoviralen

Proteine exprimiert werden und die Immunantwort gegen den Vektor sich demnach nur gegen das hereinkommende Protein der Vektor-Partikel richtet.

Um genauer herauszufinden, welcher Anteil der CD8+T-Zellantwort in diesem Ad-HBV Maus-Modell wirklich HBV- und nicht Adenovirus-spezifisch ist, wurden OT-I-transgene Mäuse benutzt. Diese Mäuse sind transgen für einen T-Zellrezeptor (TCR), der das Peptid OVA257-264 (SIINFEKL) im Kontext von MHC-Klasse-I H2-K^b erkennt (Hogquist *et al.*, 1994) und wurden mit 1×10^9 i.u. Ad-HBV oder Ad-HBV-k/o *i.v.* in die Schwanzvene injiziert. Da bis jetzt keine H2-K^b- oder H2-K^d-Peptide spezifisch für Adenovirus Typ 5 charakterisiert sind, wurde für die Stimulation der murinen LALs und Milzzellen eine murine-Kb-positive-Zelllinie C57, die ursprünglich von C57Bl/6 Mäusen abstammt, benutzt. Die C57-Zellen wurden entweder mit Ad-HBV, Ad-HBV-k/o oder Ad-OVA, das als positiv-Kontrolle diente, infiziert und für die Stimulation der murinen Zellen benutzt (Abb. 2.20 A). Mir gelang der Beweis, dass die CD8+T-Zellantwort in diesem Ad-HBV-Maus-Modell HBV- und nicht Adenovirus-spezifisch ist. Dies belegt die Tatsache, dass man nur in LALs der Ad-HBV transduzierten OT-I Mäuse nach der Stimulation mit Ad-HBV und Ad-OVA infizierten C57-Zellen, die IFN- γ -produzierende CD8+T-Zellen nachweisen konnte. Dagegen wurde in Ad-HBV-k/o transduzierten OT-I Mäusen nur eine CD8+T-Zell-Antwort gegen die Positiv Kontrolle Ad-OVA ermittelt.

Für das Studium der HBV-spezifischen T-Zellantwort wurden bisher Schimpansen verwendet, da diese neben den Menschen, das einzige vollwertige Modell für das Studium der HBV Infektion sind. Bei Thimme *et al.*, 2003 wurde in HBV-infizierten Schimpansen die Rolle der HBV-spezifischen T-Zellantwort im Verlauf einer akuten Infektion beschrieben. In dieser Studie mit HBV-infizierten Schimpansen wurde gezeigt, dass eine intrahepatische IFN- γ -Produktion in Zusammenhang mit der Eliminierung des Virus steht (Thimme *et al.*, 2003). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die Einwanderung der CD8+T-Zellen und Expression von IFN- γ in der Leber von der HBV-spezifischen Immunantwort gesteuert wird (Isogawa *et al.*, 2005). Studien mit HBV-infizierten Patienten sind mit einem hohen Risiko des Auftretens möglicher Komplikationen bei der Durchführung der Leberbiopsie, verbunden. Kürzlich zeigte eine neue Studie, in der eine viel schonendere Methode der Feinnadelaspiration-Biopsie (FNAB) durchgeführt wurde, dass die intrahepatische HBV-spezifische CD8+T-Zellantwort parallel zum akuten Leberschaden verläuft und höher war als in der Peripherie und die Zahl der intrahepatischen HBV-spezifischen CD8+T-Zellantwort

nach der HBsAg-Serokonversion noch mal anstieg (Sprengers *et al.*, 2006). Meine Daten korrelierten genau mit dem beschriebenen Verlauf der HBV-spezifischen CD8⁺T-Zelleantwort bei einer akuten Infektion im Menschen in dieser Studie.

In dieser Arbeit wurde ein neues Tiermodell der akuten Hepatitis B etabliert, das erlaubt die HBV-spezifische Immunantwort und den Verlauf der Infektion näher zu untersuchen. Die Ad-HBV Injektion eignet sich optimal, um weiter die HBV-gerichtete Immunantwort zu analysieren und versuchen, die Zellen, die die Leberentzündung begleiten und an der Kontrolle der HBV-Replikation beteiligt sind, zu bestimmen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

Für die Herstellung aller Lösungen wurde deionisiertes Wasser aus dem Ultra Pure Water System „Easy Pure UV/UF“ von Barnstead Reinstwassersystem verwendet. Dabei gilt Wasser ab einem Widerstand von 16 Mega Ohm als vollentsalzt und ist mit doppelt destiliertem Wasser vergleichbar.

4.1.1 Verbrauchsmaterial

ALT (GPT) Streifen	Scil, Weinheim, Deutschland
ELISA 96-Well-Platten	Maxisorb, Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Einfrierhilfe	Nalgene, Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
FACS-Röhren	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Filme	Biomax MR-Film, Kodak, Deutschland
Filterpapier	Whatman 3MM, Biometra, Göttingen, Deutschland
Cryo-Gefriergefäße	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nylonmembran	Positively Charged Nylonmembrane, Amersham, Little Chalford, Großbritannien
Nitrocellulose Membran	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Perfusionsbesteck mit Flügeln	BD Valu-Set™, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Präparationsbesteck	Heiland Med GmbH, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Saran Folie	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Slide-A-Lyzer Dialyse Kassette (10,000 MWCO)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Tuberkulinspritzen (1ml)	Heiland Med GmbH, Hamburg, Deutschland
Ultrazentrifugenröhren	Konrad Beranek, Weinheim, Deutschland
Whatmann-Papier	Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Zellkulturschalen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Zellsieb (Cellstrainer)	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Zentrifugenröhren (15/50 ml)	Falcon, BD GmbH, Heidelberg, Deutschland

4.1.2 Chemikalien

Acrylamid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Agarose	SeaKem LE, Cambrex, Rockland, USA
Aqua-Phenol pH 4,5	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bradford Reagent	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA (Bovines Serumalbumin)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Cäsiumchloride	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Entwickler	G153 A + B, Agfa, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fixierer	G354, Agfa, Deutschland
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glukose	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Hefeextrakt	BD Microbiology Systems, Sparks, USA
Imidazol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kollagen	Serva, Heidelberg, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Natriumcitratdihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nickelsulfat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ponceau	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Propidiumjodid	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
RNA <i>Later</i>	Quiagen, Hilden, Deutschland
Roti-Phenol pH 7,5	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tetramethylbenzidin	Biosource, Camarillo, USA
Tris-Base	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Virkon Desinfektionsmittel	Tetenal AG & Co KG, Norderstedt, Deutschland

4.1.3 Kits

Aufreinigung von DNA	DNeasy Tissue Kit, Quiagen, Hilden, Deutschland
Aufreinigung von DNA aus Serum	Dneasy Blood Kit, Quiagen, Hilden, Deutschland
DNA-Geleextraktion	QIAquick, Qiagen, Hilden, Deutschland
Gateway® LR Clonase™ II Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
IMAGEN™ Adenovirus (direkter	DakoCytomation, Cambs, England
Immunfluoreszenztest zum	
Nachweis des Adenovirus)	
Interferon gamma secretion	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
assay detection Kit (PE)	
Präparation von Plasmiden	QIAprep Miniprep, Maxiprep, EndoFree Maxiprep Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
PCR Reaktionsmix	PuReTaq Ready-to-go PCR Beads, Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England

Real time PCR	DNA Amplification Kit SYBR [®] Green 1 und Light Cycler [®] Capillaries (20µl), Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Transfektion von Zellen	Lipofectamine 2000, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Western Blot	ECL Western Blotting Detection Reagent Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England
Radioaktive Sondenherstellung	Rediprime II Random Prime Labelling System, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England

4.1.4 Eukaryonte Zelllinien und adenovirale Vektoren

293-Zellen	Zelllinie, die durch Infektion menschlicher embryonaler Nierenzellen mit Adenovirus Typ 5 entstand und einen kleinen Bereich aus der regulatorischen Region der Virus-DNA im zellulären Genom trägt; Verpackungs-Zelllinie für adenovirale Vektoren
C57- Zellen	Zelllinie erhalten von Prof. Dr. Percy Knolle; adhärenente murine K ^b -positive-Fibroblastenzelllinie, die von C57Bl/6 Mäusen stammt
Ad-HBV	adenoviraler Vektor, enthält ein 1.3-faches Überlängen-Genom des HBV (hergestellt von A. Untergasser)
Ad-HBV-k/o	adenoviraler Vektor, enthält ein 1.3-faches Überlängen-Genom des HBV, in dem alle HBV-Gene ausgeschaltet sind (hergestellt von A. Untergasser)
Ad-HBV-GFP	adenoviraler Vektor, enthält ein 1.3-faches Überlängen-Genom des HBV und zusätzlich noch eine GFP-Expressionskassette, wurde für die Untersuchung der Effizienz des HBV-Genomtransfers benutzt (hergestellt von A.Untergasser)

Ad-OVA	rekombinanter Adenovirus, der das Antigen Ovalbumine (OVA) unter dem CMV Promotor exprimiert (hergestellt von A.Untergasser)
Ad-GFP	adenoviraler Kontrollvektor, exprimiert grün fluoreszierendes Protein (GFP)

4.1.5 Medien und Reagenzien für Zellkulturen

Dulbeccos MEM	<i>Dulbecco 's Modified Eagle Medium</i> , Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium 1640</i> , Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Opti-MEM I	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland; zur Komplementinaktivierung für 30 min bei 56°C erhitzt
Trypsin/EDTA	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L- Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Natriumpyruvat	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Nicht essenzielle Aminosäuren	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penizillin/Steptomycin	(Pen/Strep) Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

4.1.5.1 Medien für murine-Leber-assoziierte Lymphozyten (LAL)

Perfusions-Medium:

HBSS (Ca/ Mg-frei) + 0,05% Kollagenase TypIV (419 U/mg)	500 ml Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland 200 mg Lot 88H8620 Sigma, Deisenhofen, Deutschland
---	--

DMEM Medium (5% FKS+ Penizillin/Streptomycin)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Percoll™	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England
PBS-Dulbecco (1x) (w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

4.1.5.2 Medien für murine-Milzzellen

RPMI 1640 (5 % FKS+ Penizillin/Streptomycin)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS-Dulbecco (1x) (w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Erythrozyten Lysis-Puffer	0.14 M NH ₄ Cl, 0.17 M Tris, pH 7.2
Einfriermedium	70 ml RPMI 1640 (5 % FKS + Penicillin/Streptomycin), 20 ml FKS (30 %), 10 ml DMSO (10 %)

4.1.5.3 Medien für Bakterienkulturen

Ampizillin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Kanamyzin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
LB-Medium (pH 7.0)	NaCl (5 g/l), Hefeextrakt (5 g/l), Bactotrypton (10 g/l)
SOB-Medium (pH 7.0)	NaCl (0,5 g/l), Hefeextrakt (5 g/l), Bactotrypton (20 g/l), MgSO ₄ (5 g/l), KCl (0,186 g/l)
SOC-Medium (pH 7.0)	SOB-Medium, 20 mM Glukose
LB-amp	LB-Medium + 100 µg/ml Ampizillin
LB-kana	LB-Medium + 100 µg/ml Kanamyzine
LB-amp-Agar	15 g/l Agar in LB-Medium+100µg/ml Ampizillin
LB-kana-Agar	15 g/l Agar in LB-Medium+100µg/ml Kanamyzine

4.1.6 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser angesetzt. Sie wurden gegebenenfalls autoklaviert oder steril filtriert (0,2 µm Filter, B.Braun, Meisungen).

Agarosegelelektrophorese

TAE 50 x (Agarosegel Laufpuffer)	2 M Tris-Acetat; 50 mM EDTA, pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0
TBE 10 x Laufpuffer	108 g Tris Base (890 mM); 55 g Borsäure (890 mM); 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; add 1 L
DNA Ladepuffer	5 ml 100 % Glycerin; 4,8 ml H ₂ O; 200 µl 0,5 M EDTA; 25 mg Bromphenolblau; in ddH ₂ O

Ethidiumbromidlösung	2 µg/ml in H ₂ O
<u>Western-Blot Analyse</u>	
10 % APS	1 g Ammoniumpersulfat auf 10 ml ddH ₂ O auffüllen
Laemmli Puffer (5 x Probenauftrags-Puffer)	für eine 10 ml Lösung: 0,6 ml 1 M Tris-HCL (pH 6.8) (60 mM) 1 ml 20% SDS-Lösung (14,4 mM) 5 ml 50% Glycerol (25%) 1 ml 1% Bromphenolblau (0,001%) 5% β-Mercaptoethanol bei Gebrauch dazugeben
10 x SDS-Laufpuffer	288 g Glycin; 60 g Tris; 20 g SDS; auf 2 L ddH ₂ O auffüllen
5 x Transferpuffer	75,75 g Tris-Base; 360 g Glycin; auf 5 L ddH ₂ O auffüllen
10 x Blotpuffer	144,19 g Glycin; 30,29 g Tris; mit HCl auf pH 8,3 einstellen; bei 1x Puffer 10 % Methanol zugeben
Blockingpuffer	5 % Milchpulver; 0,05 % Tween 20; mit ddH ₂ O auffüllen
S-PBS	Für eine 2 L Lösung: 14 g NaCl; 2,76 g NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O; 3,12 g NaH ₂ PO ₄ *2 H ₂ O; 10,88 g K ₂ HPO ₄ pH 7,6
<u>Northern-Blot Analyse</u>	
DEPC- H ₂ O	1 ml DEPC (Diethylpyrocarbonat), auf 1 L mit ddH ₂ O auffüllen, über Nacht (ü.N.) bei 37 °C stehen lassen; autoklavieren
10 x E- Puffer	46,8 g 300 mM NaH ₂ PO ₄ *2 H ₂ O; 18,6 g 50 mM EDTA, pH 7,0; auffüllen auf 1 L mit DEPC- H ₂ O
10 x SSC	60 g 150 mM NaCl; 44 g 15 mM Na-Citrate-dihydrate; auf 1 L ddH ₂ O auffüllen
Waschpuffer	2 x SSC; 2 x SSC / 0,1 % SDS
RNA-Ladepuffer	50 % Glycerol; 1mM EDTA, 0,25 % Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol

Southern-Blot Analyse

Blotpuffer/Denaturierung	0,4 M NaOH
Depurinierung	0,25 M HCl
Waschpuffer	2 x SSC / 0,1 % SDS; 1 x SSC / 0,5 % SDS

Radioaktive Hybridisierung

Church-Puffer	0,25 M Phosphat-Puffer (pH 7,2); 1 mM EDTA, 1 % BSA; 7 % SDS
---------------	---

Heringssperma DNA 10 µg/ml in dd H₂O; Lagerung bei 4°C

Präparation genomischer-DNA

NP-40 Lysis Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,2 % NP40; 0,15 % NaCl
Proteinase K Puffer	100 mM Tris pH 8,5; 5 mM EDTA; 0,2 % SDS; 200 mM NaCl

Sonstige Puffer und Lösungen

Virus Dialyse-Puffer	8 g NaCl; 0,37 g KCl; 1,21 g Tris; 0,2 g MgCl ₂
MACS-Puffer	200 ml PBS-Dulbecco ; 800 µl 0,5 M EDTA ; 1g BSA
Narkosemittel	Ketanest (Ketavet) 100mg/ml; Rompun 2 % für 10 ml: 1 ml Ketanest; 0,25 ml Rompun; 8,75 ml 0,9 % NaCl; bei 4 °C lagern
4 % gepuffertes Formalin	9,07 g KH ₂ PO ₄ ; 11,86 g Na ₂ HPO ₄ ; in 860 ml ddH ₂ O lösen und 140 ml Formalin (37 % Stammlösung) hinzugeben, gut mischen und pH 7,4 einstellen

4.1.7 Enzyme

LR Clonase II	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase K (3 mg/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Rnase A (10 mg/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Dnase I	Quiagen, Hilden, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
T4-DNA Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

4.1.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotidsequenzen wurden mit dem Light Cycler Probe Design Programm erstellt und von Invitrogen, Schottland, bezogen. Sie wurden bei -20°C in ddH₂O mit einer Konzentration von 1mM gelagert. Außerdem wurde jeweils eine 20 µM Gebrauchslösung angefertigt und ebenfalls bei -20°C aufbewahrt.

Maus-Primer für quantitative Light Cycler RT-PCR:

Nachweis der HBV-DNA:

HBV (1844) + 5' GTTGCCCGTTTGTCTCTAATTC 3'

HBV (1745) – 5' GGAGGGATACATAGAGGTTCTTGA 3'

Nachweis der adenoviralenen-DNA :

Ad (156) + 5' TAAGCGACGGATGTGG 3'

Ad (388) – 5' CCACGTAAACGGTCAAAG 3'

Nachweis der ausgewählten Maustranskripte:

mausGAPDH + 5' ACCAACTGCTTAGCCC 3'

maus GAPDH – 5' CCACGACGGACACATT 3'

mausCD8 + 5' GGATTGGACTTCGCCTG 3'

mausCD8 – 5' CAAGTATGCTTTGTGTCAAAGA 3'

mausCD4 + 5' AGCTCAACAATACTTTGACC 3'

mausCD4 – 5' CCCAGAAAGCCGAAGGA 3'

mausNK1.1 + 5' CTTGGAGTTTGTCCCTTCT 3'

mausNK1.1 – 5' CTCATCCCAATCAGGGT 3'

mausIFN-γ+ 5' ATGGTGACATGAAAATCCTG 3'

mausIFN-γ – 5' GTGGACCACTCGGATGA 3'

mausTGF-β + 5' GGAGACGGAATACAGGG 3'

mausTGF-β – 5' CAGAAGTTGGCATGGT 3'

mausTNF- α +	5' ACGTCGTAGCAAACCAC 3'
mausTNF - α –	5' AGATAGCAAATCGGCTG 3'
mausIL-10 +	5' GCTGGACAACATACTGC 3'
mausIL-10 –	5' GCATCCTGAGGGTCTT 3'
mausFoxP3 +	5' CCAAGCCTATGGCTCC 3'
mausFoxP3 –	5' TGAAGTGTGGTCTGTCC 3'
mausPD1 +	5' GGTACTGTTCTCGGTTCC 3'
mausPD1 –	5' ATCAAACCCAAGGGCTA 3'

4.1.9 Gewichts- und Längenstandards

DNA-Standard

SmartLadder, 0,2-10 kb	Eurogentec, Liege, Belgien
SmartLadder, 0,1-2 kb	Eurogentec, Liege, Belgien

RNA-Standard

RNALadder, 0,5-10 kb	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
----------------------	------------------------------------

Protein-Standard

Prestained Protein ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
---------------------------	------------------------------------

4.1.10 Antikörper

Antikörper für die FACS-Analyse

Alle verwendeten Antikörper für die FACS-Analyse (ausser IFN γ -PE) wurden bei eBioscience, San Diego, USA bestellt.

FITC (Fluorescein Isothiocyanate)- konjugierter anti-Maus CD8 (Klone: 53-6.7)

PE (Phycoerythrin)- konjugierter anti-Maus CD4 (Klone: 6K1.5)

APC (Allophycocyanin)- konjugierter anti-Maus NK1.1 (Klone: PK136)

APC (Allophycocyanin)- konjugierter anti-Maus CD19 (Klone: MB19-1)

Alexa Fluor 647- konjugierter anti-Maus CD3 (Klone: 17A2)

Alexa Fluor 488- konjugierter anti-Maus CD3 (Klone: 145-2C11)

Alexa Fluor 647- konjugierter anti-Maus CD8 (Klone: 53-6.7)

Maus IFN γ (PE) Maus IFN γ secretion assay Kit (PE);
Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

Primäre Antikörper für Western Blot:

Hase H800-anti core Aufreinigung von H. Schaller, Heidelberg,
Deutschland

Sekundäre Antikörper für Western Blot:

Hase anti- β -aktin Sigma, St. Louis, USA

Ratte-anti-Maus CD8 Antikörper benutzt für die Depletion der CD8+T-
Zellen in C57Bl/6 und CD1-k/o Mäusen;
Antikörper erhalten von Dr. O. Utermöhlen, Köln,
Deutschland

4.1.11 HBV-Antigene

HBvaxProTM Hepatitis B Oberflächenantigen (40 μ g/ml)
rekombinant in *S. cerevisiae* hergestellt
(Subtyp adw), Aventis Pasteur, Leimen,
Deutschland

4.1.12 Radioaktives [32P] dCTP

Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England

4.1.13 Bakterienstämme

DH5 α *E. coli*, Promega, Mannheim, Deutschland

XL1blue *E. coli*, Stratagene, LaJolla, USA

4.1.14 Vektoren und Plasmide

4.1.14.1 Vektoren

pAdGH1.3 Adenoviraler Vektor zur Transduktion eukaryontischer Zelllinien
mit 1.3-fachem HBV-Überlängengenom und grün
fluoreszierendem Protein (GFP) (Sprinzl *et al.*, 2001)

pAdGTK Adenoviraler Kontrollvektor, der ein GFP-ORF transduziert

4.1.14.2 Adenovirale Verpackungsplasmide

pENTRY Gateway, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

pAD/DEST Gateway, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

4.1.15 Verwendete Mauslinien

Alle Mäuse wurden im Tierstall des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Köln gehalten. Bei den Versuchstieren handelt es sich um männliche oder weibliche Mäuse (*Mus musculus*) von folgenden Stämmen:

C57BL/6 Mäuse (Charles River, Frankreich) :

Der MHC-Haplotyp dieses Mausstamms ist H-2K^b. Mäuse wurden im Alter von 8-12 Wochen eingesetzt.

OT-I transgene Mäuse (erhalten von Prof. Dr. Knolle, Bonn, Deutschland):

Dieser Mausstamm ist transgen für einen T-Zellrezeptor (TCR), der das Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ im Kontext von MHC-Klasse I H2-K^b erkennt.

CD1-k/o Mäuse (erhalten von Prof. Dr. Knolle, Bonn, Deutschland)

Dieser Mausstamm zeichnet sich damit aus, dass das CD1-Molekül ausgeschaltet wurde und dadurch die NK-T-Zellen in diesen Tieren nicht aktiviert werden.

4.1.16 Synthetische Peptide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, synthetisiert. Die Synthese erfolgte nach der F-moc (*Fluorenylmethoxycarbonyl*)-Methode mit einem 9050 PepSynthesizer (Milligen, Eschborn). Die Peptid-Reinigung erfolgte mittels HPLC (Pharmacia, Uppsala, Schweden), wonach die Peptide als Amine vorlagen.

Alle Peptide lagen nach der Synthese in lyophilisiertem Zustand vor. Sie wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml in sterilem Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in 100 µl Aliquots bei -20 °C gelagert. Um konstante Bedingungen bei der Stimulation zu gewährleisten, wurde jeder Stimulationsansatz frisch angesetzt, bereits aufgetaute Peptid-Aliquots nicht erneut eingefroren und nicht benötigte Restmengen verworfen.

Peptide zur Stimulation von murinen Milz und Leber-assoziierten Lymphozyten:

CD8⁺ T-Zellen von C57Bl/6 Mäusen erkennen folgende Peptide, die im Kontext mit dem MHC-Klasse-I Molekül H-2K^b präsentiert werden:

2 Epitope vom S-Protein:

S₁₉₀₋₁₉₇ H- VWLSVIWM - OH; endogen prozessiert

S₂₀₈₋₂₁₅ H- ILSPFLPL -OH; exogen prozessiert

1 Epitope vom Kapsid (core)-Protein:

C₉₃₋₁₀₀ H- MGLKFRQL -OH

Kontrollpeptid:

OVA₂₅₇₋₂₆₄ H- SIINFEKL -OH; wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Knolle aus Bonn zur Verfügung gestellt.

4.1.17 Geräte und Software

4.1.17.1 Geräte

ALT-Messgerät	Reflonet Plus, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Autoradiographie	Molecular Imager FX, Biorad, Hercules, USA
Blotkammer	BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
Brutschränke	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Dispergiergerät T 8-Ultra-Turrax	Merck Eurolab GmbH, Bruchsal, Deutschland
Durchflußzytometer	FACSCanto™, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
ELISA Reader	MRX Revelation, Dynex, Gaithersburg, USA
Feinwaage	Kern 440-47, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Filmentwickler	Curix 60, Agfa, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	IX 81, Olympus, Hamburg, Deutschland
Gelkammer	BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
Imaging Screen k-HD (20x25 cm)	BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
Kühl- und Gefriergeräte	Liebherr, Lientz, Deutschland
Light Cycler	Light Cycler System, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Luminometer	GENios Pro, Tecan, Grödig, Österreich
Molecular Imager®FX	BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
pH-Meter	WTW, wissenschaftlich technische Werkstätten

PCR	T3-Thermocycler, Biometra, Göttingen, Deutschland
Photometer	Smart Spec 3000, BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
Photosystem für Agarosegele	Gel-doc 2000, BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
Pipettierhilfe	Swift Pet [®] , Abimed, Langenfeld, Deutschland
Plattenluminometer	GENios Pro, Tecan, Crailsheim, Deutschland
Schüttler	Innova 4230, New Brunswick scientific, USA
Sterilbank (Zellkultur)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Thermomixer	Comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifugen	Centrifuge 5417C/5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Megafuge 1.0/1.0R, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
UV-Ofen	GS Gene Linker [™] , BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
Ultrazentrifuge XL-70	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Ultrazentrifuge Rotor SW41	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Ultrazentrifuge Schwenkbecher (SER.90E.2006)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
4.1.17.2 Software	
Autoradiographie	Quantity One Software, Biorad, Hercules, USA
Datenverarbeitung	Windows 2000, MS Office 2000, Word und Exel, Microsoft, Redmont, USA
Durchflußzytometrie	FACSDiva [™] , BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskopie	AnalySIS, Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland
Grafikprogramme	Adobe Photoshop 5.5; 6.0, Adobe, San Jose, USA Power Point 2000, Microsoft, Redmont, USA Canvas X, ACD Systems, Saanchiton, Kanada

Light Cycler	Probe Design Analysis und Rel Quant, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Luminometer	Magellan Software, Tecan, Grödig, Österreich

4.1.17.3 Statistik

Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte (stud. T-Test) wurden mit dem Programm Microsoft® Excel 2003 berechnet.

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Rekombination von DNA aus den *entry*-Vektoren in die *destination*-Vektoren mit Hilfe des Gateway Systems

Das Gateway System (Invitrogen) basiert auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ (Landy *et al.*, 1989), das insgesamt vier Erkennungssequenzen verwendet (attL x attR \leftrightarrow attB x attP). Jede dieser att-Erkennungssequenzen besteht aus zwei Kassetten, die miteinander kombiniert werden können. Jeder Vektor besitzt zwei gleiche att-Sequenzen, so dass während der Rekombination DNA-Abschnitte, die zwischen den att-Sequenzen liegen, zwischen Donor (*entry* Vektor) und Akzeptor (*destination* Vektor) ausgetauscht werden. Der *entry* Vektor (pENTRY) besitzt die attL-Sequenzen und dazwischen liegt das umzuklonierende DNA-Fragment. Den attR-Sequenzen im *destination* Vektor (pAD/DEST) fehlen 43bp, wodurch die attL x attR Reaktion irreversibel und effizienter wird (Bushman *et al.*, 1985). Die attL x attR \leftrightarrow attB x attP Rekombination wird von drei Proteinen, der Integrase (Int) und Excisionase (Xis) des Bakteriophagen λ und des *integration host* Faktors (IHF) von *E. coli* katalysiert. Unerwünschte Rekombinationsprodukte werden dabei durch das Resistenzgen im Vektor-*backbone* (Kanamycin im *entry* Vektor, Ampicillin im *destination* Vektor) selektiert. Zusätzlich besitzt der *destination* Vektor zwischen den Rekombinationskassetten das Killergen *ccdB*, welches nach der Rekombination im *entry* Vektor sitzt. Das CcdB Protein interagiert mit der DNA Gyrase von *E. coli* und verhindert so das Wachstum der meisten *E. coli* Stämme, die das Plasmid besitzen.

Für die Rekombination wurden 150 ng *entry* Vektor, 150 ng *destination* Vektor, 4 μ l LR Clonase Enzyme Mix und 4 μ l LR Clonase Reaktions-Puffer zusammenpipettiert

und mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1 µl Proteinase K dazugegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert.

Aus diesem Reaktionsansatz wurden 5 µl in 50 µl DH5α Bakterien transformiert. Die transformierten Bakterien wurden auf Amp-Agarplatten ausgestrichen, so dass nur die rekombinierten Adenoviruskonstrukte (enthalten attB-Sequenzen, den *destination backbone* und die HBV-Kassette) wachsen konnten.

4.2.1.2 Transformation

Kompetente Bakterien der *E. coli* Stämme DH5α und XL1-blue wurden nach der Methode von Inoue hergestellt (Inoue *et al.*, 1990) und bei –80°C gelagert. Bakterienaliquots (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut und in 25 µl Aliquots verwendet. Nach der Zugabe von 50-200 ng Plasmid oder Ligationsansatz wurden die kompetenten Bakterien 30 min auf Eis inkubiert. Dies dient der Anlagerung der DNA an die Bakterien. Durch den folgenden Hitzeschock bei 42°C für 60 sec wird die Fremd-DNA aufgenommen. Anschließend wurden die Bakterien 5 min auf Eis inkubiert und in 400 µl antibiotikafreiem SOC-Medium aufgenommen. Die Inkubation für 1 h bei 37°C ist nötig für die Ausbildung der vom Plasmid kodierten Antibiotikaresistenz. Anschließend wurden 100 µl Bakteriensuspension entsprechend der transformierten Antibiotikaresistenz auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert.

4.2.1.3 Kultivierung von Bakterien

Bakterien wurden in einem geeigneten Volumen an Flüssigmedium (LB-Medium) auf dem Schüttler bei 220 rpm oder auf Festmedium (LB-Agarplatten) bei 37°C über Nacht kultiviert. Die Selektionierung transformierter Bakterien erfolgte durch das Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (100 µg/ml).

4.2.1.4 Plasmidpräparation

Präparationen von Plasmiden wurden je nach Mengenbedarf der DNA mit Kits (QIAprep Miniprep und Maxiprep Kit, Qiagen) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die Bakterien werden alkalisch lysiert und durch Neutralisation werden die Proteine gefällt. Die Proteinassozierte genomische DNA wird zusammen mit den Proteinen entfernt. Die nicht an Proteine gebundenen Plasmide verbleiben in der Lösung und werden durch Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Ein zusätzlicher Waschschrift mit 70% Ethanol (EtOH) erhöht bei der Maxipräparation die Reinheit der DNA, was für die Transfektion von eukaryontischen Zelllinien unerlässlich

ist. Für sensible Experimente wurde die Maxi-Präparation zusätzlich mit einem Kit zur endotoxinfreien Präparation (QIAprep EndoFree Maxiprep Kit, Qiagen) durchgeführt.

4.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte photometrisch durch die Messung der Absorption bei 260 nm. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260 nm, die Extinktion bei dieser Wellenlänge ist proportional zur DNA Konzentration der Lösung.

Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz gilt:

$$E = \varepsilon * c * d \Leftrightarrow c = E / (\varepsilon * d)$$

wobei

E = Extinktion bei 260 nm

ε = Extinktionskoeffizient (1/ mol * cm)

c = Konzentration der DNA (mol/l)

d = Schichtdicke (cm)

sind. Ausgehend von einem Extinktionskoeffizienten von 0,02 und einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm lässt sich die Konzentration einer unbekanntes DNA Lösung durch die Formel

$$c \text{ (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$c \text{ (nmol/}\mu\text{l)} = A_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor} / M_w * L$$

bestimmen, wobei

M_w = Molekulargewicht je Basenpaar (660 g/mol)

L = Länge der DNA in bp

sind. Darüber hinaus lässt sich der Reinheitsgrad der isolierten DNA aus dem Verhältnis der Absorptionsmaxima von DNA und Proteinen zueinander ableiten. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei einer Wellenlänge von 280 nm und wird durch die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin bestimmt. Der Koeffizient A_{260}/A_{280} einer reinen DNA Lösung liegt zwischen 1,8 und 2. Zur Messung wurde die DNA-Probe 1:100 verdünnt. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten, da diese das UV-Licht nicht absorbieren. Die Absorption von Plasmid-DNA-Lösungen wurde gegen das entsprechende Lösungsmittel (H₂O, TE-Puffer) normalisiert. Zusätzlich ist eine Abschätzung der DNA-Konzentration durch den Vergleich der Fluoreszenzen der DNA Banden auf einem Agarosegel mit der von DNA-Standards bekannter Konzentration möglich.

4.2.1.6 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme mit DNA-Nukleaseaktivität, die eine definierte DNA-Sequenz erkennen und einen Schnitt in den doppelsträngigen DNA-Strang einführen. In Abhängigkeit der erzeugten Endigungen der gegenüberliegenden DNA-Stränge werden diese Schnittstellen, in stumpfe oder überhängende Schnittstellen eingeteilt. Aufgrund des parentalen Organismus besitzen die Restriktionsendonukleasen unterschiedliche chemische Optimumsbedingungen, die durch spezielle Restriktionspuffer und Temperatureinstellungen erreicht werden. Die entsprechenden Puffer, ihre Kombinationen und die Reaktionsbedingungen wurden nach Herstellerangaben ausgewählt. Die Aktivität einer Restriktionendonuklease wird in Units gemessen. Per Definition schneidet ein Unit Enzym ein Mikrogramm Referenz-DNA vollständig in einer Stunde. Anhand der vom Hersteller angegebenen Aktivität wurde die benötigte Menge an Enzym berechnet.

4.2.1.7 Ligation

Bei der Ligation werden ca. 50 ng geschnittener Vektor und ein 3-5-facher molarer Überschuss an Insertionsfragment mit 1x Ligasepuffer gemischt. Da die DNA-Fragmente komplementäre überhängende Einzelstrangenden aufweisen, wird mit 0,5 µl 1 U T4-DNA-Ligase (Roche Biondiagnostics) 30 min bei 22°C bzw. über Nacht bei 16°C ligiert. Das Reaktionsvolumen beträgt 10-20 µl.

4.2.1.8 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese wurden Moleküle aufgrund ihrer Ladung und Größe in einem Gel aufgetrennt. Bei Nukleinsäuren ist die Ladung der Moleküle proportional zum Molekulargewicht, daher kommt es bei linearisierter DNA zur exakten Auftrennung nach dem Molekulargewicht.

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen 0,8-2,0%igen Agarose-Gelen. Je nach Prozentualität des Gels wurde die erforderliche Menge Agarose abgewogen und in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Zur Detektion der DNA wurde das abgekühlte Gel mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Endkonzentration) versetzt und nach der Polymerisation mit 1xTAE als Laufpuffer überschichtet. Ethidiumbromid ist ein organischer Fluoreszenzfarbstoff, der aufgrund seiner planaren Struktur zwischen die Basenpaare von dsDNA interkaliert. Auch bei ssDNA und RNA kann der Farbstoff sich zwischen die Basenpaare einlagern, allerdings ist die Interkalation hier schwächer als

bei dsDNA. Unter UV-Licht (254-366 nm) wurde Ethidiumbromid angeregt und emittiert Licht im orange-roten Bereich (590 nm), wodurch die DNA sichtbar wurde. Die Detektionsgrenze von Ethidiumbromid in Agarosegelen liegt bei etwa 10-20 ng dsDNA. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1x DNA-Probenpuffer versetzt. Das darin enthaltene Glycerol erleichtert das Befüllen der Geltaschen, und Bromphenolblau bzw. Xylencyanol markiert die Lauffront des Gels.

Zur späteren Identifikation der Bandengröße wurden zusätzlich zu den Proben 5 µl eines definierten DNA-Längenmarkers in eine Geltasche aufgetragen. Die Auftrennung der Proben verlief unter konstanter Spannung (50-120 V).

4.2.1.9 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*) ist eine Methode zur *in vitro* Amplifikation eines spezifischen DNA-Segments. Eine thermophile DNA-Polymerase amplifiziert dabei in mehreren aufeinanderfolgenden Replikationszyklen einen DNA-Abschnitt zwischen zwei entgegengesetzt gerichteten Primern. Diese Primer sind komplementär zu den Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts (Matrizen-DNA). Die PCR wurde mit Hilfe eines PCR-Fertigansatzes durchgeführt, der bei einem Gesamtansatzvolumen von 25 µl ca. 2,5 Einheiten der puReTaq[®] DNA-Polymerase, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ und 200 µM Oligonucleotide enthält.

Ein PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Matrizen-DNA:	150-300 ng
Forward Primer (+):	5 pmol
Reverse Primer (-):	5 pmol
H ₂ O	auf 20 µl auffüllen

Die Amplifikation erfolgte in einem programmierbaren PCR-Gerät. Dabei wurde folgendes Programm verwendet:

<u>Programmschritte</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>
1. Initiale Denaturierung	94°C	5 min
2. Zyklische Denaturierung	94°C	1 min
3. Primeranlagerung (Annealing)	55°C	1 min
4. Elongation	72°C	1 min

Die Schritte 2.-4. wurden in 30 Zyklen wiederholt.

Abschließend wurde das Produkt für 4 min auf 72°C amplifiziert, um eine vollständige Amplifikation aller Fragmente zu erreichen.

4.2.1.10 Quantitative Light Cycler[®] PCR

Bei dem Light Cycler Gerät der Firma Roche Diagnostics handelt es sich um einen Thermocycler, der mit einem Fluorimeter kombiniert ist. Als Reaktionsgefäße werden Glaskapillaren eingesetzt, die eine hohe Effizienz des Wärmetransfers und damit kurze Gesamtreaktionszeiten erlauben. Die Reaktionsansätze wurden in Glaskapillaren in einem Karussell platziert, das Steckplätze für 32 Reaktionen besitzt. Der Light Cycler wird über einen Computer gesteuert und die ermittelten Daten werden zur Weiterbearbeitung gespeichert. Während der PCR kann man den Verlauf der Reaktionen über ein Sensorgramm verfolgen. Die Intensität des Fluoreszenzsignals aller Proben wird am Ende jeder Elongationsphase bei einer vorher festgelegten Temperatur gemessen. Dabei werden die Kapillaren im Karussell nacheinander über eine optische Einheit gedreht, wobei die Signalintensitäten bestimmt werden. Die Amplifikation eines Fragmentes kann über die Änderung der Fluoreszenzintensität nach jedem Reaktionszyklus in Echtzeit mitverfolgt werden. Als Fluoreszenzfarbstoff wird SYBR GreenI eingesetzt, welches bevorzugt in die kleine Furche doppelsträngiger DNA (dsDNA) interkaliert. Durch die Bindung des Farbstoffes an die dsDNA steigt die Fluoreszenzintensität an. SYBR GreenI absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 488 nm und emittiert bei 530 nm. Das Fluoreszenzsignal ist direkt proportional zur DNA-Konzentration. Die anfänglich enthaltene Menge an Matrizen-DNA wird durch die Bestimmung des „Crossing Points“ (CP) ermittelt. Der CP definiert die Zyklusnummer, bei der gleiche Fluoreszenzintensitäten für alle Amplifikationen auftreten. Zur Bestimmung dieses Punktes muss man die Anzahl der Reaktionszyklen so wählen, dass die sigmoide Kurve der Fluoreszenzintensität von der exponentiellen in die Sättigungs- oder Plateauphase übergeht. Innerhalb des linearen Bereichs der logarithmischen Kurve, also dem Bereich, in dem das Fluoreszenzsignal exponentiell steigt, wird eine Gerade gelegt. Der Punkt, an dem diese Gerade die Grundlinie schneidet, wird als CP bezeichnet. Um die Auswertung zu objektivieren, wurden die CPs nicht manuell gewählt, sondern mittels der Light-Cycler[®] Software automatisch ermittelt. Die Spezifität der PCR wird durch die Analyse der Schmelztemperatur in einer Schmelzkurve des Produktes überprüft. Hierfür wird die Temperatur schrittweise

von 40 auf 90°C erhöht, wobei die Fluoreszenz ständig überwacht wird. Da beim Schmelzen der dsDNA der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird, entsteht ein typischer Kurvenverlauf. Die Schmelztemperatur ist für jedes Produkt spezifisch und ergibt sich in Abhängigkeit der Fragmentlänge und des Gehalts an Guanin und Cytosin. Im Vergleich mit einem definierten Standard kann die Identität des Amplifikats bestimmt werden.

Alle Materialien für die quantitative Echtzeit-PCR wurden von Roche Diagnostics bezogen. Es wurde folgender Master Mix angefertigt und zu je 2 µl Matrizen-DNA gegeben:

PCR-Ansatz:

Light Cycler© FS DNA Master Plus SYBR Green	4 µl
forward Primer (20 µM)	1 µl
reverse Primer (20 µM)	1 µl
ddH ₂ O	12 µl

Im Reaktionsmastermix (Light Cycler© FS DNA Master Plus SYBR Green) sind Taq-DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, MgCl₂, SYBR Green I und dNTPs enthalten.

Für die Negativkontrollen wurden statt 2 µl Matrizen-DNA 2 µl Wasser verwendet.

Es wurde folgendes Programm verwendet:

<u>Programmschritte</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>
1. Initiale Denaturierung	95°C	300 sec
2. Zyklische Denaturierung	95°C	15 sec
3. Primeranlagerung	60°C	5 sec
4. Elongation	72°C	15 sec

Die Schritte 2. bis 4. wurden in 45 Zyklen wiederholt.

5. Schmelzkurve von 65°C auf 95°C mit einer Geschwindigkeit von 0,1°C/sec

6. Kühlen 40°C 30 sec

Die Veränderung der Fluoreszenzintensität wurde jeweils am Ende der Elongationsphase gemessen und für die Auswertung gespeichert.

Zur relativen Quantifizierung des analysierten Gens wurde dessen Menge mit einem DNA-Standard bekannter Konzentration verglichen oder relativ zu einem Haushaltsgen quantifiziert.

4.2.1.11 HBV-und Ad-DNA-Messung mittels quantitativer PCR

Aus dem Lebergewebe wurde mittels DNeasy Tissue Kit (Quiagen, Hilden) die Gesamt-DNA gewonnen und als Matritze für die quantitative Light-Cycler-PCR verwendet. Durch Konstruktion spezifischer Primer kann die partiell doppelsträngige DNA in reifen HBV-Kapsiden und die Ad-DNA nachgewiesen werden. Die ermittelten Werte für HBV rcDNA wurden in Kopien pro 10^3 Zellen umgerechnet. Die Reaktion wurde wie unter 4.2.1.10 beschrieben durchgeführt und neben der Schmelzkurvenanalyse wurde die Größe des PCR-Produktes durch Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurden die Glaskapillaren nach der Light-Cycler-PCR umgekehrt in Eppendorfgefäße gestellt und das Produkt durch Zentrifugation aufgefangen. Mit diesen Proben wurde die Fragmentlänge analysiert.

4.2.1.12 Präparation genomischer DNA

Die Gewinnung der gesamten DNA aus Lebergewebe wurde mit Hilfe der Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. 50 mg Lebergewebe wurden in 1 ml NP40-Lysispuffer homogenisiert und mit 20 μ l Proteinase K (20 mg/ml) ü.N schüttelnd bei 56°C inkubiert. Die DNA wurde weiter mit Phenol und Chloroform aufgereinigt, indem zuerst 500 μ l Phenol hinzugegeben wurde und für 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert wurde. Die Nukleinsäuren wurden dabei wegen ihrer hydrophilen Gruppen in der wässrigen Phase gelöst, wohingegen die Proteine zwischen den beiden Phasen, der sog. Interphase, enthalten sind. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in einem neuen Gefäß 1:1 mit Phenol-Chloroform gemischt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 14.000 rpm wurde die wässrige Phase erneut abgenommen und 1:1 mit Chloroform gemischt. Durch die Zugabe von Chloroform wird das Phenol aus der wässrigen Lösung befreit. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen. Die DNA wurde mit 600 μ l kaltem Isopropanol gefällt und 30 min bei -20°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 14.000 rpm für 15 min und Waschen mit 250 μ l 70 % Ethanol wurde das DNA-Pellet getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 500 μ l TE-Puffer oder H₂O aufgenommen. Zudem wurde die enthaltenen RNA mit 2,5 μ l RNase A (60 mg/ml) verdaut.

4.2.1.13 Southern-Blot Analyse

Beim Southern-Blot wird die zuvor in einem Gel elektrophoretisch aufgetrennte DNA dauerhaft auf einer positiv geladenen Nylonmembran fixiert, um später durch

Hybridisierung mit markierten Sonden einzelne DNA-Fragmente spezifisch nachweisen zu können. Die Methode wurde 1975 von Ed M. Southern etabliert. Die DNA wurde in einem vertikalen 1 %igen Agarosegel (1 % w/v Agarose in 1x TAE-Puffer) ohne Ethidiumbromid bei konstanter Spannung (65 Volt) aufgetrennt. Danach wurde das Gel mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid für ca. 2 min gefärbt und die DNA mittels UV-Licht visualisiert. Das Gel wurde dann in ddH₂O geschwenkt und mit 0,25 M HCl für 5 min depuriniert. Danach wurde das Gel noch einmal mit ddH₂O abgespült und dann für 15 min in 0,4 M NaOH auf einem Schüttler inkubiert, um die DNA zu denaturieren. Anschließend wurde die DNA mittels Kapillarkraft und 0,4 M NaOH als Blotpuffer über Nacht auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert (Abb. 4.1).

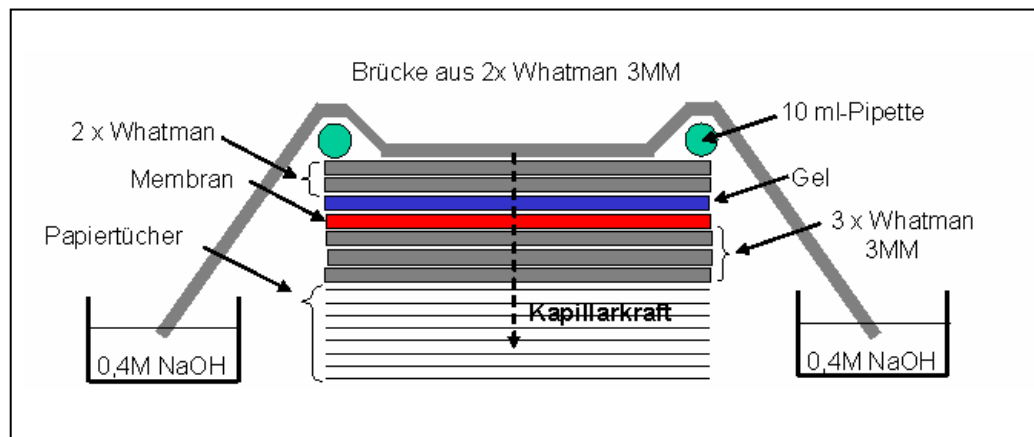


Abb. 4.1 : Aufbau der Southern-Blot Apparatur

Nach dem Blotten wurde die Membran zur Neutralisation für 3 min in 2 x SSC gewaschen, danach kurz getrocknet und die DNA auf der Membran in einem UV-Ofen bei 150 mJ gecrosslinkt.

4.2.1.14 Gesamt-RNA-Präparation mit Trizol[®] Reagenz

Für die Herstellung der Gesamt-RNA wurden 50 mg murines Lebergewebe in 1 ml Trizol[®] Reagenz lysiert. Die Isolation der RNA erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers und basiert auf der von Chomczynski und Sacci, 1987 etablierten „single-step“ RNA-Isolationmethode. Trizol[®] ist ein monophasisches Lösungsmittel aus Phenol und Guanidinisothiocyanat (GTC). GTC ist ein chaotropes Salz, das Proteine denaturiert und dabei auch RNasen inaktiviert. Durch das im Trizol[®] enthaltene Phenol werden die Proteine aufgrund einer pH-Wert- Erniedrigung von der RNA abgetrennt. Sie sammeln sich nach Zugabe von Chloroform und Zentrifugation bei 14.000 rpm für 15 min bei 4 °C in der Interphase. Die in der wässrigen Phase befindliche RNA wurde

mit Isopropanol gefällt und mit 70 % Ethanol gewaschen. Die RNA-Proben wurden in 100 µl RNase freiem Wasser resuspendiert und gegebenenfalls bei -80 °C gelagert. Die Dnase I Behandlung der präparierten RNA, die für RT-PCR oder Northern-Blot Analyse eingesetzt wurde, war erforderlich, um Rest-DNA zu entfernen. Im Anschluss an die DNase I Behandlung wurde die RNA-Integrität durch die Darstellung der 18S- und 28S-rRNA im Agarosegel überprüft.

4.2.1.15 Northern-Blot Analyse

Die Gesamt-RNA wurde nach der in 4.2.1.14 beschriebenen Methode aus dem Lebergewebe extrahiert. Zur Herstellung des 1%igen vertikalen Agarosegels wurde 1,5 g Agarose in 15 ml autoklaviertem 10x E-Puffer und 105 ml DEPC-H₂O gelöst und aufgeköcht. Nachdem die Agarose auf 60°C abgekühlt wurde, wurden 30 ml Formaldehyd (Formaldehyd, 37%) zugegeben und das Gel in die zuvor mit 1%igem SDS gründlich gereinigte und mit ddH₂O gespülte Kammer, einschließlich Kamm, gegossen. 25 µg Gesamt-RNA wurden auf Eis mit 10 µl 10x E-Puffer, 15 µl Formaldehyd und 40 µl Formamid versetzt. Die Proben wurden 10 min auf 65°C erhitzt, auf Eis abgekühlt, kurz anzentrifugiert um entstandenes Kondenswasser zu entfernen, und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gestellt. Die elektrophoretische Auftrennung der aufgetragenen Proben erfolgte in 1 x E-Puffer bei 80-100 V. Danach wurde das Gel 2-mal für 10 min in ddH₂O gewaschen. Der Aufbau der Blot-Apparatur erfolgte anhand der Abbildung 4.1. Als Transferpuffer diente 10x SSC. Der RNA-Transfer auf die positiv geladene Nylonmembran erfolgte in 12 bis 16 h. Danach wurde der vollständige Transfer der RNA durch eine Überprüfung des Gels unter dem Transilluminator kontrolliert. Die Membran wurde für 10 min in 2 x SSC gewaschen, 30 min an der Luft getrocknet und anschließend die RNA durch 2-maliges Cross-linken unter UV-Licht bei 150mJ an die Membran gebunden. Die Aufbewahrung der Membran bis zur Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde erfolgte in einer sterilen Klarsichtfolie bei 4°C.

4.2.1.16 Herstellung von radioaktiv markierten Sonden

Die Markierung der DNA-Sonde erfolgt über ein Random-Priming mit radioaktiven, phosphatmarkierten Desoxy-Cytosin-Tri-Phosphaten $[(\alpha^{32}\text{P})\text{dCTP}]$. Radioaktiv markiert ist bei diesem Verfahren die α -ständige Phosphatgruppe. Für das Random-Priming wird das Rediprime II DNA Labeling System der Firma Amersham verwendet.

In dem Mastermix des Kits (dNTP, DNA-Polymerase, Mg^{2+}) wird 25 ng lineare, dsHBV-DNA oder GAPDH-DNA (in einem Gesamtvolumen von 45 μ l) pipettiert und zur Denaturierung der Doppelstränge für 5 min bei 100°C aufgeköcht. Die Lösung wird unmittelbar nach dem Aufkochen auf Eis inkubiert. Daraufhin werden 5 μ l der Radioaktivität [$\alpha^{32}P$]dCTP] (entspricht 50 μ Ci) in den Ansatz gegeben und für ca. 10 min im Bruttschrank bei 37°C inkubiert.

4.2.1.17 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden

Die zu hybridisierenden Membranen wurden bei 65°C im Hybridisierungssofen mit einer Lösung zu Blockade unspezifischer Bindungen (Church-Puffer mit 50 μ l (10 μ g/ml Heringssperma) inkubiert. Das Heringssperma blockiert unspezifische Bindungen. Vor Zugabe der radioaktiven Sonde wurde diese bei 100°C für 5 min denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Hybridisierung erfolgte ü.N. bei 65°C. Nach der Hybridisierung folgten mehrere Waschschrte, um überschüssige Sondenfragmente zu entfernen. Die radioaktive Sonde wurde für eine erneute Verwendung bei +4°C für einige Tage gelagert. Im ersten Waschschrte wurde die Membran mit vorgewärmten 2 x SSC bei 65°C für 5 min gewaschen. Im zweiten Waschschrte wurde mit vorgewärmten 2 x SSC mit 0,1% SDS bei 65°C für 20 min gewaschen. Die gewaschenen Membranen wurden bei RT getrocknet und in Haushaltsfolie eingeschweißt. Zum Nachweise der Radioaktivität stehen zwei Verfahren zur Verfügung. Die Membranen wurden entweder in eine Entwicklungskassette unter einen Röntgenfilm gelegt oder unter einem Phosphorscreen gelegt, der über eine CCD-Kamera ausgelesen wurde. Wurde ein Standard mitaufgetragen, können anhand der gemessenen Counts pro Fläche Konzentrationsbestimmungen vorgenommen werden.

4.2.1.18 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem SuperScript™ III First-Strand Synthesis System Kit for RT-PCR, der Firma Invitrogen nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Es wurde jeweils 1 μ g Gesamt-RNA eingesetzt und die mRNA mit Oligo(dT)24 Primern mittels Super Script III reverser Transkriptase, gemäß dem Kit beiliegenden Protokoll, in cDNA revers transkribiert. Dabei ist zu beachten, dass die RNA am Ende der cDNA-Synthese durch Zugabe von RNase H verdaut wurde. Je 2 μ l cDNA wurden als Matrize für die Untersuchungen der Genexpression in der Leber der infizierten Mäuse mittels quantitativer PCR verwendet. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

4.2.2 Zellbiologische Methoden

4.2.2.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellen wurden bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre (5% CO₂) auf 175 cm²- und 75 cm²-Plastikkulturflaschen (Nunclon oder TPP) gezüchtet. Je nach Zelllinie wurde das Kulturmedium alle 2 bis 3 Tage erneuert. Konfluente Zellkulturen wurden geteilt. Hierbei wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen und 2 min bei 37°C mit Trypsin/EDTA inkubiert. Das Trypsin löst die Zellen durch den hydrolytischen Abbau verankernder Zelloberflächen-Proteine. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden die Zellen mit Medium gewaschen und 3 min bei 300 g sedimentiert. Für die langfristige Lagerung wurden 3 x 10⁶ Zellen in FKS/10% DMSO eingefroren. Die Zellen wurden stufenweise auf -196°C heruntergekühlt und bei dieser Temperatur in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die Zellen möglichst schnell auf 37°C erwärmt, gewaschen und mit einer größeren Menge Medium in Kultur gebracht, um toxische Effekte des DMSOs zu minimieren.

4.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Neubauer Zählkammer verwendet. Dabei wurde ein Aliquot der Zellen mit Trypan blau gemischt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff über die Membran auf und lassen sich so blau anfärben. Zehn µl Zellen wurden mit 10 µl Trypan blau gemischt in eine Neubauer Zählkammer pipettiert und die lebenden Zellen wurden unter dem Mikroskop gezählt.

Dabei wurde die Anzahl der lebenden Zellen wie folgt bestimmt:

$$\text{Lebende Zellen/ml} = n \times V_f \times 10^4$$

mit

n = Mittelwert der Zellen aus vier ausgezählten Quadraten

V_f = Verdünnungsfaktor der Zellen, in diesem Fall 2

4.2.2.3 Kultivierung von 293-Zellen

Kulturmedium

Dulbeccos MEM

10 % hitzeinaktiviertes (30 min, 56°C) FKS

5,5 ml Glutamin (200 mM); 5,5 ml Penizillin/Streptomycin (1000 µg/ml)

Die 293 Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen bei 37°C in einem Inkubator mit 5 % CO₂ kultiviert. An jedem dritten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen gesplittet. Zur Virusproduktion wurden die 293 Zellen in 175 cm² Zellkulturflaschen überführt und bei konfluentem Wachstum mit einem rekombinanten Adenovirus infiziert.

4.2.2.4 Produktion und Amplifikation von rekombinanten Adenoviren

Die rekombinierten Adenovirusplasmide wurden vor der Transfektion mit Pac I linearisiert, die DNA gefällt und mittels Lipofectamine 2000 transfiziert in 293-Zellen. Diese Zellen stellten das für die Vermehrung der rekombinanten Adenoviren essentielle Gen E1 *in trans* zur Verfügung, so dass es zu einer Virusproduktion in diesen Zellen kam. Nach einigen Tagen lösten sich die Zellen vom Flaschenboden ab. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Viren sowohl im Überstand als auch in den Zellen. Die restlichen Zellen wurden mit dem Medium abgespült und in ein verschließbares 50 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, um die noch intakten Zellen aufzubrechen. Die Zellreste wurden durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 min abgetrennt und der virenhaltige Überstand nach Zugabe von 10 % Glycerol bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die Bestimmung des Virustiters ergab im Mittel einen Wert von 1×10^8 infektiösen Partikeln pro ml.

4.2.2.5 Produktion von hochkonzentrierten Adenovirusstocks

Da die Konzentration der Viren im Medium nach der Transfektion noch sehr niedrig war, wurden mehrere 175 cm² Zellkulturflaschen mit frischen 293 Zellen mit dem Überstand infiziert. Diese sekretierten größere Mengen Viren in ihrem Überstand, da mehr Zellen von Beginn an infiziert wurden. Die Adenoviren wurden aus dem Überstand und den Zellen wie in Abschnitt 4.2.2.4 beschrieben aufgereinigt. Das Passagieren des Adenoviruses auf frische 293-Zellen wurde solange wiederholt, bis die gewünschte Konzentration erreicht war. Die Konzentration der Viren wurde durch Titration des Virusstockes auf 293-Zellen bestimmt. Dabei wurde der Grad des cytopathischen Effektes bestimmt. Der cytopathische Effekt zeigt sich morphologisch in einem Abrunden, Verklumpen und Ablösen der Zellen von der Unterlage. Bei der Produktion von hochkonzentrierten Adenovirusstocks ergab die Bestimmung des Virustiters im Mittel einen Wert von 5×10^9 infektiösen Partikeln pro ml.

4.2.2.6 Aufreinigung mittels Cäsiumchlorid (CsCl) Gradienten

Zur Aufreinigung des Virus im CsCl Gradienten wurden die hochkonzentrierten Adenovirus-Überstände 10 min bei 4.000 rpm abzentrifugiert, bis der Überstand klar wurde. Jeweils 8 ml Adenovirus Überstand wurden vorsichtig mit einer CsCl Lösung mit einer Dichte von 1,50 g/ml gemischt, in Ultrazentrifugenröhrchen überführt, austariert und mit Mineralöl überschichtet. Als nächstes erfolgte die erste Ultrazentrifugation in einer Beckmann Zentrifuge mit dem SW41 Rotor bei 33.000 rpm für 16 h bei 10°C. In diesem Schritt wurden die infektiösen Viruspartikel von defekten Viruspartikeln und Zellresten getrennt. Nach der Ultrazentrifugation ist das Adenovirus als bläulich schimmernde Bande zu erkennen. Die Bande wurde mit einer Kanüle abgenommen und zur besseren Aufreinigung auf eine CsCl Lösung mit einer Dichte von 1,50 g/ml gegeben und bei 33.000 rpm bei 10°C erneut in einer Beckmann Zentrifuge in dem Rotor SW41 für ca. 14-16 h ultrazentrifugiert. Die Adenoviren wurden wie oben geschildert nach der Zentrifugation abgenommen und bis zur Dialyse zur Entfernung des zelltoxischen CsCl bei 4 °C aufbewahrt.

4.2.2.7 Dialyse von Adenovirusstocks

Das CsCl im Adenovirus-Eluat wurde in einer Dialysekammer (Slide-A-Lyzer 4-12 ml, MWCO=10.000, Pierce, Rockford, USA) für 9 h bis 12 h im Dialyse Puffer bei RT entfernt. Der Puffer wurde 3-mal gewechselt, um somit ein komplettes Entfernen des CsCl Salzes zu erreichen. Nach Abschluss der Dialyse wurde das Virus aliquotiert und in sterilen Röhrchen bei -80° gelagert.

4.2.3 Biochemische Methoden

4.2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford-Assay)

Bei der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe von 465 nm ohne Protein zu 595 nm mit Protein. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist demzufolge ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung. Es wurde das Protein Assay-Farbreagenz von BioRad verwendet. Die zu messende Proteinprobe wurde mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Farbreagenz vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde die OD₅₉₅ bestimmt. Zuvor wurde eine Eichkurve mit festgelegten Mengen an BSA erstellt. Im linearen Bereich der Kalibrierungsgerade (1-10 µg Protein) entsprach eine OD₅₉₅ von 0,06 ca. 1 µg Protein.

4.2.3.2 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die diskontinuierliche denaturierende SDS-PAGE nach Lämmli dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. SDS (Sodium-dodecyl-sulfat) ist ein anionisches denaturierendes Detergens, das an Peptide bindet und den Proteinen so eine negative Ladung proportional zum Molekulargewicht verleiht, die auch die Eigenladung des Proteins überlagert. Die meisten Proteine binden etwa 1,4 g SDS pro Gramm Protein. Auf der Oberfläche der gebildeten SDS-Protein Komplexe findet man die negativ geladenen Sulfatgruppen des SDS. Dadurch werden alle Proteine über ein konstantes Ladung/Masse-Verhältnis vergleichbar. Im elektrischen Feld kommt es zur Auftrennung des Proteingemisches. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht (MG) auf. Durch Zugabe von Mercaptoethanol werden zusätzlich eventuell vorhandene Disulfid-Bindungen reduziert. Es wurde ein diskontinuierliches System verwendet, in dem die Proben zuerst in ein nicht-restriktives Sammelgel einlaufen und dann in einem Trenngel aufgetrennt werden. Je nach Größe des nachzuweisenden Proteins werden Trenngele mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen verwendet. So werden z.B. 14%-ige Trenngele für Proteine mit einem MG zwischen 10 und 60 kDa, 10%-ige Trenngele für Proteine mit einem MG zwischen 30 kDa und 120 kDa und für Proteine mit einem MG zwischen 50 kDa und 200 kDa werden 8%-ige Trenngele verwendet. Es wurden zwischen 10 und 450 µg Protein mit Ladepuffer und 1% Mercaptoethanol 5 min bei 95°C inkubiert, 3 min abzentrifugiert und der Überstand auf ein 14%-iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 20 mA.

Sammelgel (4% Acrylamid):	6,1 ml H ₂ O
	2,5 ml 0,5 M Tris (pH 6,8)
	100 µl 10% SDS
	1 ml Acrylamid/Bis 40%
	100 µl APS
	10 µl TEMED
Trenngel (8% Acrylamid):	5,5 ml H ₂ O
	2,5 ml 1,5 M Tris (pH8,8)

	100 µl 10% SDS
	2 ml Acrylamid/Bis 40%
	50 µl APS
	10 µl TEMED
Trenngel (10% Acrylamid):	5 ml H ₂ O
	2,5 ml 1,5 M Tris (pH8,8)
	100 µl 10% SDS
	2,5 ml Acrylamid/Bis 40%
	50 µl APS
	5 µl TEMED
Trenngel (14% Acrylamid):	4 ml H ₂ O
	2,5 ml 1,5 M Tris (pH8,8)
	100 µl 10% SDS
	3,5 ml Acrylamid/Bis 40%
	50 µl APS
	5 µl TEMED

4.2.3.3 Western-Blot

Mit der Western-Blot-Methode können auf einem SDS-Gel aufgetrennte Proteine elektrophoretisch auf eine Membran übertragen werden. Als Blot-Membran wurde eine Nitrocellulose Membran (Nitrocellulose, Protran, Schleicher & Schuell, Dassel) verwendet. Diese bindet die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen. Die Proteinbindungsstellen der negativ geladenen Nitrocellulose-Membran wurden aktiviert, indem dem Transferpuffer Methanol zugesetzt wurde. Nitrocellulose-Membranen besitzen eine hohe Proteinbindungskapazität und eignen sich für Proteinfärbung und Immunfärbung. Die Nitrocellulosemembran und das Polyacrylamidgel wurden zwischen zwei Lagen Whatman-3MM-Filterpapier gelegt und mit Transferpuffer durchtränkt. Das Gel und die Nitrocellulosemembran wurden so zwischen die Elektroden gelegt, dass die Nitrocellulosemembran auf der Seite der Anode zu liegen kam. Der elektrophoretische Transfer erfolgte 90 min bei 250 mA. Aufgrund des Stroms wandern die negativ geladenen Proteine aus dem Gel in Richtung Anode, also in

Richtung Nitrocellulosemembran, und binden unspezifisch aber nahezu irreversibel an die Nitrocellulosemembran.

4.2.3.4 Ponceaufärbung von Proteinen auf Blots

Ponceaurot färbt Proteine auf Nitrocellulose-Membranen, sofern die Proteinmenge mehr als 50 ng/Bande beträgt. Die Färbung ist reversibel und eine anschließende Immunfärbung möglich. Der Blot wurde 1-2 min bei RT in Ponceaurot (2% in 3%-iger Trichloressigsäure) inkubiert und die überschüssige Farbe danach mit Wasser abgewaschen. Mit Hilfe der Ponceaufärbung wurde eine gleichmäßige Übertragung der Proteine auf die Membran nachgewiesen.

4.2.3.5 Immundetektion von Proteinen auf der Nitrocellulose-Membran

Mit Hilfe der Immunfärbung lassen sich Proteine auf der Membran mit spezifischen Antikörpern nachweisen. Der Primärantikörper bindet spezifisch an ein oder mehrere Epitope des nachzuweisenden Proteins, während der Sekundärantikörper wiederum spezifisch für die Spezies und die Klasse des Primärantikörpers ist. Der Sekundärantikörper ist an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt, das in Anwesenheit von H₂O₂ die Oxidation von Luminol katalysiert und damit eine Chemilumineszenz auslöst. Die Chemilumineszenz wurde durch Exposition eines Röntgenfilms für 30 sec bis zu 1h dokumentiert, so dass eine Lokalisierung der Proteine auf den Membranen möglich war. Zunächst wurde die Nitrocellulosemembran nach dem Transfer 30 min in Blocking-Puffer (Magermilchlösung) geschwenkt, damit die unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran abgesättigt werden. Danach wurde die Membran 60 min mit einem primären Antikörper, der spezifisch an das zu detektierende Protein bindet, inkubiert. Die primären Antikörper wurden in verschiedenen Verdünnungen in den Blocking Puffer gegeben. Nach dreimaligem 15-minütigem Waschen mit S-PBS, um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper für 1h bei RT schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3-mal 5 min mit S-PBS gewaschen. Die Detektion der Peroxidase erfolgte durch die ECL-Detektionslösungen 1 und 2, (Amersham, Bioscience) die im Verhältnis 1:1 gemischt und kurzzeitig auf die Membran gegeben wurden. Die Membran wurde zur Belichtung mit einem Röntgenfilm (Amersham, Bioscience) in eine Bleikassette gelegt. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte durch die Curix 60 AGFA Entwicklmaschine.

4.2.4 *In vivo* und immunologische Methoden

4.2.4.1 Injektion von Mäusen mit adenoviralen-HBV-Vektoren

Im Rahmen aller Experimente wurden alle Mäuse entweder mit Ad-HBV oder Kontrollvektor Ad-HBV-k/o *i.v.* in die Schwanzvene infiziert. Die Dosis bei einer *i.v.*-Injektion war 1×10^9 i.u.. Zuvor wurde die Maus zur besseren Sichtbarkeit der Schwanzvenen kurzzeitig unter eine Wärmelampe gesetzt.

4.2.4.2 Entnahme von Blut und Herstellung von Serum

Die Mäuse wurden auf Trockeneis in gesättigter CO₂-Atmosphäre getötet, auf einem Präparationsbrett fixiert und mit 70% Ethanol desinfiziert. Der Brustraum wurde mit einer Schere geöffnet und mit einer Spritze wurde soviel Blut wie möglich aus dem Herzmuskel entnommen. Das Blut, das sofort gerann, wurde für 10 min bei 6000 rpm in einer Tischzentrifuge bei RT zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Das Serum wurde bei -20°C gelagert.

4.2.4.3 Bestimmung der Lebertransaminasenaktivität

Das leberspezifische Enzym Alanin Aminotransferase (ALT) wird von apoptotischen Hepatozyten ins Blut abgegeben. Seine Konzentration im Blut ist somit ein hochspezifischer Marker für Leberzellschädigung (Chisari *et al.*, 1989). Die Bestimmungen der Lebertransaminasenaktivität im Blut können verwendet werden, um den Grad der Leberentzündung in der Maus zu bestimmen. Die Transaminasenaktivität von 32 µl frischem Mäuse-Serum wurden nach Herstellerangaben der Firma Roche® auf einen Reagenzträger (Reflotron®) mit dem Messgerät Reflovet® bestimmt.

4.2.4.4 Bestimmung von HBsAg, HBeAg und anti-HBs-Antikörper im Serum

HBsAg und HBeAg sind wichtige serologischen Marker, die während einer akuten sowie chronischen HBV-Infektion im Blut nachzuweisen sind (Takahashi *et al.*, 1976). Die Bestimmung von HBsAg, HBeAg und anti-HBs-Antikörper in Serum wurde von Mitarbeitern des Instituts für Virologie der Universität zu Köln durchgeführt (AXSYM™ assays, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA).

4.2.4.5 Histologische Gewebepreparationen

Unmittelbar nach der Entnahme der Mausleber wurde ein Teil des Gewebes in 4% gepuffertem Formalin aufbewahrt. Die fixierten Stücke wurden dann entwässert und in

Paraffin eingebettet. Die weiteren histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen, sowie die Hämatoxylin-Eosin (HE-) Färbungen und HBV-Kapsid(core)-Färbungen wurden im Institut für Pathologie in Kooperation mit Dr. Uta Drebber durchgeführt. Die HE-Färbung stellt eine Routine-Färbung dar. Mit ihr gelingt eine gute Darstellung des Gewebes, wobei Zellkerne blau-violett und Zytoplasma rosa erscheinen. Die histologische Analyse der Gewebeschnitte erfolgte mit Hilfe eines konventionellen Lichtmikroskopes und einer angeschlossenen Kamera.

4.2.4.6 Depletion von CD8+T-Zellen in C57Bl/6 und CD1-k/o Mäusen

Die C57Bl/6 und CD1-k/o Mäuse wurden mit je 100 µg des Ratte-anti-Maus-CD8 Depletions-Antikörpers (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. O. Utermöhlen, Mikrobiologie, Köln) intraperitoneal (*i.p.*) injiziert. Die Depletion der CD8+T-Zellen wurde durch Untersuchung der Milzzellen in der Durchflusszytometrie bestätigt.

4.2.4.7 Isolierung von primären murinen Zellen

In dieser Arbeit wurden Zellen aus der Milz und Leber isoliert und für FACS-Analysen verwendet.

4.2.4.7.1 Isolierung von Milzzellen

Zur Entnahme der Milz wurden die Mäuse durch CO₂ getötet. Die Bauchdecke wurde durch einen medianen Bauchschnitt eröffnet und die Milz unter sterilen Bedingungen entnommen. Die Milz wurde anschließend in 5 ml kaltem RPMI Medium (supplementiert mit 5% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin) mit Hilfe des Stempels einer 5 ml Spritze durch ein Nylonsieb (Porengröße 70 µm) gedrückt, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min unter Kühlung auf 4°C wurden die Erythrozyten durch Zugabe von 5 ml ACK-Lysis Puffer 3 min lysiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min wurden die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen und in einer Zählkammer nach Neubauer wurde im Trypanblau-Ausschlußverfahren die Dichte der vitalen Zellen bestimmt.

4.2.4.7.2 Isolierung von Leber-assoziierten Lymphozyten (LAL)

Zur Entnahme der Leber wurden die Mäuse durch CO₂ getötet. Anschließend wurde der Bauchraum geöffnet und die Pfortader (*Vena porta*) frei präpariert, über die die Leber 5 min mit HBSS (Ca/Mg-frei) Medium komplementiert mit 0,05 % Collagenase

Typ IV (419 U/mg) bei 37 °C verdaut wurde, bis das Organ blutleer war. Bei erfolgreicher Perfusion blähte sich die Leber auf und wurde sehr hell. Das verdaute Gewebe wurde entnommen, über ein 70µm-Nylonsieb zerrieben und mit 50 ml 1x PBS-Dulbecco gewaschen. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 1350 rpm und 18 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 4 ml 40% Percoll aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde mit 3 ml einer 80% Percoll-Lösung unterschichtet. Der Percoll-Gradient wurde 25 min. bei 800 x g ohne Bremsen bei 18 °C zentrifugiert. Zellen mit höherer Dichte wie Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen wandern durch den Gradienten in die untere Phase. Mononukleäre Zellen geringerer Dichte wie Lymphozyten sammeln sich an der Grenzschicht, der Interphase. Die Zellen in der Interphase wurden mit einer Pasteurpipette entnommen, zweimal in komplettem Medium (DMEM +5 % FKS + Penicillin/Streptomycin) gewaschen, gezählt und in der gewünschten Konzentration (10^6 Zellen/ml) in eine 12-Loch Platte ausgesät.

4.2.4.8 Maus IFN- γ Sekretion-Assay (Miltenyi Biotec)

Der INF- γ Sekretion-Assay ist eine Methode, die es ermöglicht sezernierte – und damit biologisch aktive – Zytokine auf Einzelzellniveau quantitativ nachzuweisen (Desombere *et al.*, 2004). Dazu bindet im ersten Schritt ein bispezifischer Antikörper an die Zelloberfläche, dessen einer Arm gegen ein ubiquitäres Lymphozytenantigen gerichtet ist. Somit befindet sich auf jeder Zelle eine einem zytokinspezifischen „Fangnetz“ vergleichbare Catch-Matrix. Während der Sekretionsphase bindet das von der Zelle sezernierte Zytokin (IFN- γ) an den zweiten Arm des Antikörpers. Ein PE (Phycoerythrin) markierter Sekundärantikörper, dessen Bindungsstelle spezifisch für ein zweites Epitop des Zytokins ist, ermöglicht den durchflusszytometrischen Nachweis der INF- γ -positiven Zellen.

Murine Milz- und leberassoziierte Lymphozyten wurden für ungefähr 12 h mit HBV-S, core und einem Kontroll-Peptid stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 1 ml MACS-Puffer und gründlicher Durchmischung wurden die Zellen bei 4°C bei 300 g pelletiert. Dieser Waschschrift wurde nach vollständigem Absaugen des Überstandes wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 80 µl kalten RPMI-Medium (+ 5% FKS) resuspendiert und der bi-spezifische Catch-Antikörper in einer Menge von 10µl hinzupipettiert. Nach sorgfältigem Mischen wurden die Proben 5 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden in 15 ml Tubes 5 ml warmes Kulturmedium

vorgelegt, in welches die Proben anschließend überführt wurden. Es folgte eine Sekretionsphase von 45 min bei 37°C in einem Zellschüttler. Um eine Agglomeration der Zellen zu vermeiden, deren Folge es wäre, dass einzelne Zellen auch Zytokine der Nachbarzelle an der Oberfläche binden, wurden diese mit 150 rpm rotiert. Um die Zytokinsekretion möglichst schnell zu stoppen, wurden die Reaktionsgefäße anschließend mit kaltem (4°C) MACS-Puffer aufgefüllt und bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und mit 1 ml MACS-Puffer bei 300 g erneut gewaschen. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 90 µl kaltem MACS-Puffer resuspendiert und 10 µl eines zytokinspezifischen mit PE-markierten Antikörpers (anti-maus IFN-γ-PE) zugegeben. Anschließend wurde eine 1:200 verdünnte Mischung aus anderen Antikörpern (anti-maus CD8-FITC und anti-maus NK1.1-APC) hinzugefügt. Diese Mischung wurde 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert und anschließend kurz in 1 ml kaltem MACS-Puffer (4°C und 300 g) gewaschen. Die Pellets wurden in 300 µl kaltem MACS-Puffer resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

4.2.4.9 Durchflusszytometrische Analyse

Grundlage der durchflußzytometrischen Zellanalyse (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) ist eine Antigen-Antikörperreaktion, die mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Die Zellen einer Einzelzellsuspension werden durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten monochromatischen Laserstrahl vorbeigeleitet. Durch Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben und fallen nachfolgend unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) wieder auf ihr Ursprungsniveau zurück. Das resultierende Fluoreszenz- und Streulicht wird über ein komplexes System von Spiegeln und Filtern auf verschiedene Photodetektoren gelenkt und nach Intensität und Farbe vom Computer getrennt registriert. Jede der aufgezeichneten optischen Eigenschaften (Streu- und Fluoreszenzlicht) steht für eine bestimmte Charakteristik der erfassten Zelle. Das Vorwärtstreulicht (*forward scatter*, FSC), d.h. das in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht, korreliert dabei mit der Zellgröße, das Seitwärtstreulicht (*side scatter*, SSC), d.h. das in rechtem Winkel zum Laserstrahl gestreute Licht, mit der Binnenstruktur der Zelle, die wiederum u.a. von der Granularität des Zytoplasmas und der Größe des Zellkerns abhängt. Das Fluoreszenzlicht besitzt je nach Art des

verwendeten Fluorochroms des jeweiligen Antikörpers eine bestimmte Wellenlänge (Deneys *et al.* 2001).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde für die Durchflußzytometrische Analyse von INF- γ produzierenden CD8+T-Zellen aus muriner Milz- und LAL- Einzelzellsuspensionen der Durchflußzytometer (FACSCanto, Becton Dickinson, San Jose, USA) verwendet. Nach Einstellung des Lymphozytengates – gesetzt nach Zellgröße und Granulationsgrad – wurden direkt vor Durchführung der Analyse in allen Proben tote Zellen mit je 10 μ l Propidiumiodid gefärbt und vor der Messung ausgeschlossen. Anschließend wurden 50000 Ereignisse der vitalen Population aufgenommen.

5 Literaturverzeichnis

- Araki, K., J. Miyazaki, O. Hino, N. Tomita, O. Chisaka, K. Matsubara, and K. Yamamura. (1989). Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:207-11.
- Ballay, A, M. Levrero, M. A. Buendia et al. (1995). In vivo and in vitro synthesis of the hepatitis B surface antigen and of the receptor for polymerized human serum albumin from recombinant human adenoviruses. *EMBO J.* 4:3861-5.
- Barker, L. F., J. E. Maynard, R. H. Purcell, J. H. Hoofnagle, K. R. Berquist, and W. T. London. 1975. Viral hepatitis, type B, in experimental animals. *Am. J. Med. Sci.* 270:189- 195.
- Barnaba, V., A. Franco, A. Alberti, C. Balsano, R. Benvenuto, and F. Balsano. (1989). Recognition of hepatitis B virus envelope proteins by liverinfiltrating T lymphocytes in chronic HBV infection. *J Immunol* 143:2650- 5.
- Baron, J. L., Gardiner, L., Nishimura, S., Shinkai, K., Locksley, R. & Ganem, D. (2002). Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. *Immunity* 16, 583–594.
- Bartenschlager, R., and Schaller, H. (1992). Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *Embo J* 11, 3413-3420.
- Berkman, N., John, M., Roesems, G., Jose, P. J., Barnes, P.L., Chung, K. F. (1995). Inhibition of Macrophage Inflammatory Protein-1 α Expression by IL-10. *J. Immunol.* 155, 4412-4418.
- Berting, A., Hahnen, J., Kroger, M., and Gerlich, W. H. (1995). Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein. *Intervirology* 38, 8-15.
- Bertoletti, A., Ferrari, C., Fiaccadori, F., Penna, A., Margolskee, R., Schlicht, H. J., Fowler, P., Guilhot, S., and Chisari, F. V. (1991). HLA class I-restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 10445-10449.
- Blumberg, B. S., Melartin, L., Guint, R. A., and Werner, B. (1966). Family studies of a human serum isoantigen system (Australia antigen). *Am J Hum Genet* 18, 594- 608.
- Blumberg, B. S., Sutnick, A. I., and London, W. T. (1969). Australia antigen and hepatitis. *Jama* 207, 1895-1896.
- Bock, C. T., Schwinn, S., Schroder, C. H., Velhagen, I., and Zentgraf, H. (1996). Localization of hepatitis B virus core protein and viral DNA at the nuclear membrane. *Virus Genes* 12, 53-63.
- Bolhuis, R. L., and Gratama, J. W. (1998). Genetic re-targeting of T lymphocyte specificity. *Gene Ther* 5, 1153-1155.

- Block, T. M., X. Lu, A. S. Mehta, B. S. Blumberg, B. Tennant, M. Ebling, B. Korba, D. M. Lansky, G. S. Jacob, and R. A. Dwek. (1998). Treatment of chronic hepadnavirus infection in a woodchuck animal model with an inhibitor of protein folding and trafficking. *Nat Med* 4:610-4.
- Botta, A., M. Lu, X. Zhen, T. Kemper, and M. Roggendorf. (2000). Naturally occurring woodchuck hepatitis virus (WHV) deletion mutants in chronically WHV-infected woodchucks. *Virology* 277:226-34.
- Buschman, W., Thompson, J.F., Vargas, L., Kandy, A. (1985) Control of directionality in lambda site specific recombination. *Science*. Nov 22; 230(4728):906-11.
- Cattaneo, R., Will, H., and Schaller, H. (1984). Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *Embo J* 3, 2191-2196.
- Chisari, F. V. (1995). Hepatitis B virus transgenic mice: insights into the virus and the disease. *Hepatology* 22, 1316-1325.
- Chisari, F. V., and Ferrari, C. (1995a). Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 13, 29-60.
- Chisari, F. V., and Ferrari, C. (1995b). Hepatitis B virus immunopathology. *Springer Semin Immunopathol* 17, 261-281.
- Chisari, F. V., Pinkert, C. A., Milich, D. R., Filippi, P., McLachlan, A., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. (1985). A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science* 230, 1157-1160.
- Chisari, F. V. (1997). Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. In: *Viral hepatitis and liver disease*. Rizetto, M.; Purcell, RH.; Gerin, JL; Verme G. (Hrsg.):405-415.
- Chan, M. M., Chen, C.-L. H., Ager, L. L., Cooper, M. D. (1988). Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. *J. Immunol.* 140 (7), 2133-2138.
- Chang, C. M., K. S. Jeng, C. P. Hu, S. J. Lo, T. S. Su, L. P. Ting, C. K. Chou, S. H. Han, E. Pfaff, J. Salfeld. (1987). Production of hepatitis B virus in vitro by transient expression of cloned HBV DNA in a hepatoma cell line. *EMBO J.* 6:675-680.
- Chen, Y.H., Chiu, N.M., Mandal, M., Wang, N., Wang, C.R. (1997). Impaired NK1-T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice. *Immunity* 6:459-467.
- Chen, H. S., M. C. Kew, W. E. Hornbuckle, B. C. Tennant, P. J. Cote, J. L. Gerin, R. H. Purcell, and R. H. Miller. (1992). The precore gene of the woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host. *J Virol* 66:5682-4.

- Cote, P. J., B. E. Korba, R. H. Miller, J. R. Jacob, B. H. Baldwin, W. E. Hornbuckle, R. H. Purcell, B. C. Tennant, and J. L. Gerin. (2000). Effects of age and viral determinants on chronicity as an outcome of experimental woodchuck hepatitis virus infection. – *Hepatology* 31.
- Crispe IN. (2003). Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol*; 3:51– 62.
- Chu, C. M., and Liaw, Y. F. (1995). Membrane staining for hepatitis B surface antigen on hepatocytes: a sensitive and specific marker of active viral replication in hepatitis B. *J Clin Pathol* 48, 470-473.
- Crocker, P. R., Jefferies, W. A., Clark, S. J., Chung, L. P., Gorden, S. (1987) Species heterogeneity in macrophage expression of the CD4 antigen. *J. Exp. Med.* 166, 613.
- Cooper, A., Paran, N., and Shaul, Y. (2003). The earliest steps in hepatitis B virus infection. *Biochim Biophys Acta* 1614, 89-96.
- Cooper, A., Tal, G., Lider, O., and Shaul, Y. (2005). Cytokine induction by the hepatitis B virus capsid in macrophages is facilitated by membrane heparan sulfate and involves TLR2. *J Immunol* 175, 3165-3176.
- Chomczynski, P., Sacci, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* Apr;162(1):156-9.
- Cullen, J. M., S. L. Smith, M. G. Davis, S. E. Dunn, C. Botteron, A. Cecchi, D. Linsey, D. Linzey, L. Frick, M. T. Paff, A. Goulding, and K. Biron. (1997). In vivo antiviral activity and pharmacokinetics of (-)-cis-5-fluoro-1-[2- (hydroxymethyl)-1,3-oxathiolan-5-yl]cytosine in woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2076-82.
- Cullen, J. M., D. H. Li, C. Brown, E. J. Eisenberg, K. C. Cundy, J. Wolfe, J. Toole, and C. Gibbs. (2001). Antiviral efficacy and pharmacokinetics of oral adefovir dipivoxil in chronically woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2740-5.
- Dahmen, U., O. Dirsch, J. Li, M. Fiedle, M. Lu, K. Rispeter, M. Picucci, C. E. Broelsch, and M. Roggendorf. (2004). Adoptive transfer of immunity: a new strategy to interfere with severe hepatitis virus reinfection after woodchuck liver transplantation. *Transplantation* 77:965-72.
- Dandri M, Burda MR, Torok E, Pollok JM, Iwanska A, Sommer G, Rogiers X, Rogler CE, Gupta S, Will H, Greten H, Petersen J. (2001). Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology.* Apr;33(4):981-8
- Dandri, M., Burda, M. R., Zuckerman, D. M., Wursthorn, K., Matschl, U., Pollok, J. M., Rogiers, X., Gocht, A., Kock, J., Blum, H. E., et al. (2005). Chronic infection with hepatitis B viruses and antiviral drug evaluation in uPA mice after liver repopulation with tupaia hepatocytes. *J Hepatol* 42, 54-60.

- Dane, D. S., Cameron, C. H., and Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1, 695-698.
- Deneys, V., Mazzon, A.M., Marques, J.L, Benoit, H., De Bruyere, M. (2001). Reference values for peripheral blood B-lymphocyte subpopulations: a basis for multiparametric immunophenotyping of abnormal lymphocytes. *J Immunol Methods*. Jul 1;253(1-2):23-36.
- de Franchis, R., G. Meucci, M. Vecchi, M. Tatarella, M. Colombo, E. Del Ninno, M. G. Rumi, M. F. Donato, and G. Ronchi. (1993). The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers. *Ann Intern Med* 118:191-4.
- Desombere, I., Meuleman, P., Rigole, H., Willems, A., Irsch, J., Leroux-Roels, G. (2004). The interferon gamma secretion assay: a reliable tool to study interferon gamma production at the single cell level. *Journal of Immunol. Methods* 286: 167-185
- Donello, J. E., J. E. Loeb, and T. J. Hope. (1998). Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* 72:5085-92.
- De Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figor, J. E. de Vries (1991). Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174, 1209-1220.
- Dumortier J, Schönig K, Giese T, Schirmacher P, Bujard H, Protzer U. (2005) Liver-specific expression of interferon-gamma following adenoviral gene transfer controls hepatitis B virus replication in mice. *Gene Ther.* Apr;12(8):668-77.
- Farza, H., M. Hadchouel, J. Scotto, P. Tiollais, C. Babinet, and C. Pourcel. (1988). Replication and gene expression of hepatitis B virus in a transgenic mouse that contains the complete viral genome. *J Virol* 62:4144-52.
- Ferrari, C., A. Penna, P. Sansoni, T. Giuberti, T. M. Neri, F. V. Chisari, and F. Fiaccadori. (1986). Selective sensitization of peripheral blood T lymphocytes to hepatitis B core antigen in patients with chronic active hepatitis type B. *Clin Exp Immunol* 66:497-506.
- Ferrari, C., A. Penna, A. Bertoletti, A. Valli, A. D. Antoni, T. Giuberti, A. Cavalli, M. A. Petit, and F. Fiaccadori. (1990). Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 145:3442-9.
- Ferrari, C., A. Bertoletti, A. Penna, A. Cavalli, A. Valli, G. Missale, M. Pilli, P. Fowler, T. Giuberti, F. V. Chisari, and et al. (1991). Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Clin Invest* 88:214-22.
- Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, T. R. Mosmann, M. Howard, A. O'Garra. (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 147, 3815-3822.
- Fruh, K., and Y. Yang. (1999). Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Curr Opin Immunol* 11:76-81.

- Ganem, D. (1982). Persistent infection of humans with hepatitis B virus: mechanisms and consequences. *Rev Infect Dis* 4, 1026-1047.
- Ganem, D., Pollack, J. R., and Tavis, J. (1994). Hepatitis B virus reverse transcriptase and its many roles in hepadnaviral genomic replication. *Infect Agents Dis* 3, 85-93.
- Ganem, D., and Prince, A. M. (2004). Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 350, 1118-1129.
- Ganem, D., and Schneider, R. (2001). Hepadnaviridae The viruses and their replication. In *Field's Virology* (Philadelphia, Lipincott-Raven).
- Garcia-Navarro, R., B. Blanco-Urgoiti, P. Berraondo, R. Sanchez de la Rosa, A. Vales, S. Hervas-Stubbs, J. J. Lasarte, F. Borrás, J. Ruiz, and J. Prieto. (2001). Protection against woodchuck hepatitis virus (WHV) infection by gene gun coimmunization with WHV core and interleukin-12. *J Virol* 75:9068-76.
- Gavilanes, F., Gonzalez-Ros, J.M., and Peterson, D.L. (1982). Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. *The Journal of biological chemistry* 257, 7770-7777.
- Gilbert, R. J., Beales, L., Blond, D., Simon, M. N., Lin, B. Y., Chisari, F. V., Stuart, D. I., and Rowlands, D. J. (2005). Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 14783-14788.
- Glebe, D., M. Aliakbari, P. Krass, E. V. Knoop, K. P. Valerius, and W. H. Gerlich. (2003). Pre-s1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus. *J. Virol.* 77:9511-9521.
- Glebe, D., S. Urban, E. V. Knoop, N. Cag, P. Krass, S. Grun, A. Bulavaite, K. Sasnauskas, and W. H. Gerlich. (2005). Mapping of the Hepatitis B Virus Attachment Site by Use of Infection-Inhibiting preS1 Lipopeptides and Tupaia Hepatocytes. *Gastroenterology* 129:234-245.
- Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. (2004). NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* ;4:231-237.
- Goodbourn, S., Didcock, L. and Randall, R.E. (2000). Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol*, 81(Pt10), 2341-64.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Graham, F. L., and van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.
- Gripon, P., S. Rumin, S. Urban, J. Le Seyec, D. Glaise, I. Cannie, C. Guyomard, J. Lucas, C. Trepo, and C. Guguen-Guillouzo. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:15655-15660.

- Gregory, S. H., and E. J. Wing. (1993). IFN-gamma inhibits the replication of *Listeria monocytogenes* in hepatocytes. *J Immunol* 151:1401-9.
- Guidotti, L. G., Ishikawa, T., Hobbs, M. V., Matzke, B., Schreiber, R., and Chisari, F. V. (1996). Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 4, 25-36.
- Guidotti, L. G., Matzke, B., Schaller, H., and Chisari, F. V. (1995). High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 69, 6158-6169.
- Guidotti LG, Chisari FV (2001). Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 19: 65-91.
- Hannet, I., Erkeller-Yuksel, F., Lydyard, P., Deneys, V., and DeBruyere, M. (1992). Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunol Today* 13, 215, 218.
- Heermann, K. H., and Gerlich, W. H. (1991). Surface proteins of hepatitis B viruses. In *Molecular biology of the hepatitis B virus*, A. McLachlan, ed. (Boca Raton, Florida, CRC Press), pp. 109-144.
- Hervas-Stubbs, S., J. J. Lasarte, P. Sarobe, I. Vivas, L. Condreay, J. M. Cullen, J. Prieto, and F. Borrás-Cuesta. (2001). T-helper cell response to woodchuck hepatitis virus antigens after therapeutic vaccination of chronically-infected animals treated with lamivudine. *J Hepatol* 35:105- 11.
- Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, F. R. Carbone. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76: 17-27.
- Hoofnagle, J. H. (1981). Serologic markers of hepatitis B virus infection. *Annu Rev Med* 32, 1-11.
- Hoofnagle, J. H. and di Bisceglie. (1997). The treatment of chronic viral hepatitis. *N Engl J Med*. Jan 30; 336(5):347-56.
- Hoofnagle, J. H. and Everhart, J. (1997). Dose-finding study of interferon alfa-n3 in hepatitis C. *Hepatology*. Nov;26(5):1366-7.
- Horowitz, M. M., Gale, R. P., Sondel, P. M., Goldman, J. M., Kersey, J., Kolb, H. J., Rimm, A. A., Ringden, O., Rozman, C., Speck, B., and et al. (1990). Graft-versus leukaemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75, 555-562.
- Huang, L.R., Wu, H.L., Chen, P.J., Chen, D. S. (2006). An immunocompetent mouse model for the tolerance of human chronic hepatitis B virus infection. *PNAS*, Nov 21, vol.103; 17862-17867.
- Huovila, A. P., Eder, A. M., and Fuller, S. D. (1992). Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J Cell Biol* 118, 1305-1320.

- Isogawa, M., Furuichi, Y., and Chisari, F. V. (2005a). Oscillating CD8(+) T cell effector functions after antigen recognition in the liver. *Immunity* 23, 53-63.
- Isogawa, M., Kakimi, K., Kamamoto, H., Protzer, U., and Chisari, F. V. (2005b). Differential dynamics of the peripheral and intrahepatic cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis B surface antigen. *Virology* 333, 293-300.
- Isogawa, M., Robek, M. D., Furuichi, Y., and Chisari, F. V. (2005c). Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Virol* 79, 7269-7272.
- Janeway, A. J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. (2004). *Immunobiology The Immune System in Health and Disease*, 6 edn (New York, Garland Publishing).
- Jean-Jean, O., Levrero, M., Will, H., Perricaudet, M., and Rossignol, J.M. (1989). Expression mechanism of the hepatitis B virus (HBV) C gene and biosynthesis of HBe antigen. *Virology* 170, 99-106.
- Jilbert, A.R., Miller, D.S., Scougall, C.A., Tumbull, H., Burrell, C.J. (1996). Kinetics of duck hepatitis B virus infection following low dose virus inoculation: one virus DNA genome is infectious in neonatal ducks. *Virology*. Dec 15;226(2):338-45.
- Jung, M. C., U. Spengler, W. Schraut, R. Hoffmann, R. Zachoval, J. Eisenburg, D. Eichenlaub, G. Riethmuller, G. Paumgartner, H. W. Ziegler- Heitbrock, and et al. (1991). Hepatitis B virus antigen-specific T-cell activation in patients with acute and chronic hepatitis B. *J Hepatol* 13:310-7.
- Kakimi, K., Guidotti, L. G., Koezuka, Y. & Chisari, F. V. (2000). Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 192, 921–930.
- Kakimi, K., Lane, T. E., Chisari, F. V. & Guidotti, L. G. (2001). Cutting edge: inhibition of hepatitis B virus replication by activated NK T cells does not require inflammatory cell recruitment to the liver. *J Immunol* 167, 6701–6705.
- Karlsson, S, K. Van Doren, S. G. Schweiger et al. (1985). Stable gene transfer and tissuespecific expression of a human globin gene using adenoviral vectors. *EMBO J*. 5:2377- 85.
- Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K. (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V₁₄ NK T cells by glycosylceramides. *Science*;278:1626 –1629.
- Kock, J., and Schlicht, H. J. (1993). Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J Virol* 67, 4867-4874.
- Koller, B.H., Marrack, P., Kappler, J.W., Smithies, O. (1990). Normal development of mice deficient in beta 2m, MHC class I Proteins, and CD8+ T-cells. *Science* 8;248(4960):1227-30.

- Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Elerl, G., Hamann, A., Wagner, H., Huehn, J., Sparwasser, T. (2007). Selective depletion of FoxP3+regulatory T-cells induces a scurvy-like disease. *J.Exp.Med.* 204 (1): 57-63.
- Lammert, F., Busch, N., Mattern, S. (2000). Clinical aspects and therapy of viral hepatitis. *Chirurg. Apr*;71(4):381-8.
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem.*;58:913-49.
- Lanford, R. E., Chavez, D., Brasky, K. M., Burns, R. B., 3rd, and 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.
- Lau, D. T., Farooq Khokhar, M., Edward Doo, Marc G. Ghany, David Herion, Yoon Park, David E. Kleiner, Peter Schmid, Lynn D. Condreay, Josée Gauthier, Mary C. Kuhns, T. Jake Liang, Jay H. Hoofnagle (2000). Long-term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine. *Hepatology.* Oct;32(4 Pt 1):828-34.
- Li, Q., Kay, M.A., Finegold, M., Stratford-Perricaudet, L.D., and Woo, S.L. (1993). Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy. *Human gene therapy* 4, 403-409.
- Li, D. H., J. E. Newbold, and J. M. Cullen. (1996). Natural populations of woodchuck hepatitis virus contain variant precore and core sequences including a premature stop codon in the epsilon motif. *Virology* 220:256- 62.
- Li, X., S. Sambhara, C. X. Li, M. Ewasyshyn, M. Parrington, J. Caterini, O. James, G. Cates, R. P. Du, and M. Klein. (1998). Protection against respiratory syncytial virus infection by DNA immunization. *J Exp Med* 188:681-8.
- Lien, J. M., Aldrich, C. E., and Mason, W. S. (1986). Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis. *J Virol* 57, 229-236.
- Lien, J. M., Petcu, D. J., Aldrich, C. E., and Mason, W. S. (1987). Initiation and termination of duck hepatitis B virus DNA synthesis during virus maturation. *J Virol* 61, 3832-3840.
- Lu, M., G. Hilken, J. Kruppenbacher, T. Kemper, R. Schirmbeck, J. Reimann, and M. Roggendorf. (1999). Immunization of woodchucks with plasmids expressing woodchuck hepatitis virus (WHV) core antigen and surface antigen suppresses WHV infection. *J Virol* 73:281-9.
- Lu, M., and M. Roggendorf. 2001. Evaluation of new approaches to prophylactic and therapeutic vaccinations against hepatitis B viruses in the woodchuck model. *Intervirol* 44:124-31.
- Mangold, C. M., and Streeck, R. E. (1993). Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein. *J Virol* 67, 4588-4597.

- Macrae, D. R., V. Bruss, and D. Ganem.(1991). Myristylation of a duck hepatitis B virus envelope protein is essential for infectivity but not for virus assembly. *Virology* 181:359-363.
- Marion, P. L., Oshiro, L. S., Regnery, D. C., Scullard, G. H., and Robinson, W. S. (1980). A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 2941-2945.
- Mason, W. S., Seal, G., and Summers, J. (1980). Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* 36, 829-836.
- Mendiratta, S.K., Martin, W.D., Hong, S., Boesteanu, A., Joyce, S., Van Kaer, L. (1997). CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity*. 6:469–477.
- Menne, S., J. Maschke, T. K. Tolle, M. Lu, and M. Roggendorf. (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., J. Maschke, M. Lu, H. Grosse-Wilde, and M. Roggendorf. (1998). T Cell response to woodchuck hepatitis virus (WHV) antigens during acute self-limited WHV infection and convalescence and after viral challenge. *J Virol* 72:6083-91.
- Milich, D.R., Jones, J.E., Hughes, J.L., Price, J., Raney, A.K., and McLachlan, A. (1990). Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 6599- 6603.
- Miller, R. H., R. Girones, P. J. Cote, W. E. Hornbuckle, T. Chestnut, B. H. Baldwin, B. E. Korba, B. C. Tennant, J. L. Gerin, and R. H. Purcell. (1990). Evidence against a requisite role for defective virus in the establishment of persistent hepadnavirus infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9329-32.
- Moore,K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.*;19:683-765. Review.
- Mosmann, T. R., and R. L. Coffman. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-73.
- Murray, J.M., Wieland, S.F., Purcell, R.H., Chisari, F.V. (2005). Dynamics of hepatitis B virus clearance in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 6;102(49):17780-5. Epub Nov 23.
- Nassal, M., Schaller, H. (1993). Hepatitis B virus replication. *Trends Microbiol.* 1, 221-228.

- Nayersina, R., P. Fowler, S. Guilhot, G. Missale, A. Cerny, H. J. Schlicht, A. Vitiello, R. Chesnut, J. L. Person, A. G. Redeker, and F. V. Chisari. (1993). HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J Immunol* 150:4659-71.
- Neurath, A. R., Kent, S. B., Strick, N., Taylor, P., and Stevens, C. E. (1985). Hepatitis B virus contains pre-S gene-encoded domains. *Nature* 315, 154-156.
- Oberwinkler H, Untergasser A, Sprinzl M & Protzer U. (2005). Transfer of HBV genomes into mice. In: Roggendorf M, v. Weizsäcker F (eds) „Current Models of Viral Hepatitis“.
- Ochs, H.D. (2005). FOXP3 acts as a rheostat of the immune response. *Immunol. Rev.* 203:156-64
- Ohashi K, Marion PL, Nakai H, Meuse L, Cullen JM, Bordier BB, Schwall R, Greenberg HB, Glenn JS, Kay MA. (2000). Sustained survival of human hepatocytes in mice: A model for in vivo infection with human hepatitis B and hepatitis delta viruses. *Nat Med.* 2000 Mar;6(3):327-31.
- Patzer, E. J., Nakamura, G. R., Simonsen, C. C., Levinson, A. D., and Brands, R. (1986). Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 58, 884-892.
- Penna, A., Artini, M., Cavalli, A., Levrero, M., Bertoletti, A., Pilli, M., Chisari, F. V., Rehermann, B., Del Prete, G., Fiaccadori, F., and Ferrari, C. (1996). Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J Clin Invest* 98, 1185-1194.
- Penna, A., Chisari, F. V., Bertoletti, A., Missale, G., Fowler, P., Giuberti, T., Fiaccadori, F., and Ferrari, C. (1991). Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Exp Med* 174, 1565-1570.
- Portnoy, D. A., R. D. Schreiber, P. Connelly, and L. G. Tilney. (1989). Gamma interferon limits access of *Listeria monocytogenes* to the macrophage cytoplasm. *J Exp Med* 170:2141-6.
- Porcelli SA, Modlin RL. (1999). The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol*; 17:297–329.
- Protzer, U., Nassal, M., Chiang, P. W., Kirschfink, M., and Schaller, H. (1999). Interferon gene transfer by a hepatitis B virus vector efficiently suppresses wildtype virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10818-10823.
- Protzer, U., and Schaller, H. (2000). Immune escape by hepatitis B viruses. *Virus Genes* 21, 27-37.
- Price, D.A., Klenerman, P., Booth, B., Phillips, R.E. and Sewell, A.K. (1999). Cytotoxic T lymphocytes, chemokines and antiviral immunity. *Immunol Today* 20:212-6.

- Quint WGV, Heijtkink R, Schirm J, Niesters B, Gerlich WH. (1995). Reliability of hepatitis B virus DNA detection. *J Clin Microbiol*, 33 (1): 225.
- Raulet, D.H. (1994). MHC class I deficient mice; *Adv Immunol*; 55:381-421
- Rehermann, B. (2000). Intrahepatic T cells in hepatitis B: viral control versus liver cell injury. *J Exp Med* 191, 1263-1268.
- Rehermann, B., Ferrari, C., Pasquinelli, C., and Chisari, F. V. (1996a). The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med* 2, 1104-1108.
- Rehermann, B., Fowler, P., Sidney, J., Person, J., Redeker, A., Brown, M., Moss, B., Sette, A., and Chisari, F. V. (1995). The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med* 181, 1047-1058.
- Rehermann, B., Lau, D., Hoofnagle, J. H., and Chisari, F. V. (1996b). Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Invest* 97, 1655-1665.
- Rehermann, B., and Nascimbeni, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 5, 215-229.
- Ren, S., and Nassal, M. (2001). Hepatitis B virus (HBV) virion and covalently closed circular DNA formation in primary tupaia hepatocytes and human hepatoma cell lines upon HBV genome transduction with replication-defective adenovirus vectors. *J Virol* 75, 1104-1116.
- Ribeiro, R. M., Lo, A., and Perelson, A. S. (2002). Dynamics of hepatitis B virus infection. *Microbes Infect* 4, 829-835.
- Robinson, W. S. (1996). Biology of human hepatitis viruses. In, D. Zakim, and T. D. Boyer, eds. (Philadelphia, W.B. Saunders Company), pp. 1171-1174.
- Robinson, J., and S. G. Marsh. (2000). The IMGT/HLA sequence database. *Rev Immunogenet* 2:518-31.
- Ruiz, M., V. Giudicelli, C. Ginestoux, P. Stoehr, J. Robinson, J. Bodmer, S. G. Marsh, R. Bontrop, M. Lemaitre, G. Lefranc, D. Chaume, and M. P. Lefranc. (2000). IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* 28:219-21.
- Schirmbeck, R., X. Zheng, M. Roggendorf, M. Geissler, F. V. Chisari, J. Reimann, and M. Lu. (2001). Targeting murine immune responses to selected T cell- or antibody-defined determinants of the hepatitis B surface antigen by plasmid DNA vaccines encoding chimeric antigen. *J Immunol* 166:1405-13.
- Schirmbeck, R., Dikopoulos, N., Kwissa, M., Leithäuser, F., Lamberth, K., Buus, S., melber, K., Reimann, J. (2003). Breaking tolerance in hepatitis b surface antigen (HBsAg) transgenic mice by vaccination with cross-reactive natural HBsAg variants. *Eur. J. Immunol.* 2003. 33: 3342–3352.

- Stoop, J.N., Woltman, A.M., Biesta, P.J., Kusters, J.G., Kuipers, E.J., Janssen, H.L., vander Molen, R.G. (2007a). Tumor necrosis factor alpha inhibits the suppressive effect of regulatory T cells on the hepatitis B virus-specific immune response. *Hepatology*. Sep;46(3):699-705.
- Stoop, J.N., van der Molen, R.G., Kuipers, E.J., Kusters, J.G., Janssen, H.J. (2007b). Inhibition of viral replication reduces regulatory T cells and enhances the antiviral immune response in chronic hepatitis B. *Virology*. Apr 25;361(1):141-8. Epub 2006 Dec 20.
- Rossner, M. T. (1992). Review: hepatitis B virus X-gene product: a promiscuous transcriptional activator. *J Med Virol* 36, 101-117.
- Satoh, O., Imai, H., Yoneyama, T., Miyamura, T., Utsumi, H., Inoue, K., and Umeda, M. (2000). Membrane structure of the hepatitis B virus surface antigen particle. *J Biochem (Tokyo)* 127, 543-550.
- Seder, R. A., and W. E. Paul. (1994). Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 12:635-73.
- Schaefer, E., Koeppen, H., and Wirth, S. (1993). Low level virus replication in infants with vertically transmitted fulminant hepatitis and their anti-HBe positive mothers. *European journal of pediatrics* 152, 581-584.
- Schettler, C. H. (1971). Goose virus hepatitis in the Canada Goose and Snow Goose. *J Wildl Dis* 7, 147-148.
- Schulze-Bergkamen, H., Untergasser, A., Dax, A., Vogel, H., Buchler, P., Klar, E., Lehnert, T., Friess, H., Buchler, M. W., Kirschfink, M., et al. (2003). Primary human hepatocytes--a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 38, 736-744.
- Sells, M. A., M. L. Chen, and G. Acs. (1987). Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84:1005-1009.
- Shevach, E.M. (2002). CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2: 389-400
- Smiley, S.T., Kaplan, M.H., Grusby, M.J. (1997). Immunoglobulin E production in the absence of interleukin-4-secreting CD1-dependent cells. *Science*. 275:977-979.
- Sprengel, R., Kaleta, E. F., and Will, H. (1988). Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol* 62, 3832-3839.
- Sprengers, D., van der Molen, R.G., Kusters, J.G., De Man, R.A., Niesters, H.G., Schalm, S.W., Janssen, H.L. (2006). Analysis of intrahepatic HBV-specific cytotoxic T-cells during and after acute HBV infection in humans. *J.Hepatology* 45 (2): 182-9.

- Sprinzel, M. F., Oberwinkler, H., Schaller, H., and Protzer, U. (2001). Transfer of hepatitis B virus genome by adenovirus vectors into cultured cells and mice: crossing the species barrier. *J Virol* 75, 5108-5118.
- Sprinzel M, Dumortier J & Protzer U. Construction of recombinant adenoviruses that produce infectious HBV. In: R. Hamatke, J. Lau (eds.). „Hepatitis B and D Virus Protocols“. The Humana Press Inc., Totowa NJ, 2004. *Methods in Molecular Medicine*. 96 (Vol.2): 209-218.
- Stevens, C. E., Beasley, R. P., Tsui, J., and Lee, W. C. (1975). Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan. *N Engl J Med* 292, 771-774
- Stevenson, H.L., Crossley, E.C., Thirumalapura, N., Walker, D.H., Ismail, N. (2008). Regulatory roles of CD1d-restricted NKT cells in the induction of toxic shock-like syndrome in an animal model of fatal ehrlichiosis. *Infect Immun*. Apr;76(4):1434-44. Epub 2008 Jan 22.
- Summers, J., Smolec, J. M., and Snyder, R. (1978). A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 4533-4537.
- Sureau, C., J. L. Romet-Lemonne, J. I. Mullins, and M. Essex. (1986). Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell* 47:37-47.
- Suvas, S., Azkur, A.K., Kim, B.S., Kumaraguru, U., Rouse, B.T. (2004). CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *J Immunol*. Apr 1;172(7):4123-32.
- Takahashi, K., Imai, M., Tsuda, F., Takahashi, T., and Miyakawa, Y. (1976). Association of dane particles with e antigen in the serum of asymptomatic carriers of hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 117, 102-105.
- Taniguchi M., M. Harada, S. Kojo, T. Nakayama, and H. Wakao. (2003). The regulatory role of V α 14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu Rev Immunol* 21:483-513.
- Thimme, R., Wieland, S., Steiger, C., Ghayeb, J, Rheinman, K.A., Purcell, R.H., Chsari, F.V. (2003). CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol*. Jan;77(1):68-76.
- Tiollais, P., C. Pourcel, and A. Dejean. (1985). The hepatitis B virus. *Nature* 317:489-95.
- Trobonjaca Z, Leithauser F, Moller P, Schirmbeck R, Reimann J. (2001). Activating immunity in the liver. I. Liver dendritic cells (but not hepatocytes) are potent activators of IFN-gamma release by liver NKT cells. *J Immunol*;167:1413–1422.
- Tuttleman, J. S., Pourcel, C., and Summers, J. (1986). Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 47, 451-460.

- Wagner, L., O. O. Yang, E. A. Garcia-Zepeda, Y. Ge, S. A. Kalams, B. D. Walker, M. S. Pasternack, and A. D. Luster. (1998). Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature* 391:908-11.
- Walter E, Keist R, Niederost B, Pult I and Blum HE.(1996). Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology*; 24 (1): 1-5.
- Wang, P., Wu,P., Siegel, M.I., Egan, R.W., Billah, M.M. (1994). IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 153, 811-816.
- Webster, G. J., S. Reignat, M. K. Maini, S. A. Whalley, G. S. Ogg, A. King, D. Brown, P. L. Amlot, R. Williams, D. Vergani, G. M. Dusheiko, and A. Bertolotti. (2000). Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 32:1117-24.
- Vento, S., E. G. Rondanelli, S. Ranieri, C. J. O'Brien, R. Williams, and A. L. Eddleston. (1987). Prospective study of cellular immunity to hepatitis-Bvirus antigens from the early incubation phase of acute hepatitis B. *Lancet* 2:119-22.
- Wang, Y., S. Menne, J. R. Jacob, B. C. Tennant, J. L. Gerin, and P. J. Cote. (2003). Role of type 1 versus type 2 immune responses in liver during the onset of chronic woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology* 37:771-80.
- Wang, Y., S. Menne, B. H. Baldwin, B. C. Tennant, J. L. Gerin, and P. J. Cote. (2004). Kinetics of viremia and acute liver injury in relation to outcome of neonatal woodchuck hepatitis virus infection. *J Med Virol* 72:406-15.
- Werle-Lapostolle, B., Bowden, S., Locarnini, S., Wursthorn, K., Petersen, J., Lau, G., Trepo, C., Marcellin, P., Goodman, Z., Delaney, W. E. t., et al. (2004). Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 126, 1750-1758.
- WHO (2000). Fact Sheet Hepatitis B. Fact Sheets. 204
- Wiegers, G. J., Stec, I. E., Klinkert, W. E., Linthorst, A. C., and Reul, J. M. (2001). Bidirectional effects of corticosterone on splenic T-cell activation: critical role of cell density and culture time. *Neuroendocrinology* 73, 139-148.
- Wieland, S., Thimme, R., Purcell, R. H., and Chisari, F. V. (2004). Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 6669-6674.
- Will H, Cattaneo R, Darai G, Deinhardt F, Schellekens H and Schaller H. Infectious hepatitis B virus from cloned DNA of known nucleotide sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82 (3): 891-5.
- Walter, E., R. Keist, B. Niederost, I. Pult, and H. E. Blum. (1996). Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology* 24:1-5.

Yang P, Althage A, Chung J & Chisari FV (2002). Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13825-30.

Zijlstra, M., Bix, M., Simister, N.E., Loring, J.M., Raulet, D.H., Jaenisch, R. (1990). Beta 2- microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells; *Nature* 344(6268):742-6

Xu, D., Fu, J., Jin, L., Zhang, H., Zhou, C., Zou, Z., Zhao, J.M., Zhang, B., Shi, M., Ding, X., Tang, Z., Fu, Y.X., Wang, F.S. (2006). Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol.* Jul 1;177(1):739-47.

6 Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Abb	Abbildung
Ad	Adenovirus
ALT	Alaninaminotransferase
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Amp	Ampicillin
AmpR	Ampicillin-Resistenz
As	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
CD	Differenzierungsantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
cccDNA	kovalent geschlossene zirkuläre (<i>covalently closed circular</i>) DNA
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA (<i>copyDNA</i>)
CMV	Zytomegalievirus (<i>Cytomegalovirus</i>)
CMV-Promotor	CMV-IE-Promotor
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt (<i>cytotoxic T-lymphocyte</i>)
DHBV	Duck Hepatitis B Virus
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (<i>et alii</i> bzw. <i>et aliae</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Enh	Verstärkerelement (<i>Enhancer</i>)
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
h	Stunde

HBcAg	Hepatitis B core Antigen
HBsAg	Hepatitis B e Antigen
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HLA	human leukocyte antigen
HRP	Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl-b-D-Thiogalactosid
i.u.	infection units
i.v.	intravenös
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
k/o	knockout
LAL	Leber-assoziierte-Lymphozyten
mA	Milli-Ampere
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minute
MOI	Infektionsverhältnis in Viren pro Zelle (<i>multiplicity of infection</i>)
μM	Mikromolar
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nM	Nanomolar
N-Terminal	Amino-terminal
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ori	Startpunkt der Replikation
ORF	offenes Leseraster
PAA	Polyacrylamid

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pgRNA	prägenomische RNA
präS1	C-terminale Domäne des L-Proteins
präS2	C-terminale Domäne des M-Proteins
rcDNA	partiell doppelsträngiges HBV-Genom (<i>relaxed circular DNA</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
ss	einzelsträngig
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBS	Tris buffered saline
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T-cell receptor</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Th-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TGF	Transforming growth factor
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
WHV	Woodchuck Hepatitis Virus
w/v	weight per volume

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ulrike Protzer für die Möglichkeit dieses tolle Projekt durchführen zu können, für die kompetente und intensive Betreuung meiner Arbeit, die vielen Ideen, Anregungen, konstruktiven Diskussionen und Hilfestellungen. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit an vielen Kongressen im In- und Ausland teilzunehmen, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Jens C. Brüning danke ich für die Übernahme des Erstreferates und die Begleitung dieser Arbeit als Betreuer der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät. Bei Frau Prof. Dr. Dagmar Mörsdorf möchte ich mich für die Übernahme des Koreferates bedanken.

Herrn Prof. Dr. Ansgar Büschges möchte ich ganz herzlich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Herrn Prof. Dr. Martin Krönke danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Lieblingskollegin Uta Zedler für die unvergesslich lustige Zeiten, Hilfe bei vielen kleinen oder großen Problemchen nicht nur im Labor, sondern auch außerhalb. Ich danke Dir für deine Ehrlichkeit und deine Freundschaft! Außerdem bedanke ich mich bei Marianna Hösel, die immer einen guten Rat für mich hatte, wenn der Light-Cycler mal wieder gestreikt hat, aber auch für die tolle Zeit und die vielen Gespräche, die wir miteinander hatten. Danke auch an alle Mitglieder meiner Gruppe: Silke, Gregor, Knud, Raindy, Maria, Gesa, Matthias, Karin, Chris und alle ehemaligen Mitglieder der Gruppe für diese tolle Zeit. Mit Euch hat arbeiten immer Spaß gemacht! Dirk Stabenow danke ich für seine Hilfsbereitschaft bei Auswertungen meiner FACS-Daten. Ein herzliches Dankeschön an alle Mitglieder der AG Kashkar, und alle IMMIH'ler und Ehemaligen für die super Atmosphäre im Labor. Meine Rettung in der Not waren oft die drei Mädels aus dem Gastro-Labor: Gisella, Gudrun und Gitta, ich danke Euch!

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich auch bei meinen Eltern für deren uneingeschränkte Unterstützung. Danke auch an meine zukünftigen Schwiegereltern, bei denen ich oft am Wochenende meine Seele baumeln lassen konnte und immer ein offenes Ohr fand.

Mein größter Dank gilt meinem Freund und bald Ehemann Michael. Du hast mich immer unterstützt, an mich geglaubt, mich geliebt und das gab mir Kraft. Danke!

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Jens C. Brüning betreut worden.

Köln, 22.04.2008

(Miriam Svorcova)

Publikationen:

Antiviral activity and hepatoprotection by heme oxygenase-1 in hepatitis B virus infection. (2007)

Ulrike Protzer, Stefan Seyfried, Maria Quasdorff, Gabriele Sass, Miriam Svorcova, Dennis Webb, Felix Bohne, Marianna Hösel, Peter Schirmacher, and Gisa Tiegs, *Gastroenterology*; 133(4): 1156-65

A new mouse model of transient hepatitis B that allows studying the onset and clearance of HBV infection. (2008)

Miriam Svorcova, Andreas Untergasser, Heike Oberwinkler, Uta Drebber and Ulrike Protzer (eingereicht)

Bax-Inhibitor (BI)-1 Protects from Obesity-Associated Insulin Resistance via ER-Stress Inhibition. (2008)

Béatrice Bailly-Maitre, Bengt F. Belgardt, Sabine D. Jordan, Miriam Svorcova, Andre Kleinridders, Jan Mauer, Michael Cuddy, Jens Alber, Brigitte Hampel, Ulrike Protzer, John C Reed, Jens C. Brüning (in Revision)

Lebenslauf

Miriam Svorcova

24.08.1979 geboren in Partizanske (Slowakei)

Staatsangehörigkeit: slowakisch; Familienstand: ledig

Kinkelstrasse 16, 50935 Köln

e-mail: msvorcova@web.de; tel: 0221-2805073 / 0178-4720553

Schulische Ausbildung:

- 1985-1994 Besuch der Grundschule in Partizanske, Slowakei
- 1995-1997 Besuch des Gymnasiums in Partizanske, Slowakei
- 1997-1998 Austauschjahr mit dem American Field Service (AFS), Besuch der 12./13. Klasse am Überwald-Gymnasium, Wald-Michelbach
- 1998 Abitur am Gymnasium Partizanske, Slowakei

Akademische Ausbildung:

- 1998-2003 Biologiestudium an der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg; Hauptstudium in den Fächern Molekularbiologie, Zellbiologie, Biochemie/Biophysik
- 2003 Diplomarbeit am Hygiene-Institut, Abteilung Virologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Fickenscher: Adenovirale Vektoren zur Blockade von Interleukin-26 (Abgabetermin 17. November 2003; Note 1,0)
- 2004 Diplom Abschluß an der RK-Universität Heidelberg (Note 1,8)
- Seit 03/2004 Promotion am Institut für Genetik; Externe Doktorarbeit am Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene in Köln; Molekulare Infektiologie, Forschungsgruppe der Medizinischen Fakultät, Prof. Dr. U. Protzer
- 2005-2007 Doktorandenstipendium bei Köln Fortune Nachwuchsförderprogramm der Medizinischen Fakultät Köln

Kongresse:

- 2004 Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Gentherapie in Frankfurt, Deutschland
- 2005 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses in Heidelberg, Deutschland: Poster Präsentation
- 2006 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Paris, Frankreich: Poster Präsentation
- 2006 EASL Monothematic Conference Clinical Immunology in Viral Hepatitis, London, England
- 2007 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses in Rome, Italien: Poster Präsentation
- 2008 18th Annual Meeting Gesellschaft für Virologie Heidelberg: Poster Präsentation

Köln, 22.04.2008

(Miriam Svorcova)