

**Das Hepatitis B Virus folgt dem Transport der neutralen Lipide in die Leber und
in die Hepatozyten, um seine Wirtszelle zu erreichen und zu infizieren**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. nat. med.
der Medizinischen Fakultät
und
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Knud Esser
aus Köln

Köln, Februar 2012

Berichtersteller/Berichterstellerin: Prof. Dr. Dagmar Knebel-Mörsdorf
Prof. Dr. Herbert Pfister

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 14. Mai 2012

ZUSAMMENFASSUNG	1
ABSTRACT	3
1 EINLEITUNG	5
1.1 DIE LEBER.....	5
1.1.1 <i>Gefäßversorgung und Aufbau</i>	5
1.2 HEPATITIS B VIRUS	7
1.2.1 <i>Epidemiologie</i>	8
1.2.2 <i>Krankheitsverlauf</i>	9
1.2.3 <i>Immunantwort</i>	9
1.2.4 <i>Virusmorphologie</i>	10
1.2.5 <i>Virusgenom</i>	12
1.2.6 <i>Viraler Lebenszyklus</i>	13
1.2.6.1 <i>HBV Transport zur Wirtszelle</i>	13
1.2.6.2 <i>Aufnahme von HBV in die Wirtszelle</i>	15
1.2.6.3 <i>Intrazellulärer Virus- und Kapsidtransport</i>	19
1.2.6.4 <i>Transfer der viralen DNA in den Zellkern</i>	20
1.2.6.5 <i>Transkription und Expression der HBV-Proteine</i>	20
1.2.6.6 <i>Sekretion der viralen Partikel</i>	21
1.3 LIPOPROTEINSTOFFWECHSEL.....	22
1.3.1 <i>Lipide und Lipoproteine</i>	22
1.3.2 <i>Stoffwechselwege der Lipoproteine</i>	23
1.3.2.1 <i>Exogener Stoffwechselweg</i>	24
1.3.2.2 <i>Endogener Stoffwechselweg</i>	25
1.3.2.3 <i>Reverser Cholesteroltransport</i>	26
1.3.3 <i>Metabolisierung endozytierter Lipoproteine und intrazellulärer Transport der von ihnen stammenden Lipide</i>	30
1.3.3.1 <i>LDL</i>	31
1.3.3.2 <i>TRL</i>	33
1.4 STOFFAUSTAUSCH ZWISCHEN ZELLEN	35
1.4.1 <i>Transport über den extrazellulären Raum</i>	35
1.4.2 <i>Direkter interzellulärer Transport über tubuläre Zell-Zell-Verbindungen</i>	35
1.4.2.1 <i>Gap Junctions</i>	35
1.4.2.2 <i>TNT</i>	36

1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	38
2 ERGEBNISSE	40
2.1 AUFREINIGUNG UND FLUORESZENZMARKIERUNG DER VP	40
2.1.1 <i>Aufreinigung L-Protein-reicher VP aus HBV-positivem Plasma</i>	40
2.1.2 <i>Fluoreszenzmarkierung der aufgereinigten VP</i>	43
2.2 UNTERSUCHUNG DER ROLLE DER VERSCHIEDENEN LEBERZELLTYPEN IN DER FRÜHEN HBV-INFEKTION	45
2.2.1 <i>Das humane ex vivo Lebergewebsperusionsmodell</i>	45
2.2.2 <i>Kurzzeitige Perfusion des humanen Lebergewebes mit VP₅₉₄-haltigem Medium (45 Minuten)</i>	47
2.2.3 <i>Kurzzeitige Perfusion des humanen Lebergewebes mit nicht-modifizierten VP (45 Minuten)</i>	48
2.2.4 <i>Injektion fluoreszenzmarkierter VP in Maus</i>	51
2.2.5 <i>Injektion nicht-modifizierter VP in Maus</i>	52
2.2.6 <i>Analyse der HBV-Lipoproteinassoziation in serum- und plasmahaltigen Lösungen</i>	53
2.2.7 <i>Pulse-Chase-Perfusion des humanen Lebergewebes (17h)</i>	57
2.2.8 <i>HBV-Trans-Infektion von PHH durch Kupffer-Zellen in vitro</i>	60
2.3 CHARAKTERISIERUNG DES HBV-TRANSPORTMECHANISMUS IN KUPFFER-ZELLEN....	62
2.3.1 <i>Charakterisierung der VP₅₉₄-enthaltenden Kompartimente</i>	62
2.3.2 <i>Effekt von U18666a auf den Transport freier Cholesterole und VP₅₉₄ in Makrophagen</i>	66
2.3.3 <i>Analyse der Cholesterol- und HBV-Resekretion aus Makrophagen</i>	68
2.4 UNTERSUCHUNG DES TRANSPORTES VON VP ₅₉₄ UND NEUTRALEN LIPIDEN AUS KUPFFER-ZELLEN IN DIE HEPATOZYTEN IM HUMANEN LEBERGEBE	70
3 DISKUSSION.....	77
3.1 AUFREINIGUNG DER VP	77
3.2 FLUORESZENZMARKIERUNG DER VP	79
3.3 DAS HUMANE LEBERGEBESPERFUSIONSMODELL.....	80
3.4 HBV AKKUMULIERT IN DER LEBER INITIAL IN KUPFFER-ZELLEN	83
3.5 HBV ASSOZIIERT IN SERUM- UND PLASMAHALTIGEN LÖSUNGEN MIT TRL ZU VIRUS- TRL-KOMPLEXEN	91
3.6 KUPFFER-ZELLEN <i>TRANS</i> -INFIZIEREN HEPATOZYTEN MIT HBV.....	95

3.7 HBV FOLGT IN MAKROPHAGEN DEM TRANSPORTWEG DER FREIEN CHOLESTEROLE ENDOZYTIERTER LIPOPROTEINE	97
3.8 HBV FOLGT DEM TRANSPORTWEG DER IN DEN KUPFFER-ZELLEN AKKUMULIERENDEN NEUTRALEN LIPIDE ZUR UND IN SEINE WIRTSZELLE	103
3.9 ZUSAMMENFASSUNG DER AUFGESTELLTEN THEORIE ÜBER DIE FRÜHEN INFEKTIONSSCHRITTE DES HBV	110
4 MATERIAL UND METHODEN	112
4.1 MATERIAL	112
4.1.1 Verbrauchsmaterial	112
4.1.2 Chemikalien	113
4.1.3 Kits	114
4.1.4 Medien und Medienzusätze	115
4.1.5 Gewichts- und Längenstandards	116
4.1.6 Antikörper und Proteine	116
4.1.7 Enzyme	117
4.1.8 Oligonukleotide	117
4.1.9 Radioisotope	118
4.1.10 Geräte	118
4.1.11 Software	120
4.1.12 Statistik	120
4.1.13 Eukaryotische Zelllinien	120
4.1.14 Lösungen und Puffer	121
4.1.15 Angesetzte Zellkulturmedien	121
4.1.15.1 Medien für die Leberzellpräparation	121
4.1.15.2 Medien zur Kultivierung primärer humaner Zellen	122
4.1.15.3 Medium für die <i>ex vivo</i> Perfusion humanen Lebergewebes	123
4.1.15.4 Medien zur Kultivierung humaner Zelllinien	123
4.2 METHODEN	124
4.2.1 Biochemie	124
4.2.1.1 Dichtegradientenultrazentrifugation	124
4.2.1.2 Dichtebestimmung der Gradientenfraktionen	125
4.2.1.3 Berechnung der Durchmesser mit HBV assoziierter Lipoproteine	126
4.2.1.4 Umpuffern der VP mittels Ultrafiltration	127
4.2.1.5 Bestimmung der Proteinkonzentration	127

4.2.1.6	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen	129
4.2.1.7	Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese	129
4.2.1.8	Silberfärbung der SDS-Polyacrylamidgele	130
4.2.1.9	Fluoreszenzanalyse der SDS-Polyacrylamidgele	131
4.2.1.10	Aufreinigung von humanen TRL	131
4.2.1.11	Radioaktive Markierung der TRL mit ³ H-Cholesterolen	131
4.2.1.12	Markierung der TRL mit NBD-Cholesterolen	132
4.2.1.13	„Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA).....	132
4.2.1.14	„Microparticle enzyme immunoassay “ (MEIA)	132
4.2.2	<i>Molekularbiologie</i>	132
4.2.2.1	Isolation zellulärer RNA.....	132
4.2.2.2	Isolation viraler DNA	133
4.2.2.3	cDNA-Synthese.....	133
4.2.2.4	Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentrationen	133
4.2.2.5	Quantitative Light Cycler [®] PCR.....	134
4.2.2.6	HBV-spezifischer DNA Dot-Blot	135
4.2.3	<i>Zellbiologie</i>	137
4.2.3.1	Produktion nativer VP in HepG2.2.15-Zellen	137
4.2.3.2	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität.....	137
4.2.3.3	Präparation primärer humaner Leberzellen	137
4.2.3.4	<i>Trans</i> -Infektionsversuche mit Kupfer-Zell-PHH-Mischkulturen	139
4.2.3.5	Präparation primärer muriner Leberzellen	139
4.2.3.6	Das humane <i>ex vivo</i> Lebergewebsperusionsmodell.....	140
4.2.3.7	Isolierung primärer humaner Monozyten und Differenzierung zu pro-inflammatorischen Makrophagen	141
4.2.3.8	Differenzierung monozytärer THP-1 Zellen zu Makrophagen.....	142
4.2.3.9	Pulse-Chase-Experimente	142
4.2.4	<i>Mikroskopie</i>	142
4.2.4.1	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	142
4.2.4.2	Transmissionselektronenmikroskopie	143
5	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	144
6	LITERATUR.....	150
	DANKSAGUNG	165

Zusammenfassung

Das humane Hepatitis B Virus (HBV) gehört zu der Familie der Hepadnaviren und ist ein ausgesprochen spezies- und leberspezifisches Pathogen. Die Infektion mit HBV stellt weltweit ein großes Gesundheitsproblem dar. Über 350 Millionen Menschen sind chronische Virusträger, von denen viele eine Leberzirrhose und ein hepatozelluläres Karzinom entwickeln. Ein Grund für die starke Ausbreitung des Virus in der menschlichen Bevölkerung ist seine hohe Infektiosität, wobei eine minimale Infektionsdosis, wahrscheinlich ein einzelnes Virion, zur Infektion eines Menschen ausreicht. Dies lässt auf einen hochspezifischen Infektionsweg schließen, über den das Virus seine Wirtszelle in der Leber, den Hepatozyten, erreicht.

Trotz vieler Bemühungen ist bis heute nicht verstanden, wie das Virus einer vorzeitigen Elimination aus der Blutzirkulation entgeht und so effizient in seine Wirtszelle transportiert werden kann. Da HBV nur Menschen und Menschenaffen produktiv infiziert, wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung der frühen Infektionsschritte ein neuartiges humanes *ex vivo* Lebergewebesperfusionssystem entwickelt. Die unveränderte Gewebearchitektur und die physiologisch angepassten Perfusionsbedingungen ermöglichten die Untersuchung der Virus-Leberzell-Interaktionen, wie sie *in vivo* in der menschlichen Leber stattfinden. Die durchgeführten Experimente zeigten, dass HBV, assoziiert mit Triacylglyceridreichen Lipoproteinen (TRL), in der Leber zunächst von den Kupffer-Zellen aufgenommen und die viralen Partikel anschließend zum Hepatozyten weiter transportiert werden. Dies führte zu einer produktiven Infektion der Hepatozyten. Die initiale Aufnahme von HBV in der Leber durch Kupffer-Zellen wurde auch in Mäusen beobachtet. Im Gegensatz zu dem humanen System fand sich in der Maus jedoch kein Transfer viraler Partikel in die Hepatozyten.

Anschließend wurde der molekulare Mechanismus untersucht, über den HBV von den Kupffer-Zellen dem Perfusat entzogen und in die Hepatozyten transportiert wurde. Im Menschen stellt der Transport von TRL-Remnants aus der Peripherie in die Leber einen Stoffwechselweg dar, über den neutrale Lipide effizient zur Leber und in die Leberparenchymzellen, den Hepatozyten, gelangen. Dies kann über einen direkten Transport der Lipoproteine durch das Lebersinusendothel in die Parenchymzellen oder auch indirekt über eine initiale Lipoproteinaufnahme durch nicht-parenchymale Kupffer-Zellen mit anschließender Lipidübertragung in die

Hepatozyten geschehen. In dieser Arbeit wurde zunächst durch biochemische Analysen die im Perfusionsmodell beobachtete Assoziation von HBV mit TRL aus menschlichem Serum bestätigt. Dies unterstützt die Annahme einer wichtigen Funktion des TRL-Metabolismus beim spezifischen Transport von HBV in die Leber. Anschließend wurde in kultivierten Kupffer-Zellen und Makrophagen sowohl funktionell als auch in Lokalisationsstudien Parallelen der Transzytose von HBV zu dem transzellulären Transport der neutralen Lipide endozytierter Lipoproteine aufgezeigt, was nach Aufnahme von HBV in die Kupffer-Zellen eine intrazelluläre Migration entlang des Transportweges dieser Lipide nahelegt. Auch im perfundierten Lebergewebe ließ sich eine Migration des HBV entlang des Transportweges der aus den Kupffer-Zellen stammenden neutralen Lipide in die Hepatozyten darstellen. Zuletzt konnten Hinweise dafür gesammelt werden, dass der interzelluläre Lipid- und Virustransfer über fusionierte Zellmembranen vermittelt wird.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit einen Infektionsweg auf, bei dem HBV im menschlichen Organismus über die Assoziation mit TRL dem physiologischen Transport der neutralen Lipide in die Leber folgt, dort als Virus-Lipoproteinkomplex von den Kupffer-Zellen aufgenommen wird und sich entlang des Transportweges der neutralen Lipide der endozytierten Lipoproteine bewegt, um seine Wirtszelle zu infizieren.

Abstract

The human hepatitis B virus (HBV) belongs to the family hepadnaviridae and is a highly species- and liver-specific pathogen. Infection with HBV represents a major health problem worldwide. More than 350 million people are chronic carriers of the virus being at high risk for developing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. One reason for the effective spread of the virus within the human population is its high infectivity requiring an only extremely low infectious dose, with probably one single virion being sufficient to establish an infection. Thus, HBV must possess an extraordinary specific infection pathway to target the liver and its host cell, the hepatocyte.

Despite exceeding efforts it is not understood how the virus is efficiently transported from the circulation into its host cell. Since only primates become productively infected, a new experimental system was developed to investigate the early HBV infection pathway. In this model, a human liver tissue is perfused *ex vivo* under physiological conditions. Due to the preserved histological context and microenvironment, virus-human liver cell interactions could be investigated like they also occur *in vivo*. It was found that HBV, associated with TRL, was rapidly taken up preferentially by Kupffer cells and viral particles were subsequently delivered into hepatocytes, leading to productive host cell infection. Initial uptake of HBV by Kupffer cells was also observed in mice livers, however, in marked contrast to the human system, no viral particle transfer into hepatocytes could be detected.

Next the molecular mechanism how the virus was detracted from the perfusate and transported into hepatocytes was investigated. In humans the triglyceride rich lipoprotein (TRL) remnant transport is a liver-specific pathway by which neutral lipids are carried to the liver and into its parenchymal cells, the hepatocytes. This can either occur directly by lipoprotein transport through the endothelial fenestrae into the parenchymal cells, or indirectly by initial TRL-uptake into non-parenchymal Kupffer cells following neutral lipid transfer into hepatocytes in a second step. In these studies, the HBV-TRL-association observed in the *ex vivo* perfusion model was proved by biochemical analyses supporting an important role of the TRL-metabolism in HBV transport to the liver. Functional as well as colocalization investigations with cultured Kupffer cells and macrophages showed that virus transcytosis occurred along the transcellular pathway of neutral lipids derived from endocytosed

lipoproteins. Viral transport along Kupffer cell derived neutral lipid routes was also observed from liver macrophages into hepatocytes in *ex vivo* perfused human liver tissue. Finally, the intercellular lipid and viral transport is suggested to occur via fused Kupffer cell and hepatocyte plasma membranes.

Taken together, these studies present an infection pathway in which HBV, by associating with TRL, follows the physiological neutral lipid transport into the liver where it is taken up as a virus-lipoprotein complex by Kupffer cells. Subsequently, HBV is delivered into hepatocytes along the intercellular transport route of lipoprotein derived neutral lipids leading to productive host cell infection.

1 Einleitung

1.1 Die Leber

Die Leber (griechisch: hepar) ist ein bei einem Erwachsenen ungefähr 1,5-2 kg schweres, rotbraunes Organ, welches die größte Drüse und das größte Stoffwechselorgan unseres Körpers darstellt. Sie besitzt vielfältige Aufgaben, zu deren wichtigsten folgende zählen:

1. Die Aufnahme von Proteinen, Glukose und Lipiden (vgl. 1.3) aus dem Blut und deren Metabolisierung, 2. der Aufbau von Proteinen (u.a. einen großen Teil der Serumproteine, wie z.B. Gerinnungsfaktoren und Albumin) und Glykogen als auch Cholesterol und Fetten, wobei letztere beiden zur Sekretion in Lipoproteine eingebaut werden können (vgl. 1.3), 3. die chemische Entgiftung des Blutes, 4. die Beteiligung (über Kupfer-Zellen) am Abbau der Erythrozyten und 5. die Bildung von Galle: Eisenfreies Bilirubin, welches beim Abbau von Hämoglobin in den Retikulumzellen der Milz und den Kupfer-Zellen entsteht und ins Blut abgegeben wird, wird (an Albumin gebunden) den Leberzellen zugeführt und dort an Glucuronsäure gebunden und als wasserlösliches Bilirubinglucuronid über die Gallengänge in den Darm ausgeschieden. Die Leber produziert täglich etwa einen Liter Galle, die, neben dem Bilirubinglucuronid, die Gallensäure (diese dient der Emulgierung von Fetten im Darm und wird wieder rückresorbiert und der Leber zugeführt, vgl. 1.3.2.1), Cholesterol und Mineralien enthält. Zu den aufgezählten Funktionen der Leber kommt in der Fetalzeit noch die Bildung von Blutzellen hinzu (Moll und Moll, 2002).

1.1.1 Gefäßversorgung und Aufbau

Die Leber wird von zwei Gefäßen mit Blut versorgt. Zum einen von der Arteria hepatica propria, welche als Vas privatum sauerstoffreiches Blut zur Leber transportiert, und zum anderen von der Pfortader (Vena portae), welche als funktionelles Gefäß (Vas publicum) sauerstoffarmes, aber nährstoffreiches Blut aus dem Darm zur Leber befördert. Das abfließende Blut sammelt sich in den Venae hepaticae, welche in die Vena cava münden (Moll und Moll, 2002).

Die Leberzellen lassen sich in parenchymale und nicht-parenchymale Zellen unterteilen. Erstere werden als Hepatozyten bezeichnet und erfüllen die meisten Stoffwechselfunktionen der Leber (s.o.). Zu den nicht-parenchymalen Zellen gehören

die Leber-Sinus-Endothel-Zellen (LSEC, „liver sinusoidal endothelial cells“), die Kupffer-Zellen und die Ito-Zellen (s. Abb. 1.1). Die LSEC bilden die Lebersinusoidale, in die das Blut von der Pfortader fließt. Sie stellen feine Kapillare mit fenestriertem Endothel dar, das die Hepatozyten von dem Blutstrom abtrennt. Die Kupffer-Zellen liegen im Lebersinus und sind die ortsständigen Makrophagen der Leber. Sie entstammen dem Blut eingewanderter Monozyten und spielen die Hauptrolle bei dem Entzug älterer Erythrozyten aus dem Blutkreislauf und deren Abbau. Die Ito-Zellen liegen im Zwischenraum vom Lebersinusendothel und den Hepatozyten, dem sog. Disse-Raum. Sie besitzen in der Leber eine Speicherfunktion, indem sie Fett und Vitamin A einlagern (Malarkey et al., 2005; Moll und Moll, 2002).

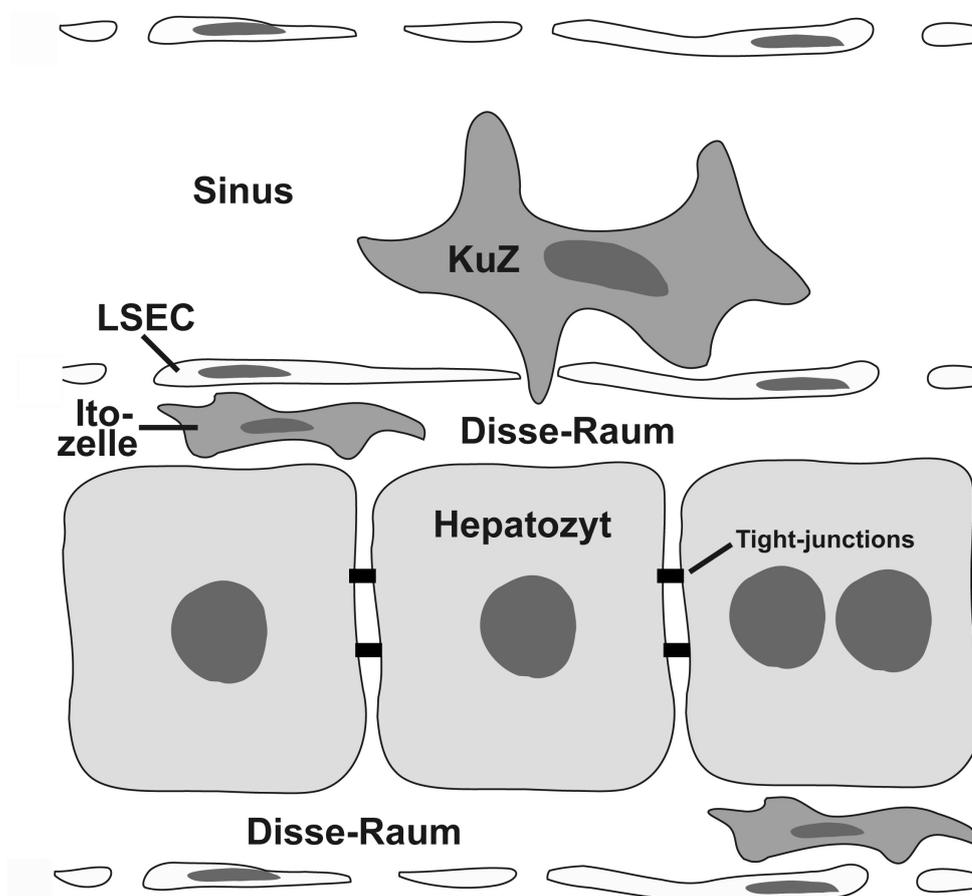


Abbildung 1.1: Anordnung der verschiedenen Leberzelltypen im sinusoidalen Gefäßsystem

Die Leber erhält Blut sowohl aus der Ateria hepatica propria als auch der Vena portae. Von diesen Gefäßen ausgehend wird es in sich weiter verzweigende, kleinere Gefäße geleitet, bis es im Sinus, der kleinsten Gefäßstruktur der Leber, angekommen ist. Dieser wird von dem fenestrierten Endothel der Leber-Sinus-Endothel-Zellen (LSEC) begrenzt, hinter dem sich die Parenchymzellen der Leber, die Hepatozyten, als auch die Fettspeicherzellen, die Ito-Zellen, befinden. Die Hepatozyten sind über „tight-junctions“ miteinander verbunden. Im Sinus befinden sich die ortsständigen Makrophagen der Leber, die Kupffer-Zellen (KuZ).

1.2 Hepatitis B Virus

Das Hepatitis B Virus (HBV) stellt den Prototypen einer Familie von verwandten Viren dar, die als Hepadnaviren bezeichnet werden. Der Name dieser Virusfamilie leitet sich, aufgrund ihres hohen Lebertropismus und des enthaltenden Nukleinsäuretyps, von griechisch „hepar“ sowie der Abkürzung für englisch „deoxyribonucleic acid“ (DNA, deutsch: „Desoxyribonukleinsäure“) ab. Die sehr hohe Spezifität stellt ein weiteres Charakteristikum dieser Erreger dar. Nach Studien an australischen Ureinwohnern wurde 1966 erstmals eine als Australien-Antigen-positiv bezeichnete Hepatitis beschrieben, als deren infektiöses Agens 1969 das humane HBV charakterisiert (Blumberg et al., 1966; Blumberg et al., 1969) und 1970 von Dane durch Elektronenmikroskopie dargestellt wurde (Dane et al., 1970). Das erste der nicht humanen Hepadnaviren wurde in amerikanischen Waldmurmeltieren (WHV, „woodchuck hepatitis virus“) (Summers et al., 1978) entdeckt. Es ist morphologisch nicht von dem humanen HBV zu unterscheiden und besitzt mit ihm eine Nukleotidsequenz-Homologie von ungefähr 60% (Galibert et al., 1982; Kodama et al., 1985). Darüber hinaus wurden weitere Viren dieser Gattung in Erdhörnchen (GSHV, „ground squirrel hepatitis virus“) (Ganem et al., 1982; Marion et al., 1980) und Ente (DHBV, „duck hepatitis B virus“) (Mason et al., 1980) festgestellt. Weniger gut charakterisierte Viren sind in Reihern sowie in verschiedenen Arten von Gänsen, Beuteltieren und Orang-Utans beschrieben (Schettler, 1971; Sprengel et al., 1988; Testut et al., 1996; Warren et al., 1999). Die Hepadnaviren des Waldmurmeltieres und der Ente stellen wichtige Modellsysteme für das humane HBV dar.

Hepadnaviren verursachen Leberinfektionen, bei denen bei persistierendem Verlauf die Leberzirrhose und das hepatozelluläre Karzinom (HCC, „hepatocellular carcinoma“) mögliche Spätfolgen darstellen. Eine direkte Zytogenität dieser Viren liegt vermutlich nicht oder nur in sehr geringem Maße vor, wie in Lebern von immuntoleranten, HBV-transgenen Mäusen festgestellt (Chisari, 1995) sowie aufgrund einer nahezu vom Virustiter unabhängigen Leberzellschädigung bei infizierten Schimpansen geschlussfolgert wurde (s. 1.2.3) (Guidotti et al., 1999). Die Infektion erfolgt parenteral über virushaltiges Blut (oder Blutprodukte), und zwar horizontal zwischen Individuen oder vertikal von der HBV-positiven Mutter auf das Neugeborene (Ganem, 1982).

Von dem humanen HBV sind zurzeit 7 Genotypen (A-G) beschrieben, die zu 8-15% in der Nukleotidsequenz ihres Virusgenoms voneinander abweichen. Hominide Primaten, z.B. Schimpansen, sind die einzigen Tiere, die mit dem humanen HBV infiziert werden können. Eine Besonderheit stellt das asiatische Spitzhörnchen (*Tupaia belangeri*) dar: Obwohl es (wenn auch eng verwandt) nicht zu den Primaten gezählt wird (Novacek, 1992), können isolierte Tupaiahepatozyten *in vitro* mit dem humanen HBV infiziert werden (Walter et al., 1996; Yan et al., 1996).

Tupaia-, als auch humane Hepatozyten, können zur Repopulation der Leber von immundefizienten uPA/RAG-2-Mäusen benutzt werden, deren murine Hepatozyten gezielt zerstört wurden (Dandri et al., 2005). Diese Kleintiermodelle werden heutzutage zur Untersuchung der humanen HBV-Infektion benutzt, da Schimpansen hierzu kaum noch Verwendung finden. Der Nachteil dieser Modelle ist ein hoher experimenteller Aufwand sowie eine im Vergleich zum Menschen geringere Infizierbarkeit und Virämie. Hinzu kommt, dass die nicht-parenchymalen Leberzellen, im Gegensatz zur menschlichen Leber, murinen Ursprungs sind und potentielle Interaktionen mit HBV möglicherweise nicht oder nur teilweise eingehen.

1.2.1 Epidemiologie

Weltweit haben sich im Laufe ihres Lebens etwa 2 Milliarden Menschen mit HBV infiziert von denen mehr als 350 Millionen chronische Träger des Virus sind (World Health Organization. Hepatitis B. World Health Organization Fact Sheet 204. WHO Web site. 2008. <http://who.int/inf-fs/en/fact204.html>). Letztere besitzen, verglichen mit HBV-negativen Menschen, ein 100-fach erhöhtes Risiko, ein HCC zu entwickeln (Beasley, 1988; Beasley et al., 1981). Man nimmt an, dass von den chronischen Trägern 15-40% eine Leberzirrhose, ein Leberversagen oder ein HCC entwickeln werden (Lok, 2002). Die HBV-Infektion ist die Ursache für 500.000 bis 1,2 Millionen Todesfälle jährlich weltweit (Lee, 1997; Mahoney, 1999). Trotz eines verfügbaren Impfstoffes steigen besonders in den Entwicklungsländern die Infektionsraten weiterhin an (Ganem und Schneider, 2001).

Zu den hochendemischen Regionen mit Trägerraten von 5-10% zählen der Mittlere Osten sowie weite Teile Afrikas und Asiens. In diesen Bereichen ist der vertikale Übertragungsweg häufig (World Health Organization. Hepatitis B. World Health Organization Fact Sheet 204. WHO Web site. 2008. <http://who.int/inf-fs/en/fact204.html>). In den Ländern mit geringer Trägerrate wie Westeuropa und Nordamerika (0,1-0,5%) erfolgen Neuinfektionen hauptsächlich im Erwachsenenalter

(Lok et al., 2001), wobei das Virus durch sexuellen Kontakt oder Kontakt mit virushaltigem Blut bzw. Blutprodukten übertragen wird (Ganem, 1982; Hoofnagle, 1981).

1.2.2 Krankheitsverlauf

Die HBV-Infektion kann sehr unterschiedlich verlaufen. Neben einem inapparenten Verlauf kann es bei Erwachsenen zu einer akuten Hepatitis kommen. In den meisten Fällen heilt die Infektion aus und wird nur bei etwa 5% sonst gesunder Individuen chronisch (Hyams, 1995). Von einer chronischen Infektion spricht man, wenn Patienten über einen Zeitraum länger als sechs Monate positiv für Hepatitis B Oberflächenantigene (HBsAg, „hepatitis B surface antigen“) sind. Sie kann symptomlos verlaufen oder mit einer unterschiedlich ausgeprägten Leberzellschädigung und Leberentzündung verbunden sein (Lau und Wright, 1993). Als weitere Form der HBV-Infektion tritt in seltenen Fällen (<1%) eine fulminante Leberentzündung auf, die unter Ausfall des Blutgerinnungssystems und Ausbildung einer hepatischen Enzephalopathie zu 70% letal ist. Im Gegensatz zu Erwachsenen verläuft bei Neugeborenen die Infektion meistens ohne akute Phase, wird jedoch in 80-90% der Fälle chronisch (Beasley et al., 1977; Lee et al., 1978).

Die klinischen Symptome der HBV-Infektion sind oft unspezifisch wie Schmerzen im rechten Oberbauch, Müdigkeit und Ikterus, wobei letzterer bei mildem Verlauf fehlen kann. Aufgrund von Leberzellschädigungen lassen sich im Blut erhöhte Konzentrationen von Alaninaminotransferasen (ALT) nachweisen, die von apoptotischen Hepatozyten freigesetzt werden.

1.2.3 Immunantwort

Im Schimpansenmodell konnte gezeigt werden, dass vier bis sechs Wochen nach einer Infizierung mit HBV HBsAg und virale DNA im Serum nachweisbar werden, wobei der höchste Titer nach ungefähr acht Wochen erreicht wird und mehr als 75% der Hepatozyten infiziert sind (Guidotti et al., 1999). Im DHBV- und WHV-Modell werden bei einer typischen Primärinfektion nahezu 100% der Hepatozyten infiziert (Jilbert et al., 1987; Jilbert et al., 1992; Kajino et al., 1994). Beim Menschen können Virustiter von 10^9 bis 10^{10} Virionen/ml erreicht werden (Ribeiro et al., 2002). Interessanterweise gibt es bis zum Erreichen des höchsten Virustiters im Schimpansen kaum Hinweise auf eine Leberzellschädigung (Guidotti et al., 1999), was in Einklang mit einer Nicht-Zytopathizität des HBV-Replikationszyklusses steht

(Chisari, 1995). Ein Anstieg der ALT im Blut wird erst durch die einsetzende T-Zellantwort, insbesondere zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL, „cytotoxic T-lymphocytes“), vermittelt und lässt sich ungefähr ein bis drei Wochen nach Erreichen der höchsten Virusproduktion beobachten (Franco et al., 1997; Moriyama et al., 1990; Penna et al., 1992).

Kurz nach Erreichen des Blutkonzentrations-Gipfels von HBsAg und viraler DNA können beim Menschen erste HBV-spezifische Antikörper (Anti-HBcAg („hepatitis B core antigen“)) detektiert werden. Ungefähr 10 Wochen später lassen sich bei akuter, selbstlimitierender Infektion (jedoch nicht bei chronischem Verlauf) auch Anti-HBsAg- und Anti-HBeAg („hepatitis B e antigen“)- Antikörper nachweisen (Rehermann und Nascimbeni, 2005).

Die T-Zellantwort, insbesondere die CTL-Antwort, auf HBV spielt bei der Ausheilung der HBV-Infektion eine essentielle Rolle. Bei Patienten, die keine chronische HBV-Infektion entwickeln, ist die CTL-Antwort stark, polyklonal und gegen alle der viralen Genprodukte gerichtet. Im Gegensatz dazu ist die CTL-Antwort gegen virale Antigene bei chronischen HBV-Trägern schwach oder gar nicht detektierbar (Bertoletti et al., 1991; Chisari, 1997; Penna et al., 1991).

1.2.4 Virusmorphologie

HBV ist ein membranumhülltes Virus, das sich im Elektronenmikroskop in wasserfreier, fixierter Form mit einem Durchmesser von 42 nm darstellt und nach seinem Entdecker „Dane Partikel“ genannt wird (Dane et al., 1970). Es besitzt eine Dichte von 1,22 g/ml in CsCl und einem Sedimentationskoeffizienten in Saccharose von 280 Svedberg (S) (Hollinger und Liang, 2001; Kaplan et al., 1976). In der Virusmembran befinden sich die drei HBV Oberflächenproteine (s. Abb. 1.2), die je nach Glykosilierungsstatus der Asn-146 zwei unterschiedliche Proteinmassen aufweisen: Das 39/42 Kilodalton (kDa) L- („large“), das 35/38 kDa M- („middle“) und das 24/28 kDa große S- („small“) Protein (Heermann und Gerlich, 1991; Neurath et al., 1985). Hierbei enthalten das M- und L-Protein zusätzlich zur S-Proteinsequenz die sog. Pre-S2 bzw. Pre-S2 und Pre-S1 Sequenz. Das M-Protein enthält zu der potentiellen Glykosilierung der S-Domäne ein weiteres N-Oligosaccharid (Heermann et al., 1984). Beim L-Protein ist als posttranslationale Modifikation zudem eine Myristylierung am N-terminalen Glycin vorhanden, die für die Infektiosität von HBV eine essentielle Rolle spielt (Persing et al., 1987). Die Oberflächenproteine sind über wahrscheinlich vier transmembranäre Domänen der S-Proteinsequenz in der

Virusmembran verankert (Berting et al., 1995). Darüber hinaus dienen 14 teilweise vernetzte Cysteine der Stabilisierung der S-Proteinkonformation (Mangold und Streeck, 1993).

Das Innere der Virionen bildet das Nukleokapsid, welches die Virus-DNA und die virale Polymerase beinhaltet (s. Abb. 1.2). Das Kapsid ist ein Oligomer aus 180 bzw. 240 Core-Proteinen und hat (gemäß kryoelektronenmikroskopischer Analysen) einen Durchmesser von 30 bzw. 34 nm (Crowther et al., 1994). Bei der Kapsidbildung entstehen, durch die Anlagerung von je zwei Alpha-Helices zweier Core-Proteine zu einem Vier-Helix-Bündel, Dimere, die sich wiederum zu Ikosaeder mit T=3 bzw. T=4 Symmetrie zusammenlagern (Crowther et al., 1994; Wynne et al., 1999). Die 21 kDa großen Core-Proteine sind basische Phosphorproteine und enthalten in ihren carboxyterminalen Bereichen kationische Seitenketten, welche vermutlich mit dem viralen Genom im Inneren des Kapsids interagieren (Gallina et al., 1989; Nassal, 1992). Serologisch wird das Core-Protein als HBcAg bezeichnet.

Bei den im Serum infizierter Patienten vorhandenen viralen Partikel (VP) findet man neben den Virionen nukleokapsidfreie, nicht infektiöse Partikel, die als subvirale Partikel (SVP) bezeichnet werden und in 1.000- bis zu 100.000-fachem Überschuss zu den Virionen vorliegen (Ganem und Prince, 2004). Die SVP lassen sich in filamentöse und sphärische SVP unterteilen. Filamentöse SVP besitzen (bei einem konstanten Durchmesser von ungefähr 22 nm) eine variable Länge mit bis zu 200 nm. Sie enthalten in ihrer Hülle alle drei Virusoberflächenproteine (mit Anteilen S>M>L vergleichbar zu Virionen). Die sphärischen SVP sind ungefähr 20 nm groß und enthalten das S- und M-Protein, jedoch kein, oder teilweise in nur sehr geringen Mengen, das L-Protein (s. Abb. 1.2) (Glebe und Gerlich, 2004; Heermann et al., 1984). Die Dichte der nukleokapsidfreien SVP in CsCl beträgt 1,18 g/ml mit einem Sedimentationskoeffizienten der sphärischen SVP von 39 bis 54 S (Hollinger und Liang, 2001; Robinson, 1995). Die Lipide der SVP-Hülle entstammen der Wirtszelle, wobei es sich hauptsächlich um Phosphatidylcholine, freie Cholesterole, Cholesterolester (CE) und Triacylglyceride (TG) handelt (Gavilanes et al., 1982). Aufgrund der hohen Konzentration von SVP in Seren HBV infizierter Patienten dienen die viralen Oberflächenproteine als serologischer Marker und werden als HBsAg bezeichnet, wobei die äußere Schleife des S-Proteins die Antigen determinanten enthält.

Zusätzlich zu den SVP kann im Serum von HBV-Patienten das virale e-Protein nachgewiesen werden. Es ist mit dem Core-Protein verwandt, enthält jedoch zusätzlich ein Sekretionssignal, weshalb es nicht in die VP eingebaut, sondern separat von den infizierten Hepatozyten sezerniert wird. Serologisch wird es als HBeAg bezeichnet.

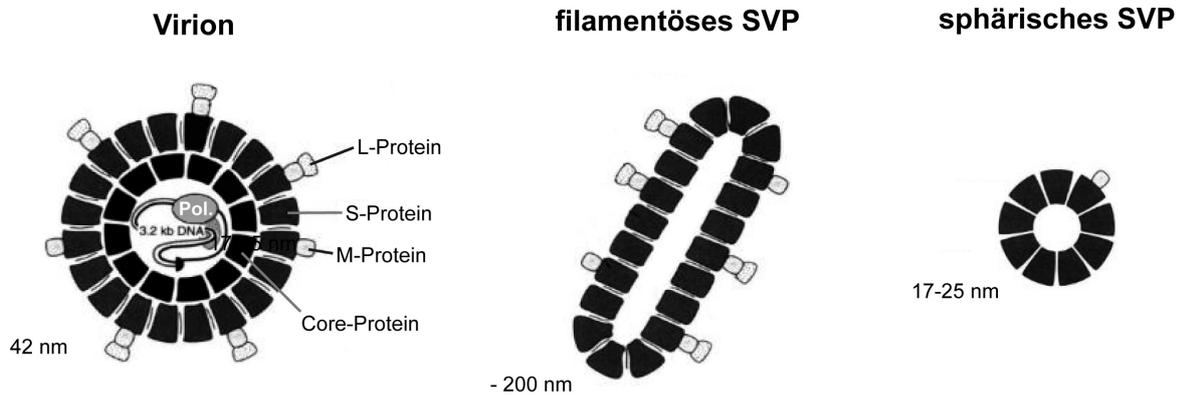


Abbildung 1.2: Aufbau der VP

Die infektiösen Virionen bestehen aus einem von Core-Proteinen gebildeten Kapsid, welches die virale DNA und Polymerase (POL) enthält, sowie einer das Nukleokapsid umhüllenden Lipid-Doppelschicht, in die die drei HBV-Oberflächenproteine (L-, M- und S-Protein) eingebaut sind. Die nicht infektiösen SVP enthalten kein Nukleokapsid und liegen entweder in einer länglichen Form mit unterschiedlicher Größe und allen drei viralen Oberflächenproteinen, oder sphärisch mit nur den S- und M-Proteinen vor. (Aus: Bundesgesundheitsblatt 43, 3 (2000):240-248).

1.2.5 Virusgenom

Das Genom des HBV besteht aus ungefähr 3200 Nukleotiden und ist eines der kleinsten, das bei Viren nachgewiesen wurde. Die im Nukleokapsid enthaltene virale DNA ist (ohne Verdrillung) zirkulär angeordnet (rcDNA, relaxed circular DNA), ohne an seinen Enden kovalent verbunden zu sein (Robinson et al., 1974; Summers et al., 1975). Während der DNA-Minusstrang in der Länge des gesamten Genoms vorliegt, variiert der Plusstrang in seiner Länge am 3'-Ende (Lien et al., 1987). An das 5'-Ende des viralen Minusstrangs ist kovalent ein terminales Protein gebunden (Gerlich und Robinson, 1980), welches als virale Polymerase identifiziert wurde (Bosch et al., 1988). Am 5'-Ende des Plusstranges befindet sich eine aus 18 Ribonukleotiden bestehende Cap-Struktur (Lien et al., 1986; Seeger et al., 1986).

Charakteristisch für die Hepadnavirusgenome ist die hohe Informationsdichte ihrer Nukleotidsequenz, die durch ihre mehrfache Nutzung erreicht wird. So überlappen zum einen die vier offenen Leseraster (ORF, „open reading frames“) innerhalb der HBV DNA und zum anderen enthält ein ORF mehrere Start-Codons, was die Anzahl der von einem ORF kodierten Proteine erhöht.

Folgende virale Proteine werden durch die ORF kodiert: Die virale Polymerase durch das P-ORF, das X-Protein durch das X-ORF, das Core- und e-Protein durch das PreC/C-ORF und die viralen Oberflächenproteine durch das PreS/S-ORF (s. Abb. 1.3).

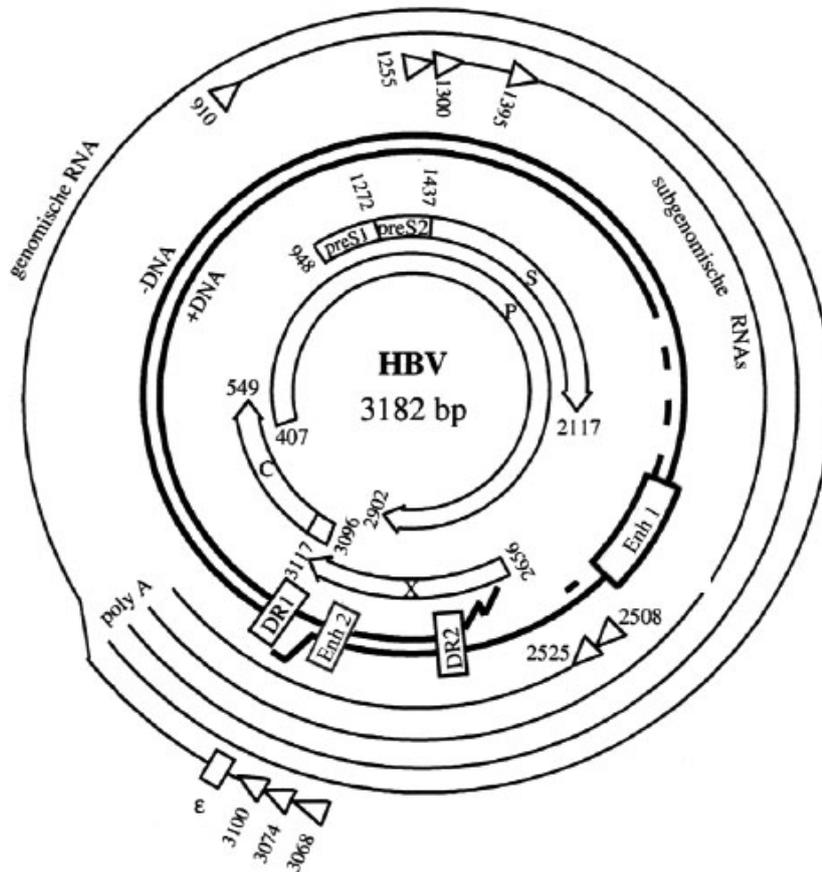


Abbildung 1.3: Genomorganisation von HBV

Im Inneren der Zeichnung zeigen die kreisförmigen Pfeile die vier offenen Leseraster (ORF) und die kodierten Proteine Polymerase (P), Oberflächenproteine S, M (PreS2 +S) und L (PreS1/ 2 +S), sowie Core- (C) und X-Protein. In der Mitte stellen die beiden dicker gezeichneten Kreise das teilweise doppelsträngige Genom dar. Abgebildet sind zudem die Verstärkerelemente (Enh, „enhancer“) und die posttranskriptionalen Regulationselemente (DR1+2, „direct repeats“). Die äußeren Kreise stellen die genomischen und subgenomischen Transkripte dar, wobei die dreieckigen Pfeilspitzen die Transkriptionsstartstellen und das Viereck die ε-Verpackungssequenz kennzeichnen. (Modifiziert nach: (Protzer et al., 1999)).

1.2.6 Viraler Lebenszyklus

1.2.6.1 HBV Transport zur Wirtszelle

Die frühen Schritte im Lebenszyklus des humanen HBV sind bis heute nur wenig verstanden. Studien mit Schimpansen und dem DHBV-System deuten darauf hin, dass (intravenös appliziert) geringste Mengen Virus, wahrscheinlich ein einziges Virion, für eine produktive Infektion der Leber ausreichen (Asabe et al., 2009; Jilbert

et al., 1996). Das lässt einen sehr effizienten Mechanismus vermuten, über den das Virus aus der Peripherie zu seiner Wirtszelle gelangt. Während bis heute für HBV kein hepatotroper physiologischer Transportweg beschrieben wurde, den das Virus zum gezielten Erreichen der Leber nutzt, wird für das leberspezifische Hepatitis C Virus (HCV) angenommen, dass es über eine Assoziation mit TG-reichen Lipoproteinen (TRL) (Prince et al., 1996; Thomssen et al., 1992) dem Transport der TRL-Remnants folgt (Diaz et al., 2006) (vgl. 1.3). Denkbar ist dabei, dass im Lebersinus initial die TRL-Komponente des Lipoprotein-Viruskomplexes an leberzellenspezifische Glykosaminoglykane und/oder LDL-Rezeptoren bindet, bevor es zu weiteren Interaktionen mit zellulären Rezeptoren kommt (Sabahi, 2009).

Weiterhin ist unklar, ob in der Leber ausschließlich Hepatozyten HBV initial binden, bevor es in die Wirtszelle aufgenommen wird. Hepatozyten haben zu dem durch die Leber fließenden Blut keinen direkten Kontakt, sondern liegen hinter einer zellulären, fenestrierten Barriere aus LSEC und Kupffer-Zellen (vgl. 1.1), durch die HBV gelangen muss, um seine Wirtszelle zu erreichen. Für Moleküle größer als 17 nm konnte kein direkter Transport durch das fenestrierte Endothel beobachtet werden (Kempka und Kolb-Bachofen, 1988). Da HBV einen Durchmesser von 42 nm besitzt (vgl. 1.2.4), wird aufgrund des wahrscheinlich stark verminderten direkten Transportes des Virus durch das Endothel ein Infektionsweg vermutet, bei dem HBV im Sinus initial durch nicht-parenchymale Leberzellen aufgenommen und nachfolgend zu den Hepatozyten weitergereicht wird. Diese Hypothese basiert auf Untersuchungen im DHBV-Modell. Hier wurde beobachtet, dass sowohl fluoreszierende SVP als auch Gold markiertes PreS-Oberflächenprotein intravenös appliziert nach 30 Minuten nicht in Parenchymzellen, sondern in LSEC akkumulierten (Breiner et al., 2001). Für das humane HBV ist eine mögliche Rolle von nicht-parenchymalen Leberzellen bei dem Virustransport zur Wirtszelle bis heute nicht untersucht worden.

Auch für das HCV wird ein Infektionsweg diskutiert, bei dem in der Leber eine initiale Aufnahme des Virus von nicht-parenchymalen Leberzellen vor der Weitergabe an die Hepatozyten stattfindet. Es wird vermutet, dass die C-Typ-Lektine „liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin“ (L-SIGN) und „dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin“ (DC-SIGN) hier eine entscheidende Rolle spielen. So konnte gezeigt werden, dass nach Bindung an diese Rezeptoren HCV internalisiert wird. Darüber hinaus transinfizieren über L-/DC-

SIGN aufgenommene HCV-Pseudoviren umliegende Leberzellen *in vitro* (Cormier et al., 2004; Gardner et al., 2003).

1.2.6.2 Aufnahme von HBV in die Wirtszelle

Über den Mechanismus, wie das Virus in die Hepatozyte aufgenommen wird, ist bis heute wenig bekannt. Ein Grund hierfür ist, dass lange Zeit nur primäre humane Hepatozyten (PHH) produktiv mit HBV infiziert werden konnten. Dabei kann die Effizienz der PHH Infektion durch Zugabe von Polyethylenglykol gesteigert werden, welches eine vermehrte Bindung der Virionen an Glykosaminoglykane der Hepatozyten vermittelt (s.u.) (Gripon et al., 1993; Schulze et al., 2007). Entscheidend für die Infizierbarkeit der PHH ist ihr Differenzierungsstatus. Durch Kultivierung mit DMSO und kortikoidhaltigem Medium können PHH noch bis zu drei Wochen nach Aussaat mit HBV infiziert werden, während sie ansonsten innerhalb weniger Tage diese Eigenschaft verlieren (Gripon et al., 1988). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass DMSO-haltiges Medium den Differenzierungsstatus von primären Hepatozyten stabilisiert, indem es die Expression von Hepatozyten-spezifischen Detoxifikationsenzymen, wie z.B. P450, hochhält (Muakkassah-Kelly et al., 1987). Neuerdings werden neben den PHH auch HepaRG-Zellen für HBV-Infektionsstudien verwendet. Zellen dieser Hepatoma-Zelllinie lassen sich nach mehrwöchiger Differenzierung mit DMSO- und kortikoidhaltigem Medium mit HBV infizieren (Gripon et al., 2002). Interessant ist, dass die zelluläre HBV-Aufnahme von nicht-differenzierten und differenzierten HepaRG-Zellen vergleichbar ist. Dies deutet darauf hin, dass die mangelnde Infizierbarkeit nicht-differenzierter Zellen nicht auf eine geringere Anzahl oder Abwesenheit von Virusaufnahme vermittelnder Wirtsfaktoren zurückzuführen ist, sondern auf ausbleibende Virus-Zell-Interaktion(en), die in differenzierten Zellen erst nach Viruseintritt in die Zelle stattfinden (Glebe und Urban, 2007).

Bisherige Untersuchungen mit kultivierten Hepatozyten legen dar, dass das Virus nicht hepatozytenspezifisch zunächst an hochgradig sulfatierte Glykosaminoglykane bindet. Bindungsstudien bei 4°C zeigten, dass dieser Vorgang vom viralen L-Protein vermittelt wird und von geringer Affinität ist (Leistner et al., 2008; Schulze et al., 2007; Ying et al., 2002). Bei Erwärmen auf 37°C kommt es zu einer Virusaufnahme in die Zelle. Eine direkte Fusion der Virus- und Zellmembran bei primären Hepatozyten erscheint dabei eher unwahrscheinlich, da in mit fluoreszenzmarkierten, filamentösen SVP inkubierten Zellen eine Akkumulierung in endosomalen Strukturen

dargestellt werden konnte (Glebe und Gerlich, 2004). Auch für DHBV wurde eine Aufnahme in primäre Entenhepatozyten durch Endozytose beschrieben (Funk et al., 2006; Kock et al., 1996). Neuere Untersuchungen an HepaRG-Zellen ergaben, dass funktionelles Caveolin-1 für die zelluläre Aufnahme entscheidend ist. Da die Depletion von zellulärem Cholesterol mit Methyl-beta-Cyclodextrin bzw. die Behandlung der Zellen mit Genistein, einem Inhibitor für Caveolae vermittelte Endozytose, die Infektion ebenfalls stark reduzierte, Inhibitoren für Clathrin abhängige Endozytose jedoch keinen Effekt zeigten, schlugen die Autoren eine Caveolae-vermittelte Virusaufnahme in HepaRG-Zellen vor (Macovei et al., 2010). Diese Theorie wird durch kürzlich an einer Fibroblastenzelllinie (COS-7 Zellen) durchgeführten Studien unterstützt, nach denen Cholesterol in der Plasmamembran für die zelluläre Aufnahme fluoreszenzmarkierter, HBV-Oberflächenprotein-haltiger Partikel notwendig ist (Hao et al., 2011).

Rolle der viralen Oberflächenproteine und potenzielle Bindungspartner

Unabhängig von der die HBV-Aufnahme vermittelnde Endozytoseform ist bis heute kein HBV-bindender zellulärer Rezeptor bekannt. Obwohl mittels HBV-Peptiden oder viralen Partikeln verschiedene HBV-bindende Komponenten der Plasmamembran primärer Hepatozyten oder auch von Hepatoma-Zelllinien identifiziert wurden (s.u.), konnte bis heute für keine eine entscheidende Rolle in der HBV-Infektion gezeigt werden. Für DHBV konnte die membranständige Carboxypeptidase D (CPD) als ein bei der Virusaufnahme essentieller Rezeptor dargestellt werden (Breiner et al., 1998). CPD bindet dabei hochaffin an die Pre-S1 Domäne des viralen L-Proteins (Kuroki et al., 1994; Urban et al., 2000). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass weitere Rezeptoren an der DHBV-Aufnahme in die Zelle beteiligt sind, da die Expression von CPD in nicht-permissiven Zelllinien, die jedoch kompetent für die Replikation des Virus sind, z.B. LMH-Zellen, nicht zu einer Infizierbarkeit der Zellen führen (Breiner et al., 1998).

Für das humane HBV wird im Rahmen der Virusaufnahme in die Wirtszelle der Pre-S1-Domäne des L-Proteins ebenfalls eine essentielle Rolle zugesprochen. Man vermutet eine hochaffine Bindung der Pre-S1 Domäne an einen (noch nicht charakterisierten) Rezeptor, da geringste Mengen (<100nM) synthetischen Peptids, welche die N-terminale Sequenz des L-Proteins enthält, eine HBV Infektion *in vitro* und *in vivo* vollständig inhibieren (Gripon et al., 2005; Petersen et al., 2008). Hierbei sind besonders die Aminosäuren neun bis 18 sowie die N-terminale Myristoylierung

des Peptids von Bedeutung (Glebe et al., 2005; Gripon et al., 2005). Die entscheidende Rolle dieser Pre-S1 Sequenzen für die HBV-Infektion der Hepatozyten konnte durch HBV-Mutanten bestätigt werden (Engelke et al., 2006). Durch die Modifikation der Fettsäurelänge der Pre-S1-Peptide lässt sich eine Steigerung der Inhibition von C5 (pentanoyl) über C14 (myristoyl), C16 (palmitoyl) und C18 (stearoyl) feststellen (Glebe et al., 2005; Gripon et al., 2005). Es wird vermutet, dass die Fettsäuremodifikation des L-Proteins dessen Rezeptorinteraktion verstärkt, indem der Myristoylrest in die Membran oder den Rezeptor eingelassen wird (Glebe und Urban, 2007). Die Exposition eines Myristoylrestes lässt sich bei einigen nicht umhüllten Viren im Zuge der Virusaufnahme in die Zelle beobachten und wird als „myristoyl-switch“ bezeichnet (Hogle, 2002; Liemann et al., 2002).

Als möglicher hochaffiner zellulärer Interaktionspartner der viralen Pre-S1-Domäne wird der Asialoglykoproteinrezeptor (ASGPR) diskutiert. HBV-Bindung an ASGPR konnte durch monoklonale PreS1, aber nicht PreS2 spezifische Antikörper inhibiert werden (Treichel et al., 1994). Darüber hinaus nehmen, im Gegensatz zu ASGPR-negativen CHO Zellen, ASGPR-positive HepG2 und HuH7 Zellen HBV auf (Treichel et al., 1997). Wurde HBV vor Inkubation mit HepG2 Zellen desialyliert, führte dies zur HBV-Infektion der nicht mit HBV-Wildtyp infizierbaren Hepatomazelllinie (Owada et al., 2006). Es ist denkbar, dass die Desialylierung der HBV-Oberflächenproteine und nachfolgende Bindung an ASGPR einen entscheidenden Schritt beim Viruseintritt in die Wirtszelle darstellt. Als weitere zelluläre Interaktionspartner der viralen PreS1-Domäne werden hepatozelluläre Immunglobulin A (IgA)-Rezeptoren diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Pre-S1 Domäne eine Sequenzhomologie mit IgA aufweist und auf der Hepatozytenmembran die Bindung von IgA in gleichem Maße inhibiert wie aufgereinigtes unmarkiertes IgA. Aufgrund dieser Beobachtungen vermutet man, dass HBV an hepatozelluläre IgA-Rezeptoren bindet, was beim Eintritt des Virus in die Wirtszelle von Bedeutung sein könnte (Neurath und Strick, 1990; Pontisso et al., 1992). Weitere zelluläre Bindungspartner der PreS1-Domäne und potentielle HBV-Rezeptoren sind das „human squamous cell carcinoma antigen 1“ (De Falco et al., 2001) und die Glycerinaldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (Duclos-Vallee et al., 1998; Petit et al., 1992). Darüber hinaus wurde die Bindung von PreS1-Peptiden an Interleukin 6 und Interleukin 6-exprimierenden Zelllinien gezeigt (Neurath et al., 1992a; Neurath et al., 1992b).

Im Gegensatz zum L-Protein ist das M-Protein für die HBV-Infektion nicht essentiell. Virionen, die nur S- und L-Proteine in der viralen Membran enthalten, zeigen keinen Verlust an Infektiosität (Fernholz et al., 1993). Es wird allerdings diskutiert, ob die PreS2-Sequenz im L-Protein beim Viruseintritt in die Zelle eine Rolle spielt. Der carboxyterminale Bereich enthält ein Translokationsmotiv (TLM), von dem vermutet wird, dass es am Viruseintritt beteiligt sein könnte (Oess und Hildt, 2000). Gegen diese These spricht allerdings die Beobachtung, dass rekombinante HBV-Varianten mit veränderter oder fehlender TLM-Sequenz in der PreS2-Domäne in PHH-Kulturen infektiös sind (Le Seyec et al., 1998).

Für das S-Protein scheint eine alleinige Beteiligung an der initialen Virusbindung an die Wirtszelle unwahrscheinlich, da SVP, die nur das S-Protein als Oberflächenprotein enthalten, nicht an PHH binden (Glebe et al., 2005). Allerdings legt die Tatsache, dass anti-HBsAg Antikörper die HBV Infektion *in vitro* und *in vivo* inhibieren, den Schluss nahe, dass der S-Domäne eine Rolle bei der Virus-Aufnahme in die Zelle zukommt (Iwarson et al., 1985; Ogata et al., 1999; Shearer et al., 1998). Für das Hepatitis D Virus (HDV), welches die HBV Oberflächenproteine für den viralen Eintritt nutzt, konnte gezeigt werden, dass Deletionen innerhalb der Antigenerkennungsstelle (Aminosäuren 104 bis 163) zu reduzierter Infizierbarkeit führen. Der hierfür essentielle Bereich konnte noch weiter auf die Aminosäuren 119 bis 124 eingegrenzt werden (Jaoude und Sureau, 2005). Diese Domäne enthält ein CXXC-Motiv, welches eine aktive Stelle für Protein-Disulfid-Isomerasen darstellt, die wiederum den Austausch von Disulfidbrückenbindungen katalysieren. Im Gegensatz zur Pre-S-Domäne enthält die S-Domäne inter- und intramolekulare Disulfidbrückenbindungen ausbildende Cysteine (vgl. 1.2.4). Für das Maus-Leukämie-Virus konnte gezeigt werden, dass eine CXXC-Sequenz in der rezeptorbindenden Untereinheit (SU, „receptor-binding subunit“) der Oberflächenproteine nach Rezeptorbindung aktiviert wird. Dies führt zu einer Isomerisierung der SU-Transmembranuntereinheit-Disulfidbrücken und Fusionsaktivierung innerhalb der Transmembranuntereinheit (Wallin et al., 2004, 2005). Eine vergleichbare Rolle der S-Domänen CXXC-Sequenz in der HBV-Infektion wird diskutiert.

Eine gesicherte Funktion bei der Virusaufnahme in die Wirtszelle wird der ersten, transmembranalen Sequenz der S-Domäne zugeschrieben. Sie enthält Sequenz-

Ähnlichkeiten zu Typ 1 Fusionspeptiden und vermittelt die Aggregation von phospholipidhaltigen Vesikeln sowie deren Lipidaustausch, was ihre Rolle in der Fusion von viraler und zellulärer Membran unterstützt. Für DHBV konnte gezeigt werden, dass eine Verringerung der Hydrophobizität in der ersten transmembranalen Sequenz in der S-Domäne des L-Proteins, nicht aber in der des S-Proteins die Infektion von Hepatozyten verhinderte. Darüber hinaus konnte die Sequenz im DHBV durch die des HBV ersetzt werden, ohne die Infektiosität des Virus zu beeinflussen (Chojnacki et al., 2005). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Topologie der S-Domäne im L-Protein von der des S-Proteins abweicht und möglicherweise nach Aufnahme von HBV die Fusion von viraler und zellulärer Membran vermittelt.

Als potentielle Bindungspartner für das S-Protein konnte Apolipoprotein (Apo) H dargestellt werden, welches von Hepatozyten exprimiert und ins Blut sezerniert wird (Mehdi et al., 1994). Da ApoH an Annexin 2 auf Zellmembranen bindet, könnte ApoH über die Assoziation mit HBV die Bindung des Virus an zelluläres Annexin 2 vermitteln (Gao et al., 2007; Ma et al., 2000). Neben ApoH wurde eine Bindung des S-Proteins an Annexin 5 dargestellt, welches auf der Oberfläche von Hepatozyten und Makrophagen vorkommt (Diakonova et al., 1997; Hertogs et al., 1993). Sowohl für Annexin 2 als auch Annexin 5 wird eine wichtige Rolle in Endozytosevorgängen vermutet (Burgoyne und Clague, 1994; Gruenberg und Emans, 1993). Die Bindung von HBV an ApoH und Annexin 5 wird anscheinend nicht nur über virale Oberflächenproteine, sondern auch über Phosphatidylserine der Virusmembran vermittelt (De Meyer et al., 1999; Stefas et al., 2001). So wurde für ApoH gezeigt, dass trotz einer vergleichbaren Oberflächenproteinzusammensetzung Virionen stärker ApoH binden als filamentöse SVP, was möglicherweise auf einen höheren Phosphatidylserin-Anteil in der Membran der Virionen zurückzuführen ist (Stefas et al., 2001).

1.2.6.3 Intrazellulärer Virus- und Kapsidtransport

Wie HBV nach Aufnahme in die Zelle weiter transportiert wird, ist nahezu vollständig unbekannt. In COS-7-Zellen konnte für fluoreszenzmarkierte, HBV-oberflächenproteinhaltige Partikel ein eher ungewöhnlicher Aktin-, aber nicht Mikrotubuli-abhängiger Transport dargestellt werden (Hao et al., 2011). Dies scheint im Gegensatz zu DHBV zu stehen, in dem eine Mikrotubuli-abhängige endosomale Virusmigration gezeigt wurde (Funk et al., 2004). Ungewöhnlich für endosomal

transportierte Viren, scheint hierbei eine Fusion der viralen und der zellulären Membranen unabhängig von einer Erniedrigung des pH-Wertes und vor Erreichen der späten Endosomen stattzufinden, bei der die virale DNA ins Zytosol entlassen wird (Funk et al., 2006; Kock et al., 1996). Für HBV scheint die Infektion der Hepatozyten ebenfalls unabhängig von einer Erhöhung der endosomalen Protonenkonzentration zu sein (Macovei et al., 2010).

Die Überführung des nach einer Fusion von zellulärer und viraler Membran ins Zytosol freigesetzten Nukleokapsids zum Zellkern ist für HBV ebenfalls kaum untersucht. In HuH-7-Zellen konnte ein Mikrotubuli-basierender Transport gezeigt werden (Rabe et al., 2006).

1.2.6.4 Transfer der viralen DNA in den Zellkern

Man geht heute davon aus, dass die virale DNA innerhalb intakter Kapside in das Innere des Zellkerns gelangt und dort erst entlassen wird (Rabe et al., 2003). Dies erscheint möglich, da der Kapsid-Durchmesser mit 34 nm gerade an der Grenze eines funktionellen Transportes durch die Kernporen liegt (Pante und Kann, 2002).

Im Zellkern wird die zirkuläre virale DNA kovalent geschlossen und die cccDNA („covalently closed circular DNA“) gebildet. Dieser Prozess beinhaltet die Synthese des viralen Plusstrang zur vollen Länge, die Entfernung der 5`-terminalen Strukturen (Polymerase und Cap-Struktur) sowie die kovalente Verbindung der Enden der vervollständigten viralen Plus- und Minusstränge. Dieser Vorgang wird vermutlich überwiegend von zellulären Komponenten durchgeführt (Kock und Schlicht, 1993). Die cccDNA dient als Matrize der viralen RNA.

1.2.6.5 Transkription und Expression der HBV-Proteine

Die Transkription von cccDNA-Nukleotidsequenzen wird von zwei Verstärker-Elementen („enhancer“) und vier Promotoren kontrolliert. Es gibt zwei Klassen von viralen Transkripten: Die genomische und die subgenomische Klasse (s. Abb. 1.3).

Subgenomische Transkripte dienen ausnahmslos als Boten-RNA (mRNA, „messenger RNA“) für die Translation der Oberflächenproteine (L, M und S) und des X-Proteins. Die für das L-Protein kodierende mRNA ist 2,4 Kilobasen (kb) groß und enthält das erste Startcodon des L-ORF. Sie wird von dem leberspezifischen PreS1-Promotor kontrolliert. Die für die M- und S-Proteine kodierenden mRNA haben eine ungefähre Größe von 2,1 kb und beginnen entweder kurz vor (mRNA des M-Proteins) oder nach (mRNA des S-Proteins) dem zweiten Startcodon des L-ORF. Sie

stehen unter der Kontrolle des ubiquitären PreS2/S-Promotors. Die für das X-Protein codierende mRNA ist 0,7 kb groß.

Bei den genomischen Transkripten gibt es zwei Formen: Enthält die mRNA lediglich das zweite Startcodon des Core-ORF, wird das Core-Protein sowie die Polymerase translatiert. Diese mRNA dient darüber hinaus als Matrize für die reverse Transkription des viralen DNA Negativstrangs und wird deswegen auch prägenomische DNA (pgRNA) genannt. Die zweite Form der genomischen RNA enthält das erste Startcodon des Core-ORF und dient nur für die Translation des e-Proteins.

Die für die Synthese der viralen Genom-DNA (rcDNA) notwendige reverse Transkription der pgRNA findet innerhalb der Kapside statt. Nach Enkapsidierung der pgRNA wird bei der durch die virale Polymerase durchgeführten Reaktion zunächst der virale DNA-Minusstrang und nachfolgend der Plusstrang synthetisiert (Ganem et al., 1994; Lien et al., 1986; Seeger et al., 1986).

Die rcDNA enthaltenden Nukleokapside werden entweder zellulären Sekretionstransportwegen zugefügt (s. 1.2.6.6) oder zum Zellkern transportiert, in den die rcDNA zur Auffüllung des zellulären cccDNA-Pools entlassen wird.

1.2.6.6 Sekretion der viralen Partikel

Im Falle der sphärischen SVP geht man davon aus, dass sowohl ihr Zusammenbau als auch ihre Sekretion ausnahmslos vom S-Protein vermittelt werden (Laub et al., 1983; Liu et al., 1982; Persing et al., 1985). Die S-Proteine werden als integrale Membranproteine am ER translatiert, wobei vermutlich der N- und C-Terminus im ER-Lumen liegen (Eble et al., 1986; Eble et al., 1987). Die Zusammenlagerung von Oberflächenproteine und Lipidkomponenten führen dann innerhalb des ER zur Bildung der SVP (Gerber et al., 1974; Patzer et al., 1986), die nachfolgend über den Golgi-Apparat sezerniert werden, wobei ihre Glykosylierung zu der komplexen Form modifiziert wird (Patzer et al., 1984).

Für die Bildung von Virionen werden neben den S-Proteinen auch L-Proteine benötigt (Bruss und Ganem, 1991). Im Gegensatz zu S-Proteinen werden zellulär exprimierte L-Proteine jedoch nicht sezerniert (Cheng et al., 1986). Dies deutet darauf hin, dass die Sekretion der Virionen von den S-Proteinen vermittelt wird. Für das L-Protein wird jedoch eine entscheidende Rolle bei der Membranhüllung der Nukleokapside vermutet. Bei diesem Vorgang könnte die im ER überwiegend zytosolisch lokalisierte PreS-Domäne (Ostapchuk et al., 1994) mit den gereiften

DNA-haltigen Nukleokapsiden interagieren und die Virusmembrananlagerung vermitteln (Bruss, 1997; Bruss et al., 1994). Unterstützt wird diese Theorie durch die Beobachtung, dass bei L-Proteinmutanten mit im ER luminal orientierter PreS-Domäne zwar L-Protein-haltige SVP, jedoch keine Virionen sezerniert wurden (Bruss und Vieluf, 1995). Nach Kapsidinteraktion der PreS-Domäne und Virusbildung wird im weiteren Verlauf der Virusprozessierung wahrscheinlich ungefähr die Hälfte der an das Kapsid gebundenen PreS-Domänen auf die Oberseite der Partikel transloziert (Bruss et al., 1994), wo sie nach deren Sekretion für die Virus-Rezeptor-Interaktion(en) zur Verfügung stehen (vgl. 1.2.6.2).

Das M-Protein ist bei der Bildung und Sekretion der Virionen entbehrlich (Santantonio et al., 1992).

1.3 Lipoproteinstoffwechsel

1.3.1 Lipide und Lipoproteine

Lipide erfüllen im menschlichen Organismus verschiedene lebenswichtige Funktionen. Sie bilden die Lipiddoppelschicht zellulärer Membranen, dienen als Ausgangsstoffe für die Herstellung vieler Hormone und Vitamine, sind Bestandteil der Gallensäuren und stellen mit den TG die konzentrierteste Speicherform von Energie dar: Im Vergleich zu Glukose oder Proteinen besitzen TG ungefähr den doppelten physiologischen Brennwert und binden zudem aufgrund ihrer Lipophilie bei ihrer Speicherung wesentlich weniger Wasser (Klinke und Silbernagl, 2003).

Aufgrund ihres hydrophoben Charakters sind Lipide in polaren Lösungsmitteln wie Wasser weitgehend unlöslich. Um im Blut transportiert werden zu können, bilden sie mit Apolipoproteinen wasserlösliche Lipid-Protein-Komplexe, die als Lipoproteine bezeichnet werden und chemisch Mizellen darstellen. Freie Fettsäuren werden auch an Serum-Albumin gebunden transportiert. In der Hülle der kugelförmigen Lipoproteine bewirken die Apolipoproteine mit ihren hydrophilen und hydrophoben Kettenabschnitten zusammen mit amphiphilen Phospholipiden und unveresterten Cholesterolen die Emulsion der im Inneren der Lipoproteine eingelagerten, apolaren neutralen Lipide (TG und CE) (Klinke und Silbernagl, 2003). Apolipoproteine vermitteln zudem die Bindung der Lipoproteine an Lipoproteinrezeptoren und haben weitere Funktionen im Lipidstoffwechsel (s.u.). Mindestens 15 unterschiedliche Apolipoproteine wurden bis heute beschrieben. Sie besitzen ein Molekulargewicht

von 6,5 kDa bis ungefähr 1000 kDa und werden überwiegend in der Leber und dem Darm gebildet (s. Tab. 1).

Lipoproteine werden gemäß ihrer unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften wie Durchmesser, Dichte und elektrophoretische Mobilität unterschieden. Eine Auftrennung der Lipoproteine mittels Dichtegradientenzentrifugation ermöglicht ihre Unterteilung in fünf Hauptklassen: 1. Chylomikronen, 2. Lipoproteine sehr niedriger Dichte (VLDL, „very low density lipoproteins“), 3. Lipoproteine mittlerer Dichte (IDL, „intermediate density lipoproteins“), auch als VLDL-Remnants bezeichnet (vgl. 1.3.2.2), 4. Lipoproteine niedriger Dichte (LDL, „low density lipoproteins“) und 5. Lipoproteine hoher Dichte (HDL, „high density lipoproteins“) (s. Tab. 1). Die geringste Dichte unter den Lipoproteinen haben die Chylomikronen, was durch ihren größten Anteil an Lipiden im Verhältnis zu Apolipoproteinen begründet ist. Da sowohl Chylomikronen als auch VLDL im Gegensatz zu Lipoproteinen höherer Dichte TG-reich sind, werden sie auch unter der Bezeichnung TRL zusammengefasst.

Tabelle 1: Eigenschaften und Zusammensetzung der humanen Plasmalipoproteine

Lipoproteine werden gemäß ihrer Dichte gewöhnlich in 5 Klassen eingeteilt: Chylomikronen (CM), Lipoproteine sehr niedriger Dichte (VLDL), Lipoproteine mittlerer Dichte (IDL), Lipoproteine niedriger Dichte (LDL) und Lipoproteine hoher Dichte (HDL). Neben unterschiedlicher Dichte besitzen sie auch verschiedene Apolipoprotein- und Lipidanteile (TG: Triacylglyceride; C: freie Cholesterole; CE: Cholesterolester; PL: Phospholipide; P: Protein; %: prozentualer Masseanteil an der Partikelgesamtmasse). (Modifiziert nach: (Klinke und Silbernagl, 2003; Mahley et al., 1984)).

	Dichte [g/ml]	Durchmesser [nm]	Apo- lipoproteine	TG [%]	C [%]	CE [%]	PL [%]	P [%]
CM	< 0,96	100-500	B48, AI/IV, CI-III, E	84-89	1-3	3-5	7-9	≤2,5
VLDL	0,96-1,006	30-90	B100, E, CI-III	50-65	5-10	10-15	15-20	5-10
IDL	1,006- 1,019	25-50	B100, E, CI-III	30	8	22	22	15-20
LDL	1,019- 1,063	18-28	B100	7-10	7-10	35-40	15-20	20-25
HDL	1,063- 1,210	8-12	AI/II/IV, E	3-5	3-4	12	22	40-55

1.3.2 Stoffwechselwege der Lipoproteine

Im menschlichen Organismus unterscheidet man drei Stoffwechselwege der Lipoproteine: Den exogenen und den endogenen Weg, sowie den reversen Cholesteroltransport (s. Abb. 1.4).

1.3.2.1 Exogener Stoffwechselweg

Über den exogenen Weg werden Lipide (insbesondere TG) transportiert, die über die Nahrung aufgenommen werden (s. Abb. 1.4). Die TG werden zunächst durch die Magenlipase, hauptsächlich jedoch im Duodenum durch die Pankreaslipase, in Mono- und Diacylglyceride, freie Fettsäuren und Glycerin aufgespalten. Diese Lipidbestandteile werden, da sie eine nur geringe Wasserlöslichkeit besitzen, mit amphiphilen Gallensäuremolekülen zu Mizellen komplexiert, aus denen von den Mukosazellen des Darms die Lipide aufgenommen und zu TG resynthetisiert werden, während die Gallensäure wieder über den enterohepatischen Kreislauf in die Leber gelangt. Zudem werden in den Enterozyten resorbierte freie Cholesterole durch die Acyl-Coenzym A-Cholesterol-Acyltransferase verestert. Dann werden aus TG, CE, Phospholipiden sowie ApoB-48 und -A1 Chylomikronen gebildet, die in das intestinale Lymphsystem exozytiert und über den Ductus thoracicus dem venösen Blutkreislauf zugeführt werden. Hier nehmen sie u.a. ApoCII aus HDL auf (Klinke und Silbernagl, 2003). Die aus dem Kapillarbett an die Chylomikronen gebundene Lipoproteinlipase (LPL) wird durch ApoCII aktiviert und es kommt zur Freisetzung von Monoacylglyceriden und freien Fettsäuren, die von Muskel- und Fettgewebe aufgenommen werden, und dadurch zur Abnahme des Lipoprotein TG-Gehaltes (Heeren et al., 2002; Patsch, 1987). Während dieses Prozesses tauschen die Chylomikronen mit den HDL ApoAI gegen ApoE aus (Vigne und Havel, 1981). Die nun TG-armen und CE bzw. ApoE reichen Chylomikronen werden als Chylomikronenremnants bezeichnet, die aufgrund des erhöhten ApoE-Gehaltes zusammen mit der gebundenen LPL eine verstärkte Affinität zu Heparansulfaten und dem LDL-Rezeptor verwandten Protein 1 (LRP1, „LDL-receptor related protein 1“, auch als Alpha2-Makroglobulinrezeptor (a2MR) oder CD91 bezeichnet) besitzen. Nach initialer Bindung an die Glykosaminoglykane im Lebersinus werden die Chylomikronenremnants schließlich über LRP1 (und wahrscheinlich auch über den LDL-Rezeptor) in die Hepatozyten aufgenommen (Beisiegel et al., 1989; Heeren et al., 2002; Mahley und Ji, 1999; Rohlmann et al., 1998; Verges et al., 2004). Neuere Untersuchungen zeigen, dass bestimmte Subgruppen von Heparansulfaten, sog. Syndekane, nach Bindung der Remnants direkt deren Endozytose vermitteln können (Stanford et al., 2009; Wilsie et al., 2006).

1.3.2.2 Endogener Stoffwechselweg

Im Falle mangelnder Nahrungszufuhr wird das periphere Gewebe über den endogenen Lipoproteinstoffwechsel mit TG und Cholesterol versorgt (s. Abb. 1.4). Hierbei werden in den Hepatozyten VLDL synthetisiert, die TG, Cholesterol und Phospholipide sowie ApoB-100 und geringe Mengen an ApoE und -C enthalten. VLDL gelangen durch die Fenster des Sinusendothels in die Blutbahn, wo sie aus HDL mit weiterem ApoE und -C angereichert werden und im Austausch gegen freie Cholesterole Phospholipide an HDL abgeben. Die LPL hydrolysiert die TG und bewirkt die Abgabe von Monoacylglyceriden und freien Fettsäuren (Merkel et al., 2002), wobei (unter Rückgabe eines Großteils der ApoC und der freien Cholesterole an HDL) die VLDL-Remnants (gewöhnlich als IDL bezeichnet, vgl. 1.3.1) entstehen, die reich an ApoE und CE sind (Pagnan et al., 1977). Im Gegensatz zu den Chylomikronen binden die VLDL wahrscheinlich keine (oder nur im sehr geringen Maße) LPL aus dem Kapillarbett, welche somit auch keine Rezeptorbindung der VLDL-Remnants vermittelt (Heeren et al., 2002; Xiang et al., 1999). Diese binden über ApoB-100 und ApoE an Heparansulfate im Lebersinus und anschließend an den LDL-Rezeptor der Leberzellen, über den sie dann (und im Gegensatz zu Chylomikronenremnants vermutlich nicht LRP1-vermittelt) in diese aufgenommen werden (Ishibashi et al., 1994; Mahley und Ji, 1999; Veniant et al., 1998). Darüber hinaus werden auch (wie bei den Chylomikronenremnants) Syndekane für die direkte Vermittlung einer Endozytose diskutiert (Stanford et al., 2009; Wilsie et al., 2006). Alternativ zur Aufnahme der VLDL-Remnants in die Zelle können diese weiter zu LDL umgewandelt werden. Dabei wird das ApoE der Lipoproteine abgegeben und CE, vermittelt durch das Cholesterol-Transferprotein (CETP), von HDL aufgenommen. Die LDL besitzen nun lediglich ApoB-100 als Apolipoprotein und versorgen vor allem (über Bindung an den LDL-Rezeptor) periphere Zellen des Organismus mit Cholesterol oder werden wieder von der Leber aufgenommen (Klinke und Silbernagl, 2003).

Wird ab einer LDL-Konzentration von ungefähr 200 mg/dl die LDL-Rezeptorsättigungskonzentration überschritten, werden die LDL aufgrund ihrer längeren Verweilzeit im Blutkreislauf durch Oxidation chemisch verändert. Das so entstandene oxidierte LDL wird von sog. Scavengerrezeptoren erkannt und in die Zelle aufgenommen. Im Gegensatz zu den LDL-Rezeptoren ist die Expression der Scavengerrezeptoren unabhängig von dem Cholesterolgehalt der Zelle. Da

Scavengerrezeptoren insbesondere auf Makrophagen vorkommen, führt dies zu einer vermehrten Lipideinlagerung in diesen Zellen. Dabei wird überschüssiges Cholesterol als CE in „lipid droplets“ gespeichert, was zu ihrem charakteristischen Aussehen als Schaumzellen führt. Subintimale Schaumzellen in Gefäßwänden von Arterien spielen bei der Entstehung der Arteriosklerose eine bedeutende Rolle (Goldstein et al., 1979; Steinberg, 1997). Neuere Untersuchungen zeigen, dass bei Hypertriglyzeridämie auch VLDL von Makrophagen aufgenommen werden und zur Schaumzellbildung beitragen (Gianturco et al., 1982; Nakajima et al., 2011).

1.3.2.3 Reverser Cholesteroltransport

Obwohl nahezu jede Zelle Cholesterol synthetisieren kann, ist die Leber das einzige Organ, das Cholesterol im größeren Maße ausscheiden kann. Demnach muss Cholesterol, welches überschüssig in extrahepatischen Zellen anfällt, zur Leber transportiert werden. Dieser Prozess wird als reverser Cholesteroltransport bezeichnet. Er wird insbesondere von Makrophagen, die vermehrt Cholesterol in der Peripherie anhäufen (vgl. 1.3.2.2), betrieben und, auf diesen Zelltyp bezogen, Makrophagen reverser Cholesteroltransport genannt. In der Leber wird das Cholesterol, in nicht veresterter freier Form oder konjugiert als Gallensäure, über die Gallengänge in den Darm sezerniert, wo es entweder über den enterohepatischen Kreislauf recycelt oder ausgeschieden wird (Brewer, 2004; Ikonen, 2008).

Der reverse Cholesteroltransport lässt sich in zwei Schritte unterteilen:

1. Zellulärer Efflux von Cholesterol

Im ersten Schritt werden freie Cholesterole aus nicht-hepatischen Zellen auf extrazelluläre Cholesterolakzeptoren übertragen, die anschließend das Cholesterol zur Leber transportieren. Dies kann über einen passiven, diffusionsgetriebenen oder einen aktiven Prozess ablaufen. Ersterer findet in allen Zellen statt, wobei freie Cholesterole aus der Plasmamembran auf lipidreiche Lipoproteine und Albumin übertragen werden. Der Transport ist ATP-unabhängig und wird durch einen Konzentrationsunterschied an freien Cholesterolen angetrieben, welcher durch die extrazelluläre Veresterung der Cholesterole in Lipoproteinen mittels der Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase (LCAT) aufrechterhalten wird (Johnson et al., 1991; Yancey et al., 2003). Da der größte Teil der freien Cholesterole auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran-Doppelschicht konzentriert ist, können nur die wenigen, auf

der extrazellulären Seite der Membran konzentrierten Cholesterole diffundieren. *In vivo* ist der passive Cholesterolefflux sehr ineffizient und trägt nur im geringen Maße zur Reduktion des zellulären Cholesterolgehaltes bei.

Im Gegensatz zum passiven Cholesteroltransport wird der aktive Cholesterolefflux durch die Hydrolyse von ATP angetrieben und findet extrahepatisch insbesondere in Makrophagen statt (Klucken et al., 2000; Lawn et al., 2001). Es gibt hierbei verschiedene Cholesterol-Transportmechanismen, die sich in Lipidakzeptoren und Transporterproteinen unterscheiden. Eine Reihe von ATP-bindenden Kassetten (ABC, „ATP-binding cassette“)-Transmembrantransporter sind dabei von Bedeutung: ABCA1 vermittelt den Transfer von Phospholipiden und freien Cholesterolen zu einer, aufgrund ihrer elektrophoretischen Migration in der prä β -Bande als prä β -HDL bezeichnete, Cholesterol- und CE-armen Subfraktion der HDL, sowie zu lipidarmen/freien Apolipoproteinen wie ApoA1, ApoE und ApoIV. Demgegenüber übertragen ABCG1 und ABCG4 freie Cholesterole an prä β -HDL und große, phospholipidreiche HDL. Der Scavengerrezeptor B1 (SR-B1) vermittelt die Lipidierung vorzugsweise großer, phospholipidreicher HDL (Wang und Tall, 2003; Yancey et al., 2003). Dysfunktionen im Cholesterolefflux führen in Makrophagen zur intrazellulären Lipidanhäufung und Schaumzellenbildung (Klucken et al., 2000; Lawn et al., 2001; Tall et al., 2002) (vgl. 1.3.2.2). Auf den Lipidakzeptoren werden die meisten freien Cholesterole, vermittelt durch die LCAT, zu CE verestert.

Der molekulare Mechanismus der Lipidübertragung auf die Lipidakzeptoren ist bis heute nur unvollständig verstanden. Die meisten zellulären freien Cholesterole befinden sich (unter physiologischen Bedingungen) in der Plasmamembran. Diese werden entweder durch neu synthetisierte, freie Cholesterole aus dem ER, intrazellulären Speichern wie „lipid droplets“, oder dem endosomalen System nach Endozytose und Metabolisierung von cholesterolhaltigen Lipoproteinen (s. 1.3.3) nachgeliefert. Ob die Lipidübertragung auf extrazelluläre Akzeptoren nur an der Plasmamembran (Oram et al., 1987; Vaughan und Oram, 2005) oder auch intrazellulär mit folgender Retroendozytose der Lipidakzeptoren stattfindet (Azuma et al., 2009; Pagler et al., 2006; Schmitz et al., 1985), ist Gegenstand aktueller Forschung.

2. Aufnahme von Cholesterol in die Hepatozyten

Die in der Peripherie lipidierten HDL transportieren das CE zurück zur Leber, wo es in die Hepatozyten aufgenommen wird. Ein Teil der HDL-CE werden vorher über die CETP an LDL abgegeben, welche wiederum über den hepatozellulären LDL-Rezeptor endozytiert werden können (s.o.). Während beim zweiten Prozess die Lipoprotein-CE indirekt über die Endozytose des LDL aufgenommen und nach dessen intrazellulären Metabolisierung durch die saure Lipase als freie Cholesterole endosomal prozessiert werden (vgl. 1.3.3), werden beim HDL die HDL-CE ohne eigene Internalisierung des Lipoproteins direkt aus dem Lipoprotein in die Zelle übertragen und intrazellulär unabhängig von der sauren Lipase hydrolysiert (Glass et al., 1983; Pittman et al., 1987; Rinninger et al., 1994). Die isolierte Aufnahme der CE aus den HDL wird selektive Lipidaufnahme genannt.

Der erste Schritt der selektiven Lipidaufnahme ist der Lipidtransfer in die Hepatozyten-Plasmamembran. Im Mausmodell wird dieser Transfer einzig durch SR-B1 vermittelt (Out et al., 2004). Ob SR-B1 auch im Menschen eine Hauptrolle bei diesem Prozess übernimmt, ist unklar. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass der humane SR-B1 effizient nicht nur die direkte Aufnahme von CE, sondern beider neutralen Lipoproteinlipide, CE und TG, sowie deren hydrophoben Hydrolyseprodukte (z.B. freie Cholesterole), bewirkt (Thuahnai et al., 2001). Neben HDL konnte die selektive Lipidaufnahme über SR-B1 auch aus LDL dargestellt werden (Stangl et al., 1998; Swarnakar et al., 1999). Der genaue Mechanismus, wie SR-B1 den Lipidtransfer in die Plasmamembran vermittelt, ist noch nicht genau verstanden. Im Falle von HDL geht man von einem zweistufigen Prozess aus. Dabei bindet HDL zunächst hochaffin an die extrazelluläre Domäne von SR-B1, bevor nachfolgend die Lipide in die Plasmamembran übertragen werden (Connelly et al., 1999; Gu et al., 1998). Für den letzteren Vorgang wird angenommen, dass SR-B1 einen unpolaren Kanal zwischen dem gebundenen HDL-Partikel und der Membran ausbildet, durch den hydrophobe Moleküle wie CE aus dem Lipoprotein diffundieren. Angetrieben wird dieser Mechanismus durch einen CE-Konzentrationsunterschied zwischen Plasmamembran und HDL (Rodrigueza et al., 1999).

Entgegen älterer Annahmen weisen neuere Ergebnisse darauf hin, dass die selektive Lipidaufnahme von HDL in zelluläre Membranen nicht nur an der Zelloberfläche in die Plasmamembran, sondern auch während der Retroendozytose des Lipoproteins innerhalb von Endosomen in die endosomalen Membranen stattfindet (Silver et al., 2000; Silver et al., 2001).

Den zweiten Schritt der selektiven Lipidaufnahme nach der Übertragung der Lipide in die zellulären Membranen stellt der weitere Lipidtransport ins Zellinnere dar. Dieser ist, wie auch der Transfer von HDL-Lipiden in die Plasmamembran, nicht auf CE beschränkt, sondern findet effizient auch für andere neutrale Lipide und freie Cholesterole statt (Pittman et al., 1987; Wustner et al., 2004). Vermittelt wird dieser Transport über einen clathrinunabhängigen, möglicherweise vesikulären und/oder nicht-vesikulären Mechanismus, über den die Lipide direkt zu dem ER/Golgi-Apparat oder den „lipid droplets“ befördert werden (Frolov et al., 2000; Pittman et al., 1987; Reaven et al., 1996; Schroeder et al., 2001). Dieser Prozess ist bis heute nur sehr wenig verstanden. In SR-B1-exprimierenden CHO-Zellen konnte für CE gezeigt werden, dass der Lipidtransport von einem Caveolin-1/Annexin II/Cyclophilin A/Cyclophilin 40-Komplex aus Caveolae vermittelt wird (Uittenbogaard et al., 2002). Über diesen Komplex werden auch freie Cholesterole in die Zelle aufgenommen (Smart et al., 2004). In Hepatozyten von Caveolin-1-knockout Mäusen konnte jedoch keine reduzierte und in Caveolin-1 überexprimierenden Hepatozyten nur eine leicht erhöhte direkte Sterolaufnahme beobachtet werden, was auf weitere bzw. andere Lipid-Aufnahmetransportwege hindeutet (Harder et al., 2006). Dem Sterol-Carrier-Protein-2 (SCP-2), welches besonders in der Leber stark exprimiert wird, wird ebenfalls eine Funktion bei der zellulären Sterolaufnahme aus der Plasmamembran zugesprochen. SCP-2 bindet Cholesterol und Überexpression in Zellen zeigte eine wahrscheinliche Beteiligung am Cholesteroltransport von der Zellmembran zu intrazellulären Strukturen (Moncecchi et al., 1996).

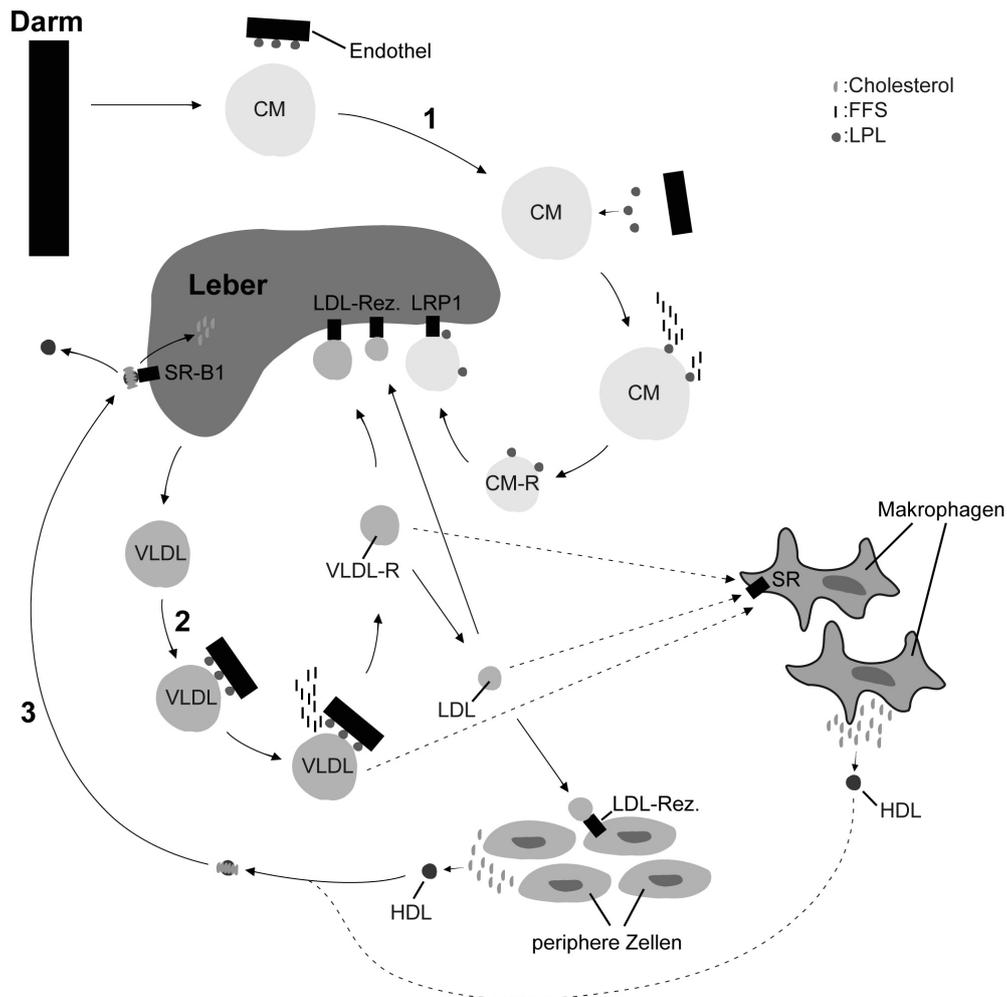


Abbildung 1.4: Lipoprotein-Stoffwechsel

Die mit (1) bezeichnete Pfeilfolge zeigt den exogenen Lipoproteintransport: TG-reiche Chylomikronen (CM) werden im Darm gebildet. Im Blut lagern sich endothelständige Lipoproteinlipasen (LPL) an die CM an und spalten deren TG, wobei freie Fettsäuren (FFS) ins Blut entlassen werden. Die so gebildeten Chylomikronenremnants werden über LRP1 in die Leberzellen aufgenommen. Die mit (2) markierte Pfeilfolge stellt den endogenen Lipoproteintransport dar: VLDL werden in den Hepatozyten gebildet und ins Blut sezerniert. Im Blut werden am Gefäßendothel durch die LPL Triacylglyceride der VLDL gespalten und FFS ins Blut entlassen. Die so gebildeten VLDL-Remnants werden entweder über den LDL-Rezeptor in die Leberzellen aufgenommen oder weiter zu LDL umgebaut, die Cholesterin in die peripheren Blutzellen oder zurück zur Leber befördern. Die mit (3) bezeichnete Pfeilfolge zeigt den reversen Cholesteroltransport: Aus peripheren Zellen werden freie Cholesterole auf HDL übertragen, welche zurück zur Leber transportiert werden. Über SR-B1 wird die selektive Cholesterolaufnahme in die Hepatozyten vermittelt. Die gestrichelten Pfeile verdeutlichen den Transportweg der unter hyperlipidämischen Bedingungen chemisch modifizierten Lipoproteine. SR: Scavengerrezeptor

1.3.3 Metabolisierung endozytierter Lipoproteine und intrazellulärer Transport der von ihnen stammenden Lipide

Wie in Kapitel 1.3.2 dargestellt, werden die Lipoproteine im Blut von verschiedenen Zellen dem Blutkreislauf entzogen. Im folgenden soll erläutert werden, wie die Lipoproteine nach zellulärer Aufnahme metabolisiert und die von ihnen stammenden Lipide intrazellulär transportiert werden. Hierzu wird auf die neutralen Lipide,

insbesondere die CE, eingegangen, welche wichtige Kargos der Lipoproteine darstellen und in der Zelle einem komplexen Recyclingweg folgen, der die aus den Lipoproteinen stammenden Cholesterole dem hepatozytenspezifischen reversen Cholesteroltransport zuführt (vgl. 1.3.2.3).

1.3.3.1 LDL

Die intrazelluläre Verstoffwechslung von Lipoproteinen ist auf molekularer Ebene noch in weiten Teilen unverstanden. Für die CE-reichen LDL wird folgender Mechanismus angenommen (s. Abb. 1.5): Die Lipoproteine binden an der Zelloberfläche an den LDL-Rezeptor und werden über sog. „clathrin-coated pits“ aufgenommen, wobei anschließend die Vesikel ihre Clathrin-Hülle abgeben und mit dem frühen Endosom fusionieren (Ikonen, 2008). LDL wird von dem Rezeptor abgelöst und über das späte Endosom in das Lysosom transportiert. Jedoch erreichen nicht alle Lipoproteinbestandteile das Lysosom. CE werden von der sauren Lipase, beginnend in früheren endosomalen Kompartimenten, hydrolysiert und die entstandenen freien Cholesterole (wie auch die in Lipoproteinen bereits vorhandenen freien Cholesterole) im Gegensatz zu ApoB über nur wenig verstandene Mechanismen dem endosomalen System entzogen (Brown und Goldstein, 1986; Goldstein et al., 1975; Sugii et al., 2003). Die Hydrolyse des CE ist für den weiteren Transport aus dem Endosom dabei obligatorisch, da die Dysfunktion der sauren Lipase zur endosomalen Anhäufung von CE führt (Goldstein et al., 1975). Die freien Cholesterole werden weiter zur Plasmamembran oder dem endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert (Liscum und Munn, 1999). In der Plasmamembran können die freien Cholesterole auf exogene Cholesterolakzeptoren übertragen (vgl. 1.3.2.3), oder auch von hier weiter zum ER transportiert werden (Liscum und Munn, 1999; Neufeld et al., 1996). Im ER werden die freie Cholesterole von der Acyl-Coenzym A-Cholesterol-Acyltransferase verestert und anschließend in „lipid droplets“ gespeichert (Liscum und Munn, 1999).

Ein besseres Verständnis, wie die freien Cholesterole aus den Endosomen transportiert werden, konnte durch Untersuchungen von Mutationen in Niemann-Pick Typ C (NPC) Proteinen, wie sie bei der neurodegenerativen NPC-Krankheit vorkommen, erreicht werden. Bei dieser, zu den lysosomalen Speicherkrankheiten zählenden Erkrankung, führen Mutationen in den Proteinen NPC1 und dem NPC2 zu einer zellulären Anhäufung von freien Cholesterolen, wobei in 95% der Fälle NPC1, und in 5% der Fälle NPC2 Veränderungen aufweisen (Wraith et al., 2009).

NPC1 ist ein 1278 Aminosäuren großes, integrales Transmembranprotein mit 13 potentiellen Transmembrandomänen, welches primär in späten Endosomen und in geringem Maße auch in Lysosomen und dem Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert ist (Davies und Ioannou, 2000; Higgins et al., 1999). NPC2 ist ein 131 Aminosäure großes, lösliches Protein (Naurecki et al., 2000). Der Funktionsverlust eines dieser beiden Proteine führt zu einer Anhäufung von freien Cholesterolen, aber auch Sphingosinen und Gangliosiden, in späten Endosomen und Lysosomen (Karten et al., 2009). Untersuchungen an Fibroblasten von NPC1-Patienten zeigten, dass die Ursache hierfür ein dysfunktionaler Transport der aus LDL stammenden freien Cholesterole aus endosomalen Kompartimenten zum ER bzw. zur Plasmamembran ist, während LDL vergleichbar zu gesunden Zellen endozytiert und hydrolysiert wird (Pentchev et al., 1985). Neuere Untersuchungen ergaben, dass die Expression von NPC1 in Fibroblasten von NPC1-Patienten eine Anhäufung von freien Cholesterolen in späten Endosomen/Lysosomen verhindert (Carstea et al., 1997). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die von aufgenommenen Lipoproteinen stammenden freien Cholesterole aus späten Endosomen über einen NPC1-abhängigen Transport aus dem endosomalen System entfernt werden. Neuere Untersuchungen unterstützen diese Theorie, wobei der Cholesteroltransport wahrscheinlich über NPC1-haltige Vesikel erfolgt, die sich von NPC1-positiven, freie Cholesterole akkumulierenden endosomalen Strukturen abspalten und über den Golgi-Komplex weitertransportiert werden (Ko et al., 2001; Urano et al., 2008).

Wie NPC1 und NPC2 mit Cholesterol interagieren, ist noch nicht genau verstanden. Bindungsstudien und Kristallstrukturanalysen ergaben, dass NPC2 Cholesterol in einer hydrophoben Tasche bindet, wobei der hydrophile Teil des Cholesterols (OH-Gruppe) zum Lösungsmittel exponiert bleibt (Infante et al., 2008a). Für NPC1 konnte eine umgekehrte Ausrichtung des gebundenen Cholesterols gezeigt werden (Kwon et al., 2009). Diese Tatsache führte zu dem Modell, dass NPC2 durch Hydrolyse der Lipoprotein-CE freigesetzte, freie Cholesterole im Endosom bindet und an NPC1 weitergibt. Unterstützt wird diese Theorie durch die Beobachtung, dass NPC2 den Cholesteroltransfer von NPC1 auf Akzeptorliposomen stark erhöht (Infante et al., 2008b). Alternativ wird auch das umgekehrte Szenario diskutiert, bei dem endosomales Cholesterol initial von NPC1 gebunden und nachfolgend auf NPC2 übertragen wird.

In vitro kann in NPC1/2-exprimierenden Zellen der NPC-Phänotyp durch Zusatz von

Steroiden wie Progesteron, oder von hydrophoben Aminen (Klasse II Amphiphile) wie U18666a, zum Zellkulturmedium erzeugt werden. Dabei inhibiert U18666a den Transport NPC1-haltiger Vesikel von perinukleären Kompartimenten in die Peripherie, was (vergleichbar mit NPC1-defizienten Zellen) zu einem Rückhalt von freien Cholesterolen in perinukleären Organellen führt (Ko et al., 2001; Liscum und Faust, 1989). Der zugrunde liegende Mechanismus ist nicht bekannt. Für U18666a ist zwar eine Membranbindestelle beschrieben, aber nicht genauer charakterisiert worden (Underwood et al., 1996).

Neben einem NPC1/2-abhängigen Cholesteroltransport über spätere Endosomen gibt es auch Hinweise darauf, dass Teile der freien LDL-Cholesterole bereits aus dem frühen Endosom über einen NPC1/2-unabhängigen Mechanismus und recycling Endosomen zur Plasmamembran transportiert werden (s. Abb. 1.5) (Holttä-Vuori et al., 2002).

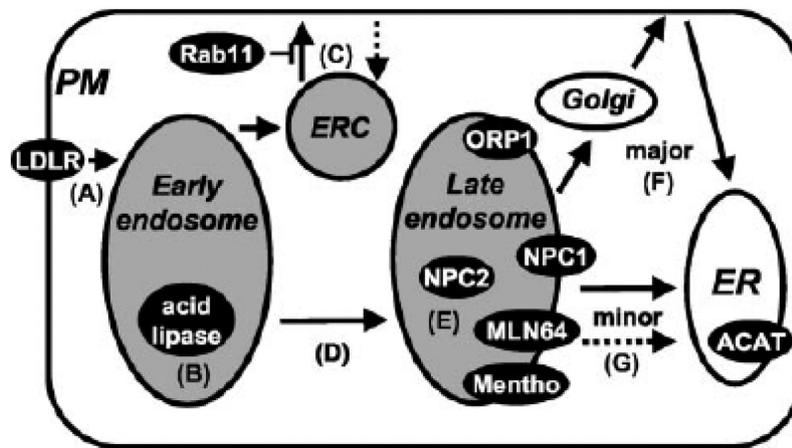


Abbildung 1.5: Intrazellulärer Transport der aus LDL stammenden freien Cholesterole

Nach Aufnahme der LDL über den LDL-Rezeptor werden die CE der Lipoproteine in endosomalen Kompartimenten von der sauren Lipase hydrolysiert und freie Cholesterole über einen NPC1-abhängigen Mechanismus aus späten Endosomen entweder erst zur Plasmamembran und anschließend oder direkt zum ER transportiert. Hier werden die freien Cholesterole von der Acyl-Coenzym A-Cholesterol-Acyltransferase (ACAT) zu CE verestert. Geringe Mengen freier Cholesterole gelangen auch aus frühen endosomalen Kompartimenten über recycling Endosomen zur Plasmamembran. Durchgehende Pfeile zeigen vesikuläre, gestrichelte Pfeile nicht-vesikuläre Transportwege an. (Modifiziert nach: (Soccio und Breslow, 2004)).

1.3.3.2 TRL

Im Gegensatz zu LDL besitzen TRL neben Cholesterol hohe Mengen an TG sowie die Apolipoproteine E und C und (im Falle der Chylomikronen) die LPL. Abgesehen vom ApoB-100 bzw. -48 wird der überwiegende Proteinanteil der TRL nach

Aufnahme der Lipoproteine in Zellen wie Hepatozyten, Fibroblasten und Makrophagen nicht wie das ApoB100 der LDL lysosomal degradiert, sondern recycelt (Hasty et al., 2005; Heeren et al., 2001; Heeren et al., 1999).

ApoE scheint bei dem intrazellulären Transport der TRL eine wichtige Rolle zu spielen. Enthalten TRL die Isoform ApoE2, die zu einer deutlich geringeren Bindung der Lipoproteine an TRL-Rezeptoren führt als die meist vorzufindende ApoE3-Isoform (Mahley et al., 1999; Schneider et al., 1981), zeigten TRL in peripheren Makrophagen einen den LDL vergleichbaren endosomalen Transport (Tabas et al., 1990). Im Gegensatz dazu zeigten ApoE3-enhaltende TRL eine nach zellulärer Aufnahme anfangs deutlich stärkere Akkumulierung in peripheren Vesikeln. Da zudem eine wesentlich stärkere Aktivierung der Acyl-Coenzym A-Cholesterol-Acyltransferase beobachtet wurde als bei ApoE2-haltigen TRL oder bei LDL (Tabas et al., 1990), und auch die TRL-stammenden, freien Cholesterole vermehrt in peripheren, ApoE-positiven Vesikeln akkumulieren (Heeren et al., 2003), ist es möglich, dass der intrazelluläre Cholesteroltransport ApoE3-haltiger Lipoproteine sich teilweise von dem Transport der LDL-stammenden freien Cholesterole unterscheidet und nach verstärkter Hydrolyse der Lipoprotein-CE in peripheren Vesikeln in geringerem Maße über perinukleäre Kompartimente wie späten Endosomen verläuft (s. Abb. 1.5) (Holttä-Vuori et al., 2002). Charakteristisch für die ApoE- und freie Cholesterole enthaltenden Vesikeln ist der Transport der ApoA1 endozytierter HDL in diese und der durch HDL verstärkte Efflux von ApoE und freien Cholesterolen aus diesen Kompartimenten (Hasty et al., 2005; Heeren et al., 2003).

Die intrazelluläre Metabolisierung der zum großen Teil in den TRL enthaltenden TG ist bis heute nur sehr wenig untersucht worden. Vergleichbar zu den Lipoprotein-CE werden die TRL-TG von der sauren Lipase endosomal hydrolysiert und freie Fettsäuren zellulär reseziert, wobei eine Dysfunktion der sauren Lipase zur endosomalen Akkumulierung von TG führt (Salvayre et al., 1989; van Dijk et al., 1992). Da sich freie Fettsäuren, analog zu den freien Cholesterolen, aufgrund ihrer Amphiphilie leicht in Doppelmembranen einlagern, ist es denkbar, dass sie intrazellulär dem Transport der freien Cholesterole aus dem endosomalen System folgen (Hornick et al., 1997). Diese Hypothese ist vereinbar mit der Beobachtung, dass es bei cholesterol- und fettreicher Ernährung von ABCG1-knock out Mäusen in Hepatozyten und Kupffer-Zellen sowohl zur Akkumulierung von CE als auch von TG kommt (Kennedy et al., 2005).

In Endosomen von Leberzellen sind neben der sauren Lipase mehrere neutrale Lipasen nachgewiesen worden, die ebenfalls TG aufgenommener Lipoproteine hydrolysieren (Hornick et al., 1992).

1.4 Stoffaustausch zwischen Zellen

1.4.1 Transport über den extrazellulären Raum

Einen gut charakterisierten Mechanismus des interzellulären Informationsaustausches stellt der Transport von Stoffen über den extrazellulären Raum dar. Hierbei wird der Kargo aus der Donorzelle exozytiert, mittels eines strömungs- und/oder diffusionsgetriebenen Prozesses durch den interzellulären Raum transportiert und schließlich rezeptorvermittelt von der Akzeptorzelle gebunden (Sherer und Mothes, 2008). Dieser Vorgang ist z.B. für Insulin beschrieben, bei der von den B-Zellen im Pankreas Insulin sezerniert und dieses in der Peripherie von den Insulinrezeptoren der Zielzellen gebunden wird. Auch für Zytokine findet man einen interzellulären Austausch über den extrazellulären Raum. Darüber hinaus spielt dieser Mechanismus in neuronalen Systemen eine wichtige Rolle, in denen über den synaptischen Spalt Informationen rezeptorvermittelt an angrenzende Nervenzellen weitergeleitet werden.

1.4.2 Direkter interzellulärer Transport über tubuläre Zell-Zell-Verbindungen

Im Gegensatz zu dem extrazellulären Transportweg können über tubuläre Verbindungen der Zytoplasmata von Donor- und Akzeptorzelle zytosolische Moleküle direkt interzellulär ausgetauscht werden. Dies ermöglicht einen sehr effizienten Stoff-Austausch, da der gerichtete Transport in die Zielzelle zum einen unabhängig von einem wenig gerichteten Transport über einen extrazellulären Raum ist und zum anderen keine Ligandenerkennung durch Rezeptoren der Akzeptorzelle benötigt. Bis heute stellen „gap junctions“ und „tunneling nanotubes“ (TNT) die beiden einzigen bekannten Zell-Zell-Verbindungen dar, die über einen direkten Kontakt zwischen den Zytoplasmata zweier verbundener Zellen den direkten Austausch zytoplasmatischer Komponenten ermöglichen.

1.4.2.1 Gap Junctions

„Gap junctions“ (= Nexus) sind gut untersuchte tubuläre Zell-Zell-Verbindungen, bei denen kanalartige Proteine die Zellmembranen zweier aneinander grenzender Zellen

durchqueren und so den direkten interzellulären Transport zytosolischer Komponenten über einen stark eingegengten Interzellularraum (2-4 nm) ermöglichen (s. Abb. 1.6). Connexin ist der Hauptbestandteil dieser Kanalproteine, bei denen sechs Untereinheiten einen Zylinder mit einem Innendurchmesser von 1,5 nm bilden und Moleküle bis zu einer relativen Molekülmasse von ungefähr 1500 Da durchlassen (z.B. Aminosäuren, Nukleotiden, Disaccharide, cAMP und Steroidhormone) (Hirsch-Kaufmann, 2009).

1.4.2.2 TNT

TNT wurden erstmals 2004 in Pheochromocytoma Zellen (PC 12) als eine neuere Form der tubulären interzellulären Verbindung zwischen Zellen von Säugetieren beschrieben (Rustom et al., 2004). TNT stellen interzelluläre Membrankanäle dar, die als Zytoskelett-Hauptbestandteil filamentöses Aktin (F-Aktin) enthalten (Onfelt et al., 2006). Im Gegensatz zu den „gap junctions“ sind bei den TNT jedoch nicht nur die Zytoplasmata, sondern auch die Plasmamembranen zweier Zellen miteinander verbunden (s. Abb. 1.6). Dies ermöglicht, neben einem interzellulären Stoffaustausch über das Tubuluslumen, den Transport über die fusionierten Plasmamembranen. So ist neben zytosomatischen Komponenten auch der interzelluläre Austausch von Plasmamembran-Proteinen wie z.B. den humanen Leukozytenantigenen A bis C (HLA-A bis C), dem Haupthistokompatibilitätskomplex I (MHC I, „major histocompatibility complex I“), Glykosylphosphatidylinositol (GPI)- verankerten Proteinen, oder auch von Plasmamembran-Lipiden über TNT beschrieben (Gerdes et al., 2007; Onfelt et al., 2004). Als weiterer Unterschied zu den „gap junctions“ ermöglichen TNT die direkte, interzelluläre Kommunikation über Distanzen von bis zu 800 µm (Onfelt et al., 2004; Vidulescu et al., 2004) und den Transfer auch größerer Kargos wie zytosolischer Proteine bis hin zu intrazellulären Vesikeln (Onfelt et al., 2005). Die Ausbildung von TNT wurde für verschiedene Zelltypen beschrieben, darunter (neben verschiedenen Zelllinien) auch in Primärkulturen von Makrophagen, T-Zellen, aktivierten B-Zellen und menschlichen Glioblastomzellen (Gerdes et al., 2007; Onfelt et al., 2006; Onfelt et al., 2004). Bei diesem Prozess geht man davon aus, dass zunächst von einer Donorzelle längliche Plasmamembranausstülpungen zu einer Akzeptorzelle gebildet werden, deren Membranen nachfolgend mit der Plasmamembran der Akzeptorzelle fusionieren (Rustom et al., 2004). TNT werden nicht nur innerhalb eines Zelltyps, sondern auch zwischen unterschiedlichen Zelltypen ausgebildet (Onfelt et al., 2004).

Interzellulärer Transport über TNT ist ATP-abhängig und zumindest teilweise selektiv, da zytoplasmatische Moleküle wie Calcein nicht transportiert werden. Es ist jedoch noch nicht geklärt, welche Faktoren eine unspezifische Diffusion von Zellkomponenten verhindern. Möglich ist, dass der hohe Aktinanteil in den TNT sterisch einen diffusionsgetriebenen Transport über das Tubuluslumen erschwert (Rustom et al., 2004).

Eine besonders ausgeprägte Tendenz, TNT auszubilden, wurde bei myeloiden Zellen beobachtet, bei denen eine einzelne Zelle bis zu 75 interzelluläre Membranfusionen eingehen kann (Watkins und Salter, 2005). Für Makrophagen sind zwei Arten von TNT beschrieben. TNT mit einem Durchmesser <700 nm, die als Zytoskelett lediglich F-Aktinfilamente enthalten, und solche mit einem Durchmesser >700 nm, in denen neben Aktinfilamenten auch Mikrotubuli vorkommen. Für beide Formen wurden unterschiedliche Transportwege von interzellulären Kargos beschrieben. Während bei den dickeren TNT ausnahmslos ein Mikrotubuli-vermittelter, ATP-abhängiger Transport von intrazellulären Kargos über das Tubuluslumen beobachtet wurde, wurde bei den dünneren TNT nur ein Mikrotubuli-unabhängiger, ATP-abhängiger oberflächiger Transport von membrangebundenen Kargos entlang der fusionierten Plasmamembranen beschrieben (Onfelt et al., 2006). Neuere Untersuchungen zeigen, dass TNT nicht nur *in vitro* gebildet werden, sondern auch *in vivo* vorkommen (Chinnery et al., 2008). Zudem gibt es zunehmend Beispiele, in denen TNT als interzelluläre Transportwege von Pathogenen wie Bakterien, Viren und Prionen fungieren und eine sehr effiziente interzelluläre Ausbreitung der Erreger vermitteln (Eugenin et al., 2009b; Gousset et al., 2009; Onfelt et al., 2006; Sowinski et al., 2008).

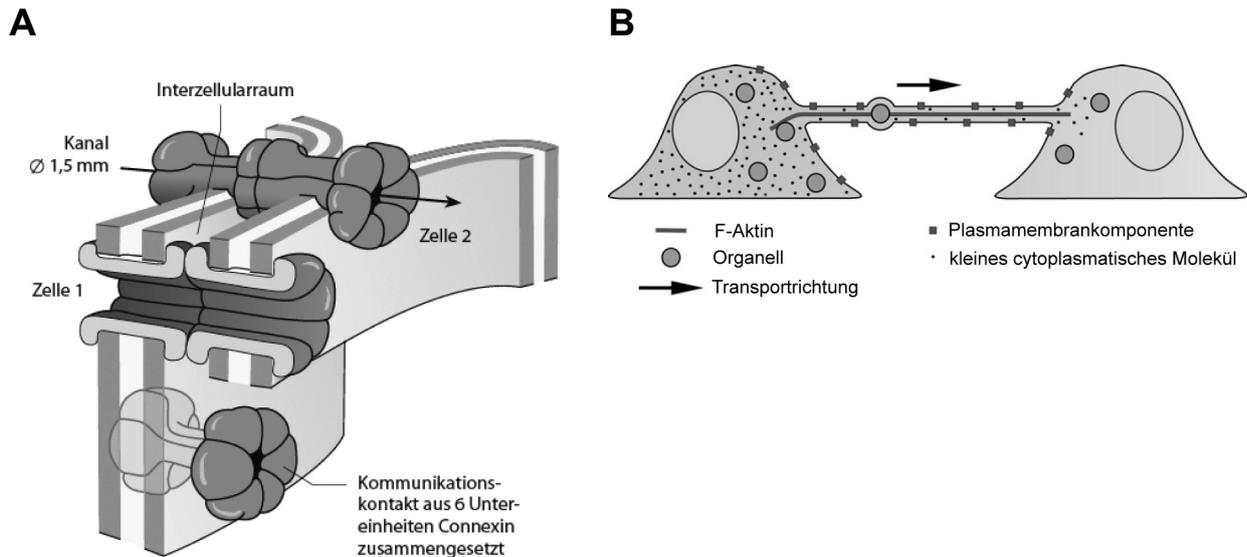


Abbildung 1.6: Tubuläre Interzellulärverbindungen

„Gap junctions“ (A) vermitteln die direkte Verbindung der Zytoplasmata zweier Zellen. Dabei bilden sie über eine kurze Distanz (2-4 nm) einen aus 6 Untereinheiten gebildeten Proteinkanal, durch den zelluläre Bestandteile bis zu einer Größe 1500 Da durchgelassen werden. Demgegenüber verbinden „tunneling nanotubes“ (TNT) (B) die Zytoplasmata zweier Zellen über eine Distanz von bis zu 800 µm. Im Gegensatz zu „gap junctions“ werden auch größere Kargos (bis hin zu zellulären Vesikeln und Organellen) transportiert. Zudem sind die Plasmamembranen von Akzeptor- und Donorzelle miteinander verbunden, was neben dem tubulären Austausch auch den interzellulären Transport von Membrankomponenten über die fusionierten Plasmamembranen ermöglicht. (Modifiziert nach: (A) (Hirsch-Kaufmann, 2009); (B) (Gerdes et al., 2007)).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Gegensatz zu der intrazellulären Replikation des HBV, die im Detail untersucht ist, sind die frühen Infektionsschritte des Virus bis heute nahezu unverstanden. Es ist unklar, wie das Virus *in vivo* effizient der Blutzirkulation entzogen und in die Leber und in seine Wirtszelle transportiert wird. Dieses fehlende Wissen ist ein wesentlicher Grund dafür, dass bei HBV die gängigen Therapien lediglich in den viralen Replikationszyklus eingreifen und nicht (wie z.B. bei HIV) zusätzlich den Viruseintritt in die Zelle verhindern. Neue Erkenntnisse über den viralen Transport zur und in die HBV-Wirtszelle stellen somit wichtige Grundlagen zu der Entwicklung erweiterter und wirksamerer Therapieansätze dar.

Viren nutzen physiologische Transportwege, um effizient Zugang zu ihrer Wirtszelle zu erhalten. Die Leber ist das einzige Organ, das überschüssiges Cholesterin aus der Zirkulation aufnimmt und ausscheidet. Dieses gelangt überwiegend als veresterte CE in den TRL-Remnants oder in den HDL zielgerichtet zur Leber und dort in die Hepatozyten. Neben den CE transportieren TRL-Remnants auch die nicht in der Blutzirkulation hydrolysierten TG. Der leber- und hepatozytenspezifische Transport

der neutralen Lipide CE und TG stellt somit einen physiologischen Stoffwechselweg für hepatotrope Pathogene wie dem HBV dar, den das Virus nutzen kann, um effizient die Leber und seine Wirtszelle zu erreichen und eine Infektion zu etablieren. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass, neben einem direkten Transport zu den Hepatozyten, sowohl die neutralen Lipide als auch Pathogene in der Leber zunächst von nicht-parenchymalen Leberzellen aufgenommen und anschließend zu und in die Parenchymzellen weitergereicht werden.

In dieser Arbeit sollte daher der molekulare Mechanismus untersucht werden, über den das HBV im menschlichen Organismus aus der Blutzirkulation in die Wirtszelle transportiert wird und diese infiziert. Hierbei sollte insbesondere die Rolle des leber- und hepatozytenspezifischen Neutrallipidtransportes über nicht-parenchymale Leberzellen im Mittelpunkt stehen. Da HBV nur Menschen und hominide Primaten produktiv infiziert, sollte ein neuartiges Modell entwickelt werden, welches die frühen Infektionsschritte des Virus im humanen Lebergewebe so wiedergibt wie sie *in vivo* in der Leber vorzufinden sind. Hierzu sollte humanes Lebergewebe *ex vivo* mit fluoreszenzmarkierten VP perfundiert werden und mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Analysen des Gewebes eine Visualisierung der HBV-Infektion erreicht werden. Zusätzlich sollte in hochreinen humanen Leberzellpopulationen über den Vergleich zum Lipidstoffwechsel der zelluläre Transportmechanismus der HBV genauer charakterisiert und abschließend die entwickelte Theorie durch gezielte fluoreszenzmikroskopische Analysen im *ex vivo* perfundierten humanen Lebergewebe verifiziert werden.

2 Ergebnisse

In dem ersten Abschnitt des Ergebnisteils (2.1) sind die Aufreinigung und die Fluoreszenzmarkierung der VP beschrieben.

In dem zweiten Abschnitt (2.2) wurde die Rolle der verschiedenen Leberzelltypen in der frühen Infektionsphase des HBV untersucht. Hierbei dienten ein neu entwickeltes, humanes Lebergewebsperforationsmodell und fluoreszenzmarkierte VP dazu, verschiedene frühe Zeitpunkte einer HBV-Infektion in der humanen Leber zu visualisieren. Die Ergebnisse wurden mit Mäusen, die als ein *in vivo*-Modell der frühen HBV-Infektion dienten, verglichen. Nachfolgend wurde die postulierte Rolle der verschiedenen Leberzelltypen in der frühen HBV-Infektion in Mischkulturen aus humanen Kupffer-Zellen und Hepatozyten überprüft.

In dem dritten Abschnitt (2.3) ist die in humanen Kupffer-Zellen und in *in vitro* differenzierten Makrophagen durchgeführte Analyse der zellulären Mechanismen dargestellt, die dem Virus eine (im Sinne einer HBV-Infektion) produktive Interaktion mit den Lebermakrophagen auf seinem Weg zur Wirtszelle ermöglichen.

Abschließend wurde in dem Abschnitt 2.4 die in 2.3 entwickelte Theorie in Schnitten des perfundierten Lebergewebes aus 2.2 überprüft und hieraus Rückschlüsse auf zelluläre Mechanismen der frühen HBV-Infektion in der humanen Leber, wie sie *in vivo* stattfinden könnten, gezogen.

2.1 Aufreinigung und Fluoreszenzmarkierung der VP

In dieser Arbeit wurden für die Untersuchung der frühen Schritte der HBV-Infektion in den humanen Lebergeweben und der Charakterisierung des HBV-Transportmechanismus in Makrophagen fluoreszenzmarkierte VP verwendet. Die Aufreinigung und Fluoreszenzmarkierung der VP erfolgte nach einem von Glebe und Gerlich (2004) publizierten Verfahren.

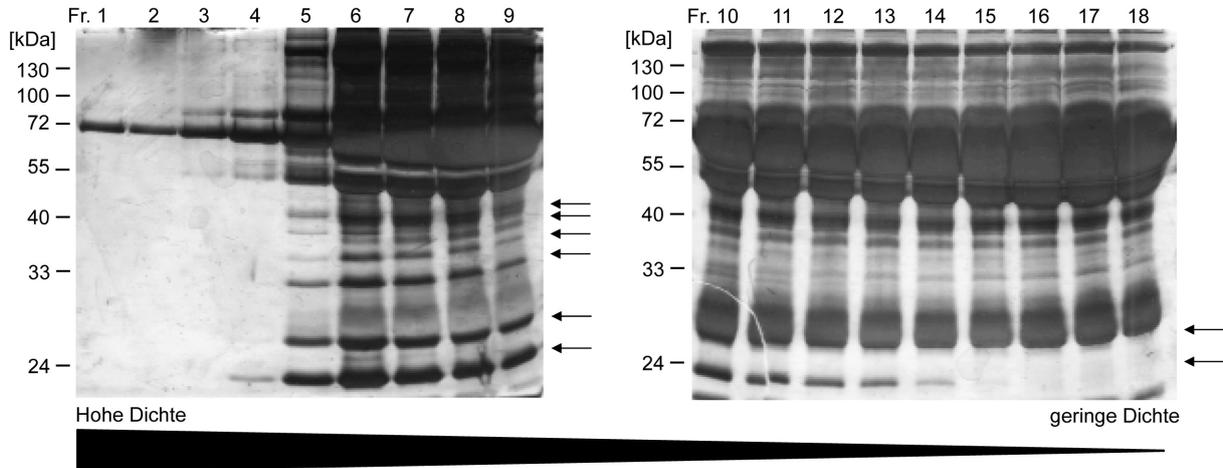
2.1.1 Aufreinigung L-Protein-reicher VP aus HBV-positivem Plasma

Die Aufreinigung L-Protein-reicher VP aus dem Plasma von HBV-positiven Patienten wurde durch die Anwendung mehrerer Ultrazentrifugationsschritte erreicht.

Zunächst wurde das Plasma mittels einer Saccharose-Dichtegradienten-ultrazentrifugation aufgetrennt, fraktioniert und anschließend die einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE mit nachfolgender Silberfärbung des Gels sowie HBV-

spezifischer DNA Dot-Blot-Analyse charakterisiert. Das silbergefärbte SDS-Polyacrylamidgel zeigt das Proteinbandenmuster der einzelnen Gradientenfractionen nach Zentrifugation (Abb. 2.1 A). In den Spuren fünf bis neun erkennt man neben den Proteinbanden mit höheren Molekulargewichten vier Proteinbanden mit apparenten Molekulargewichten zwischen ungefähr 24 und 36 kDa. In der Spur fünf lassen sich darüber hinaus zwei Proteinbanden mit apparenten Molekulargewichten von etwa 39 und 42 kDa von Proteinbanden mit höherer Molekularmasse abgrenzen, wobei die 39 kDa Proteinbande in Fraktion sechs ebenfalls zu erkennen ist. In den Spuren zehn bis 15 sind Proteinbanden mit apparenten Molekulargewichten von ungefähr 24 und 28 kDa erkennbar, die in den Spuren 16 bis 18 nicht feststellbar sind. Keine der genannten Proteinbanden ist in den Spuren eins bis drei erkennbar. Der DNA Dot-Blot zeigt den spezifischen HBV-DNA-Gehalt der Fraktionen eins bis neun (Abb. 2.1 B), wobei dieser mit 62,8 ng/ml in Fraktion vier am höchsten ist, in den Fraktionen drei und fünf geringer ausfällt und in den Fraktionen eins, zwei und sechs bis neun nicht nachweisbar war.

A



B

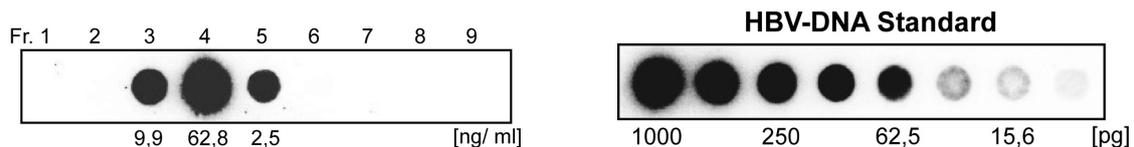


Abbildung 2.1: Anreicherung von VP aus HBV-positivem Plasma mittels Saccharose-Dichtegradientenultrazentrifugation

Das Plasma eines HBV-positiven Patienten wurde auf einen Saccharose-Dichtegradienten geschichtet (Gradient 1, vgl. 4.2.1.1), ultrazentrifugiert und fraktioniert. (A) Die Proteine in den Proben der 18 Fraktionen des Gradienten wurden mittels SDS-PAGE (12,5%) aufgetrennt und die Gele silbergefärbt. Links von den Gelen sind die Fragmentgrößen eines Größenstandards in kDa angegeben. Die Pfeile an der rechten Seite der Gele zeigen auf 6 Proteinbanden mit apparenten Molekulargewichten zwischen etwa 24 und 42 kDa. Die Gradientendichte nimmt von Fraktion 1-18 hin

Ergebnisse

ab. Auftrag Fraktionen 1-6: je 10 µl; Fraktionen 7+8: je 5 µl; Fraktionen 9+10: je 2 µl; Fraktionen 11-18: je 1 µl. (B) HBV-DNA Dot-Blot-Analyse der Fraktionen 1-9 des Saccharose-Dichtegradienten. Unter den positiven Fraktionen ist die HBV-DNA-Konzentration in ng/ml angegeben. Rechts: HBV-DNA-Standard beginnend mit 1000 pg bis 8 pg DNA. kDa: Kilodalton; Fr.: Fraktion. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Anja Langenkamp durchgeführt.

Zur weiteren Aufreinigung der VP wurden die Fraktionen drei bis sechs mittels Ultrafiltration in PBS umgepuffert, in einen CsCl-Gradienten aufgenommen und zentrifugiert. Nach der Ultrazentrifugation wurde der CsCl-Gradient fraktioniert, die Dichte der einzelnen Fraktionen refraktometrisch bestimmt und mittels HBsAg-spezifischem ELISA und HBV-spezifischer DNA Dot-Blot-Analyse auf ihren Gehalt an HBV-Oberflächenproteinen bzw. HBV-DNA hin untersucht.

Abbildung 2.2 zeigt das Dichte-, HBV-DNA- und HBsAg-Profil einzelner CsCl-Gradientenfraktionen. Man erkennt eine deutliche Anhäufung der HBV-DNA in Fraktion 18, die eine Dichte von 1,22 g/ml aufweist, sowie eine Konzentrierung der HBsAg in Fraktion 19 mit einer Dichte von 1,19 g/ml.

Für die weiteren Aufreinigungsschritte wurden die HBsAg- und HBV-DNA-positiven Fraktionen 17 bis 22 vereinigt und mittels Ultrafiltration in PBS umgepuffert.

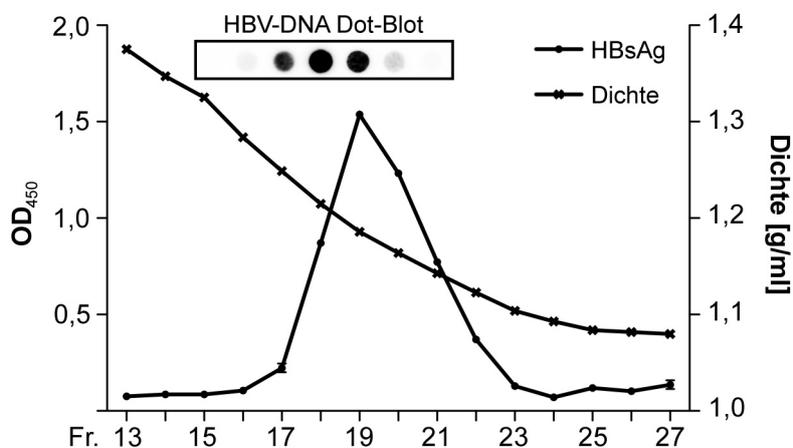


Abbildung 2.2: Auftrennung von L-Protein-haltigen VP mittels CsCl-Dichtegradientenultrazentrifugation

Die in PBS umgepufferten Fraktionen 17-22 des Saccharose-Dichtegradienten wurden mit einer CsCl-Lösung auf eine Dichte von 1,3 g/ml eingestellt, in einen CsCl-Gradienten überführt, ultrazentrifugiert und der Gradient fraktioniert. Dargestellt sind die HBV-DNA Dot-Blot-Analyse und die Ergebnisse des HBsAg-spezifischen ELISA der Fraktionen 13-27, sowie deren mittlere Dichten. Ergebnisse sind Durchschnittswerte zweier unabhängiger Replikate \pm SD.

In einem letzten Ultrazentrifugationsschritt wurde die in PBS umgepufferte VP-haltige Lösung auf einen zweiten Saccharose-Dichtegradienten (Gradient 2, vgl. 4.2.1.1) geschichtet und ultrazentrifugiert. Anschließend wurde der Gradient fraktioniert, die HBV-DNA- bzw. HBsAg-positiven Fraktionen vereinigt und mittels Ultrafiltration in PBS umgepuffert. Die Überprüfung der Reinheit der isolierten VP sowie deren

Anreicherung an L-Protein-haltigen Partikeln erfolgte durch SDS-PAGE und nachfolgender Silberfärbung des Gels. Wie in Abbildung 2.3 dargestellt, lassen sich lediglich sechs Proteinbanden mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 24 bis 42 kDa erkennen, wo hingegen Banden von Proteinen anderer molekularer Masse nicht feststellbar sind.

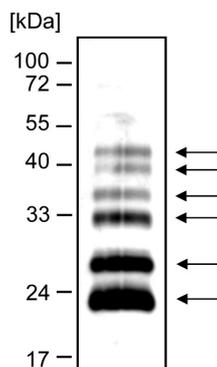


Abbildung 2.3: Charakterisierung der aufgereinigten VP mittels SDS-PAGE und Silberfärbung

Die Proteine einer Probe (2 µg) der aufgereinigten VP wurden mittels SDS-PAGE (12,5%) aufgetrennt und das Gel silbergefärbt. Links sind die Fragmentgrößen eines Größenstandards angegeben. Die Pfeile rechts zeigen auf angefärbte Proteinbanden mit apparenten Molekulargewichten zwischen etwa 24 und 42 kDa. kDa: Kilodalton

2.1.2 Fluoreszenzmarkierung der aufgereinigten VP

Für die Fluoreszenzmarkierung der VP wurden die Succinimidylester gekoppelten Fluorophore Alexa Fluor[®] 488 und 594 (Invitrogen) sowie der Isothiocyanat gekoppelte Fluorophor Fluorescein (FITC, Fluoresceinisothiocyanat) verwendet. Zunächst wurde der pH-Wert der in 2.1.1 aufgereinigten und in PBS gelösten VP mit einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf neun eingestellt und anschließend der Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben. Nach Inkubation wurde die Lösung auf einen Saccharose-Dichtegradienten geschichtet und ultrazentrifugiert. Die HBsAg- und HBV-DNA-positiven Fraktionen wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration in PBS umgepuffert. Mittels HBV-spezifischer DNA Dot-Blot-Analyse wurde die HBV-Konzentration (1 pg HBV-DNA entsprechen 3×10^5 Virionen (Gaillard et al., 2002)) und mittels Absorptionsmessungen bei 280 und 590 nm und den Formeln in 4.2.1.5 die Gesamtkonzentration der VP in der Probe bestimmt. Die OD_{280} von 4,3 entspricht hierbei einer Konzentration an HBV-Oberflächenproteinen von 1 µg/µl (Glebe und Gerlich, 2004) und 1,6 µg näherungsweise einer Anzahl von 1×10^{10} filamentösen SVP bzw. Virionen (Heermann und Gerlich, 1991). Die SVP liegen demnach in einem etwa 200-fachen Überschuss zu den Virionen vor (s. Tab. 2). Die Anzahl der

gekoppelten Fluorophore wurde, wie in 4.2.1.6 beschrieben, bestimmt und beträgt ungefähr neun pro Partikel.

Um die erfolgreiche Fluoreszenzmarkierung der viralen Proteine zu überprüfen, wurde jeweils eine Probe unmarkierter und eine Probe der mit Alexa Fluor® 594 markierten VP (im folgenden VP₅₉₄ genannt) auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, nach Elektrophorese das Gel mit elektromagnetischer Strahlung im ultravioletten Wellenlängenbereich beleuchtet und die Emission im sichtbaren Wellenlängenbereich bei 602 nm untersucht. Während auch bei längerer Belichtung der nicht fluoreszenzmarkierten Probe keine fluoreszierenden Proteinbanden sichtbar waren (s. Abb. 2.4 A), ließen sich bereits bei kurzer Belichtung der fluoreszenzmarkierten Probe sechs fluoreszierende Proteinbanden mit apparenten Molekulargewichten zwischen ungefähr 24 und 45 kDa detektieren (s. Abb. 2.4 B).

Tabelle 2: Analyse der aufgereinigten und fluoreszenzmarkierten VP

OD ₂₈₀ [nm]	OD ₅₉₀ [nm]	Anzahl VP [x10 ¹⁰ /ml]	Fluorophor/VP	HBV-DNA [ng/ml]	Anzahl Virionen [x10 ¹⁰ /ml]
1,631 ±0,030	0,858 ±0,018	167	8,62	25,5	0,765

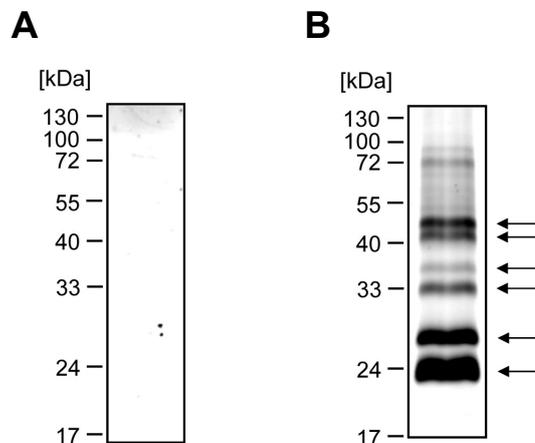


Abbildung 2.4: Charakterisierung der fluoreszenzmarkierten VP mittels SDS-PAGE und Fluoreszenzanalyse

Die Proteine einer Probe (2 µg) der aufgereinigten VP wurden vor (A) bzw. nach (B) Fluoreszenzmarkierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 594 mittels SDS-PAGE (12,5%) aufgetrennt, die SDS-Polyacrylamidgele mit elektromagnetischer Strahlung der Wellenlänge von 365 nm beleuchtet und die Emission bei 602 nm detektiert. Links sind die Fragmentgrößen eines Größenstandards angegeben. Pfeile deuten auf Banden, die Licht der Wellenlänge von 602 nm emittieren.

Anschließend sollte untersucht werden, ob die VP₅₉₄ *in vitro* nach zellulärer Aufnahme mittels HBsAg-spezifischer Immunfluoreszenzanalyse detektiert werden konnten. Hierzu wurden isolierten Kupffer-Zellen 1h mit VP₅₉₄ inkubiert und

anschließend fixiert. Nachfolgend wurden die VP₅₉₄ mittels HBsAg-spezifischer Antikörper und eines Alexa Fluor® 488-gekoppelten Sekundärantikörpers fluoreszenzmarkiert und dessen Signal mit dem Eigenfluoreszenzsignal der VP₅₉₄ verglichen. Abbildung 2.5 zeigt eine mit konfokaler Laserscanning-Mikroskopie aufgenommene Zelle. Man erkennt, dass die Eigenfluoreszenzsignale der VP₅₉₄ mit denen des Sekundärantikörpers kolokalisieren (Pfeile zeigen beispielhafte Kolokalisation an).

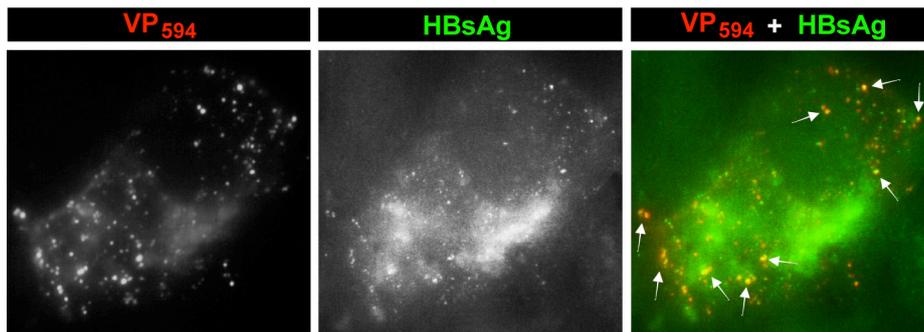


Abbildung 2.5: Detektion der VP₅₉₄ mit anti-HBsAg-spezifischen Antikörpern in Kupfer-Zellen
Kupfer-Zellen wurden 1h mit 1 µg/ml VP₅₉₄ bei 37°C inkubiert und nachfolgend mit 4% PFA-haltigem Puffer fixiert. Anschließend wurde zunächst mit HBsAg-spezifischen Antikörpern aus Kaninchen und nachfolgend mit einem Alexa Fluor® 488-gekoppelten Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Dargestellt sind die separaten Fluoreszenzkanäle sowie deren Überlagerung. Pfeile weisen auf Beispiele für kolokalisierende Fluoreszenzsignale hin.

2.2 Untersuchung der Rolle der verschiedenen Leberzelltypen in der frühen HBV-Infektion

2.2.1 Das humane *ex vivo* Lebergewebsperfuisionsmodell

Um die im Rahmen einer HBV-Infektion in der menschlichen Leber stattfindenden Interaktionen der Viren mit unterschiedlichen Leberzelltypen untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit ein neuartiges *ex vivo* Lebergewebsperfuisionsmodell etabliert. Hierbei wurden kurz zuvor entnommene humane Leberresektate verwendet und das Gewebe, wie in 4.2.3.6 beschrieben, für die Perfusion vorbereitet. Um die physiologischen Bedingungen wie sie im menschlichen Körper vorliegen nachzustellen, wurde die Perfusion in einem geschlossenen Zirkulationssystem durchgeführt, bei dem sich das Gewebe und das Perfuisionsmedium in einem Zellkulturinkubator befanden (s. Abb. 2.6).

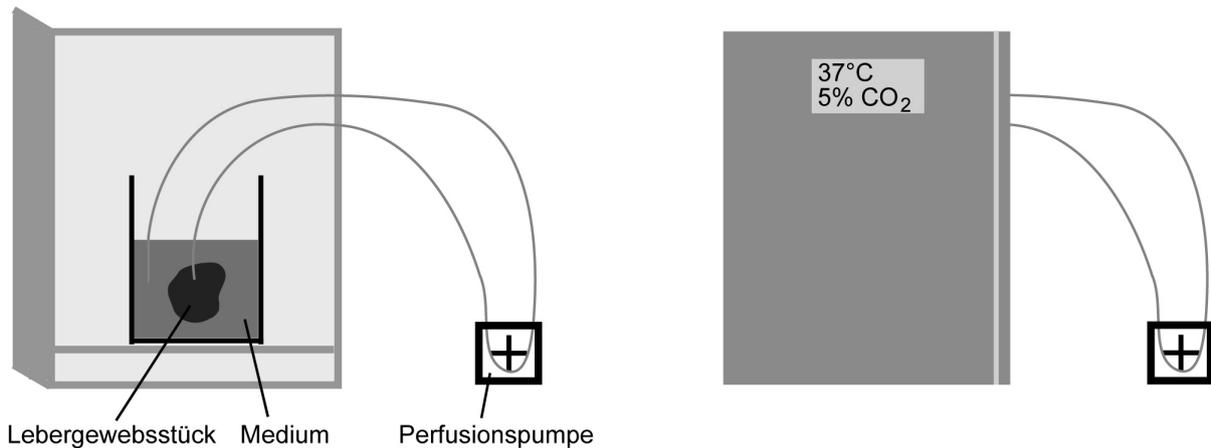


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des humanen Lebergewebsperfusionssystems

Links ist der innerhalb des Zellkulturinkubators angebrachte Teil des Systems dargestellt. In einem offenen Gefäß befindet sich im (mit humanem Serum versetzten) Medium das Lebergewebsstück, welches über Äste der Pfortader mit dem Perfusionssystem verbunden ist. Die außerhalb des Inkubators angebrachte Perfusionspumpe saugt Medium aus dem Behälter an und führt es über den das Leberstück versorgenden Perfusionsschlauch dem Gefäß im Inkubator wieder zu. Rechts ist eine Außenansicht des Systems zu sehen. Während der Perfusion herrschen innerhalb des Inkubators die für die Zellkultur optimierten Bedingungen (37°C, 5% CO₂).

Für die weiteren Arbeiten sollte zunächst abgeklärt werden, inwieweit das System die Untersuchung von Virus-Zellinteraktionen über einen Zeitraum von bis zu 20h ermöglicht. Im Folgenden wurde deswegen die Vitalität der Leberzellen über einen Perfusionszeitraum von 20h überprüft. Da bekannt ist, dass LSEC Ovalbumin effektiv in der Leber endozytieren (Kindberg et al., 1990), wurde nach 19,5h Perfusion mit Zellkulturmedium für 30 Minuten fluoreszenzmarkiertes Ovalbumin in das Zirkulationssystem gegeben und anschließend die Aufnahme in die Leberzellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Wie in Abbildung 2.7 dargestellt, ist bei dem in dieser Arbeit benutzten Lebergewebsperfuisionsmodell nach 20h ein starkes Fluoreszenzsignal in den sinusoidalen Leberzellen feststellbar.

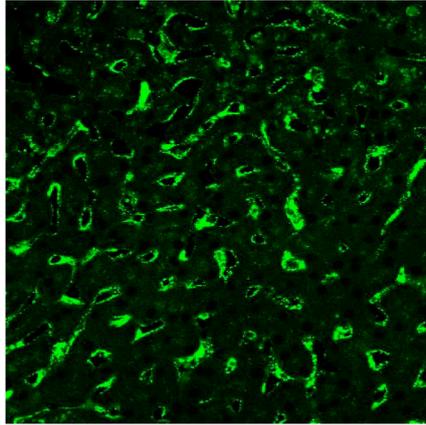


Abbildung 2.7: Überprüfung der Zellvitalität im *ex vivo* perfundierten Lebergewebsperfusions-system

Nach 19,5h Perfusion des humanen Lebergewebes im Zellkulturinkubator mit humanem Serumhaltigem Medium wurde 20 µg/ml Alexa Fluor[®] 488-gekoppeltes Ovalbumin zum Medium gegeben und nach 20h die Perfusion gestoppt. Nach Fixierung des Gewebes mit 4% PFA-haltigem Puffer und der Anfertigung von Gewebeschnitten wurden einzelne Schnitte mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Gezeigt ist das Ovalbumin₄₈₈-Fluoreszenzsignal eines mit Weitfeldmikroskopie aufgenommenen repräsentativen Mikroskopausschnittes.

2.2.2 Kurzzeitige Perfusion des humanen Lebergewebes mit VP₅₉₄-haltigem Medium (45 Minuten)

Um zu untersuchen, welche Zellen in der Leber HBV bei einer Infektion initial aufnehmen und so dem Blutkreislauf entziehen, wurde ein Leberresektat für 45 Minuten mit VP₅₉₄-haltigem Medium perfundiert. Anschließend wurde das Gewebe durch Perfusion mit PBS gewaschen, fixiert und nach Anfertigung von Gewebeschnitten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Abbildung 2.8 A zeigt einen Mikroskopausschnitt, in dem die Kupffer-Zellen durch CD68-spezifische Antikörper markiert wurden (Alabraba et al., 2007; Holness und Simmons, 1993). VP₅₉₄ lassen sich hier lediglich in CD68-positiven Zellen nachweisen. Abbildung 2.8 B zeigt die statistische Auswertung von zehn zufällig ausgewählten Mikroskopausschnitten, wobei nahezu alle Kupffer-Zellen (>99%), jedoch fast keine CD68 negativen Leberzellen (<1%) positiv für VP₅₉₄ sind. Abbildung 2.8 C zeigt die Nahaufnahme einer CD68-positiven Zelle, die eine deutliche Anreicherung an VP₅₉₄ innerhalb CD68-positiver Bereiche sowohl bei Aufnahme in der x-y-Ebene als auch bei y-z-Projektion einer z-Stapelaufnahme erkennen lässt.

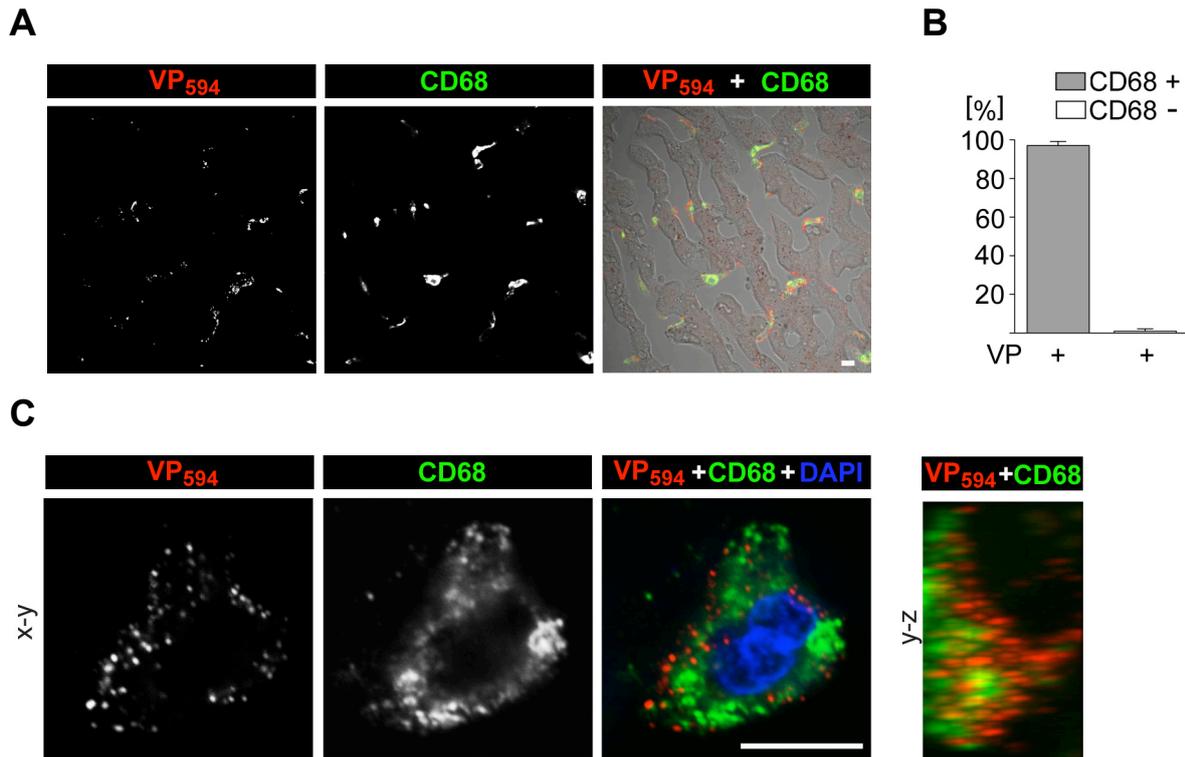


Abbildung 2.8: Immunfluoreszenzanalyse des Lebergewebes nach 45-minütiger Perfusion mit VP₅₉₄-haltigem Medium

Humanes Lebergewebe wurde für 45 min mit 5×10^{12} VP₅₉₄- und 50% humanem Serum enthaltenden Medium bei 37°C perfundiert. Danach wurde das Gewebe durch Perfusion mit PBS gewaschen und mit 4% PFA-haltigem Puffer fixiert. Nach Anfertigung von Gewebeschnitten wurden einzelne Schnitte zunächst mit CD68-spezifischen Antikörpern aus Maus und nachfolgend mit einem Alexa Fluor® 647-gekoppelten Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus inkubiert. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. In (A, C) sind die separaten Fluoreszenzkanäle repräsentativer Mikroskopausschnitte dargestellt sowie die Überlagerungen der Kanäle, in denen zusätzlich in (A) die Differentialinterferenzkontrastaufnahme und in (C) die Zellkernfärbung mit DAPI gezeigt ist. In (C) ist zusätzlich die y-z-Projektion der überlagerten Fluoreszenzkanäle einer z-Stapel-Aufnahme dargestellt. Die Größenstandards entsprechen 10 µm. (B) zeigt die statistische Auswertung von 10 zufällig aufgenommenen Mikroskopausschnitten.

2.2.3 Kurzzeitige Perfusion des humanen Lebergewebes mit nicht-modifizierten VP (45 Minuten)

In 2.2.2 wurde gezeigt, dass VP₅₉₄ im perfundierten humanen Lebergewebe initial von Kupfer-Zellen aufgenommen werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob dieses Ergebnis auch mit nicht fluoreszenzmarkierten, nativen VP erhalten wird. Hierzu wurde anstelle der fluoreszenzmarkierten VP Zellkulturüberstand von VP-exprimierenden HepG2.2.15-Zellen zur Perfusion des Lebergewebes verwendet. Nach 45-minütiger Perfusion wurde das Gewebe mit PBS gewaschen, fixiert und anschließend mittels Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie analysiert.

Abbildung 2.9 A zeigt einen Mikroskopausschnitt der Immunfluoreszenzanalyse, in der die VP durch HBsAg- und die Kupfer-Zellen durch CD68-spezifische Antikörper

markiert wurden. In Analogie zu 2.2.2 lassen sich VP lediglich in CD68-positiven Zellen nachweisen. Um die Spezifität der HBsAg-spezifischen Antikörper zu überprüfen, wurde eine weitere Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt, bei der ein Gewebeschnitt mit Kaninchenserum, welches die polyklonalen Antikörper gegen das HBsAg enthielt, und ein folgender Gewebeschnitt mit Kaninchenserum ohne HBsAg-spezifische Antikörper inkubiert wurde. Abbildung 2.9 B zeigt jeweils einen Mikroskopausschnitt der gleichen Gewebestelle zweier aufeinander folgender Schnitte, wobei nur das mit HBsAg-spezifischen Antikörpern behandelte Gewebe ein in sinusoidalen Zellen detektierbares Fluoreszenzsignal zeigt.

Abbildungen 2.9 C und D zeigen die ultrastrukturelle Untersuchung des Lebergewebes mittels Elektronenmikroskopie. In Abbildung 2.9 C erkennt man in der Übersicht eine Kupffer-Zelle mit charakteristisch länglichem Zellkern. Unterhalb der Kupffer-Zelle befindet sich ein Hepatozyt mit typisch rundem Zellkern. In der Vergrößerung sieht man in der Kupffer-Zelle eine endosomale sowie eine kleinere, vesikuläre Struktur, die beide Virionen enthalten. Ein tubuläres VP und eine rundliche Struktur von der Größe eines TRL sind ebenfalls zu erkennen. In Abbildung 2.9 D ist eine weitere Kupffer-Zelle und ein Hepatozyt zu sehen. Die Vergrößerung zeigt ein Endozytosevesikel, in welchem sich zwei rundliche Strukturen von der Größe eines Virions angelagert an einer rundlichen Struktur von der Größe eines Chylomikrons befinden.

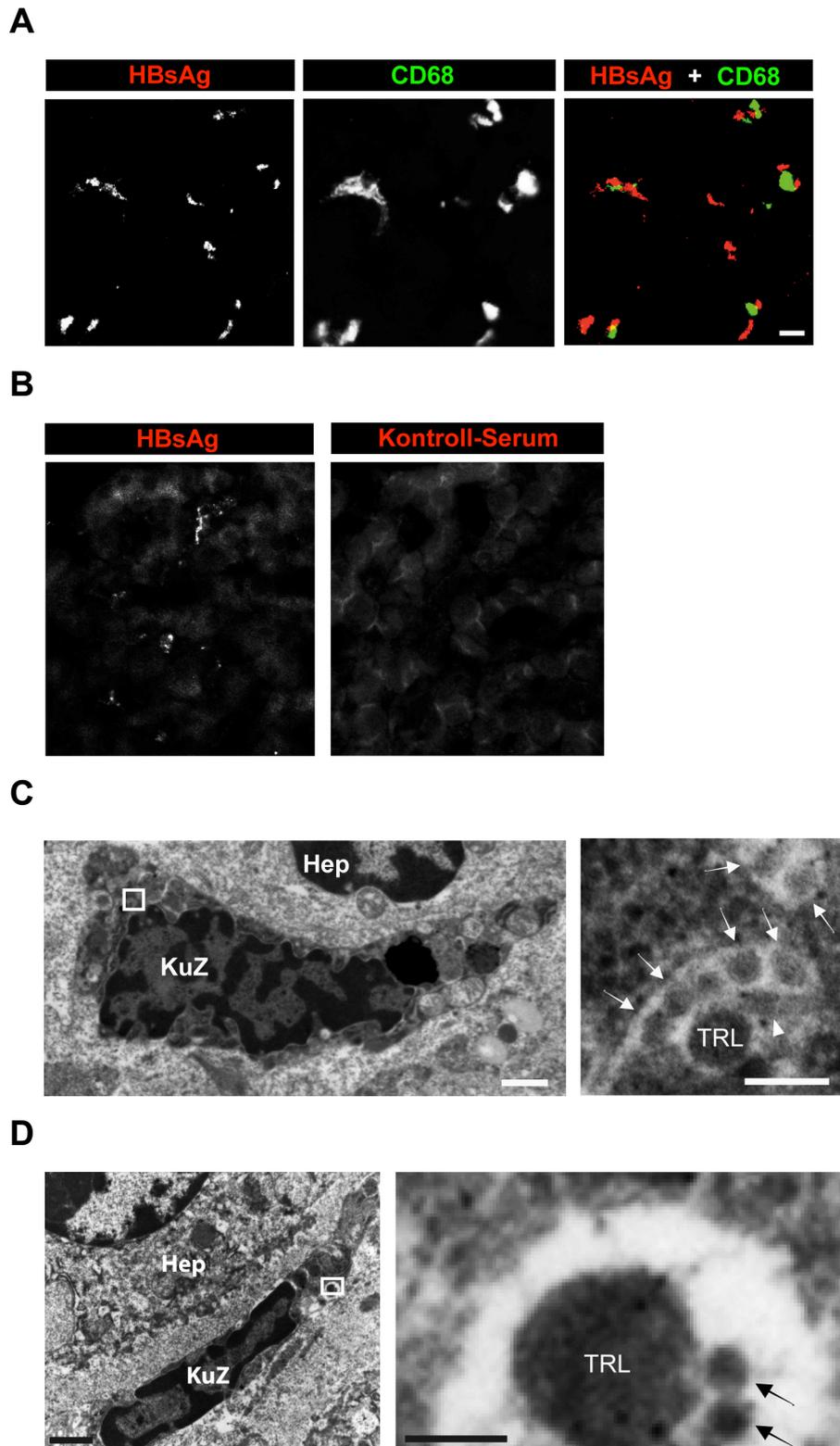


Abbildung 2.9: Immunfluoreszenz- und Ultrastrukturanalyse des Lebergewebes nach 45-minütiger Perfusion mit native VP-haltigem Medium

Humanes Lebergewebe wurde bei 37°C für 45 min mit Medium perfundiert, das den Überstand von HepG2.2.15-Zellen entsprechend einer Anzahl von $2,5 \times 10^{10}$ Virionen sowie 20% humanes Serum enthielt. Danach wurde das Gewebe durch Perfusion mit PBS gewaschen und mit 4% PFA- (A+B) oder 2,5% Glutaraldehyd- (C+D) haltigem Puffer fixiert. (A+B): Nach Anfertigung von Gewebeschnitten wurden einzelne Schnitte zunächst mit CD68-spezifischen Antikörpern aus Maus (A), HBsAg-spezifischen Antikörpern aus Kaninchen (A+B) bzw. unspezifischem Kaninchenserum (B) und nachfolgend mit einem Alexa Fluor® 488-gekoppelten Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus (A) bzw. Alexa Fluor® 594-gekoppelten Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen (A+B) inkubiert.

Abschließend wurden die Gewebeschnitte mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. In (A) sind die separaten Fluoreszenzkanäle eines repräsentativen Mikroskopausschnittes sowie die Überlagerung der Kanäle dargestellt. In (B) sind die Fluoreszenzkanäle der HBsAg-spezifischen bzw. -unspezifischen Antikörperfärbungen gezeigt. Die Größenstandards entsprechen 10 μm . In (C+D) sind zwei elektronenmikroskopische Aufnahmen der ultrastrukturellen Untersuchung dargestellt, wobei die in den Übersichten mit einem weißen Rahmen markierten Ausschnitte rechts vergrößert gezeigt sind. Pfeile zeigen auf Virionen, Pfeilspitze in (C) auf ein tubuläres VP. KuZ: Kupffer-Zelle; Hep: Hepatozyt; TRL: Triacylglycerid reiches Lipoprotein; CM: Chylomikron. Die Größenstandards in den Übersichten entsprechen 1 μm , in den Vergrößerungen 100 nm. Die elektronenmikroskopischen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Jennen erstellt.

Im Folgenden wurden die Ergebnisse des *ex vivo* Perfusionsmodells mit einem *in vivo*-System verglichen. Hierzu wurden C57BL/6 Mäuse verwendet.

2.2.4 Injektion fluoreszenzmarkierter VP in Maus

VP₅₉₄ bzw. VP_{FITC} wurden intravenös in eine Maus injiziert, nach 45 Minuten die Leber durch Perfusion mit PBS gewaschen, fixiert und nach Anfertigung von Gewebeschnitten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Abbildung 2.10 zeigt zwei Mikroskopausschnitte, in denen die Kupffer-Zellen durch MHC II- (A) bzw. F4/80- (B) spezifische Antikörper markiert wurden (Austyn und Gordon, 1981; You et al., 2008). Fluoreszenzsignale der VP₅₉₄ bzw. VP_{FITC} lassen sich hier lediglich in MHC II- bzw. F4/80-positiven Zellen nachweisen. Die Anreicherung der fluoreszenzmarkierten VP in den Kupffer-Zell-Marker-positiven Bereichen ist sowohl bei Aufnahme in der x-y-Ebene als auch bei x-z- bzw. y-z-Projektion einer z-Stackaufnahme erkennbar. Abbildung 2.10 C zeigt die statistische Auswertung von zehn zufällig ausgewählten Mikroskopausschnitten aus dem in (B) verwendeten Gewebeschnitt, wobei nahezu alle Kupffer-Zellen (>99%), jedoch fast keine F4/80 negativen Leberzellen (<1%) positiv für VP_{FITC} sind.

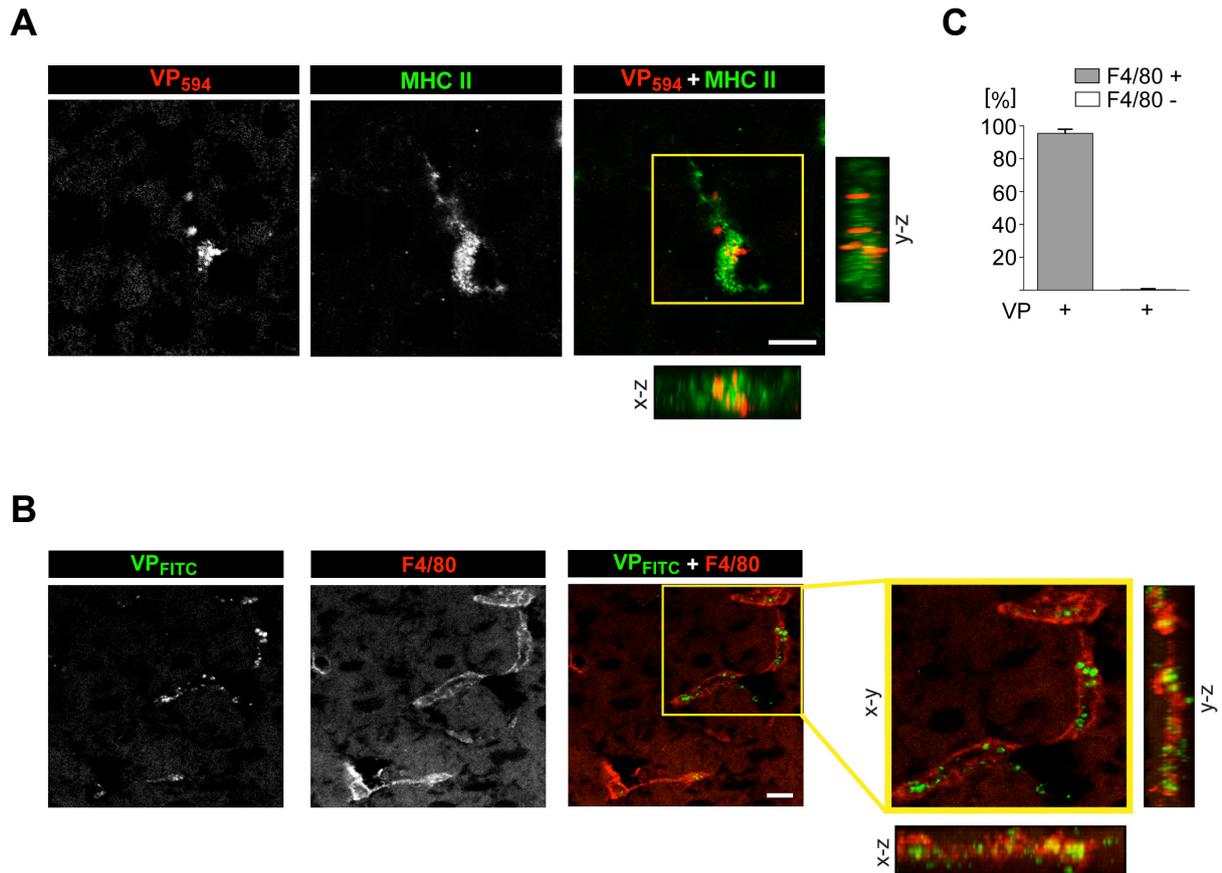


Abbildung 2.10: Immunfluoreszenzanalyse des murinen Lebergewebes nach Injektion von VP₅₉₄ bzw. VP_{FITC}
 200 µl PBS mit 2×10^{11} VP₅₉₄ (A) bzw. VP_{FITC} (B) wurden i.v. in eine C57BL/6 Maus injiziert, nach 45 min die Leber durch Perfusion mit PBS gewaschen, mit 4% PFA-haltigem Puffer fixiert und nach Anfertigung von Gewebeschnitten einzelne Schnitte zunächst mit MHC II- (A) bzw. F4/80- (B) spezifischen Antikörpern und nachfolgend mit einem Alexa Fluor® 488- (A) bzw. Alexa Fluor® 594- (B) gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Dargestellt sind die separaten Fluoreszenzkanäle repräsentativer Mikroskopausschnitte sowie die Überlagerungen der Kanäle. Zudem sind jeweils von dem mit gelben Rahmen markierten Bereich eine x-z- und eine y-z-Projektion der überlagerten Fluoreszenzkanäle einer z-Stapel-Aufnahme gezeigt. Die Größenstandards entsprechen 10 µm. (C) zeigt die statistische Auswertung von 10 zufällig aufgenommenen Mikroskopausschnitten mit F4/80-markierten Kupfer-Zellen. Die Antikörperfärbungen der Schnitte wurden von Dr. Mathias Heikenwälder vorgenommen.

2.2.5 Injektion nicht-modifizierter VP in Maus

Zur Anreicherung nativer Virionen wurde die HBV-enthaltende Fraktion drei der Saccharose-Dichtegradientenultrazentrifugation aus 2.1.1 mittels Ultrafiltration in PBS umgepuffert. Alternativ wurden identisch aufgereinigte Virionen aus Zellkulturüberstand von HepG2.2.15-Zellen verwendet. Anschließend wurden die HBV-haltigen Lösungen (2 x VP aus Plasma, 1 x VP aus HepG2.2.15-Zellen) intravenös in jeweils eine Maus injiziert, nach 45 Minuten die Lebern durch Perfusion mit PBS gewaschen und die CD11b-negativen Hepatozyten und die CD11b-positiven Kupfer-Zellen isoliert (Do et al., 1999). Aus den aufgereinigten Zellen wurde die

zelluläre DNA und RNA isoliert und mittels quantitativer PCR (qPCR) die zu dem Einzelkopie-Gen NID2 relative rcDNA-Konzentration bzw. nach cDNA-Synthese die zu GAPDH relative Expression von Albumin als hepatozytenspezifischen Marker (Li et al., 2005) und von CD11b als Marker für Kupffer-Zellen (s.o.) bestimmt. Abbildung 2.11 zeigt die Ergebnisse der qPCR: Die HBV-rcDNA-spezifische qPCR ergibt eine in den CD11b-positiven Zellen etwa 12-mal so hohe HBV-rcDNA-Konzentration relativ zu NID2 wie in den Hepatozyten (Abb. 2.11 A). Die CD11b- bzw. albuminspezifische qPCR zeigt bei den CD11b-positiven Zellen eine deutliche Expression von CD11b, jedoch eine nur geringe Albuminexpression relativ zu GAPDH, während bei den Hepatozyten eine deutliche Expression von Albumin und nahezu keine Expression von CD11b relativ zu GAPDH detektierbar war (Abb. 2.11 B).

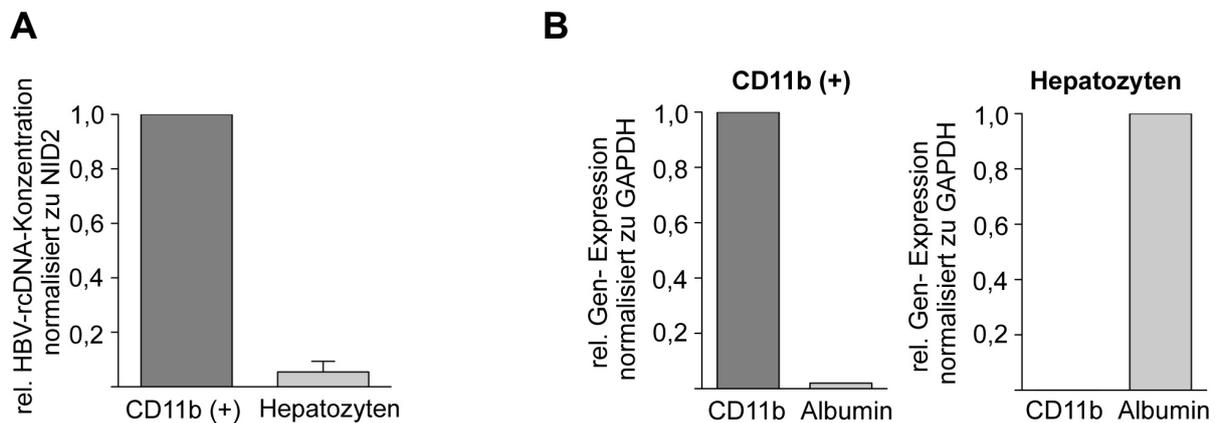


Abbildung 2.11: RT-PCR-Analyse muriner Leberzellen nach der Injektion nativer VP

In drei Mäuse wurden i.v. je 1×10^9 Virionen (zweimal aufgereinigt aus Patientenplasma, einmal aufgereinigt aus Zellkulturüberstand von HepG2.2.15-Zellen), in 200 μ l PBS gelöst, injiziert. Nach 45 min wurde die Leber durch Perfusion mit PBS gewaschen und nach einer Zwei-Schritt Collagenaseperfusion, Zentrifugationsschritten und Zellisolierung mittels CD11b-spezifischer Antikörper CD11b-positive Zellen und CD11b-negative Hepatozyten isoliert. Anschließend wurde die zelluläre DNA und RNA aufgereinigt und aus letzterer cDNA hergestellt. Die DNA wurde in einer qPCR mit HBV-rcDNA- und NID2-spezifischen Primern und die cDNA in einer qPCR mit CD11b-, Albumin- und GAPDH-spezifischen Primern analysiert. In (A) sind die Ergebnisse der HBV-rcDNA-spezifischen qPCR der isolierten Leberzellen aus drei Mäusen als relative Konzentrationen normalisiert zu NID2 angegeben. In (B) sind die Ergebnisse der CD11b- bzw. albuminspezifischen qPCR der isolierten Leberzellen aus einer Maus als relative Konzentrationen der Gene normalisiert zu GAPDH angegeben. Ergebnisse sind Durchschnittswerte dreier Zellisolationen \pm SD in (A). rel.: relativ

2.2.6 Analyse der HBV-Lipoproteinassoziation in serum- und plasmahaltigen Lösungen

Die Ergebnisse der Elektronenmikroskopieuntersuchungen in 2.2.3 zeigen, dass HBV möglicherweise während der Zirkulation im serumhaltigen Perfusionsmedium mit TRL assoziierte.

Im Folgenden wurde zunächst untersucht, ob im Plasma von HBV-positiven Patienten HBV geringer Dichte vorliegt bzw. in serumfreien Lösungen aufgereinigter Virionen nach Zugabe von humanem Serum gebildet wird. Aufgrund der geringen Dichte der meisten Lipoproteine (vgl. Tab. 1), sollte ihre Assoziation mit HBV zu einer Verringerung der Dichte führen, in der die Viren nach Ultrazentrifugation banden.

Patientenplasma wurde mittels einer Saccharose-Dichtegradientenultrazentrifugation aufgetrennt, fraktioniert und mittels Refraktometrie die durchschnittlichen Dichten der einzelnen Fraktionen bestimmt. Zusätzlich wurden die Fraktionen mittels HBV-spezifischer DNA Dot-Blot-Analyse untersucht (Abb. 2.12 A). In Fraktionen höherer Dichte (Fr. 3 bis 6, insbesondere Fr. 3 mit 1,21 g/ml mittlerer Dichte), lassen sich die höchsten Konzentrationen von HBV-DNA nachweisen (22,4 bis 7,8 ng/ml). In Fraktionen geringerer Dichte (Fr. 17 bis 26) lässt sich (auch bei einem achtfach höheren Auftragsvolumens von 200 µl) nur in Fraktion 26 (<1,011 g/ml) HBV-DNA detektieren (3,7 ng/ml). Zusätzlich wurde eine relative Quantifizierung der HBV-DNA-Konzentrationen der einzelnen Fraktionen mittels HBV-DNA-spezifischer qPCR vorgenommen (Abb. 2.12 C). Die höchste HBV-Konzentration ist in Fraktion drei erkennbar, während die Werte bis Fraktion acht konstant abnehmen und bis Fraktion 22 keine signifikante Veränderung detektierbar ist. Ab Fraktion 23 bis 26 hingegen sind zwei aufeinander folgende, signifikante Erhöhungen der HBV-DNA-Konzentration mit Höchstwerten in Fraktion 24 und 26 erkennbar. Eine vergleichbare Tendenz für die Fraktionen 24 bis 26 lässt sich auch mit HBsAg-spezifischem ELISA feststellen (Abb. 2.12 B).

Erklärt man die mittels Dot-Blot- bzw. qPCR-Analyse detektierten, erhöhten HBV-DNA-Konzentrationen in den Fraktionen geringer Dichte (Fr. 26, Dot Blot; Fr. 23, 24 und 26, qPCR) mit der Assoziation von dichteren Virionen mit weniger dichten Lipoproteinen und vernachlässigt man näherungsweise die Konzentration der nicht lipoproteinassoziierten Virionen in den Fraktionen 23, 24 und 26, so ergibt sich (nach Aufsummierung der HBV-DNA geringerer Dichte und Division durch die Gesamt-HBV-DNA des Gradienten) von allen im HBV-positiven Plasma befindlichen Virionen ein Anteil der mit Lipoproteinen geringerer Dichte assoziierten Virionen von 7,5% (Dot-Blot-Analyse) bzw. 11,4% (qPCR).

Nimmt man bei der Assoziation von Viren und Lipoproteinen eine Oberflächenanlagerung und näherungsweise eine kugelsymmetrische Form beider Komponenten an, so ergeben sich aus den gemessenen mittleren Dichten der HBV-

positiven Fraktionen 23 bis 26 und einer angenommenen Lipoproteindichte entsprechend der TRL von 0,96 bzw. 1,006 g/ml gemäß der Formel in 4.2.1.3 (bei mindestens einem assoziierten Virion pro Lipoprotein) Mindestdurchmesser der assoziierten Lipoproteine zwischen 59,0 und 157,3 nm (s. Tab. 3).

In einem zweiten Ansatz wurden in PBS gelöste aufgereinigte HBV nach Präinkubation entweder ohne oder mit humanem Serum (30 min, 37°C, 10% finale Serumkonzentration) mittels Saccharose-Dichtegradientenultrazentrifugation aufgetrennt, fraktioniert, die durchschnittliche Dichten der einzelnen Fraktionen refraktometrisch bestimmt und diese mittels HBV-spezifischer DNA Dot-Blot-Analyse untersucht (Abb. 2.12 D). Die höchste HBV-Konzentration ist bei beiden Gradienten in Fraktionen hoher Dichte (Fr. 1 und 2) erkennbar. Im Vergleich zu der nicht mit humanem Serum präinkubierten Probe lässt sich mittels DNA Dot-Blot-Analyse jedoch nur bei der mit Serum behandelten Probe HBV-DNA in der Fraktion geringster Dichte (1,032 g/ml) detektieren. Das Verhältnis der DNA-Menge in Fraktion 5 zur Gesamtmenge an DNA beträgt hier 4,6%.

Eine weitere Möglichkeit, die Assoziation von Viren mit ApoB-haltigen Lipoproteinen im Blut von Patienten zu untersuchen ist die Analyse des Plasmas mittels eines ApoB_{48/100}- und HBsAg-spezifischen ELISA. Hierzu wurde der Boden von ELISA-Gefäßen mit ApoB- bzw. HNF3beta-spezifischen Antikörper benetzt und nach Inkubation mit dem Plasma HBV-positiver Patienten Peroxidase-gekoppelter HBsAg-spezifischer Detektionsantikörper zugegeben. Man erkennt, dass lediglich die mit ApoB-spezifischen Antikörpern benetzten Gefäße mit steigender HBV-Konzentration der Proben zunehmend positiv für HBsAg wurden (Abb. 2.12 E).

Tabelle 3: Mindestdurchmesser der HBV-assozierten Lipoproteine

Aus der jeweiligen Dichte der Fr. 23-26, des HBV (1,22 g/ml) und der TRL (0,96 g/ml für Chylomikronen bzw. 1,006 g/ml für VLDL) wurde mittels der Formel in 4.2.1.3 der Mindestdurchmesser der HBV-assozierten Lipoproteine bestimmt. Dargestellt sind die Werte für die einzelnen Fraktionen 23-26.

Fr.	Lipoproteindurchmesser (Dichte TRL: 0,96 g/ml) [nm]	Lipoproteindurchmesser (Dichte TRL: 1,006 g/ml) [nm]
23	59,0	85,1
24	63,2	104,6
25	67,2	145,8
26	67,8	157,3

repräsentativen Dichtegradienten in (A) und aller Gradientenfraktionen (je 75 µl Auftrag der Fraktionen 1+2, und 700 µl Auftrag der Fraktionen 3-5) in (D). In (A) sind die aus den 25 µl Probenaufträgen bestimmten HBV-DNA-Konzentrationen unterhalb des Blots angegeben. Unterhalb der einzelnen Fraktionen sind zudem für jede (D) bzw. jede zweite (A) Fraktion deren mittlere Dichte dargestellt. In (D) ist zusätzlich der HBV-DNA-Standard für (A) und (D) gezeigt. Diagramm in (C) gibt die mittels qPCR-bestimmten, zu Fraktion 3 relativen HBV-DNA-Konzentrationen aller Fraktionen und (B) die Ergebnisse des HBsAg-ELISA der Fraktionen 24-26 an. In (E) wurden verschiedene Konzentrationen des HBV-positiven Plasmas in mit ApoB_{48/100}- bzw. HNF3beta- spezifischen Antikörpern (beide polyklonal aus Ziege) benetzten ELISA-Gefäßen inkubiert und nach mehrmaligem Waschen das HBsAg mit Peroxidase gekoppelten HBsAg-spezifischen Antikörpern und Substrat quantifiziert. Negativ gibt den Wert für HBsAg-negativen ELISA-Probenpuffer an. Ergebnisse in (B, C) sind Durchschnittswerte dreier bzw. in (E) vierer unabhängiger Replikate ± SD. ***P<0,001. Fr.: Fraktion.

2.2.7 Pulse-Chase-Perfusion des humanen Lebergewebes (17h)

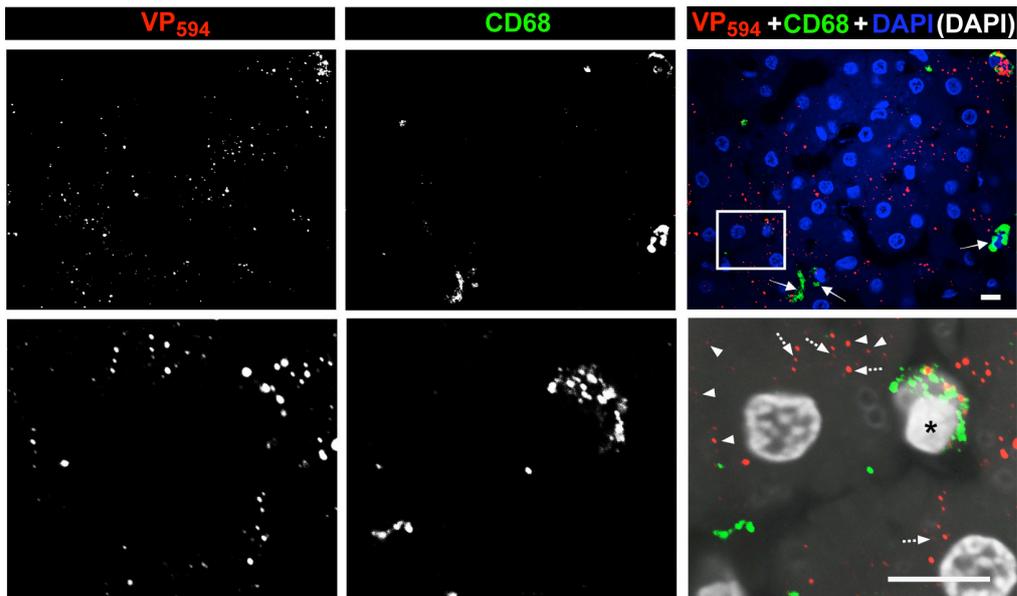
Die Untersuchungen des humanen Lebergewebes nach 45-minütiger Perfusion mit VP ergaben, dass VP₅₉₄ und HBV initial von Kupffer-Zellen aus der Zirkulation entzogen werden (vgl. 2.2.2, 2.2.3). Im folgenden sollte untersucht werden, ob bei verlängerter Perfusion VP von den Kupffer-Zellen in die Hepatozyten weitertransportiert werden. Um den VP-Transport zeitlich verfolgen zu können, wurde die Perfusion im Sinne eines Pulse-Chase-Experimentes durchgeführt. Dazu wurde zunächst analog zu 2.2.2 das Lebergewebe für 45 Minuten mit VP₅₉₄-haltigem Medium perfundiert (Pulse), anschließend mit VP-freiem Medium gewaschen und für weitere 16h mit VP-freiem Medium perfundiert (Chase). Abschließend wurde das Gewebe erneut gewaschen, danach fixiert und nach Anfertigung von Gewebeschnitten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Abbildung 2.13 A zeigt einen Mikroskopausschnitt, in dem die Kupffer-Zellen durch CD68-spezifische Antikörper markiert wurden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen nach 45-minütiger Perfusion ließen sich VP₅₉₄ in großem Umfang in CD68-negativen Zellen nachweisen, während viele CD68-positive Zellen keine oder nur eine geringe Anreicherung von VP₅₉₄ zeigten (in der Abbildung durch Pfeile markiert). Die vergrößerte Darstellung des im Mikroskopausschnitt markierten Bereiches zeigt VP₅₉₄ teilweise in einer CD68-positiven Zelle, im großen Maße jedoch in umliegenden CD68-negativen Zellen lokalisiert. Hier markieren Pfeilspitzen entlang der äußeren Zellbegrenzung und gestrichelte Pfeile von der Zellperipherie ins Zellinnere verlaufende VP₅₉₄-positive Strukturen. Die statistische Auswertung von zehn zufällig ausgewählten Mikroskopausschnitten ergab, dass ungefähr 50% der CD68-positiven und 40% der CD68-negativen Zellen positiv für VP₅₉₄ sind (Abb. 2.13 D). Es ließen sich auch wenige Bereiche finden, in denen (vergleichbar mit den

Ergebnissen für 45-minütige Perfusion) alle Kupffer-Zellen positiv waren, jedoch die CD68-negativen Zellen keine Anhäufung von VP₅₉₄ zeigten (Abb. 2.13 B).

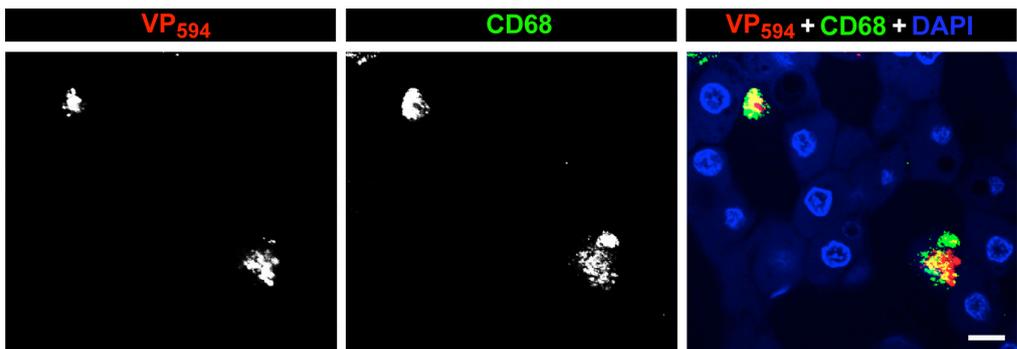
Im Folgenden wurde untersucht, ob es sich bei den CD68-negativen, VP₅₉₄-positiven Zellen um Hepatozyten handelte. Abbildung 2.13 C zeigt einen Mikroskopausschnitt, in dem ein Hepatozyt durch HepPar1-spezifische Antikörper markiert wurde. Sowohl bei Aufnahme in der x-y-Ebene als auch bei y-z-Projektion einer z-Stapelaufnahme ist eine Anreicherung von VP₅₉₄ innerhalb HepPar1-positiver Bereiche erkennbar. Die statistische Auswertung von zehn zufällig ausgewählten Mikroskopausschnitten ergab, dass nach 16h knapp 40% der Hepatozyten positiv für VP₅₉₄ sind (Abb. 2.13 D).

Wurden analog 2.2.4 VP₅₉₄ intravenös in eine Maus injiziert, das Lebergewebe nach 18h fixiert und nach Anfertigung von Gewebeschnitten mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert, konnten im Gegensatz zum humanen Gewebe keine VP₅₉₄ detektiert werden (Abb. 2.13 E).

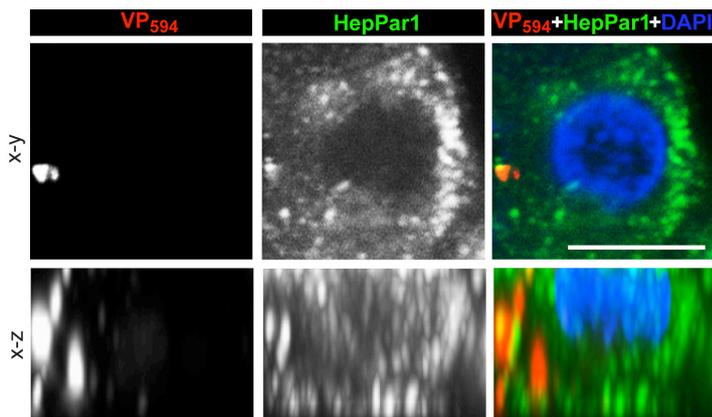
A



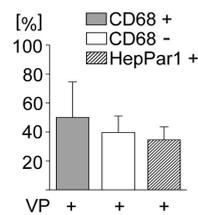
B



C



D



E

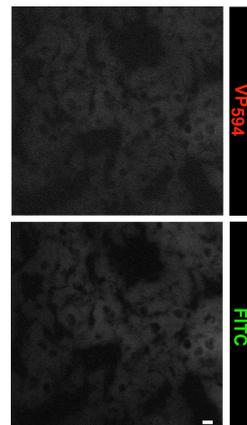


Abbildung 2.13: Immunfluoreszenzanalyse des Lebergewebes nach 45-minütiger Perfusion mit VP₅₉₄-haltigem Medium gefolgt von 16h Perfusion mit VP-freiem Medium

Humanes Lebergewebe wurde für 45 min mit 5×10^{12} VP₅₉₄- und 50% humanem Serum- enthaltendem Medium bei 37°C perfundiert. Danach wurde das Gewebe durch Perfusion mit VP₅₉₄-freiem Medium gewaschen und für weitere 16h mit serumhaltigem, jedoch VP₅₉₄-freiem Medium perfundiert. Nach erneutem Waschen wurde das Gewebe mit 4% PFA-haltigem Puffer fixiert und nach Anfertigung von Gewebeschnitten einzelne Schnitte zunächst mit CD68- (A, B) bzw. HepPar1- (C) spezifischen Antikörpern aus Maus und nachfolgend mit einem Alexa Fluor® 647-gekoppelten Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus inkubiert. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mittels konfokaler

Laserscanning-Mikroskopie analysiert. In (A-C) sind die separaten Fluoreszenzkanäle repräsentativer Mikroskopausschnitte sowie die Überlagerungen der Kanäle, in denen zusätzlich die Zellkernfärbungen mit DAPI gezeigt sind, dargestellt. Zur besseren Kontrastdarstellung ist die DAPI-Färbung in dem vergrößerten Ausschnitt des in der Überlagerung markierten Bereiches in (A) in Weiß abgebildet. In (C) ist zusätzlich die x-z-Projektion der einzelnen und der überlagerten Fluoreszenzkanäle (mit DAPI) einer z-Stapel-Aufnahme dargestellt. Die Größenstandards entsprechen 10 µm. (D) zeigt die statistische Auswertung von 10 zufällig aufgenommenen Mikroskopausschnitten. In (E) ist ein repräsentativer Mikroskopausschnitt eines mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysierten murinen Lebergewebes gezeigt, welches 18h nach Injektion von 2×10^{11} VP₅₉₄ i.v. in eine C57BL/6 Maus (vgl. 2.2.4) mit 4% PFA-haltigem Puffer fixiert worden war. Dargestellt ist der Fluoreszenzkanal für Alexa Fluor[®] 594 sowie für FITC als Kontrolle.

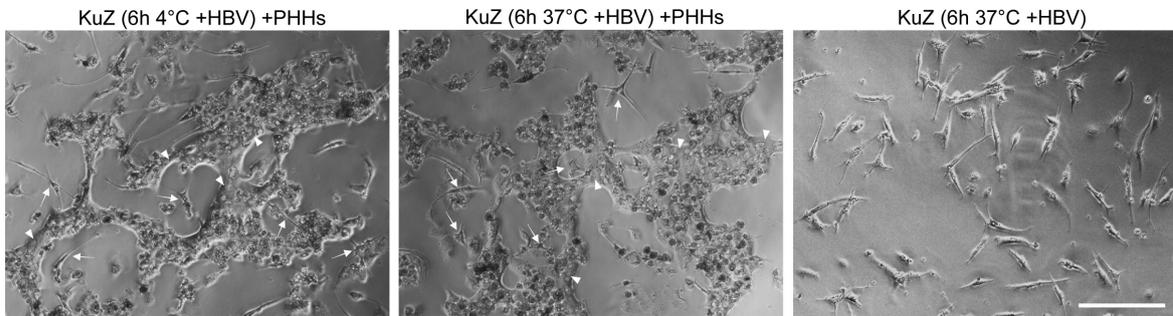
2.2.8 HBV-Trans-Infektion von PHH durch Kupffer-Zellen *in vitro*

Im Folgenden sollte in Mischkulturen von humanen Hepatozyten und Kupffer-Zellen überprüft werden, ob die initiale Aufnahme von HBV in die Kupffer-Zellen zu einer produktiven Infektion der Wirtszelle führt. Hierzu wurden Kupffer-Zellen nach einem in Zusammenarbeit mit Mathias Broxtermann entwickelten Protokoll (verwendet in: (Ebert et al., 2011; Hosel et al., 2011)) isoliert und für 6h mit HBV-haltigem Medium bei entweder 4° oder 37°C inkubiert. Nach intensivem Waschen wurden die PHH zu den Zellen ausgesät und verschiedene Infektionsmarker über einen Zeitraum von 12 Tagen gemessen. Als Kontrolle dienten einzelne mit HBV bei 37°C inkubierten Kupffer-Zell-Kulturen, zu denen keine PHH ausgesät worden waren. Abbildung 2.14 A zeigt zwei Phasenkontrastaufnahmen der Mischkulturen und eine der reinen Kupffer-Zell-Kulturen. Die Pfeile in den Mischkulturen zeigen auf einzelne Kupffer-Zellen, während die Pfeilspitzen Beispiele für PHH markieren. In Abbildung 2.14 B ist die Nahaufnahme einer Kupffer-Zelle zu sehen (s. Pfeil) die von PHH umgeben ist. Im Gegensatz zu den PHH zeigt die Kupffer-Zelle eine deutliche Aufnahme von Alexa Fluor[®] 488-markiertem acLDL. Auffällig ist eine ungefähr 10 µm lange interzelluläre Verbindung zwischen Kupffer-Zelle und Hepatozyt (s. Pfeilspitze). In Abbildung 2.14 C und D sind die Ergebnisse der HBeAg- und HBsAg-Messungen eines repräsentativen Experimentes und die gemittelten, relativen Werte der zellulären cccDNA-Konzentrationen zweier Experimente dargestellt. Man erkennt, dass nur bei der Mischkultur mit Kupffer-Zellen, die bei 37°C mit HBV-haltigem Medium inkubiert worden waren, es zu einem deutlichen Anstieg von HBeAg bzw. HBsAg bis zu Tag 12 kommt. Die durchschnittliche cccDNA-Konzentrationen der Mischkulturen, deren Kupffer-Zellen bei 37°C mit HBV inkubiert worden waren, beträgt an Tag 12 ungefähr das Dreifache der Mischkulturen, deren Kupffer-Zellen bei 4°C mit HBV inkubiert worden waren. Reine Kupffer-Zell-Kulturen konnten nicht mit HBV infiziert werden (Abb. 2.14 D). Demnach werden die bei 37°C in die Kupffer-

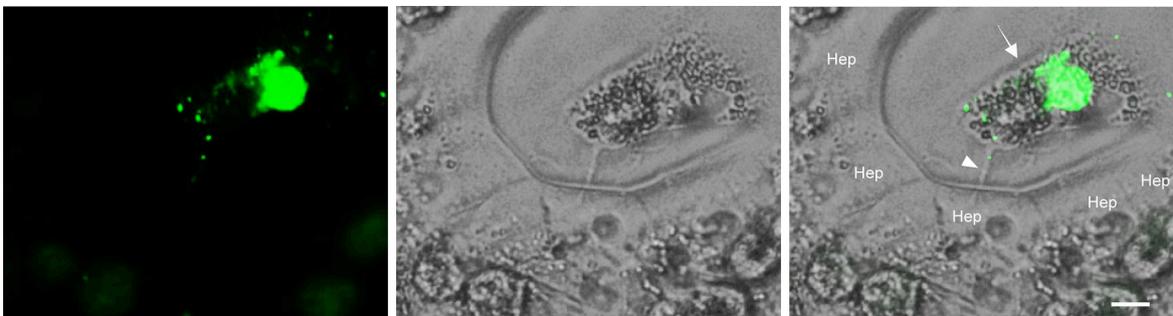
Ergebnisse

Zellen aufgenommenen HBV an die Hepatozyten weitergegeben und infizieren diese produktiv.

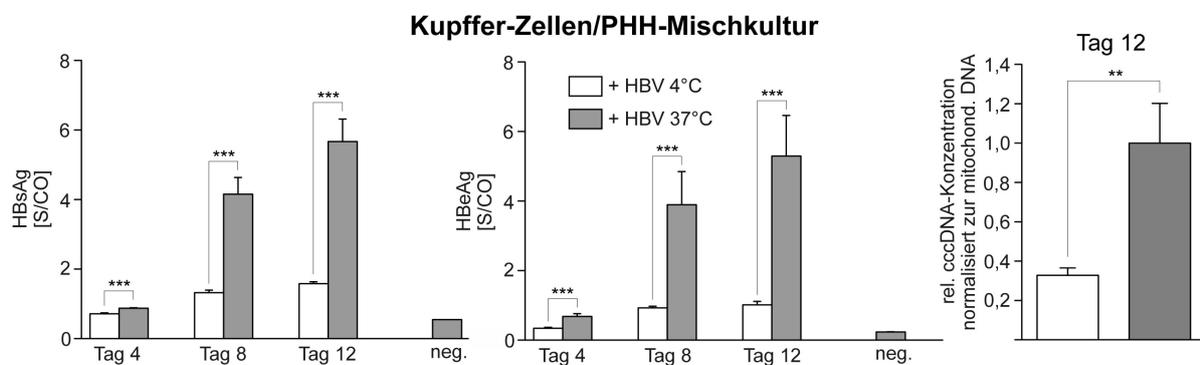
A



B



C



D

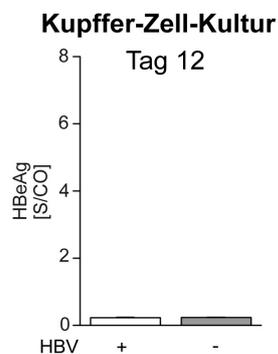


Abbildung 2.14: Trans-Infektion von PHH durch Kupfer-Zellen mit HBV *in vitro*

PHH und humane Kupfer-Zellen wurden nach einer Zwei-Schritt Collagenaseperfusion des Lebergewebes mit anschließenden Zentrifugationsschritten und Adhärenz isoliert und die Kupfer-

Zellen bei 4° bzw. 37°C für 6h mit HBV-haltigem Medium (1×10^8 /ml) inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurden PHH zu einzelnen Kupffer-Zell-Kulturen gesät und die Mischkulturen und reinen Kupffer-Zell-Kulturen für 12 Tage kultiviert. In (A) sind zwei Phasenkontrastaufnahmen der Mischkulturen gezeigt, deren Kupffer-Zellen bei 4°C bzw. bei 37°C mit HBV-haltigem Medium inkubiert wurden und einer reinen Kupffer-Zell-Kultur ohne PHH, die ebenfalls bei 37°C mit HBV-haltigem Medium kultiviert wurde. (B) zeigt den Bildausschnitt einer Mischkultur nach 6h Inkubation mit 4 µg/ml Alexa Fluor® 488-gekoppelten acLDL. Dargestellt sind eine Fluoreszenz- und eine Phasenkontrastaufnahme sowie die Überlagerungen beider Bilder. Pfeile zeigen auf einzelne Kupffer-Zellen (A, B) und Pfeilspitze(n) markieren beispielhaft PHH (A) bzw. eine Interzellulärverbindung in (B). Größenstandard in (A) entspricht 100 µm und 10 µm in (B). (C, D) zeigen die Ergebnisse des HBsAg- bzw. HBeAg-spezifischen MEIA der Zellkulturüberstände eines repräsentativen Experimentes mit 4 unabhängigen Replikaten an Tag 4, 8 (C) und 12 (C, D) der Misch- (C) bzw. der reinen Kupffer-Zell-Kulturen (D). In (C) sind zusätzlich aus zwei Experimenten mit jeweils 3 unabhängigen Replikaten die mittels qPCR ermittelten relativen cccDNA-Konzentrationen normalisiert zur mitochondrialen DNA dargestellt. Werte sind \pm SD bzw. \pm SEM (qPCR), ***P<0,001, **p<0,01. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Xiaoming Cheng durchgeführt. rel.: relativ; Hep: Hepatozyt; KuZ: Kupffer-Zellen

2.3 Charakterisierung des HBV-Transportmechanismus in Kupffer-Zellen

Die in 2.1 durchgeführten Lebergewebisperfusions-Experimente mit VP ergaben eine initiale Rolle der Kupffer-Zellen beim Erreichen der Wirtszelle durch HBV. Darauf aufbauend sollte in kultivierten Makrophagen der Transportmechanismus untersucht werden, der nach Aufnahme in die Kupffer-Zellen die Weitergabe der VP in die Hepatozyten vermittelt. Hierbei wurde ein Vergleich zum intrazellulären Transport der aus den endozytierten Lipoproteinen stammenden freien Cholesterole vorgenommen.

2.3.1 Charakterisierung der VP₅₉₄-enthaltenden Kompartimente

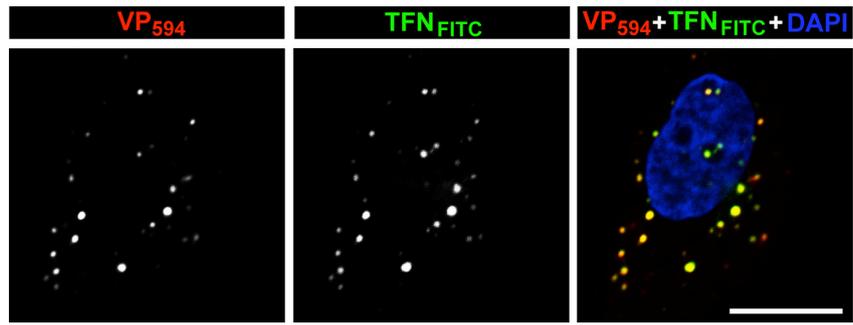
Zunächst sollte untersucht werden, ob die VP in Kupffer-Zellen in Kompartimenten konzentrieren, die eine Rezirkulierung ihrer Komponenten vermitteln. Dies ist z.B. für Transferrin beschrieben (Maxfield und McGraw, 2004; Mellman, 1996). Hierzu wurden primäre Kupffer-Zellen für 1h mit Medium inkubiert, dem VP₅₉₄- und FITC-gekoppeltes Transferrin zugegeben waren. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, für 1h mit VP- und Transferrin-freiem Medium kultiviert und fixiert. Danach wurden die Kulturen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Wie in Abbildung 2.15 A dargestellt, kolokalisieren die Fluoreszenzsignale der VP₅₉₄ mit denen des Transferrin_{FITC}.

Anschließend wurden die Kompartimente, in denen die VP in Kupffer-Zellen akkumulierten, auf gemeinsame Charakteristika mit den Kompartimenten, in denen aus Lipoproteinen stammende freie Cholesterole konzentrieren, untersucht.

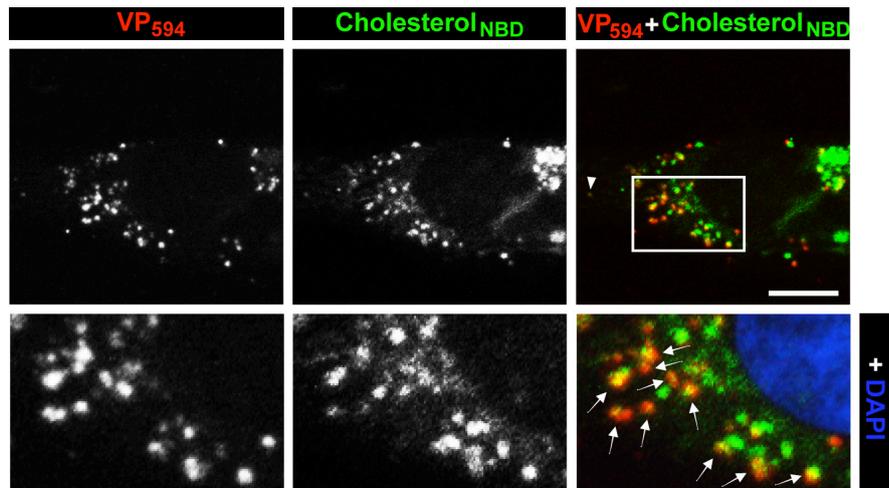
In einem ersten Versuch wurde die Lokalisation der VP₅₉₄ mit der aus TRL-stammenden Nitrobenzoxadiazole (NBD)-markierten Cholesterolen in Kupffer-Zellen verglichen. Hierzu wurden aufgereinigte TRL mit NBD-gekoppelten freien Cholesterolen beladen und zusammen mit VP₅₉₄ in serumhaltigem Medium für 1h auf isolierte Kupffer-Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, 2h mit Medium ohne VP₅₉₄ bzw. NBD-Cholesterolen beladenen TRL kultiviert, fixiert und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Wie in Abbildung 2.15 B dargestellt, kolokalisieren die Fluoreszenzsignale der NBD-Cholesterole mit denen der VP₅₉₄ sowohl in perinukleären Bereichen (s. Pfeile, vergrößerter Ausschnitt) als auch in der Peripherie (s. Pfeilspitze, Übersicht).

Freie Cholesterole endozytierter Lipoproteine akkumulieren in Kompartimenten, in die aus HDL stammendes ApoA1 nach zellulärer Lipoproteinaufnahme transportiert wird (Heeren et al., 2003). In kultivierten humanen Kupffer-Zellen wurde untersucht, ob in Gegenwart von humanem Serum VP₅₉₄-haltige Kompartimente positiv für ApoA1 sind und im serumfreien Medium die Proteinkomponenten der HDL in diese hinein transportiert werden. Isolierte Kupffer-Zellen wurden 1h mit VP₅₉₄-haltigem Medium inkubiert, dem entweder humanes Serum oder keine weiteren Zusätze beigefügt waren. Die mit Serum inkubierten Zellen wurden anschließend fixiert und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 2.15 C), während die Zellen in serumfreiem Medium vorher gewaschen und 1h mit HDL, deren Proteine mit dem Fluorophor Alexa Fluor[®] 488 gekoppelt worden waren, inkubiert wurden (Abb. 2.15 D). Abbildung 2.15 C zeigt einen Mikroskopausschnitt, in dem ApoA1 durch spezifische Antikörper markiert wurde. Man erkennt, dass die Fluoreszenzsignale der VP₅₉₄ mit denen der ApoA1-Markierung kolokalisieren (s. Pfeile). In dem in Abbildung 2.15 D dargestellten Mikroskopausschnitt kolokalisieren einige der Fluoreszenzsignale der VP₅₉₄ und HDL₄₈₈ (s. Pfeile).

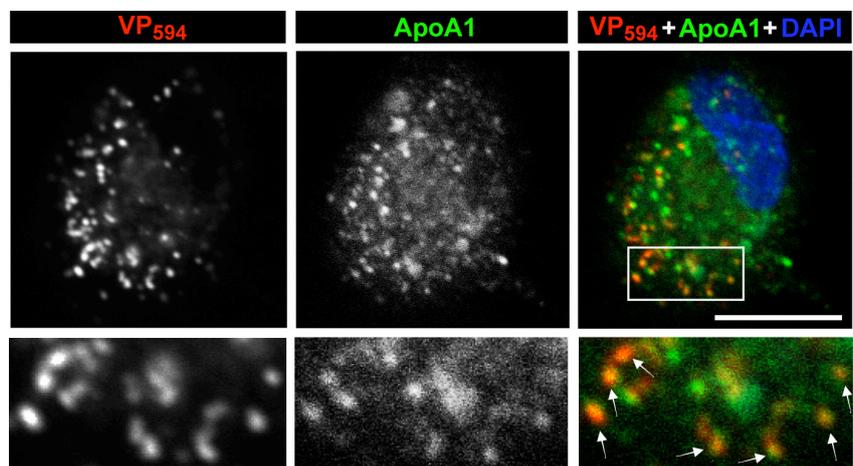
A



B



C



D

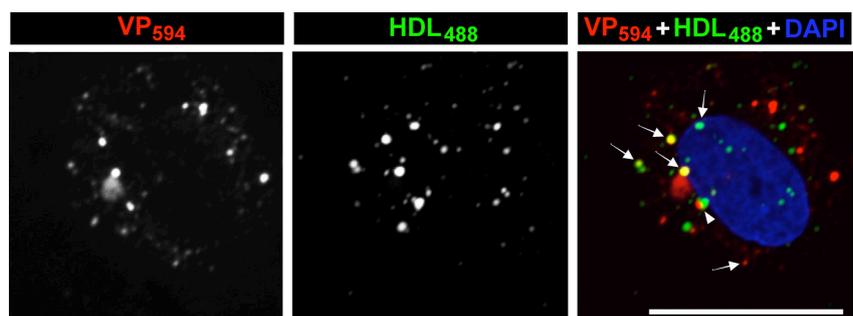


Abbildung 2.15: Charakterisierung der VP₅₉₄-positiven Kompartimente in Kupffer-Zellen

(A-C) Humane Kupffer-Zellen wurden mit VP₅₉₄-haltigem Medium (1x10¹¹/ml), ohne (A, D) oder mit (B, C) humanem Serum versetzt, für 1h bei 37°C inkubiert. In (A) waren dem Medium zusätzlich 10 µg/ml Transferrin_{FITC}- und in (B) zusätzlich 1 µg/ml mit NBD-Cholesterolen beladene TRL beigefügt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und entweder mit 4% PFA-haltigem Puffer fixiert (C) oder vor Fixierung für 2h mit serumhaltigen (B) oder 1h mit serumfreien (A, + 2 µg/ml HDL₄₈₈ in D) Medium inkubiert. Zellen in (C) wurden mit ApoA1-spezifischen Antikörpern aus Kaninchen gefolgt von einem Alexa Fluor® 488-gekoppelten Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen inkubiert. Schließlich wurden die Zellen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Dargestellt sind die separaten Fluoreszenzkanäle repräsentativer Mikroskopausschnitte sowie die Überlagerungen der Kanäle, in denen zusätzlich (in (A) nur Ausschnitt) die Zellkernfärbung mit DAPI gezeigt ist. Der in der Überlagerung mit weißem Rahmen markierte Bereich in (A-C) ist unter den Mikroskopausschnitten vergrößert dargestellt. Pfeile zeigen auf kolokalisierende Fluoreszenzsignale. Die Größenstandards entsprechen 10 µm.

Zur weiteren Charakterisierung der zellulären Kompartimente in denen HBV in Makrophagen akkumuliert, wurden Versuche in aus primären humanen Monozyten differenzierten Makrophagen durchgeführt.

Es ist bekannt, dass freie Cholesterole endozytierter LDL in NPC1-positiven Kompartimenten konzentrieren (Sugii et al., 2003; Wojtanik und Liscum, 2003). Um die Lokalisation der VP in NPC1- und freie Cholesterole-positiven Kompartimenten zu prüfen, wurden Makrophagen zunächst mittels 24-stündiger Kultivierung mit acLDL-haltigem Medium lipoproteinbeladen und anschließend für 2h mit VP₅₉₄-haltigem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 4h mit acLDL-haltigem, VP₅₉₄-freiem Medium kultiviert, fixiert und NPC1 mit spezifischen Antikörpern und freie Cholesterole mit Filipin markiert. Danach wurde die Lokalisation der VP₅₉₄- und der NPC1- bzw. freien Cholesterole enthaltenden Kompartimente mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Abbildungen 2.16 A und B zeigen zwei Mikroskopausschnitte einer (Immun-)Fluoreszenzanalyse. Der in den Mikroskopausschnitten markierte Bereich ist vergrößert dargestellt. Man erkennt, dass die Fluoreszenzsignale der VP₅₉₄- und der NPC1- bzw. der Filipin-Markierung kolokalisieren (s. Pfeile).

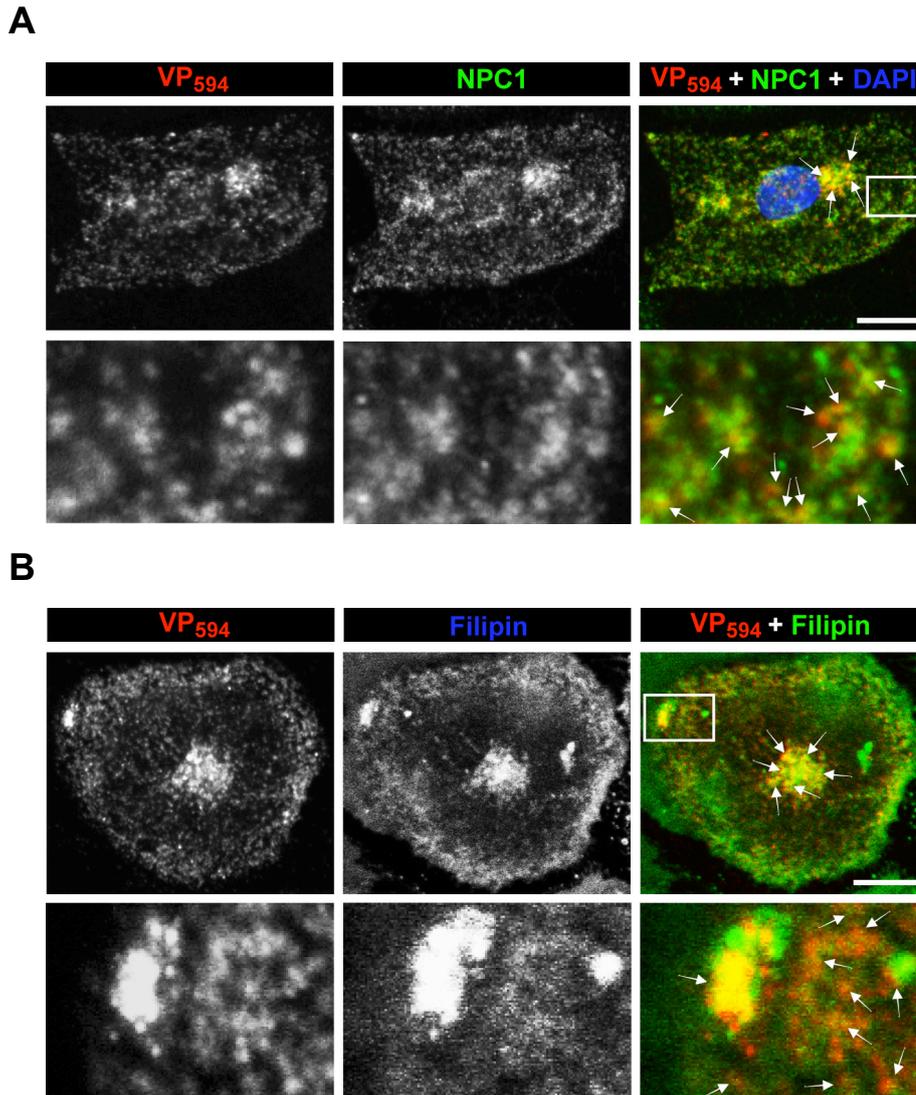


Abbildung 2.16: Charakterisierung der VP₅₉₄-positiven Kompartimente in aus Monozyten differenzierten Makrophagen

Humane aus Monozyten differenzierte Makrophagen wurden 24h mit 50 µg/ml acLDL- und anschließend für 2h mit VP₅₉₄-haltigem Medium (1×10^{11} /ml) inkubiert. Nach intensivem Waschen wurde für weitere 4h mit acLDL-haltigem Medium inkubiert und anschließend mit 4% PFA-haltigem Puffer fixiert. Zellen wurden mit NPC1-spezifischen Antikörpern aus Maus gefolgt von einem Alexa Fluor® 488-gekoppelten Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus (A) oder mit Filipin (B) inkubiert. Schließlich wurden die Zellen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Dargestellt sind die separaten Fluoreszenzkanäle repräsentativer Mikroskopausschnitte sowie die Überlagerungen der Kanäle, in denen zusätzlich in (A) die Zellkernfärbung mit DAPI gezeigt ist. Die in den Überlagerungen mit weißem Rahmen markierten Bereiche sind unter den Mikroskopausschnitten vergrößert dargestellt. Pfeile zeigen auf Beispiele kolokalisierender Fluoreszenzsignale. Die Größenstandards entsprechen 10 µm. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Xiaoming Cheng durchgeführt.

2.3.2 Effekt von U18666a auf den Transport freier Cholesterole und VP₅₉₄ in Makrophagen

U18666a bewirkt in Zellen, inklusive Makrophagen, eine Akkumulation von freien Cholesterolen endozytierter Lipoproteine in perinukleären Kompartimenten (Delton-Vandenbroucke et al., 2007; Ko et al., 2001; Liscum und Faust, 1989). Im folgenden

Pulse-Chase-Experiment sollte der Effekt von U18666a auf die Verteilung von freien Cholesterolen und VP₅₉₄ in Makrophagen untersucht werden.

Aus humanen Monozyten differenzierte Makrophagen wurden entweder mit oder ohne U18666a für 24h mit acLDL-haltigem Medium Lipoprotein beladen und anschließend für 2h mit VP₅₉₄-haltigem Medium, mit oder ohne U18666a versetzt, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 16h mit acLDL-haltigem und VP₅₉₄-freiem Medium, mit oder ohne U18666a versetzt, kultiviert, fixiert und die zelluläre Verteilung der VP₅₉₄ und der freien Cholesterole analysiert. Hierzu wurden die freien Cholesterole mit Filipin fluoreszenzmarkiert und die mittlere perinukleäre und periphere Fluoreszenzintensität der VP₅₉₄ und des Filipins, wie in Abbildung 2.17 A dargestellt, bestimmt. Da die mittlere Fluoreszenzintensität multipliziert mit der Fläche proportional zu der Anzahl der jeweiligen Fluorophore und damit der VP₅₉₄ bzw. Cholesterole in dieser Fläche ist, gibt der Quotient aus perinukleärer und peripherer Fluoreszenzintensität, die mit der jeweiligen Fläche multipliziert wurde, das Verhältnis aus perinukleärer zu peripherer Anzahl der VP₅₉₄ bzw. Cholesterole wieder. Abbildung 2.17 B zeigt die statistische Auswertung des Experimentes. U18666a bewirkt sowohl bei Filipin als auch bei VP₅₉₄ eine Erhöhung der aus der Multiplikation von perinukleärer Fluoreszenzintensität und Fläche erhaltenden Werten verglichen zu den für die Peripherie ermittelten Werte. Demnach führt die Behandlung der Makrophagen mit U18666a zu einer signifikanten perinukleären Konzentrierung von VP₅₉₄ und freien Cholesterolen.

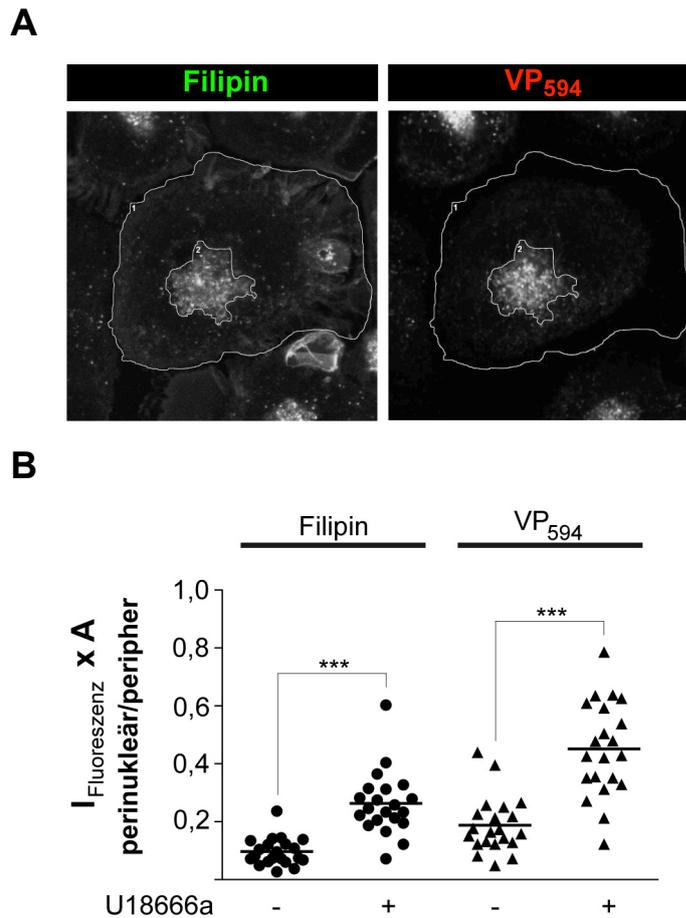


Abbildung 2.17: Effekt von U18666a auf die freie Cholesterole- und VP₅₉₄-Verteilung in Makrophagen

Humane, aus Monozyten differenzierte Makrophagen wurden 24h mit 50 µg/ml acLDL-haltigem Medium, mit oder ohne 5 µM U18666a versetzt, kultiviert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für 2h mit VP₅₉₄-haltigem Medium (1x10¹¹ VP, mit oder ohne U18666a) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde für weitere 16h mit acLDL-haltigem und VP₅₉₄-freiem Medium (mit oder ohne U18666a) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, mit 4% PFA-haltigem Puffer fixiert und mit Filipin inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert und die perinukleären und peripheren Begrenzungen, wie in (A) am Beispiel einer mit U18666a behandelten Zelle dargestellt, festgelegt: Der innere Kreis zeigt die Begrenzung für den perinukleären, der äußere Kreis die Begrenzung für den peripheren Bereich an. In (B) sind die durchschnittlichen Werte für die perinukleären und peripheren Fluoreszenzintensitäten multipliziert mit der jeweiligen Fläche von 42 analysierten Zellen aus einem repräsentativen Versuch gezeigt. ***P<0,001; I: Intensität; A: Fläche. Der Versuch mit Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit Xiaoming Cheng durchgeführt.

2.3.3 Analyse der Cholesterol- und HBV-Resektion aus Makrophagen

Serum bzw. Serumbestandteile wie ApoA1 und HDL induzieren in Makrophagen den Efflux von freien Cholesterolen endozytierter Lipoproteine (Wang und Tall, 2003; Yancey et al., 2003). In den folgenden Pulse-Chase-Experimenten sollte untersucht werden, ob HBV, nach Aufnahme in Makrophagen, reseziert wird und dieser Prozess durch Zugabe von humanem Serum bzw. ApoA1-haltigen Serumbestandteilen induziert werden kann.

Aus humanen Monozyten differenzierte Makrophagen wurden 3h mit Medium, welches mit konzentriertem Überstand von HBV-exprimierenden HepG2.2.15 Zellen versetzt worden war, inkubiert und anschließend für 16h mit HBV-negativem Medium kultiviert, welches entweder keine weiteren Zugaben, humanes Serum oder HDL enthielt. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und mittels HBsAg-spezifischem ELISA der Gehalt an HBV-Oberflächenproteinen quantifiziert (Abb. 2.18 A). Es lassen sich in mit HDL bzw. humanem Serum versetztem Medium höhere Mengen von HBsAg detektieren als im Medium ohne weitere Zusätze, wobei der HBsAg-Gehalt in mit humanem Serum gegenüber mit HDL versetztem Medium höher war.

THP-1-Makrophagen wurden analog zu den Makrophagen zuvor behandelt, wobei zusätzlich in einem weiteren Experiment mit ApoA1-haltigem Medium für 16h inkubiert wurde. Neben dem HBsAg-Gehalt mittels ELISA wurde mittels qPCR die HBV-rcDNA-Konzentration von HDL-haltigem oder keine Zusätze enthaltendem Medium quantifiziert. Die Ergebnisse der HBsAg-ELISA-Untersuchung sind in Abbildung 2.18 B dargestellt. Man erkennt in dem ersten Experiment (Diagramm oben links), dass steigende Konzentration von HDL einen Anstieg von HBsAg im Medium bewirkten, wobei bei Inkubation mit humanem Serum versetzten Medium gegenüber HDL eine weitere Erhöhung erreicht wurde. In dem zweiten Experiment (Diagramm oben rechts) lässt sich ebenfalls eine deutlich gesteigerte HBsAg-Menge in dem mit Serum versetzten Medium ausmachen, wobei (ähnlich zu HDL) ApoA1 eine geringere Erhöhung bewirkt. Abbildung 2.18 B zeigt zusätzlich das Ergebnis der qPCR eines weiteren Experimentes. Vergleichbar zu den ELISA-Ergebnissen ist bei Inkubation des Mediums mit HDL ein deutlicher Anstieg der HBV-DNA-Konzentration detektierbar.

In einem weiteren Pulse-Chase-Versuch sollte untersucht werden, ob die Resekretion von HBV mit dem Efflux von freien Cholesterolen endozytierter Lipoproteine assoziiert ist. Hierzu wurde der Versuch mit THP-Makrophagen entsprechend dem vorhergehenden Protokoll durchgeführt, jedoch zu dem HBV-haltigen Pulse-Medium ^3H -Cholesterole-beladene TRL gegeben. Nach dem Chase wurde mittels ELISA der HBsAg-Gehalt und mittels Flüssigszintillationszählung die Tritiumaktivität pro Volumen Medium bestimmt, wobei letzteres als Maß für die ^3H -Cholesterolkonzentration im Medium genommen wurde (Abb. 2.18 C). Man erkennt, dass bei Chase-Inkubation mit humanem Serum sowohl der HBsAg- als auch der ^3H -

Cholesterolgehalt im Medium deutlich erhöht sind. Wie für die serumhaltigen Proben dargestellt, korrelieren auch die einzelnen Werte für HBsAg- und ^3H -Cholesterole.

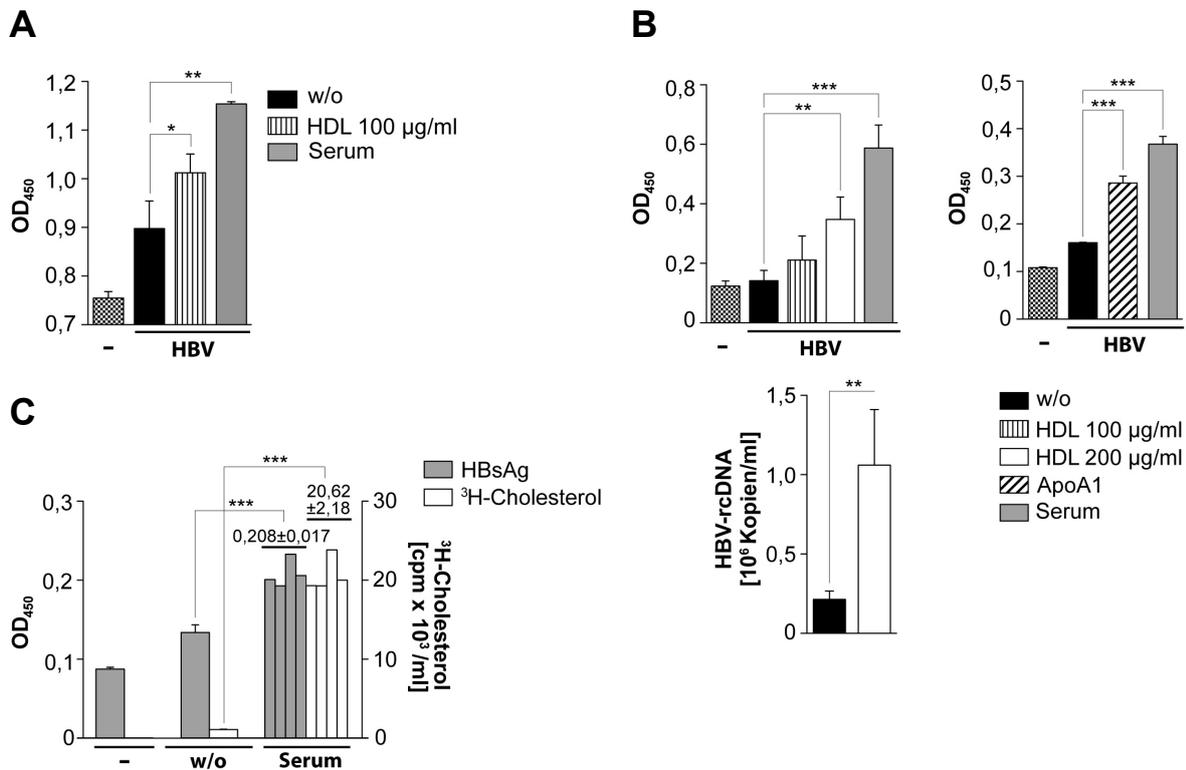


Abbildung 2.18: Resekretion der VP und der aus Lipoproteinen stammenden Cholesterole aus Makrophagen

Aus Monozyten differenzierte Makrophagen (A) und THP-Makrophagen (B, C) wurden 3h mit Medium bei 37°C inkubiert, welches mit konzentriertem Überstand von HepG2.2.15-Zellen entsprechend einer Konzentration von 1×10^8 Virionen/ml versetzt worden war (zuzüglich $1 \mu\text{g/ml}$ ^3H -Cholesterol-TRL in (C)). Nach intensivem Waschen wurden die Zellen für 16h in HBV-negativem Medium kultiviert, dem entweder nichts (w/o), 100 $\mu\text{g/ml}$ (A, B) bzw. 200 $\mu\text{g/ml}$ HDL (B), 25 $\mu\text{g/ml}$ ApoA1 (B) oder 10% humanes Serum (A-C) beigefügt worden war. Es sind die Ergebnisse der HBsAg-ELISA sowie in (B) zusätzlich die mittels HBV-rcDNA-spezifischer qPCR bestimmten HBV-DNA-Konzentrationen der Zellkulturüberstände nach 16h Chase-Phase gezeigt. In (C) sind zudem die Ergebnisse der mittels Flüssigszintillationszählung ermittelten Tritiumaktivitäten/ml dargestellt wobei die Werte der serumhaltigen Proben einzeln gezeigt und die Mittelwerte \pm SD über den Balken angegeben sind. (-) gibt den Wert von VP-freiem Medium an (A-C). Ergebnisse entsprechen mittleren Werten \pm SD jeweils drei (A) bzw. vier (B+C) unabhängiger Replikate eines repräsentativen Experimentes. * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Versuche in (A, C) wurden in Zusammenarbeit mit Xiaoming Cheng durchgeführt.

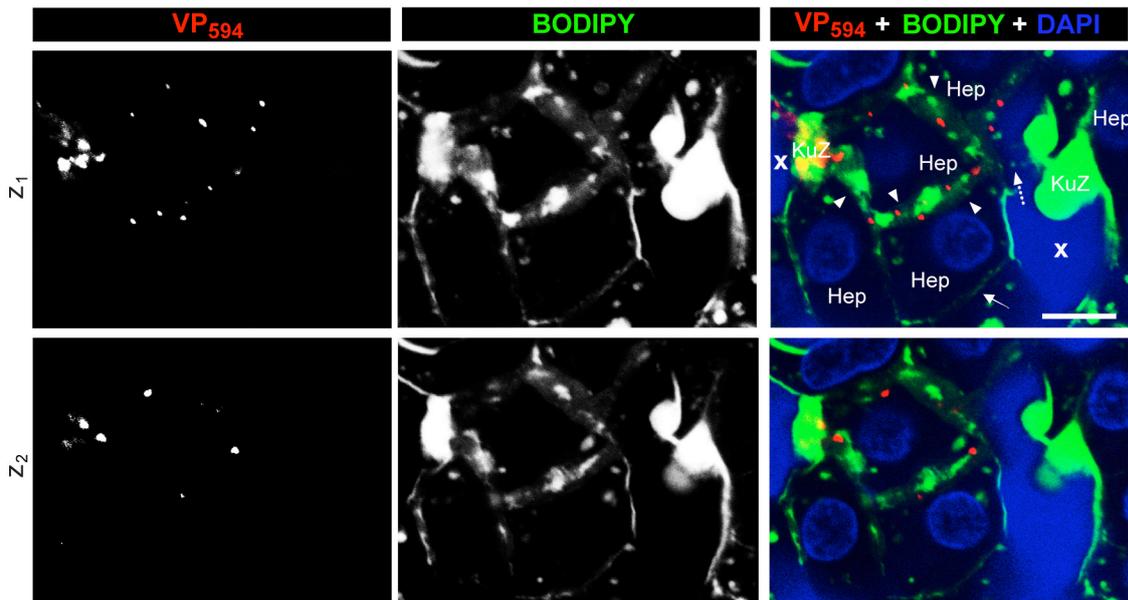
2.4 Untersuchung des Transportes von VP₅₉₄ und neutralen Lipiden aus Kupffer-Zellen in die Hepatozyten im humanen Lebergewebe

In 2.3 konnte zum einen gezeigt werden, dass VP₅₉₄ innerhalb von Makrophagen in den gleichen Kompartimenten lokalisieren wie die nach Hydrolyse der Lipoprotein-CE freigesetzten freien Cholesterole und zum anderen, dass der zelluläre Transport der VP mit dem Transport der freien Cholesterole assoziiert ist. Im Folgenden sollte anhand von Gewebeschnitten des in 2.2.7 perfundierten Lebergewebes untersucht

werden, ob HBV *in vivo* den Transportweg der hydrophoben Hydrolysate neutraler Lipide von den Lebermakrophagen zu den und möglicherweise auch in die Hepatozyten nutzt.

BODIPY₄₉₃₋₅₀₃ ist ein unpolares Derivat des Fluorophors BODIPY und besitzt unter den lipidfärbenden Fluoreszenzfarbstoffen die höchste Spezifität für neutrale Lipide und deren hydrophoben Hydrolysate und lässt sich zudem gut mit konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysieren (Rudolf und Curcio, 2009). Um die Verteilung dieser Lipide in dem perfundierten Lebergewebe zu untersuchen, wurden die Gewebeschnitte mit BODIPY₄₉₃₋₅₀₃ inkubiert und das Gewebe mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Im Gegensatz zu den Hepatozyten zeigen die sinusoidalen Kupffer-Zellen eine den ganzen Zellkörper ausfüllende starke Anfärbung mit BODIPY₄₉₃₋₅₀₃ (s. Abb. 2.19 A, B). Die Zellmembranen der in direkter Nähe zu den Kupffer-Zellen liegenden Hepatozyten in der Abbildung 2.19 A (s. Pfeilspitzen) sind im Gegensatz zu denen der weiter von den Kupffer-Zellen entfernt liegenden Zellen (s. beispielhaft Pfeil) ebenfalls stark positiv für BODIPY₄₉₃₋₅₀₃. Im Sinus zwischen einer Kupffer-Zelle und der verstärkt mit BODIPY₄₉₃₋₅₀₃ markierten Hepatozyten-Zellmembran sind länglich angeordnete, punktförmige BODIPY₄₉₃₋₅₀₃-Fluoreszenzsignale erkennbar (s. gestrichelten Pfeil). Auch in Abbildung 2.19 B sind ebenfalls an eine Kupffer-Zelle angrenzende stärker BODIPY₄₉₃₋₅₀₃-angefärbte Hepatozyten-Plasmamembranen erkennbar, die sich weiter entlang mehrerer Hepatozyten verzweigen (s. Pfeilspitzen). Fluoreszenzsignale der VP₅₉₄ sind ausschließlich entweder in den stark BODIPY₄₉₃₋₅₀₃-positiven Kupffer-Zellen oder entlang angrenzender, stark mit BODIPY₄₉₃₋₅₀₃-gefärbten Hepatozyten-Plasmamembranen detektierbar (s. Abb. 2.19 A, B).

A



B

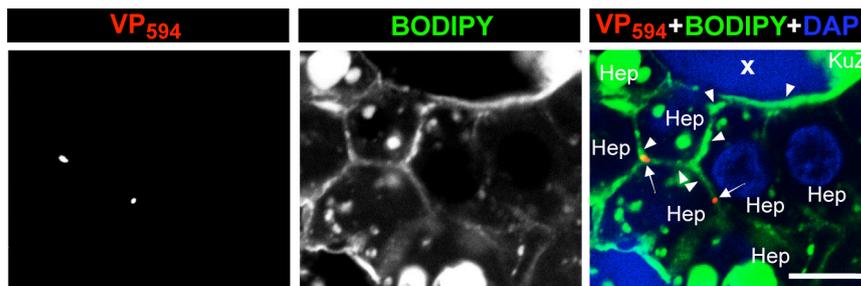
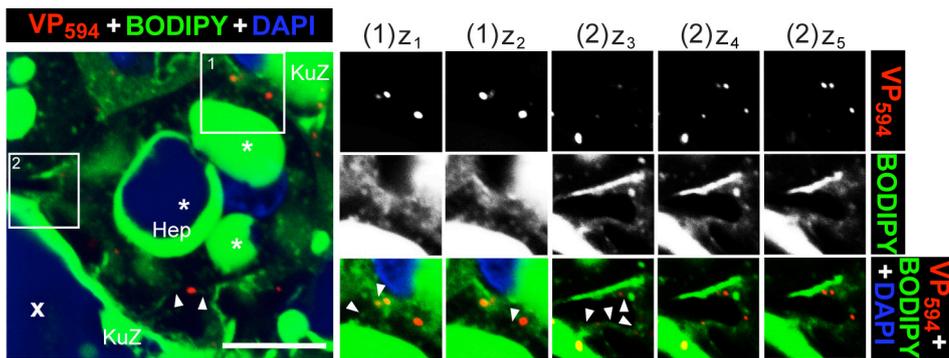


Abbildung 2.19: Vergleich der Transportwege von VP₅₉₄ und neutralen Lipiden von den Kupfer-Zellen zu den Hepatozyten im *ex vivo* perfundierten humanen Lebergewebe

Fixierte Gewebeschnitte des in 2.2.7 mit VP₅₉₄ *ex vivo* perfundierten Lebergewebes wurden mit BODIPY₄₉₃₋₅₀₃ inkubiert und anschließend mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. In (A, B) sind die separaten Fluoreszenzkanäle eines repräsentativen Mikroskopausschnittes dargestellt sowie die Überlagerungen der Kanäle, in denen zusätzlich die Zellkernfärbung mit DAPI gezeigt ist. Pfeile in (B) zeigen auf in Hepatozyten-Plasmamembranen lokalisierte VP₅₉₄, Pfeile in (A) zeigen auf nur gering und Pfeilspitzen in (A, B) auf stark mit BODIPY₄₉₃₋₅₀₃ angefärbte Zellmembranen der Hepatozyten. In (A) weist der gestrichelte Pfeil auf eine gepunktete, länglich angeordnete BODIPY₄₉₃₋₅₀₃-positive Struktur hin, die von einer Kupfer-Zelle zu einer stark mit BODIPY₄₉₃₋₅₀₃ markierten Hepatozyten-Zellmembran verläuft. Der mit x bezeichnete Bereich markiert den Sinus. Der Größenstandard entspricht 10 µm. BODIPY: BODIPY₄₉₃₋₅₀₃; Hep: Hepatozyt; KuZ: Kupfer-Zelle.

Anschließend wurde das Lebergewebe auf BODIPY₄₉₃₋₅₀₃-positive Strukturen innerhalb der Hepatozyten untersucht und diese mit der Lokalisation von intrazellulären VP₅₉₄ verglichen. In Abbildung 2.20 A und B erkennt man innerhalb der Hepatozyten und in der Nähe der Zellmembran VP₅₉₄-Fluoreszenzsignale, die sich ausschließlich innerhalb BODIPY₄₉₃₋₅₀₃-positiver, von der Zellmembran in das Zytosol verlaufender Strukturen befinden (s. Pfeilspitzen). Zur deutlicheren Darstellung dieses Befundes sind einzelne Vergrößerungen und verschiedene z-Ebenen dargestellt.

A



B

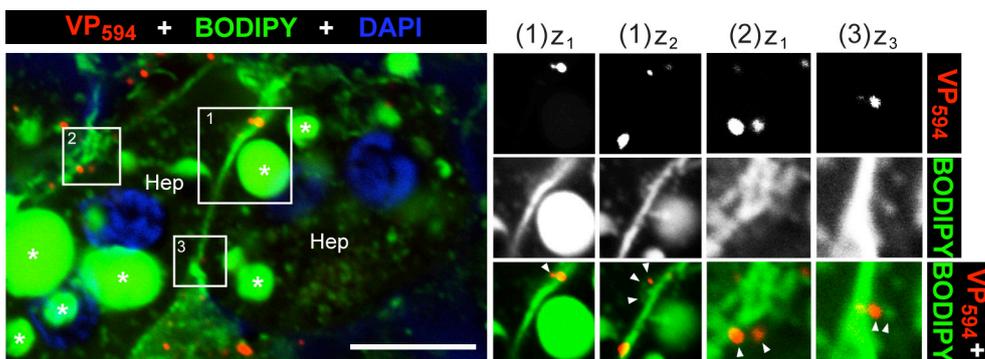


Abbildung 2.20: Vergleich der Transportwege von VP₅₉₄ und neutralen Lipiden in die Hepatozyten

Fixierte Gewebeschnitte des in 2.2.7 mit VP₅₉₄ *ex vivo* perfundierten Lebergewebes wurden mit BODIPY₄₉₃₋₅₀₃ inkubiert und anschließend mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. In (A, B) sind die überlagerten Fluoreszenzkanäle zuzüglich der Zellkernfärbung mit DAPI zweier repräsentativer Mikroskopausschnitte dargestellt, bei denen die mit weißem Rahmen markierten Bereiche seitlich zusammen mit den separaten Fluoreszenzkanälen in verschiedenen z-Ebenen vergrößert wiedergegeben sind (1+2 in (A) bzw. 1-3 in (B)). Pfeilspitzen zeigen auf intrazelluläre, von der Plasmamembran ins Zytosol verlaufende BODIPY₄₉₃₋₅₀₃-positive Strukturen. Der mit x bezeichnete Bereich markiert den Sinus, Sterne zeigen „lipid droplets“ an. Der Größenstandard entspricht 10 µm. BODIPY: BODIPY₄₉₃₋₅₀₃; Hep: Hepatozyt; KuZ: Kupffer-Zelle.

Freie Cholesterole endozytierter Lipoproteine werden intrazellulär zum großen Teil zur Plasmamembran transportiert, von wo sie entweder auf extrazelluläre Akzeptoren übertragen oder zu intrazellulären Kompartimenten befördert werden (Neufeld et al., 1996; Soccio und Breslow, 2004). Im Folgenden sollte in den Gewebeschnitten des in 2.2.7 perfundierten humanen Lebergewebes untersucht werden, ob VP₅₉₄ in den Plasmamembranen von Kupffer-Zellen detektiert werden konnten. Hierbei diente SR-B1 als Marker der Leberzellen-Plasmamembranen, der insbesondere in primären Hepatozyten in der Plasmamembran lokalisiert ist (Ahras et al., 2008; Babitt et al., 1997; Silver et al., 2001).

Abbildung 2.21 zeigt zwei repräsentative Mikroskopausschnitte, in denen SR-B1 durch spezifische Antikörper markiert wurde. Man erkennt eine deutliche Anfärbung

der Plasmamembranen sowohl der Hepatozyten (A, B) als auch einer im Lebersinus lokalisierten Kupffer-Zelle mit zu den Hepatozyten hin verlaufenden Filopodien (A, s. Pfeilspitzen). Entlang der Plasmamembran der Filopodien lassen sich mehrere Fluoreszenzsignale der VP₅₉₄ detektieren (s. Pfeile in A). Im rechteckigen Ausschnitt in (A) ist dies, wie vergrößert dargestellt, in einer anderen z-Ebene ebenfalls vorzufinden. Im quadratischen Ausschnitt in (A) erkennt man in der Aufnahme entlang der x-y-Achsen als auch bei y-z-Projektion einer z-Stapelaufnahme von einem Filopodium zu einem Hepatozyten durchgehende Fluoreszenzsignale der SR-B1-Markierung. Wie in (B) dargestellt, lokalisieren VP auch in der Plasmamembran von Hepatozyten.

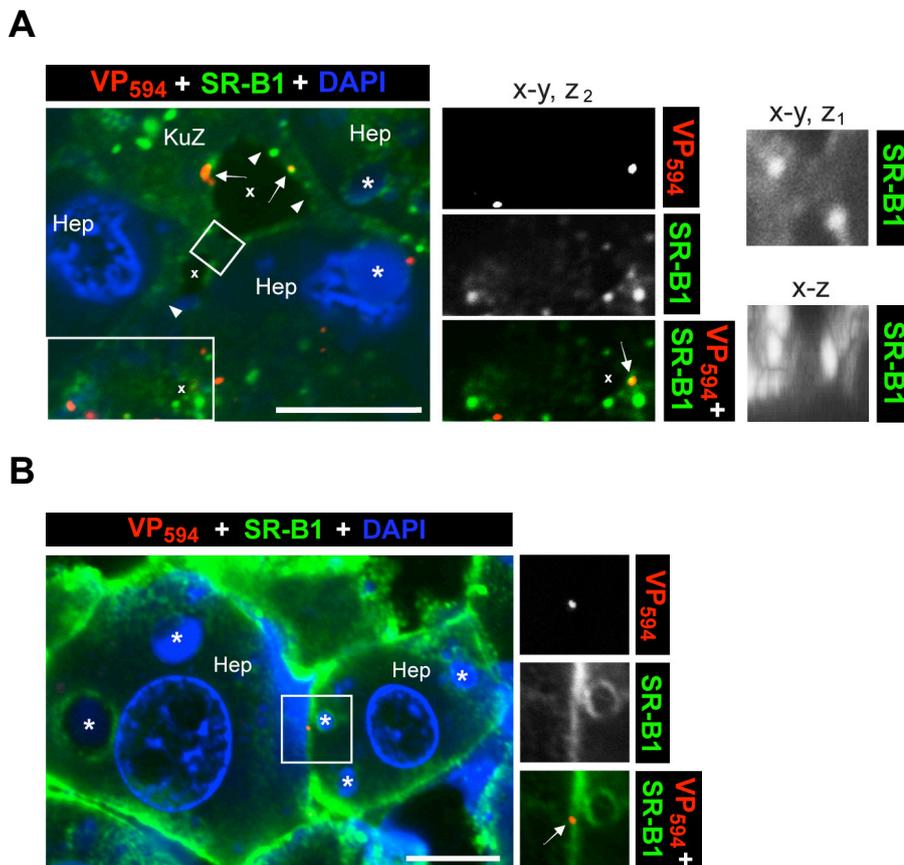


Abbildung 2.21: Visualisierung des VP₅₉₄-Transportes entlang der Kupffer-Zell-Plasmamembran zur Hepatozyte im perfundierten Lebergewebe

Fixierte Gewebeschnitte des in 2.2.7 mit VP₅₉₄ *ex vivo* perfundierten Lebergewebes wurden mit SR-B1-spezifischen Antikörpern aus Kaninchen und nachfolgend mit einem Alexa Fluor® 647-gekoppelten Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen inkubiert. Danach wurden die Zellen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Dargestellt sind die überlagerten Fluoreszenzkanäle zuzüglich der Zellkernfärbung mit DAPI zweier repräsentativer Mikroskopausschnitte. Die mit weißem Rahmen markierten Bereiche sind seitlich vergrößert wiedergegeben, mit separaten und überlagerten Fluoreszenzkanälen zuzüglich einer x-z-Projektion einer z-Stapel-Aufnahme des Fluoreszenzkanals der SR-B1-Markierung für den quadratischen Ausschnitt in (A). Pfeile markieren Fluoreszenzsignale der VP₅₉₄ in der Plasmamembran, Pfeilspitzen zeigen auf Filopodien der Kupffer-Zellen. Der Größenstandard entspricht 10 µm. Hep: Hepatozyt; KuZ: Kupffer-Zelle.

In verschiedenen Zellkultursystemen, insbesondere bei kultivierten Makrophagen, konnte ein effizienter interzellulärer Transport von Pathogenen über TNT gezeigt werden (Eugenin et al., 2009b; Onfelt et al., 2006; Sowinski et al., 2008). Auch für Viren wie HIV wird ein interzellulärer Transport zwischen Makrophagen über TNT angenommen (Eugenin et al., 2009b). Abschließend sollte untersucht werden, ob der HBV-Transport von den Kupffer-Zellen zu den Hepatozyten über interzelluläre Plasmamembranverbindungen vermittelt wird.

Hierzu wurde in den perfundierten Lebergeweben aus 2.2.2 und 2.2.7 die Lokalisation von CD68 in den verschiedenen Leberzellen analysiert. CD68 ist ein makrophagenspezifisches integrales Membranprotein vom Typ 1, das zwischen Endosomen und der Plasmamembran zirkuliert (Holness und Simmons, 1993; Kurushima et al., 2000). In den fixierten Lebergewebestücken wurde CD68 mit spezifischen Antikörpern markiert und das Gewebe mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

In dem kurzzeitig perfundierten Lebergewebe aus 2.2.2 lässt sich CD68 fast ausschließlich in den Lebermakrophagen detektieren, während sich in dem länger perfundierten Lebergewebe aus 2.2.7 CD68 häufig in geringem Maße auch in den die Kupffer-Zellen angrenzenden Hepatozyten feststellen lässt (s. Abb. 2.22). Fluoreszenzsignale der VP₅₉₄ sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen in 2.2 nach kurzzeitiger Perfusion nur in den Kupffer-Zellen und nach 16h Chase-Perfusion auch deutlich in den die Kupffer-Zellen umgebenden Hepatozyten detektierbar. Dieser Befund legt nahe, dass VP die Ausbildung interzellulärer Kontakte induzieren, die zum Austausch des membranständigen CD68 führen.

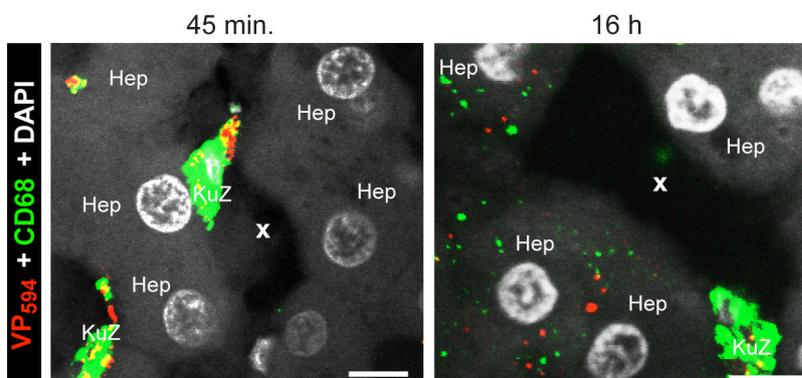


Abbildung 2.22: Lokalisierung des makrophagenspezifischen Membranproteins CD68 im perfundierten Lebergewebe

Fixierte Gewebeschnitte der in 2.2.2 und 2.2.7 mit VP₅₉₄ *ex vivo* perfundierten Lebergewebe wurden mit CD68-spezifischen Antikörpern aus Maus und nachfolgend mit einem Alexa Fluor® 647-gekoppelten Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus inkubiert. Danach wurden die Zellen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Dargestellt sind die Überlagerungen der

Ergebnisse

Fluoreszenzkanäle repräsentativer Mikroskopausschnitte, in denen zusätzlich Zellkernfärbung mit DAPI in Weiß gezeigt ist. X markiert den Lebersinus. Der Größenstandard entspricht 10 µm. Hep: Hepatozyt

3 Diskussion

Das HBV ist ein hepatotropes Virus mit hoher Wirtszellspezifität, über dessen frühen Infektionsschritte bis heute nur wenig bekannt ist. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie das Virus *in vivo* in der Leber dem Blutkreislauf entzogen, zur Wirtszelle transportiert und schließlich in diese aufgenommen wird. Anhand eines neu entwickelten *ex vivo* Lebergewebsperusionsmodells konnten wir zeigen, dass in der humanen Leber initial Kupffer-Zellen HBV-TRL-Komplexe aufnehmen und VP anschließend von den Lebermakrophagen in die Hepatozyten transportiert werden. *In vitro* wurden PHH durch primäre humane Kupffer-Zellen, die zuvor mit HBV inkubiert worden waren, *trans*-infiziert. In kultivierten Makrophagen konnten mittels Lokalisations- und Resekretionsstudien Parallelen des intrazellulären HBV-Transportes zum Recycling und Efflux von freien Cholesterolen, die aus endozytierten Lipoproteinen stammten, aufgezeigt werden. Fluoreszenzmarkierung der neutralen Lipide bzw. derer hydrophoben Hydrolyseprodukte im *ex vivo* perfundierten Lebergewebe unterstützen die Theorie, dass HBV *in vivo* den Transportweg der neutralen Lipide aus dem Blutkreislauf in die Kupffer-Zellen und von diesen weiter in die Hepatozyten nutzt, um seine Zielzelle zu erreichen und zu infizieren.

3.1 Aufreinigung der VP

VP wurden aus dem Plasma von HBV-infizierten Personen gemäß dem Protokoll von Glebe und Gerlich (2004) über zweifache Saccharose- und eine CsCl-Dichtegradientenultrazentrifugation aufgereinigt. Hierbei wurden speziell L-Proteinreiche VP isoliert, um Partikel mit einer Oberflächenproteinzusammensetzung vergleichbar mit der von infektiösen Virionen zu erhalten (vgl. 3.4).

Nach Auftrennung der Plasmabestandteile mittels Saccharose-Dichtegradientenultrazentrifugation bandeten gemäß der Dot-Blot-Analyse die HBV-DNA-positiven Virionen in den Fraktionen drei bis fünf (vgl. Abb. 2.1). Die in der SDS-PAGE-Analyse in den Fraktionen vier bis 14 erkennbaren Proteinbanden mit einem apparenten Molekulargewicht von ungefähr 24 und 28 kDa, in den Fraktionen fünf bis neun von ungefähr 33 und 36 kDa und in den Fraktionen fünf und sechs von ungefähr 39 und 42 kDa können in Analogie zu der Literatur als virale S-, M- bzw. L-Proteine interpretiert werden (Glebe und Gerlich, 2004). Demnach bandeten

L-Protein-reiche filamentöse SVP in den Fraktionen fünf und sechs, während sphärische SVP in den Fraktionen sieben bis 14 konzentrierten. Der Großteil der nicht viralen Plasmaproteine ist in den Fraktionen größer als neun detektierbar. Diese Ergebnisse sind mit denen in der Literatur für das angewandte Aufreinigungsverfahren angegebenen Daten gut vergleichbar (Glebe und Gerlich, 2004).

Die typische Dichte der Fraktionen des in dieser Arbeit aufgeschichteten Saccharose-Dichtegradienten 1 beträgt nach Zentrifugation für die Fraktionen drei bis sechs 1,21 bis 1,15 g/ml (vgl. Abb. 2.12 A). Da sowohl der Großteil der Plasmaproteine als auch der SVP in höheren Fraktionen bandete und demnach nur ein geringer Teil der Plasmabestandteile seine Partikeldichte erreichte (Dichte nicht lipidassoziierter Serumproteine: 1,2-1,7 g/ml (Lottspeich und Zorbas, 1998)), handelt es sich bei der hier durchgeführten Zentrifugation um eine Zonenzentrifugation, bei der die Partikel nicht nach ihrer unterschiedlichen Dichte, sondern nach ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit in Saccharose aufgetrennt werden (vgl. 4.2.1.1). Diese ist bei den VP für HBV am höchsten (280 S), für filamentöse SVP aufgrund ihrer Größe höher als für sphärische SVP (letztere: 39-56 S) und für die meisten nicht viralen Plasmaproteine, wie z.B. Albumin, sehr viel geringer (etwa 10 S) (Hollinger und Liang, 2001; Lottspeich und Zorbas, 1998; Robinson, 1995). Dies erklärt, warum durch die initiale Saccharose-Dichtegradientenultrazentrifugation die Virionen und filamentöse SVP von den meisten nicht viralen Plasmaproteinen und sphärischen SVP effizient abgetrennt wurden.

Bei der nachfolgenden CsCl-Dichtegradientenultrazentrifugation bandeten aufgrund der geringen Viskosität der Lösung alle Plasmabestandteile in Fraktionen entsprechend ihrer Eigendichte. Mittels ELISA konnte gezeigt werden, dass der Großteil der VP bei einer Dichte von 1,19 g/ml konzentrierte, wobei es sich hierbei (gemäß HBV-DNA-spezifischer Dot-Blot-Analyse) hauptsächlich um nukleokapsidfreie SVP handelte. Die Virionen bandeten bei einer Dichte von 1,22 g/ml. Die ermittelten Dichten der Virionen und der SVP sind hierbei mit den in der Literatur angegebenen Werten vergleichbar (Hollinger und Liang, 2001; Kaplan et al., 1976; Robinson, 1995). Zusätzlich wurden aufgrund der hohen Ionenstärke der CsCl-Lösung mit VP assoziierte Serumproteine abgelöst.

Der Funktionalitätsverlust der viralen Polymerase, der vermutlich durch die hochmolekulare CsCl-Lösung verursacht wird, wurde in dieser Arbeit toleriert, da das

Protein erst zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion eine wichtige Rolle spielt (Virusreplikation), in dieser Arbeit jedoch die Aufnahme des Virus in die Zelle untersucht werden sollte (Heermann und Gerlich, 1991).

Nach Abtrennung der VP von den verbliebenen, langsamer sedimentierenden Plasmaproteinen mittels einer zweiten Zonenzentrifugation, wurde die Reinheit der isolierten VP durch SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung des Gels überprüft (vgl. Abb. 2.3). Die dargestellten Proteinbanden mit einem apparenten Molekulargewicht von ungefähr 24, 28, 33, 36, 39 und 42 kDa entsprechen der Größe der viralen Oberflächenproteine, wie sie auch in der Literatur für die nach dem in dieser Arbeit verwendeten Protokoll aufgereinigten VP beschrieben sind (Glebe und Gerlich, 2004) und weisen auf einen hohen L-Proteinanteil der VP hin. Da andere Proteinbanden nicht darstellbar sind, kann von einer hohen Reinheit der isolierten VP ausgegangen werden.

3.2 Fluoreszenzmarkierung der VP

Für die Fluoreszenzmarkierung der VP wurde Alexa Fluor[®] 594 (Invitrogen) als Fluorophor verwendet, welcher in dem pH-Bereich von vier bis zehn unveränderte optische Eigenschaften aufweist und in allen zellulären Kompartimenten (inklusive Lysosomen) mittels Fluoreszenzanalysen mit vergleichbarer Fluoreszenzintensität detektierbar ist. Demnach sollte eine Darstellung der markierten VP in allen Zellkompartimenten möglich sein. In dem *in vivo*-Mausmodell wurden zusätzlich zu den Alexa Fluor[®] 594- auch Fluorescein-gekoppelte VP benutzt. Beide Fluorophore besitzen ein unterschiedliches heteroaromatisches Grundgerüst, welches zudem beim Fluorescein carboxyliert (R-CO₂H) und beim Alexa Fluor[®] 594 sulfoniert (R-SO₃H) ist (www.invitrogen.com, Molecular Probes amine reactive dyes, table 1.1). Die Verwendung zweier chemisch unterschiedlicher Fluorophore sollte uns helfen, fluorophorspezifische Auswirkungen auf die VP-Zellinteraktionen auszuschließen (vgl. 3.4).

Die Fluoreszenzmarkierung der VP wurde bei einem basischen pH-Wert von neun durchgeführt, bei dem nicht nur die N-Termini der Proteine, sondern auch die primären Amine der Lysin-Seitenketten deprotoniert vorliegen und eine nukleophile Additions-Eliminierungsreaktion am positivierten Carbonyl-C-Atom des Succinimidylesters (im Falle von FITC: des Isothiocyanats) eingehen. Auf diese Weise konnte eine stärkere Fluoreszenzmarkierung der VP als bei einem neutralen

pH-Wert erreicht werden, was eine bessere Detektion der VP bei den fluoreszenzmikroskopischen Analysen ermöglichte.

Zur Abtrennung der fluoreszenzmarkierten VP von den ungebundenen Fluorophoren nach Inkubation der VP mit dem Succinimidylester (bzw. Isothiocyanat) gekoppelten Farbstoff, wurde in dieser Arbeit eine Saccharose-Dichtegradientenultrazentrifugation durchgeführt (vgl. 2.1.2). Diese ermöglichte eine effiziente Isolierung der markierten VP, da der Fluorophor aufgrund seiner deutlich geringeren Größe eine wesentlich geringere Sedimentationsgeschwindigkeit besitzt als die VP.

Die bei der Fluoreszenzmarkierung entstehende kovalente Bindung zwischen den Alexa Fluor[®] 594-Fluorophoren und den Proteinen entspricht chemisch einer Carbonsäure-Amid-Gruppe (-NH-CO-), über die auch Aminosäuren in Peptiden und Proteinen verbunden sind und die dort Peptidbindung genannt wird. Die Stärke der Bindung zwischen den Fluorophoren und den Proteinen ist demnach mit der Bindung der einzelnen Aminosäuren untereinander in den Peptidketten der Proteine vergleichbar. Dies erklärt auch, warum Auftrennungen der Proteine im denaturierenden SDS-PAGE nicht zu einer Abspaltung des Fluorophors führen und so als Nachweis für eine erfolgreiche Markierung der viralen Proteine verwendet werden konnten (vgl. Abb. 2.4). Darüber hinaus sollten zelluläre Bedingungen, die nicht zu einer Auftrennung der Peptidbindungen führen, auch keine Abtrennung der Fluorophore von den Proteinen bewirken. Da VP in Kupffer-Zellen in nicht lysosomalen Kompartimenten akkumulierten (vgl. Abb. 2.15 A; 3.7), kann man demnach von einer intakten Fluorophor-VP-Bindung auch intrazellulär ausgehen. Diese Theorie stimmt mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzanalyse mit HBsAg-spezifischen Antikörpern überein, bei denen eine Kollokalisierung mit fluoreszenzmarkierten VP in der Zelle detektiert wurde und eine intrazelluläre Abtrennung des Fluorophors von den VP unwahrscheinlich erscheinen lässt (vgl. Abb. 2.5). Im Folgenden wird demnach angenommen, dass das intrazelluläre Fluoreszenzsignal der mit VP₅₉₄-inkubierten Zellen bzw. Lebergewebestücken tatsächlich die Lokalisation der fluoreszenzmarkierten VP wiedergibt.

3.3 Das humane Lebergewebsperfuisionsmodell

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte humane Lebergewebsperfuisionsmodell sollte ermöglichen, die frühen Infektionsschritte des HBV im menschlichen Lebergewebe mit unveränderter Gewebearchitektur und unter physiologischen

Bedingungen, wie sie *in vivo* bei der Infektion des Menschen in der Leber vorzufinden sind, zu untersuchen. Hierzu wurde der Versuchsaufbau für die Gewebepfusion so gewählt, dass die Bedingungen, denen das Gewebe ausgesetzt war, denen im menschlichen Körper entsprachen (vgl. Abb. 2.6):

- Das Lebergewebe wurde in einem mit bis zu 100 ml Medium gefüllten Reaktionsgefäß aufbewahrt, welches sich innerhalb des Zellkulturinkubators befand. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass das Gewebe komplett von 37°C warmem Medium umgeben war und nicht von außen vertrocknete. Darüber hinaus wurde über den konstanten CO₂-Gehalt der Inkubatorluft in dem das Gewebe umgebende Medium ein physiologischer pH-Wert beibehalten.
- Das Medium wurde über einen geschlossenen Schlauchkreislauf dem Inneren des Gewebes zugeführt, wobei nur eine geringe Schlauchstrecke außerhalb des Zellkulturinkubators verlief. Hiermit konnte sichergestellt werden, dass das Gewebeinnere mit 37°C warmem und einem auf physiologischen pH-Wert eingestellten Medium versorgt wurde.
- Für die Gewebepfusion wurde ein achtköpfiger Pumpenkopf verwendet, um in den Lebergewebegefäßen einen fast laminaren Fluss zu erreichen, wie er *in vivo* im peripheren Gefäßendothel vorliegt. Zudem wurde der Perfusionsdruck in der Pulse-Phase dem physiologischen Druck im menschlichen Körper angepasst, indem mit einer Gesamtfließgeschwindigkeit von 1 ml/g/min über Äste der Pfortader perfundiert wurde (Moll und Moll, 2002). Eine höhere Fließgeschwindigkeit hätte zu verstärkten Strömungseffekten, eine geringere Fließgeschwindigkeit zu überhöhten Diffusionseffekten beim Komponententransport führen können. Beide Perfusionsbedingungen hätten möglicherweise artifizielle Virus-Zellinteraktionen bewirkt, was mit einer wie oben beschrieben eingestellten Perfusionsgeschwindigkeit verhindert wurde. Bei der 16-stündigen Chase-Perfusion wurde die Fließgeschwindigkeit auf bis zu 3 ml/g/min erhöht, um eine bessere Oxygenierung des Gewebes zu gewährleisten, ohne jedoch die Mikrostruktur des Gewebes zu zerstören (Bessemis et al., 2006).
- Dem Medium waren 20 bis 50% humanes Serum beigefügt, um es den Eigenschaften des serumhaltigen Blutes anzunähern. Hiermit wurden

Assoziationen von HBV mit Serumkomponenten ermöglicht, die bei bestimmten Virus-Leberzellinteraktionen eine wichtige Rolle spielen könnten.

Die im Perfusionssystem vorliegenden, physiologisch angepassten Bedingungen waren für den Zeitrahmen der Versuche für Leberzellen weder toxisch, noch konnte eine veränderte Gewebearchitektur festgestellt werden, wie die Analyse von Lebergewebe ergab (vgl. Abb. 2.7): Hierbei bestätigte die Aufnahme des fluoreszenzmarkierten Ovalbumins in sinusoidale Zellen die Vitalität der Leberzellen, während keine Abweichungen in den Ausmaßen der Sinusse oder des Parenchymgewebes vom unbehandelten Lebergewebe festzustellen waren. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde davon ausgegangen, dass HBV bei den gewählten Perfusionsbedingungen die gleichen Interaktionen mit den Leberzellen eingeht, wie sie *in vivo* stattfinden.

Nicht vollständig berücksichtigt bei der Nachstellung der physiologischen Bedingungen im menschlichen Körper wurde die Sauerstoffkonzentration im Blut. Hier liegen nur geringe Mengen Sauerstoff physikalisch gelöst vor, während große Mengen an Erythrozyten gebunden sind (Klinke und Silbernagl, 2003). In dem Lebergewebsperfuisionsmodell wurde aufgrund des Fehlens von Erythrozyten Sauerstoff nur physikalisch gelöst transportiert. Da besonders periportale Hepatozyten neben einem anaeroben einen ausgeprägten aeroben Stoffwechsel betreiben, wird dieser in dem Modell (trotz der erhöhten Perfusionsgeschwindigkeit in der Chase-Phase, s.o.) wahrscheinlich nur unzureichend nachgestellt. Es ist jedoch bekannt, dass kultivierte Hepatozyten in der Gegenwart von Glukose in Kultur ohne signifikanten Viabilitätsverlust ihren aeroben Stoffwechsel auf anaerob umstellen (Hugo-Wissemann et al., 1991). Aufgrund der hohen Glukosekonzentration im Perfusionsmedium (vgl. 4.1.15.3) sollten demnach im humanen Lebergewebsperfuisionsmodell die Stoffwechselfunktionen der Hepatozyten unverändert sein.

Ebenfalls abweichend von den im menschlichen Körper herrschenden physiologischen Bedingungen ist die konstante Exposition des Perfusionsmediums zu der Inkubator-Luft, die zu etwa 21% Sauerstoff enthält. Dies kann während der Perfusion zu einer verstärkten Oxidation von Lipoproteinen führen, wie sie im menschlichen Körper vermehrt nur unter hyperlipämischen Bedingungen stattfindet (Kanazawa et al., 1994; Miyazawa et al., 1990; van Dijk et al., 1992). Dies würde wiederum zu einer gesteigerten Aufnahme von modifizierten Lipoproteinen durch

Kupffer-Zellen führen, während unter physiologischen Bedingungen die nicht-modifizierten Lipoproteine überwiegend von Hepatozyten dem Blutkreislauf entzogen werden (Naito und Wisse, 1978; van Dijk et al., 1992). Diese Hypothese wäre mit der starken BODIPY₄₉₃₋₅₀₃-Färbung der Kupffer-Zellen in dem *ex vivo* perfundierten Gewebe vereinbar, die auf eine starke Anhäufung von neutralen Lipiden hindeutet (vgl. Abb. 2.19). Falls, wie in dieser Arbeit postuliert, HBV *in vivo* mit TRL assoziiert und dem physiologischen Transportweg der TRL-Remnants in die Leber folgt, könnten unter hyperlipämischen Bedingungen, wie sie in dem Lebergewebsperfuationsmodell möglicherweise vorliegen, HBV-TRL-Komplexe verstärkt von Kupffer-Zellen statt von Hepatozyten aufgenommen worden sein (vgl. 3.4). Folglich könnte auch der Transport der hydrophoben Neutrallipidhydrolysate von den Kupffer-Zellen in die Hepatozyten (vgl. 3.8) unter physiologischen Bedingungen im geringeren Maße stattfinden als im Perfuationsmodell beobachtet. Möglich ist aber auch, dass HBV selbst die Aufnahme der Virus-TRL-Komplexe in die Kupffer-Zellen erhöht (vgl. 3.4) und es deswegen auch unter physiologischen Bedingungen zu einer erhöhten Lipidaufnahme in die Kupffer-Zellen kommt, wie es im Perfuationsmodell zu beobachten war.

Auch wenn aufgrund der hyperlipämischen Bedingungen der in dieser Arbeit postulierte Infektionsweg von HBV zur Wirtszelle über die Kupffer-Zellen möglicherweise quantitativ verzerrt wiedergegeben wird und dieser unter physiologischen Bedingungen in geringerem Maße stattfindet als im Perfuationsmodell beobachtet, bleibt die qualitative Aussage des Modells über diesen Infektionsweg unberührt.

3.4 HBV akkumuliert in der Leber initial in Kupffer-Zellen

Für die Untersuchung der frühen Infektionsschritte des HBV im humanen Lebergewebsperfuationsmodell wurden in dieser Arbeit fluoreszenzmarkierte L-Protein-reiche VP verwendet. Obwohl nur Virionen Hepatozyten produktiv infizieren, wurden zusätzlich L-Protein-reiche SVP verwendet, da sie aufgrund der identischen Oberflächenproteinzusammensetzung zu den Virionen gleiche Virus-Oberflächenproteininteraktionen mit potentiellen viralen Rezeptoren auf Leberzellen eingehen sollten (Glebe und Gerlich, 2004; Heermann et al., 1984). Da hierbei eine deutlich höhere Konzentration an fluoreszenzmarkierten VP eingesetzt werden

konnte als bei alleiniger Verwendung von Virionen, sollte so eine bessere Visualisierung der Infektion ermöglicht werden.

Nach 45-minütiger *ex vivo* Perfusion des humanen Lebergewebes konnte die Aufnahme der fluoreszenzmarkierten VP lediglich in Kupffer-Zellen detektiert werden, während die für den Makrophagenmarker CD68 negativen Zellen keine detektierbaren Fluoreszenzsignale der VP aufzeigten (vgl. Abb. 2.8) (Alabraba et al., 2007; Holness und Simmons, 1993). Makrophagen, inklusive Kupffer-Zellen, besitzen eine große Anzahl von Scavengerrezeptoren, über die sie modifizierte Serumproteine und eine Vielzahl an Pathogenen binden und aufnehmen (Goldstein et al., 1979; Greaves und Gordon, 2005; Platt und Gordon, 1998). Um auszuschließen, dass der Aufreinigungsprozess bzw. die Fluoreszenzmarkierung zu Modifikationen der VP führte, die artifiziell eine Erkennung durch Scavengerrezeptoren bewirkten, wurde das Lebergewebe mit Zellkulturüberstand von HBV-produzierenden HepG 2.2.15-Zellen perfundiert. Dieses Medium enthält native VP, wie sie im Blut von HBV-Patienten vorliegen, jedoch keine HBsAg-spezifischen Antikörper, die nach der Ausbildung von HBV-Immunkomplexen über die Bindung an Immunglobulinrezeptoren eine (im Sinne der frühen Infektion) artifizielle Virusaufnahme in Kupffer-Zellen vermitteln könnten. Mittels Immunfluoreszenzanalysen konnte die initiale Akkumulierung von nativen VP in Kupffer-Zellen, wie mit fluoreszenzmarkierten VP beobachtet, dargestellt werden (vgl. Abb. 2.9 A, B). Dies deutet darauf hin, dass die fluoreszenzmarkierten VP die Partikel-Zellinteraktionen der nativen VP wiedergeben.

Die elektronenmikroskopische Analyse des mit Überstand von HepG2.2.15-Zellen perfundierten Lebergewebes ergab eine Lokalisation von rundlichen Strukturen mit der Größe von TRL in zellulären Kompartimenten von Kupffer-Zellen. Da Lipoproteine nach der Osmiumtetroxidfixierung im Elektronenmikroskop dunkel dargestellt werden (Anderson et al., 1989), ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich hierbei um endozytierte TRL handelt. Darüber hinaus wurden in den gleichen Kompartimenten überwiegend VP detektiert, die mit ungefähr 42 nm den Durchmesser von HBV besitzen und die morphologischen Charakteristika dieser Virionen in der elektronenmikroskopischen Darstellung erfüllen (vgl. Abb. 2.9 C, D) (Roingard und Sureau, 1998). Bei dem in Abbildung 2.9 C ebenfalls erkennbaren tubulären VP handelt es sich möglicherweise um ein sog. „cobra-shaped“ Virion. Diese Viren besitzen an einer Seite tubuläre Ausstülpungen und sind sowohl im

Serum und in den Hepatozyten von Patienten als auch im Zellkulturüberstand von HepG2.2.15-Zellen in größeren Mengen nachgewiesen worden (Kaito et al., 2006). Es ist allerdings auch möglich, dass es sich bei der tubulären Struktur um ein filamentöses SVP handelt. Dagegen spricht jedoch, dass das VP im Elektronenmikroskop eine am (hier in der Darstellung linken) Ende dichtere rundliche Struktur besitzt, was typisch für „cobra-shaped“ Virionen ist und hier die Nukleokapside darstellt.

In dem in Abbildung 2.9 C dargestellten, perinukleären und endosomenartigen Kompartiment liegen die akkumulierten Virionen, im Gegensatz zum TRL, ausnahmslos membranassoziiert vor. Eine vergleichbare endosomale Anordnung für Virionen kann auch in späten Endosomen von Hepatozyten HBV-infizierter Patienten beobachtet werden (Falcon et al., 2008). Die Membranassoziation der Virionen stellt eine geometrische Anordnung von rezirkulierenden Komponenten dar (Mayor et al., 1993; Mellman und Warren, 2000) und deutet darauf hin, dass die Partikel nicht ins Lysosom, sondern zurück zur Zelloberfläche transportiert wurden. In Übereinstimmung hiermit könnte das VP-haltige Vesikel, das in direkter Nähe zu dem VP-akkumulierenden perinukleären Kompartiment elektronenmikroskopisch darstellbar war und ebenfalls membranassoziierte Virionen enthielt, von diesem abgeschnürt worden sein und den Transport der VP zur Plasmamembran vermitteln. Virionen in von Endosomen abgeschnürten Vesikeln sind auch in Hepatozyten infizierter Patienten beobachtet worden (Falcon et al., 2008). Ein Recycling der VP ist darüber hinaus in Übereinstimmung mit der in dieser Arbeit beobachteten Kolo-kalisation von VP₅₉₄ und Transferrin, einem Marker für Recycling-vermittelnde Kompartimente (vgl. Abb. 2.15 A) (Maxfield und McGraw, 2004; Mellman, 1996).

Obwohl HepG2.2.15-Zellen im großen Überschuss SVP sezernieren, konnten in der elektronenmikroskopischen Analyse nur in seltenen Fällen Strukturen, die gegebenenfalls filamentöse SVP darstellten, jedoch keine Strukturen, die sphärischen SVP entsprachen, detektiert werden (vgl. Abb. 2.9 C, D). Geht man bei der Aufnahme der (in dieser Arbeit postulierten) Virionen-TRL-Komplexe in die Kupffer-Zelle von einem ausschließlich von Viruskomponenten vermittelten Vorgang aus (s.u.), könnte die bevorzugte Endozytose des HBV durch unterschiedliche Erkennungsmechanismen der verschiedenen VP über Rezeptoren der Kupffer-Zellen erklärt werden: Virionen besitzen in ihrer viralen Membran im Gegensatz zu SVP vermutlich einen höheren Anteil an Phosphatidylserinen. So wurde die gegenüber

filamentösen SVP verstärkte Bindung von Virionen an ApoH mit einem unterschiedlichen Gehalt an Phosphatidylserinen begründet (Stefas et al., 2001). Auch die Bindung der VP an Annexin 5 ist Phosphatidylserin-vermittelt (De Meyer et al., 1999). Ein höherer Anteil dieser negativ-geladenen Lipide in der Membran der Virionen gegenüber dem sehr geringen Anteil in den SVP (Gavilanes et al., 1982) könnte demnach eine unterschiedliche Erkennung durch Kupffer-Zell-Rezeptoren bewirken. Dies würde zu einer Selektion von infektiösen gegenüber nicht infektiösen VP führen, die in der Leber dem Blutkreislauf entzogen werden.

ApoH und Annexine binden beide anionische Phospholipide. Während ApoH wahrscheinlich die Aufnahme Phosphatidylserin-exponierender Komponenten, wie z.B. apoptotischer Zellen, über einen LRP-Rezeptor in Phagozyten vermittelt (Maiti et al., 2008), ist Annexin 5 im großen Maße in der Plasmamembran, frühen und späten Endosomen sowie Phagosomen von Makrophagen lokalisiert (Diakonova et al., 1997) und wahrscheinlich auch direkt an Endozytosevorgängen von Pathogenen beteiligt (Huang et al., 1996; Majeed et al., 1994). Der außerordentlich effiziente Entzug von Phosphatidylserin-exponierenden Komponenten aus dem Blutkreislauf durch Kupffer-Zellen *in vivo* ist am Beispiel für von Erythrozyten stammenden Vesikeln gezeigt (Willekens et al., 2005). Aufgrund dieser Überlegungen ist es denkbar, dass HBV ebenfalls über einen Phosphatidylserin-vermittelten Erkennungsmechanismus in die Kupffer-Zellen aufgenommen wird.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen deuten darauf hin, dass HBV nicht als einzelnes Partikel, sondern als Virionen-TRL-Komplex von der Kupffer-Zelle dem Blutkreislauf entzogen wird (vgl. Abb. 2.9 D; 2.2.6, 3.5). Es bleibt zu untersuchen, welche Zellinteraktionen in der Leber von welcher Komponente eines Virus-Lipoproteinkomplexes vermittelt werden. Da für aufgereinigtes HBV lediglich die Bindung an leberzellenspezifische Glykosaminoglykane gezeigt werden konnte (Leistner et al., 2008), wäre es denkbar, dass die TRL-Komponente die initiale Bindung an leberzellspezifische Glykosaminoglykane bewirkt und so möglicherweise zum Lebertropismus von HBV beiträgt. Ein vergleichbares Szenario wird für HCV angenommen: Obwohl das virale Oberflächenprotein E2 an Glykosaminoglykane bindet (Olenina et al., 2005), sind *in vivo* nur Viren sehr geringer Dichte hoch infektiös (Beach et al., 1992; Bradley et al., 1991). Da diese im Blut als TRL-assoziierte Lipoprotein-Viruspartikel, sog. Lipo-Viropartikel, vorliegen (Prince et al.,

1996; Thomssen et al., 1992), wird vermutet, dass die TRL-Komponente für das Erreichen der Leberzellen durch HCV *in vivo* essentiell ist (Diaz et al., 2006).

Fraglich ist auch, inwieweit die zelluläre Aufnahme eines HBV-TRL-Komplexes in die Kupffer-Zelle von der Virus- oder der TRL-Komponente, oder von beiden Komponenten zusammen, vermittelt wird. Die Hypothese, dass die Lipoprotein-Komponente auch über Bindung an TRL-Rezeptoren an der Aufnahme eines Virionen-TRL-Komplexes beteiligt sein könnte, wird durch die Beobachtung gestärkt, dass Patienten mit einem ApoE2-Genotyp einen deutlich schwächeren Krankheitsverlauf aufzeigen, als solche mit einem ApoE3-Genotyp, was mit einer geringeren Affinität von ApoE2 als ApoE3 an TRL-Rezeptoren begründet sein könnte (Mahley et al., 1999; Schneider et al., 1981; Toniutto et al., 2010). Die in dieser Arbeit durchgeführten elektronenmikroskopischen Analysen deuten jedoch darauf hin, dass spätestens nach Aufnahme eines HBV-TRL-Komplexes in die Kupffer-Zelle auch eine höher affine Bindung der Viruskomponente an Zellrezeptor(en) stattfinden muss, da, im Gegensatz zu Lipoproteinstrukturen, einzelne Virionen membranassoziiert in perinukleären Kompartimenten vorliegen (vgl. Abb. 2.9 C). Die Tatsache, dass hochaufgereinigte VP im serumfreien Medium effizient von Kupffer-Zellen aufgenommen werden (vgl. Abb. 2.5, 2.15 A, D), lässt vermuten, dass eine HBV-Bindung an Zellrezeptor(en) bereits an der Zelloberfläche stattfindet und die Endozytose der Virionen vermittelt. Die Hypothese, dass HBV direkt von Leberzellrezeptor(en) in die Zelle aufgenommen wird, wird durch *in vitro* Studien bestärkt, die die Aufnahme von aufgereinigten nativen als auch fluoreszenzmarkierten VP hoher Dichte in serumfrei kultivierte primäre Hepatozyten darstellen (Glebe und Gerlich, 2004; Leistner et al., 2008). Demnach scheint eine Assoziation von Lipoproteinen geringer Dichte nicht essentiell für eine zelluläre Aufnahme von HBV zu sein. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass wahrscheinlich beide, die Virus- und die TRL-Komponente, über Bindung an zelluläre Rezeptoren die Aufnahme der HBV-TRL-Komplexe in die Zelle vermitteln.

Interessanterweise wurden im Mausmodell vergleichbare Ergebnisse zu den mit VP *ex vivo* perfundierten humanen Lebergewebestücken erzielt, wenn fluoreszenzmarkierte VP oder angereicherte native Virionen aus Patientenplasma intravenös injiziert und anschließend das Lebergewebe bzw. die Leberzellen analysiert wurden (vgl. 2.2.4, 2.2.5): Die in gleichem Maße detektierbare Aufnahme

der mit chemisch unterschiedlichen Fluorophoren markierten VP (vgl. Abb. 2.10) durch Kupffer-Zellen, und nicht durch Hepatozyten, deutet darauf hin, dass auch *in vivo* in der Mausleber native VP von Kupffer-Zellen endozytiert werden. Die in den Kupffer-Zellen gegenüber den Hepatozyten stark erhöhte HBV-DNA-Konzentration nach Injektion der nativen Virionen (vgl. Abb. 2.11) stammt demnach von deren Aufnahme in die Zellen, und nicht lediglich von einer zellulären Assoziation. Der zelluläre Erkennungsmechanismus von VP durch Kupffer-Zellen scheint demnach speziesübergreifend zu sein, wobei Phagozytose von artifiziellen VP-Aggregaten durch Lebermakrophagen ausgeschlossen werden kann, da Partikel mit einem größeren Durchmesser als 100 nm vor der Injektion mittels Filtration abgetrennt wurden.

Die Ergebnisse der RT-PCR deuten darauf hin, dass eine Maus-Kupffer-Zelle *in vivo* etwa das 18-fache an HBV akkumuliert wie ein Hepatozyt. Da die isolierten Leberzelltypen eine sehr hohe Reinheit aufwiesen und nur eine sehr geringe Expression von Albumin in der Kupffer-Zell-Fraktion verglichen mit der Hepatozyten-Fraktion detektierbar war (vgl. Abb. 2.11), kann davon ausgegangen werden, dass die Werte tatsächlich die HBV-DNA-Konzentrationen in den verschiedenen Leberzelltypen wiedergeben.

In der Leber liegen die Hepatozyten in einem etwa siebenfachen Überschuss gegenüber den Kupffer-Zellen vor (Pertoft und Smedsrod, 1987). Demnach werden, gemäß der RT-PCR-Analyse, von den nativen Virionen, die in der Mausleber von den Kupffer-Zellen und Hepatozyten dem Blutkreislauf entzogen werden, etwa 72% von den Kupffer-Zellen und nur ungefähr 28% von den Hepatozyten direkt gebunden bzw. aufgenommen. Da in dieser Arbeit mittels Immunfluoreszenzanalysen keine detektierbare Aufnahme von VP in LSEC oder Ito-Zellen beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 2.10), kann näherungsweise davon ausgegangen werden, dass die angegebenen Prozentzahlen nicht nur auf die Aufnahme von HBV durch Kupffer-Zellen und Hepatozyten, sondern auf alle Leberzelltypen bezogen werden können.

Inwieweit Maushepatozyten HBV aufnehmen, ist nicht bekannt. Da die Bindung von Virionen an Rattenhepatozyten und HBV-permissiven Tupaiahepatozyten vergleichbar ist (Leistner et al., 2008), ist es wahrscheinlich, dass auch Maushepatozyten HBV zumindest mit der gleichen Effektivität binden können wie Tupaiahepatozyten oder PHH. Dennoch ist es möglich, dass Maushepatozyten HBV nicht oder nur in geringen Mengen aufnehmen und die im Mausmodell ermittelten

Werte für die Virusassoziation mit Hepatozyten im Menschen deutlich höher liegen. Als wichtige Schlussfolgerung aus dem in dieser Arbeit durchgeführten Mausversuch kann jedoch gezogen werden, dass auch *in vivo* Kupffer-Zellen sowohl fluoreszenzmarkierte VP, als auch native Virionen, effizient dem Blutkreislauf entziehen und (im Falle der nativen Virionen: wahrscheinlich) aufnehmen.

Obwohl der Durchmesser der Fenestrae des menschlichen Lebersinusendothels im Durchschnitt 150 nm und maximal bis zu 300 nm beträgt (Braet und Wisse, 2002), deuten die Daten dieser Arbeit darauf hin, dass Virionen *in vivo* nicht, oder nur in geringem Maße, durch die Fenestrae direkt zu den Hepatozyten gelangen.

Die effektive Begrenzung für Partikel, die direkt durch die Fenestrae das Endothel passieren können, ist nicht eindeutig bestimmt. *In vivo* Untersuchungen ergaben, dass Mannan-benetzte Goldpartikel mit einem Durchmesser größer als 17 nm nicht die Endothel-Barriere überwinden können (Kempka und Kolb-Bachofen, 1988). Demgegenüber werden TRL-Remnants mit einer Größe bis maximal der Durchmesser der Fenestrae wahrscheinlich direkt durch das Endothel filtriert (Naito und Wisse, 1978).

Die unterschiedlichen Größenangaben der Partikel für einen effizienten Transport durch das Endothel könnten darin begründet sein, dass zu der Partikelgröße ein weiterer Faktor hinzukommt, der eine Filtration begrenzt. Dieser könnte die Dichte der partikelspezifischen Rezeptoren auf den einzelnen Leberzellen darstellen. Mannan-bindende C-Typ-Lektin-Rezeptoren sind in großer Anzahl auf den nicht-parenchymalen Leberzellen vorhanden (Feinberg et al., 2001; Noorman et al., 1997). Während Mannan-benetzte Goldpartikel von 5 nm Durchmesser noch im geringen Maße direkt zu den Hepatozyten gelangen (Kempka und Kolb-Bachofen, 1988), könnten aufgrund des erschwerten direkten Transportes größerer Partikel durch die Fenestrae (hier anscheinend ab einer Größe von 17 nm) die Bindung an Scavengerrezeptoren der nicht-parenchymalen Leberzellen im Sinus überwiegen und so effektiv mit einem diffusions- und strömungsgetriebenen Partikeltransport durch das Sinusendothel konkurrieren.

Ein ähnliches Gleichgewicht könnte bei den nicht-modifizierten und durch Oxidation modifizierten TRL-Remnants vorliegen. In Ratten konnte gezeigt werden, dass unter nicht-lipämischen Bedingungen TRL-Remnants *in vivo* in der Leber nur in deutlich geringerem Maße von Kupffer-Zellen als von Hepatozyten aufgenommen werden

(ungefähr zu 10% von Kupffer-Zellen und zu 90% von Hepatozyten) (Naito und Wisse, 1978; van Dijk et al., 1992), während durch Oxidation modifizierte TRL-Remnants, wie sie vermehrt unter hyperlipämischen Bedingungen *in vivo* vorzufinden sind, zu einem großen Teil von den Lebermakrophagen dem Blutkreislauf entzogen werden (bis zu 80%) (van Dijk et al., 1992). Eine vermehrte Aufnahme von TRL in Kupffer-Zellen unter hyperlipämischen Bedingungen *in vivo* ist in Übereinstimmung mit der Akkumulation von TG und CE in Kupffer-Zellen nach fett- und cholesterolreicher Ernährung und vermindertem Cholesterolefflux aus Makrophagen in Mäusen (Kennedy et al., 2005). Demnach scheint die Anzahl der Rezeptoren, die die Aufnahme nicht-modifizierter TRL-Remnants vermitteln, auf den Hepatozyten größer zu sein als auf den Kupffer-Zellen, obwohl auch in Kupffer-Zellen eine deutliche Expression von unmodifizierten TRL-Remnants-bindenden Rezeptoren wie LRP1 gezeigt wurde (Moestrup et al., 1992). Demgegenüber ist die Rezeptorverteilung für modifizierte TRL-Remnants auf den Leberzellen anscheinend genau umgekehrt. Basierend auf diesen Überlegungen könnte bei der geringeren Rezeptordichte auf den nicht-parenchymalen Leberzellen für nicht-modifizierte TRL-Remnants somit auch ein erschwerter direkter Transport größerer Lipoproteine durch das Endothel stattfinden, während bei hoher Rezeptordichte (wie für die modifizierten TRL) dieser jedoch effektiv verhindert wird (van Dijk et al., 1992).

Da HBV *in vitro* anscheinend sehr effizient an Kupffer-Zellen bindet und in diese aufgenommen wird (s.o.), und bei einem Durchmesser von mindestens 42 nm nach den bisherigen Annahmen die Filtration des Virus durch das Lebersinusendothel erschwert wäre, ist es wahrscheinlich, dass bereits nicht mit Lipoproteinen assoziiertes HBV *in vivo* (neben dem erschwerten direkten Transport zu den Hepatozyten) auch verstärkt von den Kupffer-Zellen aufgenommen würde.

Ähnliches würde für die Virus-TRL-Komplexe gelten. Da durch das assoziierte Virus zum einen die Bindung der TRL an Kupffer-Zellen verstärkt würde, und zum anderen der Durchmesser gegenüber den nicht-assoziierten Lipoproteinen erhöht und folglich der Transport durch die Endothelfenster erschwert wäre, ist es wahrscheinlich, dass *in vivo* auch unter physiologischen Bedingungen mehr Virus-TRL-Komplexe als nicht komplexierte TRL von den Kupffer-Zellen aufgenommen werden, anstatt direkt durch das Lebersinusendothel zu gelangen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die im *ex vivo* Perfusionsmodell beobachtete initiale Virusaufnahme im Lebersinus durch Kupffer-Zellen aufgrund der Leberarchitektur und der Viruseigenschaften auch *in vivo* wahrscheinlich ist, auch wenn eine quantitative Analyse im Vergleich zum direkten Transport des Virus zur Wirtszelle schwierig bleibt (vgl. 3.3).

Diese Theorie ist in Übereinstimmung mit der postulierten Rolle nicht-parenchymaler Leberzellen für verschiedene hepatotrope Pathogene beim Erreichen der Hepatozyten. So wurde für HCV die *Trans*-Infektion von Hepatozyten durch L- und DC-SIGN-exprimierende Zellen gezeigt (Cormier et al., 2004), d.h. durch Rezeptoren, die in großer Anzahl auf humanen Kupffer-Zellen und LSEC vorhanden sind (Bashirova et al., 2001; Lai et al., 2006). Für DHBV konnte *in vivo* eine initiale Virusaufnahme in LSEC statt in Hepatozyten dargestellt werden, was einen Entzug der Viren der Blutzirkulation durch LSEC vermuten lässt (Breiner et al., 2001). Darüber hinaus transmigrieren Plasmodium-Sporozoit Kupffer-Zellen, bevor sie in die Hepatozyten gelangen, wobei Kupffer-Zellen in der Leber *in vivo* für eine produktive Infektion der Hepatozyten notwendig sind (Baer et al., 2007; Frevert et al., 2005; Pradel und Frevert, 2001).

3.5 HBV assoziiert in serum- und plasmahaltigen Lösungen mit TRL zu Virus-TRL-Komplexen

Die elektronenmikroskopischen Analysen des *ex vivo* perfundierten Lebergewebes deuten auf die Existenz von Virus-Lipoproteinkomplexen in dem serumhaltigen Zirkulationsmedium hin (vgl. Abb. 2.9 D). Die Größe des in der Osmiumtetroxid-Fixierung dunkel erscheinenden Lipoproteins beträgt 200 nm, wobei es sich demnach wahrscheinlich um ein Chylomikron handelt. Die beiden assoziierten, rundlichen Strukturen besitzen mit etwa 42 nm den Durchmesser von HBV. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass in der Blutzirkulation von Patienten HBV mit TRL komplexiert vorliegt.

Vergleichbar zu Untersuchungen mit HCV sollten HBV, die mit Lipoproteinen geringerer Dichte assoziieren, nach Auftrennung von Patientenplasma mittels Dichteultrazentrifugation in Fraktionen geringerer Dichte als der Eigendichte der Viren banden (Nielsen et al., 2006). Die Existenz HBV-positiver Fraktionen geringerer Dichte nach Dichteultrazentrifugation wurde in dieser Arbeit mittels HBV-DNA-spezifischer Dot-Blot-Analyse bzw. RT-PCR sowie mittels HBsAg-spezifischem

ELISA erbracht (vgl. Abb. 2.12 A-C), wobei mit letzterem sichergestellt werden sollte, dass tatsächlich komplette Virionen mit Oberflächenproteinen und nicht nur HBV-DNA in diesen Fraktionen vorhanden sind.

Während mittels HBV-DNA-spezifischer Dot-Blot-Analyse bzw. RT-PCR in der Fraktion 25 im Vergleich zu der Fraktion 26 keine bzw. eine nur sehr geringe Konzentration von HBV-DNA detektiert werden konnte (vgl. Abb. 2.12 A, C), lässt sich mittels ELISA in Fraktion 25 noch ein HBsAg-Signal mit knapp einem Drittel der Stärke von Fraktion 26 detektieren (vgl. Abb. 2.12 B). Dies ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die in großer Mehrheit vorhandenen SVP aufgrund ihrer geringeren Sedimentationsgeschwindigkeit in geringerem Maße in Fraktionen höherer Dichte sedimentiert sind als die nicht Lipoprotein-assoziierten Virionen. Somit erwartete man ein starkes Signal neben Virus-Lipoproteinkomplexen in Fraktionen geringer Dichte im ELISA.

Die Tatsache, dass in der RT-PCR-Analyse oberhalb der Fraktion 12 die Fraktionen 24 und 26 deutlich positiv sind, in der Dot-Blot-Analyse jedoch nur Fr. 26, liegt wahrscheinlich an der Maskierung der HBV-DNA durch die hohe Anzahl der Plasmaproteine in Fraktion 24 und einer daraus resultierenden, verminderten Bindung der HBV-spezifischen DNA-Sonde. In Fraktion 26 ist die Konzentration der meisten Plasmaproteine deutlich geringer, da sie aufgrund ihrer höheren Dichte in dichtere Fraktionen sedimentiert sind. Da ihre Sedimentationsgeschwindigkeit jedoch teilweise sehr gering ist, ist ihre Konzentration in Fr. 24 noch deutlich höher als in Fraktion 26. Bei der quantitativen Auswertung sind demnach die höheren Werte der RT-PCR-Analyse für die HBV-DNA-Konzentration in den Fraktionen geringer Dichte (11,4%) gegenüber denen der DNA Dot-Blot-Analyse (7,5%) vorzuziehen. Demzufolge liegen im Plasma HBV-positiver Patienten mindestens 11,4% der Virionen assoziiert mit Lipoproteinen geringerer Dichte vor.

Geht man bei den Virus-Lipoproteinkomplexen von einer Oberflächenassoziation der Komponenten (s.u.) und mindestens einem assoziierten Virion pro Lipoprotein sowie näherungsweise bei Virionen und Lipoproteinen von kugelsymmetrischen Strukturen aus, ergab sich bei einer angenommenen Dichte der Lipoproteine höchstens entsprechend der VLDL (1,006 g/ml) gemäß 4.2.1.3 ein Mindestdurchmesser der Lipoproteine im Virus-Lipoproteinkomplex von 85,1 nm (Fr. 23) bzw. 157,3 nm (Fr. 26) (vgl. Tab. 3). Der ermittelte Mindestdurchmesser deutet in Übereinstimmung mit den elektronenmikroskopischen Analysen auf Chylomikronen (> 100 nm), VLDL (bis

90 nm) oder Chylomikronenremnants (> 40 nm; (Mjos et al., 1975)), also TRL, als Lipoproteinkomponente der Komplexe hin. Verwendete man für die Berechnung statt der Dichte der VLDL die der Chylomikronen (0,96 g/ml), so ergab sich ein Mindestdurchmesser von 59,0 nm (Fr. 23) bzw. 67,8 nm (Fr. 26). Auch hiermit erhält man Werte, die mindestens den Durchmessern der VLDL bzw. Chylomikronenremnants entsprechen, aber oberhalb der Mindestdurchmesser dichter Lipoproteine liegen.

Aufgrund des berechneten geringeren Mindestdurchmessers der in den Fraktionen 23 und 24 als in Fraktion 26 enthaltenen Lipoproteine ist es wahrscheinlich, dass es sich in diesen Fraktionen bei der Lipoproteinkomponente um Chylomikronenremnants oder VLDL handelt, während in Fraktion 26 eher größere Chylomikronenremnants oder Chylomikronen die Virus-Lipoproteinkomplexe bilden dürften.

Bei den durchgeführten Berechnungen wurde für die assoziierte Lipoproteinkomponente eine Annahme der Dichte entsprechend der VLDL oder geringer gemacht, da Viruskomplexe mit LDL in Fraktionen 23 oder höher dadurch auszuschließen sind, dass zum einen der berechnete Durchmesser der Lipoproteinkomponente bei eingesetzter Dichte entsprechend der LDL (1,019 g/ml) bei mindestens 112,3 nm (Dichte Fr. 23) liegen müsste, was für LDL nicht beschrieben ist, oder zum anderen die durchschnittliche Fraktionsdichte gleich (Fr. 24) bzw. unterhalb der Eigendichte der LDL lag (Fr. 25 und 26). Diese Überlegungen stützen die Theorie, dass es sich bei den im Plasma infizierter Patienten mit HBV-assoziierten Lipoproteinen um TRL handelt.

Als ein weiterer Ansatz, die Assoziation von Viren mit ApoB-haltigen Lipoproteinen im Blut von Patienten nachzuweisen, wurde in dieser Arbeit eine Analyse des Plasmas mittels eines ApoB_{48/100}- und HBsAg-spezifischen ELISAs durchgeführt. Hierbei binden die Virus-Lipoproteinkomplexe mit ihrer Lipoproteinkomponente an die ApoB-spezifischen Antikörper, mit denen der Boden der ELISA-Gefäße benetzt ist, während die Viruskomponente von dem Peroxidase-gekoppelten HBsAg-spezifischen Detektionsantikörper nachgewiesen wird. Als Negativkontrolle diente in dieser Arbeit ein HNF3beta-spezifischer Antikörper, der keine Lipoproteine bindet. Da auch bei höheren HBV-Konzentrationen nur bei den mit ApoB-spezifischen Antikörpern und nicht mit HNF3beta-spezifischen Antikörpern benetzten Gefäßen HBsAg detektiert werden konnte, weisen auch der ApoB_{48/100}-/HBsAg-spezifische

ELISA in Analogie zu den Ultrazentrifugations-Untersuchungen auf das Vorliegen von Komplexen aus Viren und ApoB-haltigen Lipoproteinen hin (vgl. Abb. 2.12).

Es ist seit längerem bekannt, dass im Blut von HCV-Patienten Virus-TRL-Komplexe vorliegen (Prince et al., 1996; Thomssen et al., 1992). Die genauere Untersuchung dieser Lipo-Viropartikel ergab, dass das Virus sehr wahrscheinlich in das Innere der Lipoproteine eingebaut und von den Lipiden und Proteinen der TRL umhüllt ist, wobei anscheinend einzelne Oberflächenproteine der Virionen auch auf der Oberfläche der Lipoproteine vorhanden sind (Andre et al., 2002; Diaz et al., 2006; Nielsen et al., 2006; Prince et al., 1996). Im Gegensatz zu HCV deuten die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Analyse bei HBV eher auf eine Virusassoziation mit TRL an der Lipoproteinoberfläche hin (vgl. Abb. 2.9 D). Auch die Ergebnisse des ApoB-/HBsAg-spezifischen ELISA unterstützen diese Theorie: Die deutliche Detektion von HBsAg auf ApoB-gebundenen Plasmabestandteilen lässt eine starke Exposition der Virusoberflächenproteine zu dem mit HBsAg-spezifischen Antikörpern versetzten ELISA-Puffer vermuten, wie sie eher bei einer Oberflächenassoziation als Inkorporation der Virionen zu erwarten wäre.

Während der Einbau der HCV in die TRL im Zuge der Produktion der Lipoproteine innerhalb der Hepatozyten stattfindet und anschließend die Lipo-Viropartikel ins Blut sezerniert werden (Gastaminza et al., 2006; Ye, 2007), wäre eine oberflächenvermittelte Assoziation von HBV mit den Lipoproteinen möglicherweise unabhängig von einem intrazellulären Produktionsweg der Lipoproteine und könnte somit auch erst nach Sekretion der einzelnen Komponenten im Blut stattfinden. Eine im Blut stattfindende Oberflächenassoziation mit Lipoproteinen ist z.B. für die mit Chylomikronen assoziierte LPL gezeigt (Heeren et al., 2002).

Die Fähigkeit von HBV im Serum Komplexe mit TRL zu bilden, wurde in dieser Arbeit mit aufgereinigten Virionen hoher Dichte überprüft, die zu dem Serum einer nicht gegen HBsAg-vaccinierten Person gegeben worden waren und das Serum anschließend nach Dichteaufftrennung über Ultrazentrifugation mittels HBV-spezifischer DNA Dot-Blot-Analyse untersucht wurde (vgl. Abb. 2.12 D). Da im Vergleich zu den nicht mit Serum versetzten Virionen nur in der serumhaltigen Probe in der Fraktion mit der geringsten Dichte HBV-DNA detektierbar war, ist davon auszugehen, dass HBV-TRL-Komplexe nach Zugabe des Serums gebildet wurden. Da ein Einbau der Virionen in Lipoproteine unwahrscheinlich erscheint,

unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese einer Oberflächenassoziation von HBV und Lipoproteinen im Blut infizierter Patienten.

Die in dieser Arbeit postulierte Form der Assoziation von HBV mit TRL könnte auch zur Folge haben, dass *in vivo* größere Mengen Virionen an Lipoproteinen gebunden vorliegen, als die Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Dichteauftrennung des Patientenplasmas ergab: Bereits für kleine TRL-oberflächenassoziierte Proteine mit im Vergleich zu den Lipoproteinen größerer Dichte, wie z.B. der LPL, konnte eine im großen Maße stattfindende Abtrennung von den Lipoproteinen während einer Dichteultrazentrifugation gezeigt werden (Heeren et al., 2002). Da HBV einen deutlich schwereren Liganden als die LPL darstellt, auf den während einer Ultrazentrifugation erheblich größere Zentrifugalkräfte wirken, ist es wahrscheinlich, dass viele HBV-TRL-Komplexe während einer Dichteultrazentrifugation zerstört werden und ihr Anteil demnach im Blut von HBV-Patienten wesentlich höher ausfällt als die quantitative Auswertung der Dichteauftrennung des Patientenplasmas in dieser Arbeit ergab.

Was vermittelt im Blut HBV-infizierter Patienten die Assoziation von Virionen mit TRL? Wie bereits erwähnt, bindet HBV spezifisch ApoH (Stefas et al., 2001), welches wiederum als Proteinbestandteil von TRL nachgewiesen wurde (Polz und Kostner, 1979). Demnach könnten im Blut über die Bindung von HBV an ApoH Virus-TRL-Komplexe gebildet werden, was für ein Erreichen der Wirtszelle durch HBV essentiell sein könnte (vgl. 3.4). Die Möglichkeit einer ApoH-vermittelte Assoziation von HBV mit TRL, insbesondere Chylomikronen, wurde bereits vorgeschlagen (Mehdi et al., 1994). Neben ApoH ist auch für die LPL eine Bindung an HBV gezeigt worden (Deng et al., 2007), was ähnlich zu ApoH die Bildung von Virus-TRL-Komplexen im Blut vermitteln könnte.

3.6 Kupffer-Zellen *trans*-infizieren Hepatozyten mit HBV

Im Rahmen eines Pulse-Chase-Experimentes konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nach 45-minütiger Perfusion des Lebergewebes mit fluoreszenzmarkierten VP und nachfolgender 16-stündiger Chase-Phase mit VP-freiem Medium fluoreszenzmarkierte VP in Hepatozyten detektierbar waren (vgl. 2.2.7). Durch den experimentellen Aufbau als Pulse-Chase-Versuch sollte dabei erreicht werden, dass die Ergebnisse nach 16h den Fluoreszenzsignalen der initial in die Kupffer-Zellen aufgenommenen VP zugeordnet werden konnten und nicht als

eine langsame, unabhängige und direkte Aufnahme der VP in die Hepatozyten hätten interpretiert werden können. Auch wenn eine direkte Aufnahme von VP dabei nicht auszuschließen ist, wäre sie vergleichsweise gering und läge unterhalb der Detektionsgrenze des Fluoreszenzmikroskops, da nach der Pulse-Phase die Fluoreszenzsignale der VP nur in den Kupffer-Zellen darstellbar waren, auf die dann nach der Chase-Inkubation mit VP-freiem Medium die detektierbaren Signale zurückgeführt wurden (vgl. 2.2.2). Diese experimentelle Anordnung lässt demnach den Schluss zu, dass in dem *ex vivo* perfundierten humanen Lebergewebe initial in den Kupffer-Zellen akkumulierende VP von den Makrophagen in die Hepatozyten weitertransportiert wurden.

Gestärkt wird diese These durch folgende Beobachtungen: Hepatozyten sind nur dann positiv für VP, wenn umliegende Kupffer-Zellen negativ oder gering positiv für VP sind (vgl. Abb. 2.13 A), also VP abgegeben haben. Im Gegensatz dazu sind Kupffer-Zellen in den Bereichen, in denen Hepatozyten negativ für VP sind, vergleichbar stark positiv für VP wie nach der 45-minütigen Pulse-Perfusion, haben also keine oder nur wenige VP abgegeben (vgl. Abb. 2.13 B). Die beobachtete Verminderung der Anzahl an VP-positiven Kupffer-Zellen ist demnach an den Anstieg der Anzahl VP-positiver Hepatozyten gekoppelt (vgl. Abb. 2.13 D). Darüber hinaus zeigen Nahaufnahmen im Gewebe VP-positive Strukturen in Kupffer-Zellen und Hepatozyten auf, die darauf hindeuten, dass VP von der Kupffer-Zelle zu der Hepatozyte transportiert worden sind. Hierbei werden VP offensichtlich zunächst zu der und dann entlang der Hepatozyten-Zellmembran transportiert, bevor sie anschließend von der Plasmamembran in die Wirtszelle hinein aufgenommen werden (vgl. Abb. 2.13 A, Vergrößerung; Abb. 2.19, 2.20, 2.21).

Ein weiterer Hinweis dafür, dass Kupffer-Zellen *in vivo* HBV an Hepatozyten weitergeben, liefern die Infektionsversuche in Mischkulturen aus Kupffer-Zellen und PHH (vgl. 2.2.8). Hierbei infizierten initial mit HBV inkubierte Kupffer-Zellen später zugefügte Hepatozyten produktiv und in *trans* (d.h. ohne HBV-Replikation in den Kupffer-Zellen). Da isolierte reine Kupffer-Zell-Kulturen nicht produktiv mit HBV infiziert werden konnten, lässt sich eine Infektion der Hepatozyten durch Kupffer-Zellen in *cis* (mit HBV-Replikation in den Kupffer-Zellen) ausschließen. Diese Ergebnisse zeigen zudem, dass der für die fluoreszenzmarkierten VP beobachtete Transfer von der Kupffer-Zelle in die Hepatozyte ein funktionelles Korrelat besitzt und eine *Trans*-Infektion der Hepatozyte bewirkt.

Interessanterweise werden fluoreszenzmarkierte VP in der Maus nach 45 Minuten zwar effizient von Kupffer-Zellen aufgenommen (vgl. Abb. 2.10), aber vermutlich nicht oder nur sehr ineffizient an Hepatozyten weitergegeben: In dieser Arbeit konnten 18h nach Injektion der VP im fixierten Lebergewebe mittels Fluoreszenzmikroskopie keine VP mehr detektiert werden, weder in Kupffer-Zellen noch in Hepatozyten (vgl. Abb. 2.13 E). Auffällig war zudem ein stark grün gefärbter Urin der Tiere 3h nach Injektion. Da die VP aufgrund des gebundenen Fluorophors im Tageslicht violett/bläulich erscheinen und demnach bei Zugabe in eine gelbe Flüssigkeit diese grün färben, ist die Verfärbung des Urins wahrscheinlich auf eine starke renale Elimination der VP zurückzuführen. In der Niere werden jedoch Proteine, die größer als 70 kDa sind, nicht filtriert (Pavenstadt et al., 2003; Wartiovaara et al., 2004). Es ist demnach wahrscheinlich, dass die VP vor der glomerulären Filtrierung in den Kupffer-Zellen (und im Gegensatz zu den humanen Kupffer-Zellen, vgl. Abb. 2.15 A; 3.7) lysosomal verdaut und als VP-Fragmente in das Blut resezerniert worden sind. Diese Erklärung unterstützt die oben geäußerte Hypothese, dass in Mäusen kein oder nur in sehr geringem Maße ein gerichteter Transport der in die Kupffer-Zellen aufgenommenen VP zu und in die Hepatozyten stattfindet. Dieser nur im humanen Lebergewebsperfuisionsmodell dargestellte Infektionsweg scheint demnach speziesspezifisch zu sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der menschlichen Leber von Kupffer-Zellen aufgenommenes HBV an seine Wirtszelle weitergegeben wird und diese *trans*-infiziert.

3.7 HBV folgt in Makrophagen dem Transportweg der freien Cholesterole endozytierter Lipoproteine

Für die Untersuchung des HBV-Transzytoseweges durch Kupffer-Zellen wurden isolierte humane Kupffer-Zellen oder, als Modell für humane primäre Lebermakrophagen, aus humanen Monozyten bzw. THP-Zellen differenzierte Makrophagen verwendet. Letztere boten in dieser Arbeit gegenüber den Kupffer-Zellen den Vorteil, dass sie unabhängig von den seltenen Leberpräparaten ständig für Untersuchungen zur Verfügung standen. Darüber hinaus ist die Hintergrundfluoreszenz im Vergleich zu den primären Kupffer-Zellen wesentlich geringer, was insbesondere bei fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen im

kurzwelligen Wellenbereich, wie z.B. bei der Verwendung von Fluorophoren wie Filipin, von großer Bedeutung ist.

Da die elektronenmikroskopischen Untersuchungen auf eine Aufnahme von HBV und TRL in identische Kompartimente hinwiesen (vgl. Abb. 2.9 C, D) und HBV in serum- bzw. plasmahaltigen Lösungen mit TRL assoziiert (vgl. 2.2.6, 3.5), wurde in dieser Arbeit untersucht, ob auch das intrazelluläre Recycling von HBV in den Lebermakrophagen an den Transport von Lipoproteinen oder einer Lipoproteinkomponente gekoppelt ist.

Das ApoB_{100/48} enthaltende Core der endozytierten Lipoproteine wird nach Hydrolyse der neutralen Lipide CE und TG nicht dem endosomalen System entzogen, sondern wird als nicht membranassoziertes Kargo ins Lysosom transportiert (Davis et al., 1987; Goldstein und Brown, 2009; Heeren et al., 2001; Heeren et al., 1999; Mayor et al., 1993). Da HBV endosomal offensichtlich im Gegensatz zu den Lipoproteinstrukturen membranassoziiert vorliegt (vgl. Abb. 2.9 C), erscheint es unwahrscheinlich, dass es dem Transport des Lipoprotein-Cores folgt. Im Gegensatz zu dem Lipoprotein-Core werden die hydrolysierten CE und TG jedoch als freie Cholesterole und Fettsäuren zellulär recycelt (Liscum und Munn, 1999; Salvayre et al., 1989; van Dijk et al., 1992), weswegen es wahrscheinlich ist, dass HBV dem Transportweg der hydrolysierten neutralen Lipide endozytierter Lipoproteine folgt, um die Kupffer-Zelle zu transmigrieren.

Um diese Theorie zu überprüfen, wurde zunächst die intrazelluläre Lokalisation fluoreszenzmarkierter VP in Kupffer-Zellen analysiert: Sollte HBV in den Lebermakrophagen tatsächlich einem nicht degradierenden Recyclingweg folgen, sollten VP auch nach längerer Chase-Inkubation mit VP-freiem Medium nicht in lysosomalen Kompartimenten konzentrieren. Hierzu wurde die Lokalisation fluoreszenzmarkierter VP mit der von fluoreszenzmarkiertem Transferrin verglichen. Wie bereits erwähnt, wird Transferrin nicht ins Lysosom transportiert, sondern akkumuliert in zellulären Kompartimenten, aus denen bzw. über die Komponenten recycelt werden (Maxfield und McGraw, 2004; Mellman, 1996). In Einklang mit einem zellulären Recycling von intakten HBV und einer Konzentrierung in nicht-lysosomalen Zellorganellen wurden auch nach einer zweistündigen Chase-Inkubation mit VP-freiem Medium VP ausschließlich in Transferrin-positiven Kompartimenten detektiert (vgl. Abb. 2.15 A).

Im Folgenden wurde die Lokalisation von fluoreszenzmarkierten VP mit der von freien Cholesterolen, stammend aus endozytierten Lipoproteinen, in Kupffer-Zellen verglichen (vgl. Abb. 2.15 B). Hierfür wurden mit NBD-Cholesterolen markierte TRL verwendet, bei denen die amphiphilen NBD-Cholesterole in die äußere Schicht der Lipoproteine eingebaut worden waren. Die Versuchsbedingungen zur Untersuchung des VP-Transports in Kupffer-Zellen wurden dabei so gewählt, dass das NBD-Fluoreszenzsignal nicht die Lokalisation der TRL, sondern die der von den TRL abgetrennten NBD-Cholesterole wiedergab. Hierzu wurden die Zellen nach Inkubation mit VP₅₉₄- und TRL_{NBD}-haltigem Medium 2h mit VP₅₉₄- und TRL_{NBD}-freiem Chase-Medium kultiviert. Auf diese Weise sollte bewirkt werden, dass nach 2h endosomalen Transportes die äußere Schicht der Lipoproteine abgebaut worden war und die NBD-Cholesterole nicht mehr in die TRL inkorporiert, sondern als freie Cholesterole vorlagen und das Fluoreszenzsignal die aus den TRL stammenden freien Cholesterole nach 2h intrazellulärer Prozessierung der Lipoproteine wiedergab (Lusa et al., 2001). Die ausschließliche Kolo-kalisation beider Komponenten nach 2h Inkubation mit VP₅₉₄- und TRL_{NBD}-freiem Medium ist ein starker Hinweis dafür, dass die VP in Kupffer-Zellen dem gleichen Transportweg intrazellulär folgen wie aus TRL stammende, freie Cholesterole. Interessant ist auch die perinukleäre Anordnung beider Komponenten, die für freie Cholesterole endozytierter Lipoproteine beschrieben ist (Ko et al., 2001; Liscum und Munn, 1999) und in Bezug auf die VP mit den Ergebnissen der elektronenmikroskopischen Analysen übereinstimmt (vgl. Abb. 2.9 C).

Für freie Cholesterole endozytierter Lipoproteine ist der Transport aus perinukleären Kompartimenten über cholesterolhaltige Vesikel zur Plasmamembran beschrieben (Ko et al., 2001; Liscum und Munn, 1999). Da auch in der Peripherie die Fluoreszenzsignale der VP mit denen der NBD-Cholesterole (hier in offensichtlich kleinen Vesikeln) überlagerten und es sich hierbei aufgrund der zweistündigen Chase-Inkubation mit TRL_{NBD}- und VP₅₉₄-freiem Medium nicht um kurz vor der Zellfixierung endozytierte Komponenten handelt, ist nicht nur von einem Transport der VP entlang des Transportweges der Lipoprotein-CE und -TG zu perinukleären Kompartimenten, sondern auch ihrer hydrophoben Hydrolysate weiter zur Plasmamembran auszugehen. Ein Abschnüren kleiner HBV-haltiger Vesikel von perinukleären Kompartimenten ist auch gut mit den Ergebnissen der elektronenmikroskopischen Analyse vereinbar (vgl. Abb. 2.9 C).

Die Hypothese, dass HBV intrazellulär dem Recyclingweg der aus Lipoproteinen stammenden freien Cholesterole folgt, wird auch durch die weiteren in dieser Arbeit durchgeführten immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen bekräftigt. So ist eine deutliche Kollokalisierung der VP₅₉₄ mit ApoA1 detektierbar, wenn Kupffer-Zellen zusammen mit humanem Serum inkubiert wurden (vgl. Abb. 2.15 C). Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die freien Cholesterole endozytierter TRL in Vesikeln akkumulieren, in die ApoA1 aus HDL transportiert wird (Heeren et al., 2003). Gestützt wird diese Hypothese durch das mit fluoreszenzmarkiertem HDL durchgeführte Pulse-Chase-Experiment. Hierbei kollokalisieren die fluoreszierenden Proteinkomponenten exogen zugeführter HDL mit VP-positiven Kompartimenten (vgl. Abb. 2.15 D). Da ApoA1 die Hauptproteinkomponente der HDL darstellt, bestätigt diese Beobachtung einen Transport der aus HDL-stammenden ApoA1 in die VP-akkumulierenden, zellulären Strukturen. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass analog zu den freien Cholesterolen stammend aus endozytierten TRL die VP in zellulären Kompartimenten lokalisieren, in die ApoA1 aus exogenem HDL transportiert wird.

Ein weiterer gut charakterisierter Marker für zelluläre Kompartimente, die freie Cholesterole endozytierter Lipoproteine akkumulieren, ist NPC1 (Sugii et al., 2003; Wojtanik und Liscum, 2003). In Pulse-Chase-Experimenten konnte in dieser Arbeit in aus Monozyten differenzierten Makrophagen eine Kollokalisierung von fluoreszenzmarkierten VP mit NPC1 nach vierstündiger Inkubation mit VP-freiem Chase-Medium gezeigt werden (vgl. Abb. 2.16 A).

Weiter gestärkt wird die Hypothese eines HBV-Transportes in Kompartimente, die freie Cholesterole endozytierter Lipoproteine konzentrieren, durch die Ergebnisse, die nach Fluoreszenzmarkierung der zellulären freien Cholesterole mittels Filipin eine Lokalisation von VP in Filipin-positiven Kompartimenten zeigten (vgl. Abb. 2.16 B).

Vergleichbar zu den Ergebnissen mit NBD-Cholesterolen markierten TRL in Kupffer-Zellen konnte sowohl mit NPC1 als auch Filipin eine Kollokalisierung nicht nur in perinukleären, sondern auch in peripheren vesikulären Strukturen detektiert werden. Hierbei konnte es sich aufgrund einer vierstündigen Inkubation mit VP-freiem Medium ebenfalls nicht um kurz vor Zellfixierung endozytierte VP handeln. Da freie Cholesterole endozytierter Lipoproteine aus perinukleären Regionen über NPC1-haltige Vesikel zur Plasmamembran transportiert werden (Ko et al., 2001; Liscum und Munn, 1999), unterstützt dies die Hypothese, dass HBV nicht nur in

Kompartimenten konzentriert, in denen freie Cholesterole akkumulieren, sondern auch dem weiteren Transport der freien Cholesterole zur Plasmamembran folgt.

Die Theorie der transzellulären HBV-Migration entlang des Transportweges freier Cholesterole endozytierter Lipoproteine wird auch durch die in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Vergleiche beider Transportwege gestärkt:

U18666a inhibiert den Transport freier Cholesterole von perinukleären Kompartimenten zu der Plasmamembran (Delton-Vandenbroucke et al., 2007; Ko et al., 2001; Liscum und Faust, 1989). Vergleichbar wie für freie Cholesterole mittels Fluoreszenzmarkierung durch Filipin gezeigt führt U18666a auch für VP zu einer verstärkten Akkumulierung in perinukleären Kompartimenten (vgl. Abb. 2.17). Dies deutet darauf hin, dass U18666a, vergleichbar zu den freien Cholesterolen, den Transport der HBV zur Plasmamembran inhibiert und HBV demnach nach Aufnahme in freie Cholesterole akkumulierende Kompartimente weiter dem Transport der freien Cholesterole in die Zellperipherie folgen.

Auch die Induktion der HBV-Retroendozytose in Makrophagen mittels ApoA1-haltiger Serumkomponenten unterstützt unsere Annahme (vgl. Abb. 2.18 A, B). ApoA1 und HDL bewirken eine Verstärkung des Cholesteroltransportes zur Plasmamembran mit resultierendem erhöhten Cholesterolefflux (Wang und Tall, 2003; Yancey et al., 2003). Da ApoA1-haltige Serumkomponenten ebenfalls den Transport von VP in das Zellkulturmedium verstärken, ist es wahrscheinlich, dass HBV dem Weg der freien Cholesterole zur Plasmamembran folgt.

Mittels in TRL inkorporierter, radioaktiv markierter Cholesterole konnte in Kollaboration mit Xiaoming Cheng auch die parallele Induktion der Resekretion von HBV und freien Cholesterolen dargestellt werden (vgl. Abb. 2.18 C). Diese beobachtete Assoziation der HBV Retroendozytose mit dem Efflux von freien Cholesterolen stammend aus endozytierten TRL stärkt weiter die Hypothese, dass der Transport von HBV und der von den Lipoprotein-CE-stammenden Lipide in Kupffer-Zellen aus perinukleären Kompartimenten in die Zellperipherie funktionell gekoppelt sind.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl die Lokalisationsstudien der fluoreszenzmarkierten VP in Kupffer-Zellen und aus humanen Monozyten differenzierten Makrophagen, als auch die funktionellen, den zellulären Transport

freier Cholesterole beeinflussenden Versuche darauf hinweisen, dass HBV in Kupffer-Zellen dem Transport der freien Cholesterole, die aus endozytierten Lipoprotein-CE stammen, folgt, um die Zelle zu transmigrieren.

Aktuelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass freie Cholesterole endozytierter Lipoproteine in sphingolipid-/cholesterolreichen Membrandomänen (sog. „lipid rafts“) akkumulieren (Lusa et al., 2001; Storey et al., 2007), welche entscheidend den weiteren Transport der in ihnen konzentrierenden Lipide und Proteine steuern (Schuck und Simons, 2004; Simons und Ikonen, 1997). Es erscheint demnach möglich, dass HBV den Transportweg der freien Cholesterole folgt, um in diesen Mikrodomänen zu konzentrieren und in „lipid rafts“ gerichtet weitertransportiert zu werden (vgl. 3.8). Eine Lokalisation von HBV in „lipid rafts“ ist bei dem gerichteten intrazellulären Transport neu gebildeter Viren in polarisierten Hepatozyten zur basolateralen als auch zur apikalen Plasmamembran vorgeschlagen worden (Bhat et al., 2011). Auch Untersuchungen an HepaRG-Zellen legen eine Konzentrierung von HBV in „lipid rafts“ nahe, wobei die Autoren eine „lipid raft“/Caveolae-vermittelte Virusaufnahme postulieren (Macovei et al., 2010). Unterstützt wird diese Theorie durch Endozytosestudien mit fluoreszenzmarkierten SVP an COS-7-Zellen (Hao et al., 2011).

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Theorie, dass HBV nach Aufnahme in die Lebermakrophagen über einen mit den freien Cholesterolen endozytierter Lipoproteine gekoppelten Transport in sphingolipid-/cholesterolreichen Membrandomänen konzentriert. In U18666a-behandelten Zellen kommt es zu einer verstärkten Bildung und Anhäufung von „lipid rafts“ in späten Endosomen (Lusa et al., 2001). Da die VP ebenfalls in U18666a-behandelten Zellen perinukleär akkumulierten (vgl. Abb. 2.17) erscheint es möglich, dass HBV in „lipid rafts“ konzentriert und deshalb der Transport zur Plasmamembran verhindert wird. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die freien Cholesterole endozytierter Lipoproteine in späten Endosomen in NPC1-funktionalen Zellen wahrscheinlich initial nicht in „lipid rafts“ akkumulieren und über einen „lipid raft“-unabhängigen Transport zur Plasmamembran transportiert werden, wo sie erst im weiteren Verlauf in sphingolipidreiche Membrandomänen eingebaut werden (Lusa et al., 2001). Im Gegensatz zu späten Endosomen sind frühe und rezirkulierende Endosomen reich an „lipid rafts“, die hier auch den Transport der Cholesterole zur Plasmamembran

vermitteln (Gagescu et al., 2000; Hao et al., 2002; Hornick et al., 1997; Mayor et al., 1998; Mukherjee et al., 1998). Da freie Cholesterole endozytierter Lipoproteine, insbesondere der TRL, wahrscheinlich auch über frühe und recycelnde Endosomen zur Plasmamembran transportiert werden (vgl. 1.3.3.1, 1.3.3.2) (Holttä-Vuori et al., 2002; Soccio und Breslow, 2004), wäre es demnach möglich, dass HBV, je nach Transportweg, bereits endosomal oder erst nach Erreichen der Plasmamembran in diesen konzentriert.

Eine Lokalisierung von HBV in sphingolipid-/cholesterolreichen Membrandomänen nach intrazellulärem Transport in den Kupffer-Zellen wäre auch in Übereinstimmung mit der Kolo-kalisation von SR-B1 und VP, wie sie in Abbildung 2.21 zu beobachten ist (vgl. Pfeile), da SR-B1 in „lipid rafts“ konzentriert (Atshaves et al., 2007; Camarota et al., 2004; Storey et al., 2007).

Die Viruslokalisierung in „lipid rafts“ könnte durch das virale L-Protein vermittelt werden, welches möglicherweise über seinen N-terminalen Acylrest als Virusmembrananker fungiert (Glebe und Urban, 2007). Für Proteine, die über gesättigte Acylketten in Membranen verankert vorliegen (wie z.B. die GPI-gekoppelten Proteine oder das Hemagglutinin der Influenzaviren), wurde eine primäre Lokalisation in sphingolipid-/cholesterolreichen Membranmikrodomänen (Melkonian et al., 1999) und eine Kopplung an den endosomalen Transport von freien Cholesterolen endozytierter Lipoproteine aus Transferrin-positiven Kompartimenten zur Plasmamembran gezeigt (Mayor et al., 1998). Demnach könnten in die zelluläre Membran eingelassene Acylreste der L-Proteine die Lokalisation von HBV in „lipid rafts“ bewirken, was eine Kopplung des Virus an den Transport dieser Domänen zur Folge hätte. Alternativ könnte HBV an einen Rezeptor binden, der seinerseits in „lipid rafts“ konzentriert.

3.8 HBV folgt dem Transportweg der in den Kupffer-Zellen akkumulierenden neutralen Lipide zur und in seine Wirtszelle

Die Ergebnisse in Abschnitt 2.3 deuten darauf hin, dass HBV in Makrophagen dem Recyclingtransportweg der freien Cholesterole endozytierter Lipoproteine folgt. Da *in vivo* neutrale Lipide endozytierter Lipoproteine nach intrazellulärer Metabolisierung aus Makrophagen gezielt über den reversen Cholesteroltransport zu und in die Hepatozyten transportiert werden (Brewer, 2004; Ikonen, 2008) und speziell für Kupffer-Zellen *in vivo* der gezielte Transfer von hydrophoben Hydrolysaten der aus

den endozytierten TRL-stammenden neutralen Lipide in die Hepatozyten vorgeschlagen wurde (van Dijk et al., 1992), sollte im letzten Abschnitt dieser Arbeit untersucht werden, ob HBV diesen Transportweg *in vivo* nutzt, um seine Wirtszelle zu erreichen und gegebenenfalls auch in diese aufgenommen zu werden.

Um die inter- und intrazellulären Transportwege neutraler Lipide und ihrer hydrophoben Hydrolyseprodukte im *ex vivo* perfundierten humanen Gewebe zu visualisieren, wurden die Lipide mit BODIPY₄₉₃₋₅₀₃ fluoreszenzmarkiert (vgl. Abb. 2.19, 2.20). Dabei lässt sich eine starke Anfärbung einzelner Zellen erkennen, bei denen es sich aufgrund ihrer sinusoidalen Lokalisation sehr wahrscheinlich um Kupffer-Zellen handelt (vgl. Abb. 2.19). Auch die teilweise starke Akkumulierung dieser Zellen von VP₅₉₄ weist in Übereinstimmung mit 2.2 auf Lebermakrophagen hin. Von diesen Zellen sind verstärkt BODIPY₄₉₃₋₅₀₃ positive Strukturen zu und entlang den Plasmamembranen direkt angrenzender Hepatozyten erkennbar, die sich mit abschwächender Fluoreszenzintensität entlang weiter entfernter Hepatozytenmembranen verzweigen (vgl. Abb. 2.19 A, B, Pfeilspitzen). Es erscheint demnach wahrscheinlich, dass während der Perfusion des Lebergewebes neutrale Lipide bzw. deren hydrophoben Hydrolysate von den Neutrallipid-akkumulierenden Kupffer-Zellen in die Plasmamembranen umliegender Hepatozyten transportiert worden sind.

Die BODIPY₄₉₃₋₅₀₃-Färbung lässt eine Unterscheidung zwischen veresterten neutralen Lipiden und deren hydrophoben Hydrolysaten nicht zu (Rudolf und Curcio, 2009). Es lassen sich demnach keine Rückschlüsse darauf ziehen, ob die Färbung den interzellulären Transport freier Cholesterole bzw. Fettsäuren oder derer neutralen Ester CE und TG darstellt. Da die neutralen Lipide endozytierter TRL und LDL von den endosomalen Lipasen hydrolysiert werden und nur die Hydrolysate aus dem endosomalen System entzogen und zellulär recycelt werden (vgl. 1.3.3), ist es wahrscheinlich, dass es sich bei den aus den Kupffer-Zellen zu den Hepatozyten transportierten BODIPY₄₉₃₋₅₀₃-positiven Komponenten im großen Umfang um freie Cholesterole bzw. freie Fettsäuren handelt.

In Makrophagen ist jedoch auch die selektive Lipidaufnahme von nicht hydrolysierten CE aus Lipoproteinen in die Zelle über SR-B1 und LRP, als auch neuerdings der Efflux von nicht hydrolysierten CE aus der Zelle über LRP, beschrieben worden (Matveev et al., 1999; Takahashi et al., 2005). Ein Teil der CE der Lipoproteine könnte demnach selektiv den Lipoproteinen entzogen (Pittman et al., 1987; Rinninger

et al., 1994; Takahashi et al., 2005) und nicht als freie Cholesterole, sondern in veresterter Form zu den Hepatozyten weitertransportiert worden sein. Bei diesem Transportweg könnte die Hydrolyse der CE dann erst nach Aufnahme der Lipide in die Hepatozyten bewirkt werden, wobei freie Cholesterole generiert würden, die in den Hepatozyten dann weiteren Stoffwechselwegen zu Verfügung stünden (Ikonen, 2008). Zu untersuchen bleibt bei einem direkten Transport von CE aus den Kupffer-Zellen in die Hepatozyten, inwieweit dieser und der der freien Cholesterole Parallelen aufweist, da die nur schwer in den Membrandoppelschichten löslichen CE auch in Mikrodomänen nachgewiesen wurden, in denen freie Cholesterole sowie die die Aufnahme der CE vermittelnden Rezeptoren, wie z. B. SR-B1 und Caveolin-1, konzentrieren (Storey et al., 2007).

Die Detektion von VP außerhalb der Kupffer-Zellen lediglich entlang der verstärkt mit BODIPY₄₉₃₋₅₀₃-angefärbten Plasmamembranen der Hepatozyten deutet darauf hin, dass HBV auch *in vivo* entlang des Transportweges neutraler Lipide endozytierter Lipoproteine die Kupffer-Zelle transmigriert und weiter über den Transportweg der Kupffer-Zell-stammenden hydrophoben Neutrallipid-Hydrolysate in die Plasmamembranen umliegender Hepatozyten seine Wirtszelle erreicht (vgl. Abb. 2.19 A, B). Die Lokalisation der VP in der Plasmamembran der Hepatozyten nach verlängerter Perfusion des Lebergewebes wird durch die Kolo-kalisation der VP mit SR-B1, ein insbesondere in Hepatozyten primär in der Plasmamembran lokalisierter Rezeptor, bestärkt (vgl. Abb. 2.21 B) (Ahras et al., 2008; Babitt et al., 1997; Silver et al., 2001).

Fraglich ist allerdings, wie im perfundierten Lebergewebe die Lipide und VP von den Kupffer-Zellen in die Plasmamembranen der Hepatozyten transferiert worden sind. Bei den Lipiden fällt dabei ein offensichtlich zielgerichteter Transport in die Plasmamembranen einzelner die Kupffer-Zellen umgebender Hepatozyten auf (vgl. Abb. 2.19 A, gestrichelter Pfeil). Wären die Lipide (wie für periphere Makrophagen im reversen Cholesteroltransport beschrieben) auf Lipidakzeptoren übertragen und über den folgenden diffusions- und strömungsgetriebenen Transport im Interzellularraum zu den Hepatozyten befördert worden (Brewer, 2004; Ikonen, 2008), würde man eine gleichmäßige Verteilung der Lipide in den die Kupffer-Zellen umgebenden Hepatozyten erwarten. Die beobachtete zielgerichtete Übertragung der Lipide lässt sich nur mit einer engen räumlichen Nähe beider Zellen erklären, die eine Diffusion

der Lipidakzeptoren stark einschränkt. Gleiches gilt auch für die zu den Hepatozyten transportierten VP (vgl. Abb. 2.13 A, Vergrößerung). Ein gerichteter Komponententransport über einen interzellulären Raum wäre demnach nur möglich, wenn die Kupffer-Zellen Filopodien zu den Hepatozyten ausprägten, die einen unmittelbaren Kontakt von Kupffer-Zell- und Hepatozytenmembran ermöglichen. Dann könnten Liganden ohne deren wesentliche Diffusion auf Rezeptoren der Hepatozyten übertragen werden, wie es z.B. für den interzellulären Ligandentransfer über sog. Cytoneme beschrieben ist (Sherer und Mothes, 2008).

Ein zielgerichteter interzellulärer Transport von Plasmamembranproteinen wie Lipiden, aber auch GPI-verankerten Membranproteinen und Pathogenen (wie für Prionen gezeigt), ist über fusionierte Plasmamembranen von „tunneling nanotubes“ (TNT) beschrieben worden (Gousset et al., 2009; Onfelt et al., 2004; Rustom et al., 2004). Bei einem Transfer über TNT würden in den Kupffer-Zellen die Lipide endozytierter Lipoproteine zunächst zur Plasmamembran transportiert werden, wo sie jedoch nicht auf exogene Lipidakzeptoren übertragen, sondern über fusionierte Plasmamembranen in die Zellmembranen der Hepatozyten transferiert würden. Ein solcher Transportweg zwischen Makrophage und Hepatozyte ist bis heute allerdings nicht bewiesen. So wie möglicherweise in Abbildung 2.14 B dargestellt (s. Pfeilspitze), könnten Kupffer-Zellen jedoch (im Gegensatz zu peripheren Makrophagen) aufgrund ihrer räumlichen Nähe zu den Hepatozyten TNT zu den Leberparenchymzellen ausbilden, was einen deutlich effizienteren Lipidtransfer ermöglichen würde.

Unterstützt wird die Hypothese der Ausbildung von TNT zwischen Kupffer-Zellen und Hepatozyten *in vivo* dadurch, dass in dieser Arbeit im perfundierten Lebergewebe SR-B1 positive, von den Filopodien der Kupffer-Zellen zu der Plasmamembran der Hepatozyten durchgängige Strukturen detektierbar waren (vgl. Abb. 2.21 A). Da SR-B1 ein primär in der Plasmamembran lokalisierter Rezeptor ist (s.o.), könnten diese Strukturen über TNT fusionierte Plasmamembranen von Kupffer-Zellen und Hepatozyten darstellen. Darüber hinaus ist nach längerer Perfusion des humanen Lebergewebes der makrophagenspezifische Marker CD68 nicht nur auf Kupffer-Zellen, sondern in geringem Maße auch auf umgebenden Hepatozyten detektierbar (vgl. Abb. 2.22). Bei CD68 handelt es sich um ein Typ-1-integrales Transmembranprotein, das zwischen Endosomen und Plasmamembran zirkuliert (Holness und Simmons, 1993; Kurushima et al., 2000). Da für Typ-1-integrale

Transmembranproteine wie MHC I ein interzellulärer Austausch über TNT beschrieben wurde (Gerdes et al., 2007; Natarajan et al., 1999), erscheint es demnach wahrscheinlich, dass im länger perfundierten Lebergewebe CD68 in geringem Maße von den Kupffer-Zellen über TNT in die Plasmamembranen der Hepatozyten transportiert wurde. Die stärkere CD68-Färbung entlang der Plasmamembran Kupffer-Zellen-umliegender Hepatozyten im länger perfundierten Gewebe deutet zudem darauf hin, dass HBV möglicherweise die Ausbildung von TNT zwischen Kupffer-Zellen und Hepatozyten triggert. Eine vergleichbare Induktion von TNT in Makrophagen ist auch für HIV beschrieben, wobei fusionierte Plasmamembranen einen erheblich effizienteren interzellulären Virustransport ermöglichen (Eugenin et al., 2009a).

In Abbildung 2.22 ist erkennbar, dass VP offensichtlich entlang des gleichen Transportweges wie CD68 von den Kupffer-Zellen zu den umliegenden Hepatozyten transferiert wurden. Dies deutet darauf hin, dass VP ebenfalls über fusionierte Plasmamembranen der TNT von den Kupffer-Zellen zu den Hepatozyten gelangten. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass VP nach längerer Perfusion des Lebergewebes in der Plasmamembran von Kupffer-Zell-Filopodien konzentrierten und offensichtlich entlang dieser zu den Hepatozyten und in deren Plasmamembranen transportiert wurden (vgl. Abb. 2.21).

Interessanterweise deuten elektronenmikroskopische Analysen von Leberbiopsien HBV-infizierter Patienten ebenfalls darauf hin, dass HBV von angrenzenden Zellen über filopodienartige Strukturen direkt die benachbarten Hepatozyten erreicht und infiziert (Falcon et al., 2008). Demnach scheint ein direkter interzellulärer HBV-Transport auch *in vivo* stattzufinden.

Eine entscheidende Rolle bei dem Transport von HBV aus den Kupffer-Zellen in die Plasmamembranen der Hepatozyten über TNT könnte der postulierten Konzentrierung von HBV in sphingolipid-/cholesterolreichen Membranmikrodomänen zukommen (vgl. 3.7). „Lipid rafts“ vermitteln den gerichteten Transport von in ihnen konzentrierenden Proteinen, wie das Hemagglutinin der Influenzaviren oder GPI-verankerte Proteine, und Lipiden zu Plasmamembranen polarisierter Zellen (inklusive Hepatozyten), wobei auch Transzytosewege beschrieben sind (Brown und Rose, 1992; Simons und Ikonen, 1997; Skibbens et al., 1989; Slimane et al., 2003). HBV könnte demnach, nach Konzentrierung in sphingolipid-/cholesterolreichen

Membranmikrodomänen, in diesen über fusionierte Plasmamembranen gerichtet in die Zellmembran der Hepatozyten transportiert werden.

In Einklang mit einem selektiven Transport, wie er durch „lipid rafts“ vermittelt wird, ist die Beobachtung, dass im länger perfundierten Lebergewebe VP offensichtlich deutlich effizienter als CD68 zu den Hepatozyten transferiert wurden: Während Kupffer-Zellen nach längerer Perfusion häufig negativ und umliegende Hepatozyten positiv für VP waren, konnte im Gegensatz dazu in den Hepatozyten, im Vergleich zu den Kupffer-Zellen, nur sehr geringe Mengen von CD68 detektiert werden (vgl. Abb. 2.13 und 2.22). Gleiches trifft offensichtlich auch für BODIPY₄₉₃₋₅₀₃-positiv angefärbte Lipide zu, deren Konzentration entlang der Plasmamembranen Kupffer-Zellen-umliegender Hepatozyten ebenfalls relativ hoch im Verhältnis zu der Konzentration in den Lebermakrophagen erscheint (vgl. Abb. 2.19).

Nicht auszuschließen ist, dass der in dieser Arbeit beobachtete interzelluläre Transfer von CD68 und VP über Exosomen vermittelt wurde (They et al., 2002). Die in Abbildung 2.21 beobachteten durchgängigen SR-B1-positiven Strukturen zwischen Kupffer-Zellen und Hepatozyten und die Tatsache, dass diffundierende Vesikel einen weniger gerichteten Transport der Komponenten in die Hepatozyten bewirkt hätten, unterstützen jedoch die Theorie eines über fusionierte Plasmamembranen vermittelten Transfers.

Falls HBV und Cholesterole über TNT von der Kupffer-Zelle zur Hepatozyte transportiert werden, was verhindert dann einen Efflux dieser Komponenten aus den Kupffer-Zellen wie er *in vitro* in Makrophagen stattfindet (vgl. Abb. 2.18; 1.3.2.3)? Die hohe Konzentration von VP in Kupffer-Zellen, bei denen kein Transfer zu den umliegenden Hepatozyten beobachtet wurde, deutet darauf hin, dass *in vivo* die Resekretion von HBV aus den Kupffer-Zellen zurück in den Blutkreislauf tatsächlich effizient verhindert wird (vgl. Abb. 2.13. B). Gemäß der in dieser Arbeit aufgestellten Theorie einer funktionellen Kopplung des Transportes von HBV- und aus Lipoproteinen stammenden freien Cholesterolen in Kupffer-Zellen könnten die Gründe hierfür, analog wie für Hepatozyten und periphere Zellen dargestellt, ein in Kupffer-Zellen im Verhältnis zu peripheren Makrophagen unterschiedliches Gleichgewicht im bidirektionalen Cholesteroltransport aus der Plasmamembran sein (Atshaves et al., 2003; Atshaves et al., 2000; Moncecchi et al., 1996; Schroeder et al., 2001): Während periphere Makrophagen spezialisiert für den Efflux von Cholesterolen sind und ein verminderter Cholesterolefflux und damit verbundener

erhöhter Cholesterolinflux zu der pathologischen Bildung von Schaumzellen führt (Klucken et al., 2000; Lawn et al., 2001; Tall et al., 2002), sollte dies in Kupffer-Zellen über den Lipidtransport entlang fusionierter Plasmamembranen einen effizienten Transfer der Lipide in die Hepatozyten, Zellen spezialisiert für den Influx von Cholesterolen und deren Ausscheidung in die Gallengänge (Atshaves et al., 2007; Puglielli et al., 1996; Schroeder et al., 1998), bewirken und eine Schaumzellbildung der Kupffer-Zellen verhindern. Dieses wäre, in Einklang mit der Theorie einer HBV-Migration entlang des Transportes freier Cholesterole in Kupffer-Zellen, mit der Beobachtung vereinbar, dass VP im perfundierten Lebergewebe anscheinend nicht aus der Kupffer-Zell-Plasmamembran ins Blut entlassen, sondern entlang der Membran zu den Hepatozyten transportiert werden (vgl. Abb. 2.21 A). Eine entscheidende Rolle könnte hierbei auch der in dieser Arbeit vorgeschlagenen Konzentrierung von HBV in sphingolipid-/cholesterolreichen Membranmikrodomänen zukommen (vgl. 3.7), da Sphingomyeline freie Cholesterole in der Plasmamembran binden und damit einen Lipid-Efflux auf exogene Akzeptoren reduzieren (Ito et al., 2000). Demnach könnte eine Akkumulation von HBV in diesen „lipid rafts“ entscheidend für eine Aufnahme in die Zelle anstelle einer Resekretion sein.

Abschließend sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob HBV nach Migration entlang der freien Cholesterole endozytierter Lipoproteine aus den Kupffer-Zellen in die Plasmamembranen umliegender Hepatozyten auch weiter dem Transportweg dieser Lipide in seine Wirtszelle folgt.

Die Fluoreszenzmarkierung neutraler Lipide bzw. ihrer hydrophoben Hydrolysate in den Gewebeschnitten der *ex vivo* perfundierten Lebergewebsstücke mit BODIPY₄₉₃₋₅₀₃ zeigt in den Hepatozyten längliche Strukturen, die von den stark angefärbten Plasmamembranen ins Zellinnere führen, teilweise zu ebenfalls deutlich angefärbten, rundlichen Strukturen, die vermutlich „lipid droplets“ darstellen (vgl. Abb. 2.20). Während es sich in der Plasmamembran analog den oben gemachten Annahmen wahrscheinlich um aus Kupffer-Zellen stammende Lipide handelt, geben die in das Zellinnere verlaufenden Strukturen Transportwege wieder, die Lipide aus der Plasmamembran in das Innere der Zelle bringen. In der Literatur ist der Transport von CE sowohl (vereinbar mit Abb. 2.20) zu den „lipid droplets“ als auch zu dem Golgi-Apparat bzw. (wie ebenfalls für freie Cholesterole gezeigt) dem perinukleären ER beschrieben (Neufeld et al., 1996; Reaven et al., 1996; Schroeder et al., 2001).

VP konnten in den Hepatozyten entweder nur in stark BODIPY₅₉₃₋₆₀₃-positiven Plasmamembranen oder intrazellulär entlang der BODIPY₅₉₃₋₆₀₃-positiven Strukturen detektiert werden (vgl. Abb. 2.19, 2.20). Dies deutet darauf hin, dass die VP nach dem Transfer in die Plasmamembranen der Hepatozyten dem Transport der von den Kupffer-Zellen stammenden neutralen Lipide in die Zelle folgen. Dabei konnte in den Gewebeschnitten keine Assoziation der VP mit „lipid droplets“, häufig jedoch Transportwege der VP von der Plasmamembran in perinukleäre Bereiche beobachtet werden (vgl. Abb. 2.13 A inklusive Vergrößerung). Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint es möglich, dass HBV über einen Mechanismus in die Hepatozyte aufgenommen wird, der auch den Transport neutraler Lipide bzw. ihrer hydrophoben Hydrolysate aus der Zellmembran zu dem ER oder dem Golgi-Apparat vermittelt.

Da in Caveolin-1 exprimierenden Zellen die Aufnahme der CE und freier Cholesterole über Caveolin-1/Annexin II-Komplexe postuliert wurde (Smart et al., 2004; Uittenbogaard et al., 2002), ist dies in Übereinstimmung mit Untersuchungen der frühen Phase der HBV-Infektion in HepaRG-Zellen, für die ein funktionelles Caveolin-1 notwendig erscheint (Macovei et al., 2010).

Ob HBV auch nach direkter Bindung an die Hepatozyten über den gleichen Mechanismus in die Zelle aufgenommen wird und diese infiziert, lässt sich nur spekulieren. Es wäre ein Szenario denkbar, in dem HBV, vergleichbar zu dem Transport in den Kupffer-Zellen, zunächst in die Endosomen der Hepatozyten aufgenommen wird, in denen es dem Transport der hydrolysierten neutralen Lipide zur Plasmamembran folgt und nachfolgend über den gleichen Mechanismus die Zelle infiziert, wie nach Transfer von den Kupffer-Zellen über interzelluläre TNT in die Hepatozyten-Zellmembran. Hierfür fehlen allerdings experimentelle Belege.

3.9 Zusammenfassung der aufgestellten Theorie über die frühen Infektionsschritte des HBV

Abschließend lässt sich aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen folgende Theorie über den Transport des HBV zum Hepatozyten und die Infektion der Wirtszelle *in vivo* postulieren, die in Abbildung 3.1 zusammengefasst ist:

1. HBV assoziiert im Blut mit TRL und folgt dem Transportweg der TRL-Remnants in die Leber.
2. Im Lebersinus binden die Virus-Lipoproteinkomplexe über die TRL-Komponente an leberspezifische Glykosaminoglykane und werden nachfolgend über lipoprotein- und virusspezifische Rezeptoren entweder direkt in die Hepatozyten oder zunächst in die Kupffer-Zellen aufgenommen.
3. In den Lebermakrophagen folgt HBV dem Recyclingweg der durch endosomale Lipasen zu freien Cholesterolen und Fettsäuren hydrolysierten neutralen Lipide endozytierter Lipoproteine zur Plasmamembran.
4. Die hydrophoben Hydrolysate und HBV werden über TNT zwischen Kupffer-Zellen und Hepatozyten in die Plasmamembran der Wirtszelle weitergereicht und über einen gemeinsamen Transportmechanismus zu perinukleären Kompartimenten aufgenommen, was
5. schließlich zu der produktiven Infektion der Hepatozyten führt.

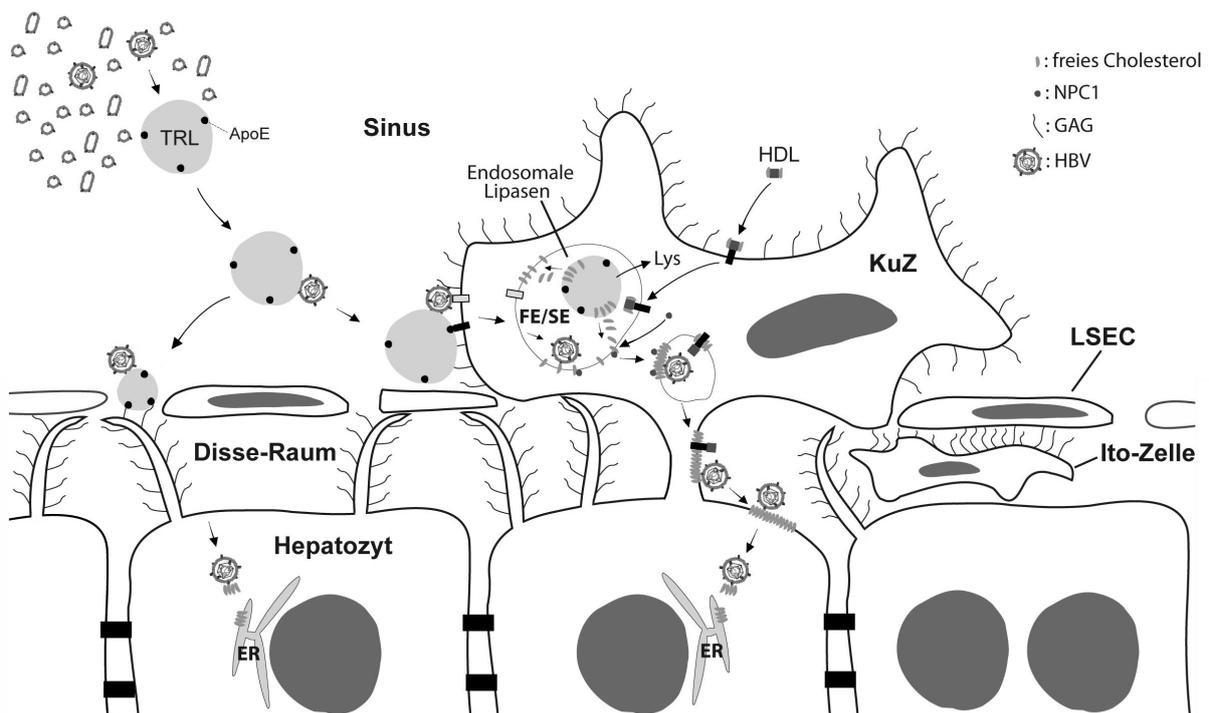


Abbildung 3.1: Theorie über das Erreichen und Infizieren der Wirtszelle durch HBV

KuZ: Kupffer Zelle; LSEC: Lebersinusendothelzelle; FE: Frühes Endosom; SE: Spätes Endosom; Lys: Lysosom; ER: Endoplasmatisches Retikulum; HDL: Lipoprotein hoher Dichte; TRL: Triacylglycerid-reiches Lipoprotein; GAG: Glykosaminoglykane; ApoE: Apolipoprotein E; NPC1: Niemann Pick Typ C 1 Protein

4 Material und Methoden

4.1 Material

Alle Lösungen wurden ausschließlich mit deionisiertem Wasser (H₂O) aus dem Milli-Q Water System von Millipore hergestellt. Soweit erforderlich, wurden die Lösungen durch Autoklavieren (20 min; 121°C) sterilisiert.

4.1.1 Verbrauchsmaterial

Adhäsionsobjektträger, HistoBond®	Marienfeld, Deutschland	Lauda-Königshofen,
Chromatographiesäulen, „Spin columns“ P-30	Biorad, Hercules, USA	
Cryo-Gefriergefäße	Nunc, Wiesbaden, Deutschland	
Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	
ELISA 96-Loch-Platte, Maxisorb®	Nunc, Wiesbaden, Deutschland	
Fettstift („Pap Pen“)	G. Kisker, Steinfurt, Deutschland	
Gaze	Maimed, Neuenkirchen, Deutschland	
Histoacryl-Kleber	Braun, Melsungen, Deutschland	
4-Kammer-Zellkulturobjektträger (Lab-Tek™ II)	Nunc, Wiesbaden, Deutschland	
Kryoeinbettmedium (Tissue Taq®)	Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande	
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	
24-Loch-Zellkulturplatten	Nunc, Wiesbaden, Deutschland	
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg, Deutschland	
Plasmaröhren	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
Serumröhren	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	
Ultrafiltrationsgefäße:		
Centricon® Plus-70	Millipore, Billerica, USA	
Vivaspin 2, 30.000 MWCO, Hydrosart	Sartorius, Göttingen, Deutschland	
Venenverweilkatheter	B. Braun, Melsungen, Deutschland	
Whatman-Papier	Whatman, GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK	

Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Zellsieb	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Zentrifugengefäße (15 ml/50 ml)	Falcon, BD, Heidelberg, Deutschland

4.1.2 Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Alexa Fluor [®] 488, 594; Succinimidylester	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Biocoll Separation Reagent	Biochrome, Berlin, Deutschland
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BODIPY ₄₉₃₋₅₀₃	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
BSA, „Essential fatty acid free“	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cäsiumchlorid (CsCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Diazabicyclooctan (DABCO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Diamidinphenylindol (DAPI)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Di-Natriumphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Filipin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FITC	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glutaraldehyd (2,5%, 0,1 M Cacodylat)	Electron Microscopy Sciences, Hatfield
Glutaraldehyd (25% in H ₂ O)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumnatriumtartrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Kollagen	Serva, Heidelberg, Deutschland
Kupfersulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	Genzyme, Neu-Isenburg, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol 4-88	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NBD-Cholesterol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
OptiPrep™	Axis-Shield, Oslo, Norwegen
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phorbolmyristataacetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Saccharose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saponin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Base	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
U18666a	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ziegenserum	Abcam, Cambridge, UK

4.1.3 Kits

cDNA-Synthese	SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Aufreinigung	Virus DNA Isolation Kit, Qiagen, Hilden, Germany

	NucleoSpin® Tissue Kit, Macherey-Nagel, Deutschland
DNA Verdau	RQ1 RNase-Free DNase, Ref. M6101, Promega, Madison, USA
ELISA	1. Murex HBsAg Version 3, Abbott Laboratories, Wiesbaden, Deutschland 2. HBeAg 2.0 and HBsAg (V2) Abbott Laboratories, Wiesbaden, Deutschland
qPCR	DNA Amplification Kit SYBR Green®1 und LightCycler® 480 96-Loch Mikrotiterplatten, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
RNA-Aufreinigung	NucleoSpin® RNA II, Macherey-Nagel, Deutschland
Zellisolation	CD11b MicroBeads, human und Maus, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

4.1.4 Medien und Medienzusätze

Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dulbeccos MEM	Gibco, BRL, Eggenstein, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS)	HyClone, South Logan, USA
Gentamycin	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Glucose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Gepufferte Salzlösung nach Hank (HBSS) (Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frei)	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Heparin	Liquemin N 25000, Roche, Mannheim, Deutschland
Hydroxyethylpiperazinyl-ethansulfonsäure (HEPES), pH 7,4	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Humanes Serum/Plasma	Postprandiales, venöses Blut nicht vaccinierter freiwilliger Personen wurde entweder in Serumröhren (nach Gerinnung) oder in EDTA-Plasmaröhren bei 2000 g, 10 min (RT) zentrifugiert,

die Überstände (ÜS) aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Plasma HBV-positiver Patienten wurde mittels Plasmapherese gewonnen und bei -20°C gelagert.

Hydrocortison	Rotexmedica, Trittau, Deutschland
Insulin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Inosin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumpyruvat	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Polyethylenglykol 6000 (PEG)	Merck, Darmstadt, Deutschland
VLI RPMI 1640	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Williams Medium E	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland

4.1.5 Gewichts- und Längenstandards

Protein – Standard

Page Ruler™, „Prestained protein ladder“	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
---	--------------------------------------

4.1.6 Antikörper und Proteine

Primäre Antikörper:

Kaninchen anti HBsAg	Heinz Schaller, Heidelberg
Kaninchen anti ApoA1 (EP1368Y), human	Novus Biologicals, Littleton
Kaninchen anti NPC1 (polyklonal), human	Novus Biologicals, Littleton
Kaninchen anti SR-B1 (polyklonal), human	Novus Biologicals, Littleton
Maus anti CD68 (PG-M1), human	DakoCytomation, Glostrup, Denmark
Maus anti HepPar1 (OCH1E5), human	DakoCytomation, Glostrup, Denmark

Ziege anti ApoB (polyklonal), human	Merridian Life Science, USA
Ziege anti HNF3beta (polyklonal), human	Santa Cruz Biotechnology, USA

Sekundäre Antikörper:

Alexa Fluor [®] 488	Ziege anti Kaninchen IgG, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Alexa Fluor [®] 488	Ziege anti Maus IgG, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Alexa Fluor [®] 594	Ziege anti Kaninchen IgG, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Alexa Fluor [®] 647	Ziege anti Kaninchen IgG, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Alexa Fluor [®] 647	Ziege anti Maus IgG, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Proteine:

Apolipoprotein A1 (ApoA1), human	Acris Antibodies, Deutschland
HDL, human	Acris Antibodies, Deutschland
Transferrin, human	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

4.1.7 Enzyme

Kollagenase Typ IV	Worthington, Lakewood, USA
--------------------	----------------------------

4.1.8 Oligonukleotide

Die aufgeführten Primerpaare wurden bei Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bestellt. Die Primer wurden mit Nuklease-freiem H₂O zunächst zu einer Stocklösung (100 µM) und dann für die PCR weiter zu Aliquots (20 µM) verdünnt und bei -20°C gelagert.

Primer HBV rcDNA

rcDNA (1844):	5' GTTGCCCGTTTGTCTCTAATTC 3'
rcDNA (1745):	5' GGAGGGATACATAGAGGTTTCCTTGA 3'

Primer HBV cccDNA

cccDNA (92): 5' GCCTATTGATTGGAAAGTATGT 3'
cccDNA (2251): 5' AGCTGAGGCGGTATCTA 3'

Primer NID2 (Maus)

mNID2 (+): 5' ATCCTACCGGGAAACAG 3'
mNID2 (-): 5' CCCAAGGTCTTCGTTGA 3'

Primer Housekeeping-Gene (Maus)

mGAPDH (+): 5' ACCAACTGCTTAGCCC 3'
mGAPDH (-): 5' CCACGACGGACACATT 3'

Primer Markergene (alle Maus)

mAlbumin (+): 5' GCAACACAAAGATGACAACC 3'
mAlbumin (-): 5' CTTTCATGCAAATAGTGTCCCA 3'

mCD11b (+): 5' GACTCAGTGAGCCCCATCAT 3'
mCD11b (-): 5' AGATCGTCTTGGCAGATGCT 3'

4.1.9 Radioisotope

Desoxycytosin-5'-[α - 32 P]-triphosphat, spezifische Aktivität >3000 Ci/mmol; Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland

[1,2- 3 H(N)]-Cholesterol, spezifische Aktivität 40-60 Ci/mmol; Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland

4.1.10 Geräte

Autoradiographie Molecular Imager FX, Biorad, Hercules, USA
Blotapparatur MiniFold[®] -1, Whatman, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK

Material und Methoden

Brutschränke	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Cryostat	CM3050S, Leica, Wetzlar, Deutschland
ELISA Reader	Infinite F200, TECAN, Crailsheim, Deutschland
Feinwaage	Kern 440-47, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Flüssigkeitsszintillationszähler	LS 6500, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Gelkammer	Biometra, Göttingen, Germany
Heizblöcke	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Light Cyler	LightCycler [®] 480, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Mikroskope	Olympus FluoView 1000-confocal laser scanning Microscope, Olympus, Hamburg, Deutschland CKX 41, Weitfeldmikroskop, Olympus, Hamburg, Deutschland EM 10 CR Transmissionselektronenmikroskop, Zeiss, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Blaubrand [®] , Brand, Wertheim, Deutschland
pH-Meter	WTW, wissenschaftlich technische Werkstätten
Perfusionspumpe	Masterflex [®] L/S, Cole-Parmer Instrument Comapy, Berrington, USA
Photometer	Smart Spec 3000, BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
Photosystem Agarosegele	Gel-doc 2000, BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
Pipettierhilfe	Swift Pet [®] , Abimed, Langenfeld, Deutschland
Refraktometer	Zeiss, Deutschland
Schüttler	Innova 4230, New Brunswick scientific, USA
Sterilbank (Zellkultur)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Thermomixer	Comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex	Vortex Genie 2, Scientific Industries, New York, USA
Zentrifugen	Centrifuge 5417C/5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Micro Centrifuge SD, Roth, Karlsruhe, Deutschland

Megafuge 1.0/1.0R, Heraeus Holding GmbH,
Hanau, Deutschland

Ultrazentrifuge XL-70, Beckman Coulter, Krefeld,
Deutschland

4.1.11 Software

Autoradiographie

Quantity One Software, Biorad, Hercules, USA

Datenverarbeitung

MS Office 2000 for Mac, Word, Microsoft, Redmont,
USA

PRISM 5.0a for Mac OS 10, GraphPad Software
Inc.

Fluoreszenzmikroskop

FV10-ASW, Olympus, Hamburg, Deutschland

Grafikprogramme

Adobe Photoshop CS3, Version 10, Adobe, San
Jose, USA

Adobe Illustrator CS3, 13.0.0, Adobe, San Jose,
USA

Light Cycler

Probe Design Analysis und Rel Quant, Roche
Diagnostics, Mannheim, Deutschland

4.1.12 Statistik

Für alle statistischen Kalkulationen wurde GraphPad Prism 5.0a verwendet. Die Signifikanz wurde mit dem ungepaarten zweiseitigen Student'schen T-Test ermittelt. Signifikanzen sind als * ($p < 0,05$) = signifikant, ** ($p < 0,01$) = sehr signifikant und *** ($p < 0,001$) = hoch signifikant angegeben. Fehlerbalken geben in einfach durchgeführten Experimenten die Standardabweichung (SD, „standard deviation“) des Mittelwertes (mit n Wiederholungen) an. Bei mehrfach wiederholten Experimenten (mit n unabhängigen Experimenten) geben die Fehlerbalken den Standardfehler (SEM, „standard error mean“) des Mittelwertes aus allen Experimenten an.

4.1.13 Eukaryotische Zelllinien

HepG2.2.15

Stabil mit vier Dimerkopien des HBV-Genoms transfizierte humane Hepatomzelllinie (HepG2-Zelllinie), die infektiöse Dane Partikel, SVP und HBe-Antigen sezerniert (Sells et al., 1987).

THP-1 (TIB-202™) Humane Monozytenzelllinie, akute Leukämie
(Tsuchiya et al., 1980)

4.1.14 Lösungen und Puffer

Church-Puffer: 0,25 M Phosphatpuffer (pH 7.2)

1 mM EDTA

1% BSA (w/v)

7% SDS (w/v)

MACS Puffer: 2% FCS (v/v)

2,0 mM EDTA

in PBS, pH 7,4

Mowiol/DABCO-Eindeckel-
medium: Nach dem Protokoll des Herstellers

PBS: 140 mM NaCl

3 mM KCl

8 mM Na₂HPO₄

1 mM CaCl₂

1 mM KH₂PO₄

1 mM MgCl₂ , auf 1 l mit H₂O auffüllen, pH auf 7,4
einstellen

PBS 0,05% Tween (PBS-T): 1 l PBS

0,5 ml Tween 20

1x SSC: 150 mM NaCl

15 mM Natriumcitrat

4.1.15 Angesetzte Zellkulturmedien

4.1.15.1 Medien für die Leberzellpräparation

Präperfusions Medium:

HBSS (Ca²⁺/Mg²⁺-frei) 500 ml

EGTA (100 mM) 2,5 ml

Heparin (5000 U/ml) 1 ml

Kollagenase Medium:

Williams Medium E 250 ml

CaCl₂ (1 M) 0,9 ml

Gentamycin (10 mg/ml)	2,5 ml
Kollagenase Typ IV (419 U/mg)	200 mg
<u>Williams E+ (= Wasch Medium):</u>	
Williams Medium E	500 ml
*Glutamin (200 mM)	5,6 ml
*Glucose (5%)	6 ml
*HEPES (1 M, pH 7,4)	11,5 ml
*Pen/Strep (5000 U/ml)	5,6 ml

(*Die Lösungen wurden vereinigt und bei -20°C als Prämix aufbewahrt.)

4.1.15.2 Medien zur Kultivierung primärer humaner Zellen

Primäre humane Hepatozyten (PHH):

PHH Medium

Williams E+ mit folgenden Additiva:

Gentamycin (10 mg/ml)	5 ml
Hydrocortison	0,5 ml
Insulin	1,4 ml
DMSO	8,7 ml
Inosine (82,5 mg/ml)	2 ml

Primäre Kupferzellen:

Makrophagen Medium 1

VLE RPMI 1640	500 ml
Pen/Strep (5000 U/ml)	5,5 ml
FCS	50 ml

Makrophagen Medium 2

Makrophagen Medium 1 ohne FCS
+ 0,2% BSA („Essential fatty acid free“)

Primäre humane Monozyten:

Differenzierungsmedium

Makrophagen Medium 1
+ 2-Mercaptoethanol (25 mM)
+ 800 U/ml GM-CSF

Aus Monozyten differenzierte Makrophagen:

Makrophagen Medium 1 bzw. 2

4.1.15.3 Medium für die ex vivo Perfusion humanen Lebergewebes

Williams E+

+ 20% bzw. 50% humanes Serum

4.1.15.4 Medien zur Kultivierung humaner Zelllinien

HepG2.2.15:

Dulbeccos MEM	500 ml
Fötale Kälberserum (FCS)	50 ml
Glutamin (200 mM)	5,5 ml
Pen/Strep (5000 U/ml)	5,5 ml
Nicht essentielle Aminosäuren	5,5 ml
Natriumpyruvat	5,5 ml

Produktionsmedium für HepG2.2.15:

1/2 :

Williams Medium E	500 ml
FCS	50 ml
Glutamin (200 mM)	5,5 ml
Pen/Strep (5000 U/ml)	5,5 ml
Nicht essentielle Aminosäuren	5,5 ml
Natriumpyruvat	5,5 ml

+1/2 :

PHH-Medium

THP:

Makrophagen Medium 1

+ 2-Mercaptoethanol (25 mM)

Differenzierungsmedium:

Makrophagen Medium 1

+ 2-Mercaptoethanol (25 mM) und 100 nM PMA

Aus monozytären THP-1 Zellen differenzierte Makrophagen:

Makrophagen Medium 1 bzw. 2

4.2 Methoden

4.2.1 Biochemie

4.2.1.1 Dichtegradientenultrazentrifugation

Bei der Ultrazentrifugation bewegen sich Teilchen in einer Flüssigkeit aufgrund der radialen Beschleunigung gemäß ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit (Svedberg-Gleichung). Die Sedimentationsgeschwindigkeit wird in S (Svedberg) angegeben.

$$v = (d^2 * (\rho_T - \rho_F) * g) / (18 * \eta)$$

v: Sedimentationsgeschwindigkeit

d: Durchmesser

g: relative Zentrifugalbeschleunigung

ρ_T : Dichte Teilchen

ρ_F : Dichte Flüssigkeit

η : Viskosität der Flüssigkeit

In dieser Arbeit wurden für die Aufreinigung von VP mittels Ultrazentrifugation drei unterschiedliche Dichtegradienten verwendet:

Gradient 1:

15% Saccharose in PBS-EDTA (1 mM EDTA, pH=7,4) (w/w), 5 ml

25% Saccharose in PBS-EDTA (w/w), 5 ml

35% Saccharose in PBS-EDTA (w/w), 4 ml

45% Saccharose in PBS-EDTA (w/w), 4 ml

60% Saccharose in PBS-EDTA (w/w), 2 ml

Gradient 2:

- 5% Saccharose in PBS-EDTA (w/w), 5 ml
- 10% Saccharose in PBS-EDTA (w/w), 5 ml
- 15% Saccharose in PBS-EDTA (w/w), 5 ml
- 20% Saccharose in PBS-EDTA (w/w), 5 ml
- 25% Saccharose in PBS-EDTA (w/w), 5 ml
- 60% Saccharose in PBS-EDTA (w/w), 5 ml

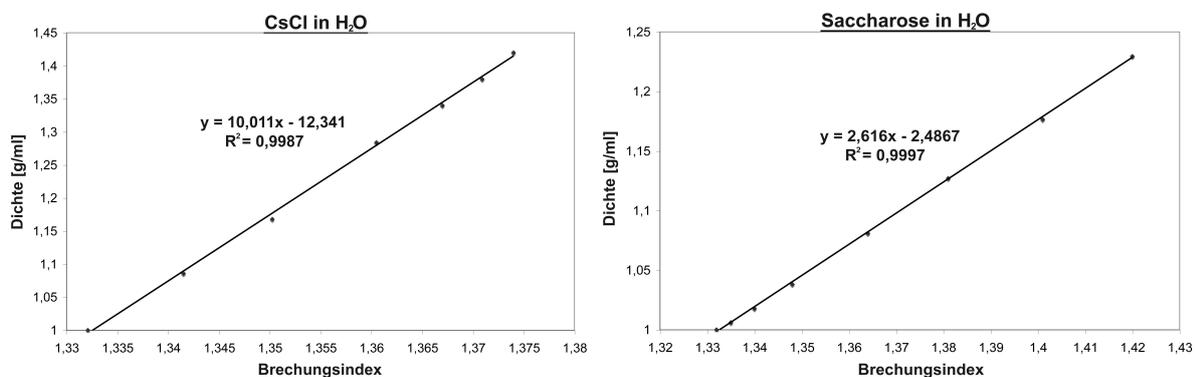
Gradient 3:

- 40,3% CsCl in PBS (w/v), 20 ml; ($\rho = 1,4 \text{ g/ml}$)
- 54,5% CsCl in PBS (w/v), 5 ml; ($\rho = 1,3 \text{ g/ml}$)

Bei beiden Saccharose-Dichtegradienten wurden die VP-haltigen Lösungen vorsichtig auf die vorgefertigten Gradienten aufgeschichtet, wobei HBV-Plasma bzw. der Zellkulturüberstand von HepG2.2.15 Zellen vorher für 15 min bei 1700 g und 10°C zentrifugiert wurde, um Aggregate abzutrennen. Anschließend wurde der Gradient für 15h bei 120.000 g und 10°C zentrifugiert und danach fraktioniert. Vor der Ultrazentrifugation des CsCl-Gradienten bei 120.000 g und 10°C für 40h wurden die VP-haltige PBS-Lösung mittels CsCl auf eine Dichte von 1,3 g/ml eingestellt und vorsichtig in den vorgeschichteten Gradienten gegeben. Nach Zentrifugation wurde der Gradient fraktioniert.

4.2.1.2 Dichtebestimmung der Gradientenfraktionen

Zunächst wurden mittels Refraktometrie die Brechungsindizes einzelner Saccharose- bzw. CsCl-Lösungen mit bekannter Dichte bestimmt (RT) und eine Eichgerade erstellt. Dargestellt ist die Eichgerade für CsCl in H₂O und eine exemplarische Eichgerade für Saccharose in H₂O:

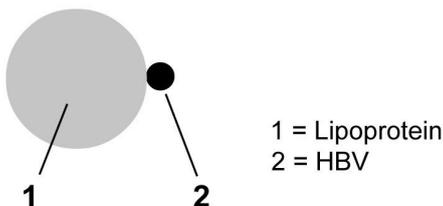


Anschließend wurden die Brechungsindizes der einzelnen Gradientenfractionen ermittelt und gemäß der mit der Eichgerade bestimmten Proportionalität zwischen Dichte und Brechungsindex die Dichte der Lösungen berechnet.

4.2.1.3 Berechnung der Durchmesser mit HBV assoziierter Lipoproteine

In dieser Arbeit wurde bei den postulierten HBV-Lipoproteinkomplexen im Plasma von Patienten von einer Oberflächenassoziation beider Komponenten ausgegangen. Darüber hinaus wurden beide Komponenten näherungsweise als kugelsymmetrisch betrachtet.

Das Gesamtvolumen und die Gesamtmasse zweier oberflächlich assoziierter Objekte ergibt sich aus der Summe beider Einzelvolumina bzw. -massen. Die mittlere Gesamtdichte des Komplexes lässt sich nach Dichteuiltrazentrifugation über die Fraktionsdichte refraktometrisch bestimmen (s. 4.2.1.2). Durch Umformen berechnet sich der Durchmesser der assoziierten Lipoproteinkomponente wie folgt:



$$\rho = \frac{m}{V}$$

$$\rho_{\text{ges}} = \frac{m_{\text{ges}}}{V_{\text{ges}}} = \frac{m_{1+2}}{V_{1+2}} = \frac{m_1 + m_2}{V_1 + V_2} \quad \left| \begin{array}{l} \cdot (V_1 + V_2) \\ : \rho_{\text{ges}} \end{array} \right.$$

$$V_1 + V_2 = \frac{m_1 + m_2}{\rho_{\text{ges}}} \quad \left| -V_2 \right.$$

$$V_1 = \frac{m_1 + m_2}{\rho_{\text{ges}}} - V_2 \quad \left| V = \frac{4}{3} \pi r^3; m = V \cdot \rho \right.$$

$$\frac{4}{3} \pi r_1^3 = \frac{\rho_1 \cdot \frac{4}{3} \pi r_1^3}{\rho_{\text{ges}}} + \frac{\rho_2 \cdot \frac{4}{3} \pi r_2^3}{\rho_{\text{ges}}} - \frac{4}{3} \pi r_2^3 \quad \left| : \frac{4}{3} \pi \right.$$

$$r_1^3 = \frac{\rho_1 \cdot r_1^3}{\rho_{\text{ges}}} + \frac{\rho_2 \cdot r_2^3}{\rho_{\text{ges}}} - r_2^3 \quad \left| - \frac{\rho_1 \cdot r_1^3}{\rho_{\text{ges}}} \right.$$

$$r_1^3 - \frac{\rho_1 \cdot r_1^3}{\rho_{\text{ges}}} = \frac{\rho_2 \cdot r_2^3}{\rho_{\text{ges}}} - r_2^3 \quad \left| r_1^3 - \frac{\rho_1 \cdot r_1^3}{\rho_{\text{ges}}} = r_1^3 \cdot \left(1 - \frac{\rho_1}{\rho_{\text{ges}}}\right); \frac{\rho_2 \cdot r_2^3}{\rho_{\text{ges}}} - r_2^3 = r_2^3 \cdot \left(\frac{\rho_2}{\rho_{\text{ges}}} - 1\right) \right.$$

$$r_1^3 \cdot \left(1 - \frac{\rho_1}{\rho_{\text{ges}}}\right) = r_2^3 \cdot \left(\frac{\rho_2}{\rho_{\text{ges}}} - 1\right) \quad \left| : \left(1 - \frac{\rho_1}{\rho_{\text{ges}}}\right); \left(\right)^{\frac{1}{3}} \right.$$

$$r_1 = \left(\frac{r_2^3 \cdot \left(\frac{\rho_2}{\rho_{\text{ges}}} - 1 \right)}{\left(1 - \frac{\rho_1}{\rho_{\text{ges}}} \right)} \right)^{\frac{1}{3}} ; \quad d_1 = 2 \cdot r_1$$

Index 1 = Lipoprotein

Index 2 = HBV

ρ = Dichte

m = Masse

V = Volumen

r = Radius

d = Durchmesser

4.2.1.4 Umpuffern der VP mittels Ultrafiltration

Die VP-enhaltenen Fraktionen der einzelnen Gradienten wurden nach der Ultrazentrifugation in 2 ml Ultrafiltrationsgefäße (Sartorius) pipettiert und diese bei 10°C und 2.500 g zentrifugiert. Nach Aufkonzentrieren auf 200 µl wurde mit PBS auf 2 ml aufgefüllt, das Filtrat verworfen und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und die Lösung als umgepuffert angesehen.

4.2.1.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Photometrie:

Die Proteinkonzentrationen der VP-haltigen Lösungen wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäure Tryptophan, bestimmt. Auch Tyrosin trägt zu der Absorption bei 280 nm bei, wenn auch in geringerem Maße als Tryptophan. Die Extinktion einer proteinhaltigen Lösung ist gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz proportional zu deren Proteinkonzentration:

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

E: Extinktion bei 280 nm

ε : Extinktionskoeffizient (ml * Mol⁻¹ * cm⁻¹)

c: Konzentration (mol/l)

d: Schichtdicke (cm)

Für die Messung der Extinktion (auch als „Optische Dichte“ (OD) bezeichnet) wurde eine Probe 1:5 verdünnt und hiervon 200 µl in eine Quarzküvette gegeben. Anschließend wurde die Küvette in einen Photometer gestellt und die Extinktion bei

280 nm gemessen. Eine OD_{280} (OD bei einer Wellenlänge von 280 nm) von eins entspricht einer Konzentration an VP von 1 mg/ml (Glebe und Gerlich, 2004). Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ergeben sich hieraus die Konzentrationen der VP-haltigen Lösungen. Bei den mit Alexa Fluor[®] 594 fluoreszenzmarkierten VP wurde zusätzlich die Extinktion bei 590 nm bestimmt. Die Konzentrationen der VP-haltigen Lösungen berechnen sich hier unter Berücksichtigung eines Farbstoff-spezifischen Korrekturfaktors:

$$c = (E_{280} - E_{590} * 0,56) / (\epsilon * d)$$

Proteinbestimmung nach Lowry:

Die Proteinkonzentration der TRL wurde in dieser Arbeit nach der Methode von Lowry durchgeführt (Lowry et al., 1951). Im Gegensatz zu anderen Methoden, wie z.B. nach Bradford, erlaubt diese Technik die Bestimmung der Proteinkonzentrationen lipidhaltiger Proben.

Die Methode beruht auf zwei Reaktionen: In einem ersten Schritt werden in einer alkalischen Lösung blauviolette Farbkomplexe aus zweiwertigen Kupfer-Ionen und den Peptidbindungen der Proteine gebildet („Biuretreaktion“). In einem zweiten Schritt werden zunächst die zweiwertigen Kupfer-Ionen zu einwertigen Ionen reduziert, die dann wiederum das molybdat- und wolframathaltige Folin-Ciocalteau-Reagenz reduzieren. Dies führt zu einer tiefblauen Färbung der Lösung, was über photometrische Messung die Quantifizierung der Proteinkonzentration ermöglicht (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Es wurden folgende Lösungen verwendet:

1. Lösung A: 2% Natriumcarbonat, 5% SDS, 0,02% Kaliumnatriumtartrat in 0,1 M NaOH; w/v
2. Lösung B: 0,5% Kupfersulfat; w/v
3. Lösung C: 20 ml Lösung A + 0,4 ml Lösung B, frisch zubereitet
4. Folin-Ciocalteau-Phenolreagenz, frisch 1:2 mit H₂O verdünnt
5. Proteinstandard (BSA), 0,125-2 mg/ml in 0,1 M NaOH
6. NaOH, 0,1 M

Zu 100 µl in 0,1 N NaOH verdünnter Probe wurde 1 ml Lösung C gegeben, vorsichtig geschüttelt und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 0,1 ml verdünntes Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz zugegeben, vorsichtig geschüttelt und für weitere 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Abschließend wurde je 250 µl Probe in eine 96-Loch-Platte überführt und die Extinktionen bei 650 nm und als Referenz bei 450 nm gemessen. Die Referenzwerte wurden von den Messwerten bei 650 nm subtrahiert und anhand des Proteinstandards die Proteinkonzentrationen der TRL ermittelt.

4.2.1.6 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Die aufgereinigten VP, HDL und Transferrin wurden mit den Amin-reaktiven Succinimidylester gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen Alexa Fluor[®] 488 bzw. Alexa Fluor[®] 594 sowie mit dem Isothiocyanat gekoppelten Fluorophor Fluorescein (FITC) fluoreszenzmarkiert. Hierbei wurde gemäß den Vorschriften des Herstellers verfahren: Zu einer proteinhaltigen PBS-Lösung wurde jeweils zu 10% (v/v) eine einmolare Natriumhydrogencarbonatlösung sowie der in DMSO gelöste Fluoreszenzfarbstoff (1 mg/ml) gegeben und 2h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Der nicht gebundene Farbstoff wurde entweder mittels Ultrazentrifugation (Gradient 2; VP) oder Größenausschlusschromatographie (P-30 Gel, Biorad) abgetrennt. Die Anzahl gebundener Fluorophore pro VP wurden wie folgt berechnet:

$$\text{Fluorophor / Protein} = E_{590} / (\epsilon * c)$$

E_{590} : Extinktion bei 590 nm

ϵ : Extinktionskoeffizient ($\text{ml} * \text{Mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$)

c: Konzentration (mol/l)

4.2.1.7 Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden Proteine durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in Modifikation nach (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Die SDS-PAGE wurde in einer „Minigel Twin“-Kammer der Firma Biometra vorgenommen, wobei die Trenngele 10% und die Sammelgele 5% Acrylamid (v/v) enthielten (s.u.). Die Proben wurden 3:1 mit 4x SDS-Probenpuffer gemischt und vor Auftragen für 5 min bei 100°C gekocht und 2 min bei 5000 g zentrifugiert. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte bei 15 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel und dauerte in etwa 90 min.

Trenngel:

40% Acrylamid (kalt)	6,25 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	5 ml
H ₂ O	8,55 ml
10% SDS	330 µl
TEMED (kalt)	20 µl
10% APS	100 µl

Sammelgel:

40% Acrylamid	0,375 ml
1,5 M Tris, pH 6,8	1,2 ml
H ₂ O	3,325 ml
10% SDS	50 µl
TEMED (kalt)	4 µl
10% APS	50 µl

4x SDS-Probenpuffer:

8% SDS(w/v)
200 mM Tris/HCl pH 6,8
50% Glycerin (w/v)
4% β-Mercaptoethanol (v/v)
0,04% Bromphenolblau (v/v)

10x SDS-Laufpuffer:

250 mM Tris (w/v)
1% SDS (w/v)
1,92 M Glycin (w/v)

4.2.1.8 Silberfärbung der SDS-Polyacrylamidgele

Bei der Silberfärbung werden Proteinbanden angefärbt, indem Silber-Ionen von den Proteinen gebunden und initial von deren funktionellen Gruppen und Peptidbindungen reduziert werden. Durch Zugabe eines starken Reduktionsmittels werden alle Silber-Ionen im Gel zu metallischem Silber reduziert. Diese Umwandlung findet in der Nähe der (von den Proteinbestandteilen durch Reduktion der Silber-Ionen gebildeten) Silberkeime wesentlich schneller statt als im Rest des Gels, weswegen sich die Proteinbanden dunkelbraun bis schwarz färben. Die Reaktion wird durch eine starke pH-Änderung mit Essigsäure gestoppt (Lottspeich und Zorbas, 1998).

In dieser Arbeit wurde zur Silberfärbung des Polyacrylamidgels 30 min mit Lösung 1 fixiert und anschließend für 30 min mit Lösung 2 inkubiert. Danach folgte ein

dreifacher Waschschrift für 5 min mit H₂O, bevor das Gel für 20 min in die Silberlösung (Lösung 3) gelegt wurde. Anschließend wurde die Silberlösung entfernt und mit Lösung 4 das Gel entwickelt. Abschließend wurde mit Lösung 5 gestoppt.

Lösung 1: 500 ml Ethanol, 100 ml Essigsäure, aufgefüllt auf 1 l mit H₂O

Lösung 2: 300 ml Ethanol, 68 g Natriumacetat, 2 g Natriumthiosulfat, aufgefüllt auf 1 l mit H₂O; pro 100 ml wurde 0,5 ml einer 25% Glutaraldehydlösung frisch zugegeben

Lösung 3: 1 g Silbernitrat auf 1 l mit H₂O aufgefüllt

Lösung 4: 25 g Natriumcarbonat, aufgefüllt auf 1 l mit H₂O

Lösung 5: 5% Essigsäure

4.2.1.9 Fluoreszenzanalyse der SDS-Polyacrylamidgеле

Alexa Fluor[®] 594 besitzt neben dem Absorptionsmaximum bei 590 nm eine Absorption im UV-Wellenlängenbereich (OD₂₈₀ entspricht 54% der OD₅₉₀). Dies ermöglicht (ähnlich wie bei Ethidiumbromid) die Anregung des Farbstoffs mit UV-Licht und Detektion der Emission im roten Wellenlängenbereich bei etwa 600 nm. Hierzu wurde das SDS-Polyacrylamidgel nach Elektrophorese auf ein UV-Photosystem für Agarosegele (Gel-doc 2000, BIO-RAD) gelegt und die Emission fotografiert.

4.2.1.10 Aufreinigung von humanen TRL

EDTA-Blut anti-HBsAg negativer Personen wurde bei 2000 g und RT für 10 min zentrifugiert und der Plasmaüberstand abgenommen. Aufgrund ihrer sehr geringen Dichte wurden die TRL mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt. Hierzu wurde der Plasmaüberstand für 60 min in der Beckman-Ultrazentrifuge bei 200.000 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die in der obersten Schicht des Gradienten konzentrierenden TRL vorsichtig abgenommen. Um die TRL von den verbliebenen Plasmaproteinen wie Albumin zu trennen, wurden die Lipoproteine in 2 ml einer 15% Saccharose-Lösung (in PBS-EDTA, 10 mM, pH = 7,4; w/v) aufgenommen, mit PBS-EDTA überschichtet und wiederholt ultrazentrifugiert. Die isolierten TRL wurden in PBS-EDTA bei 4°C für bis zu 14 Tagen gelagert.

4.2.1.11 Radioaktive Markierung der TRL mit ³H-Cholesterolen

100 µl in Ethanol gelöstes ³H-Cholesterol (3.7 MBq) (Hartman) wurde unter Stickstoffgas getrocknet und in 100 µl einer 2% BSA-Lösung (in PBS-EDTA, 10 mM,

pH=7,4; w/v) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,5 mg TRL wurde für 24h unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert und anschließend die nicht inkorporierten Cholesterole mittels Ultrazentrifugation (s. 4.2.1.10) abgetrennt.

4.2.1.12 Markierung der TRL mit NBD-Cholesterolen

Zu 0,5 mg TRL in 100 µl PBS-EDTA (10 mM, pH=7,4) wurden 50 µg NBD-Cholesterol (0,5 mg/ml in DMSO; Invitrogen) gegeben und die Lösung für 24h unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die nicht inkorporierten Cholesterole mittels Ultrazentrifugation (s. 4.2.1.10) abgetrennt.

4.2.1.13 „Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA)

Das HBsAg in Zellkulturüberständen wurde mittels dem kommerziell erhältlichen ELISA Murex HBsAg, Version 3, von Abbott nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die in der Arbeit angegebenen Ergebnisse sind Werte der Extinktion bei 450 nm, von denen die Extinktion bei 650 nm (Referenzwert) subtrahiert wurde.

4.2.1.14 „Microparticle enzyme immunoassay“ (MEIA)

Bei den *Trans*-Infektionsversuchen wurden die HBsAg- und HBeAg-Konzentrationen mit kommerziell erhältlichen MEIA von Abbot bestimmt (AxSYM[®] System, HBeAg 2.0 and HBsAg (V2)) und die Ergebnisse als Verhältnisse der Signale zu dem Grenzwert (S/CO, „Signal to cut-off ratio“) angegeben.

4.2.2 Molekularbiologie

4.2.2.1 Isolation zellulärer RNA

Die RNA-Isolation aus primären Maushepatozyten wurde in dieser Arbeit mittels des Trizol Reagenz durchgeführt. Hierbei wurden 2×10^6 aufgereinigte Zellen mit 1 ml Trizol Reagenz über 5 min bei RT lysiert. Die Lysate wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße (RNase frei) pipettiert und durch wiederholtes Pipettieren resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zu der Zellsuspension gegeben, kurz geschüttelt und 3 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Suspension bei 12.000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert, wobei eine Auftrennung in drei Phasen stattfand. Die obere wässrige Phase enthält die gelöste RNA und wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol zur Zellsuspension wurde 10 min bei RT inkubiert und anschließend bei 12.000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Hierdurch wurden die RNA und Salze

pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml Ethanol (75%) gewaschen. Nach Zentrifugation bei 7500 g und 4°C für 5 min wurde der ÜS abgenommen, wobei nach der ersten Abnahme erneut kurz zentrifugiert wurde, um das Ethanol vollständig entfernen zu können. Die isolierte RNA wurde 5 min bei RT getrocknet und anschließend in DEPC-Wasser aufgenommen. Abschließend wurde die RNA-Konzentration bestimmt und entweder die cDNA-Synthese durchgeführt oder die RNA bei -80°C eingefroren.

Die Isolation der RNA muriner Kupffer-Zellen wurde mit dem NucleoSpin® RNA II-Isolation Kit von der Firma Machery und Nagel nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

4.2.2.2 Isolation viraler DNA

Die zelluläre virale cccDNA sowie die zellassoziierte virale rcDNA der murinen Leberzellen wurde mit dem NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Wurde virale rcDNA aus dem Zellkulturüberstand oder aus Fraktionen von Gradienten isoliert, diente das Virus DNA Isolation Kit (Qiagen) zur Aufreinigung der DNA. Hierbei wurde ebenfalls nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

4.2.2.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese ermöglicht die Umschreibung von mRNA in cDNA. In dem Mastermix des Kits (SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qPCR, Invitrogen) sind eine reverse Transkriptase sowie unterschiedliche Hexamer Primer enthalten, so dass alle RNA-Sequenzen umgeschrieben werden können. Die cDNA-Synthese wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Bei mit Trizol Reagenz aufgereinigter RNA wurden vor der cDNA-Synthese verbliebene DNA-Fragmente mit dem RQ1 RNase-Free DNase Kit (Promega) verdaut.

4.2.2.4 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentrationen

Die Konzentrationsbestimmungen der DNA und RNA erfolgten photometrisch (vgl. 4.2.1.5). Hierbei wurde die Extinktion bei dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren (260 nm) gemessen. Eine OD_{260} von eins entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA, 35 µg/ml ssDNA und 40 µg/ml ssRNA. Aus den Verhältnissen der Extinktionen von Nukleinsäuren und Proteinen lässt sich aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsmaxima der Reinheitsgrad der isolierten

Nukleinsäuren bestimmen: Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} sollte dabei zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

4.2.2.5 Quantitative Light Cycler[®] PCR

Das Gerät Light Cycler[®] 480 (Roche) besteht aus einem Thermocycler, das mit einem Fluorimeter kombiniert ist. Für die Durchführung einer quantitativen PCR (qPCR) werden die einzelnen Reaktionsansätze in speziell für das Gerät hergestellte 96-Loch-Mikrotiterplatten pipettiert. Bei der qPCR-Reaktion lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (Absorptions-/Emissionsmaximum: 488/530) in neu gebildete dsDNA ein, wobei durch die Interkalierung die Fluoreszenzintensität des Fluorophors stark ansteigt. Die Fluoreszenzintensität der Proben wird nach jeder Elongationsphase gemessen und ist direkt proportional zur DNA-Konzentration.

Die ursprünglich in dem Reaktionsansatz enthaltene Menge an Matrizen DNA kann über die Bestimmung des „Crossing Point“ (CP) quantifiziert werden. Unter dem CP versteht man die Zyklusnummer, bei der für alle Amplifikationen die gleichen Fluoreszenzintensitäten gemessen werden. Dieser sollte im linearen Bereich der in Form einer sigmoiden Kurve ansteigenden Fluoreszenzintensität liegen und wird von der Light-Cycler Software automatisch ermittelt. Bezieht man die CP der Proben auf die CP eines gemessenen Standards mit bekannten DNA-Konzentrationen, lässt sich die absolute Konzentration der Matrizen DNA bestimmen. In dieser Arbeit wurden bei den qPCR zur Bestimmung der absoluten HBV rcDNA-Konzentrationen jeweils ein Standard bestehend aus mindestens fünf bekannten rcDNA-Konzentrationen mitgemessen. Bei den quantitativen PCR zur Bestimmung der relativen DNA-Konzentrationen wurde eine Verdünnungsreihe einer mit Matrizen-DNA-haltigen Probe erstellt und als relativer Standard in der PCR eingesetzt.

Über Analyse der Schmelztemperatur kann die Spezifität des in der qPCR gebildeten Produktes überprüft werden. Hierbei kommt es im Verlaufe einer schrittweisen Erwärmung der Probe bei einer produktspezifischen Temperatur zu einem Schmelzen der dsDNA, was zu einem Entlassen des Cyber Green und Fluoreszenzabfall führt.

Die für die quantitative Light Cycler[®] PCR verwendeten Materialien wurden alle von Roche Diagnostics bezogen. Folgender Master Mix wurde angefertigt und zu je 2 μ l Matrizen DNA gegeben:

qPCR-Ansatz:

Volumen	Reagenz
5 µl	Light Cycler® 480 SYBR Green I Master
0,5 µl	Vorwärtsprimer (20 µM)
0,5 µl	Rückwärtsprimer (20 µM)
2 µl	H ₂ O

“Light Cycler® 480 SYBR Green I Master” enthält dNTP, Taq-DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, MgCl₂ und SYBR Green I.

Bei den Negativkontrollen wurde statt 2 µl DNA 2 µl H₂O eingesetzt.

Für die qPCR wurde folgendes Standardprogramm verwendet:

1. Initiale Denaturierung	95°C	300 s
2. Zyklische Denaturierung	95°C	15 s
3. Primeranlagerung	60°C	5 s
4. Elongation	72°C	15 s

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/s

6. Kühlen	40°C	30 s
-----------	------	------

Für die Quantifizierung der HBV-rcDNA wurde folgendes Programm benutzt:

1. Initiale Denaturierung	95°C	300 s
2. Zyklische Denaturierung	95°C	25 s
3. Primeranlagerung	60°C	15 s
4. Elongation	72°C	30 s

Die Schritte 2. bis 4. wurden in 40 Zyklen wiederholt.

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

6. Kühlen	40°C	30 s
-----------	------	------

4.2.2.6 HBV-spezifischer DNA Dot-Blot

In dieser Arbeit wurden die HBV-DNA-Konzentrationen einzelner Fraktionen von Dichtegradienten mittels HBV-spezifischer DNA Dot-Blot-Analyse ermittelt. Die DNA Dot-Blot-Analyse stellt ein Verfahren dar, bei dem die Konzentration einer

bestimmten Nukleinsäure in einer Probe über die Hybridisierung spezifischer DNA-Sonden bestimmt werden kann. Hierzu werden virushaltige Lösungen mittels einer Blotapparatur auf eine Trägermembran aufgebracht und immobilisiert.

Zunächst wurde eine Nylonmembran und ein Whatmanpapier gleicher Größe mit H₂O befeuchtet und in die Blotapparatur eingespannt. Anschließend wurden Proben der einzelnen Fraktionen direkt in die Auftragskavitäten der Apparatur pipettiert und durch eine angeschlossene Vakuumpumpe mit identischen Querschnittsflächen auf die Membran aufgetragen. Nachfolgend wurde die Membran einmal mit PBS gewaschen, zur Denaturierung der dsDNA für 5 min auf einem mit 0,4 M NaOH getränkten Whatmanpapier inkubiert und danach zur Neutralisation für 5 min auf ein mit 2 x SSC-Puffer getränktes Whatmanpapier gelegt. Abschließend wurde die Membran an der Luft getrocknet und die DNA mit UV-Licht (125 mJ/cm²) quervernetzt und so die Nukleinsäuren für die Hybridisierung fixiert.

Die radioaktive Markierung der DNA-Sonde wurde über ein „Random“-Priming mit Desoxycytosintriphosphaten, in die radioaktive Phosphoratome eingebaut worden waren (³²P-dCTP), erhalten. Hierfür wurde das Rediprime II DNA Labeling System der Firma Amersham verwendet. Der Mastermix des Kits enthält dNTP, Mg²⁺ und die DNA-Polymerase. Nach dem Pipettieren von 25 ng linearer, HBV-dsDNA in den Mastermix wurde die DNA für 5 min bei 100°C denaturiert und anschließend kurz auf Eis gelagert. Danach wurde 5 µl der radioaktiven dCTP (50 µCi) zu dem Ansatz pipettiert und für 10 min bei 37°C inkubiert.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran bei 65°C im Hybridisierungssofen mit einem Blockpuffer (50 µl Heringssperma-DNA in Church-Puffer, 10 µg/ml) für 30 min inkubiert. Die radioaktive Sonde wurde in Blockpuffer gegeben, bei 100°C für 5 min denaturiert, auf Eis abgekühlt und anschließend gegen den reinen Blockpuffer gewechselt. Die Hybridisierung erfolgte über 24 h bei 65°C. Anschließend wurde zweimal mit auf 65°C temperierten 2 x SSC bei 65°C für 5 min gewaschen gefolgt von einem Waschschrift mit 2 x SSC mit 0,1% SDS für 10 min bei 65°C. Die Membranen wurden auf einem Whatmanpapier bei RT getrocknet und anschließend in Haushaltsfolie eingeschweißt. Zur Quantifizierung der Radioaktivität einzelner Membranbereiche wurde die Membran unter einen Phosphorscreen gelegt und 6h in einer abdunkelnden Kassette inkubiert. Anschließend wurde der Screen mittels einer CCD-Kamera (CCD: „Charge coupled device“, ladungsgekoppeltes Bauelement) ausgelesen. In dieser Arbeit wurde ein Standard mit bekannter HBV-

DNA Konzentration mit auf die Membranen aufgetragen, so dass über die Bestimmung der „Counts“ pro Fläche die Konzentrationen der einzelnen Proben bestimmt werden konnte.

4.2.3 Zellbiologie

4.2.3.1 Produktion nativer VP in HepG2.2.15-Zellen

HepG2.2.15-Zellen wurden für eine Langzeitkultivierung auf einem kollagenisierten Haftgrund kultiviert, da hierdurch die Ausbildung eines Monolayers begünstigt wird. Hierzu wurde der Boden der Zellkulturflaschen mit einer 10% Kollagenlösung (v/v, 0,2 mg/ml) benetzt und für 1h bei 37°C gelagert. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und der Boden der Flaschen zweimal mit sterilem PBS gewaschen.

Die Zellen wurden in 20 ml HepG2.2.15-Medium in 150 cm² Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde das Medium zur optimierten Virusproduktion mit Produktionsmedium gewechselt. Alle drei Tage wurde das Medium abgenommen und neues Produktionsmedium zugegeben. Das abgenommene Medium wurde vereinigt und bei 4000 g für 4 min zentrifugiert, um Zellfragmente zu entfernen. Dann wurden 70 ml des Mediums auf Ultrafiltrationsgefäße (Centricon[®] Plus-70, Millipore) gegeben und durch Ultrafiltration bei 3500 g und 4°C die im Medium enthaltenen VP aufkonzentriert. Das filtrierte Medium wurde verworfen und das Konzentrat mit 10% Glycerin (v/v) versetzt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

4.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

10 µl einer Zellsuspension wurden mit 10 µl einer 0,5% Trypanblaulösung gemischt, in eine Neubauer-Zählkammer überführt und die Zellen gezählt. Hierbei erscheinen die toten Zellen blau angefärbt, da ihre Plasmamembranen für den Farbstoff durchlässig werden, während vitale Zellen ungefärbt bleiben. Die Anzahl der Zellen ermittelt sich wie folgt:

$$\text{Zellen/ml} = n \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4$$

(n = Mittelwert der aus vier Quadranten gezählten Zellen)

4.2.3.3 Präparation primärer humaner Leberzellen

Humane Leberresektate, die bei routinemäßigen Leberoperationen anfielen, wurden durch das Universitätsklinikum Köln bzw. das Klinikum rechts der Isar, München,

bezogen. Die in dieser Arbeit dargestellten Experimente wurden im Konsens mit den Spendern und den lokalen Ethikkommissionen durchgeführt.

Grundlage der Standardtechnik für die Isolierung primärer humaner Leberzellen bildet die Kollagenaseperfusion (Seglen, 1976), die um eine vorherige Perfusion mit calciumfreiem und EGTA-haltigem Medium (s. Präperfusionsmedium) erweitert wurde (Berry et al., 1997) und als Zwei-Schritt-Kollagenaseperfusion bezeichnet wird. Vorbereitend für die einzelnen Perfusionsschritte wurden das Präperfusionsmedium und das Kollagenasemedium auf 42°C erwärmt und das Waschmedium bei 4°C gelagert und unter der Sterilbank ein Wasserbad (42°C) und die Perfusionspumpe aufgebaut. Für die Präparation primärer humaner Leberzellen werden frische Lebergewebsstücke benötigt. Da bei tumorbedingten Leberteilresektionen gesundes Peritumorgewebe prophylaktisch mitentfernt wird, konnte dieses vom Pathologen abgetrennt und für die Präparation der Zellen verwendet werden. Das Gewebe wurde in PBS gelagert transportiert und anschließend über einen 0,8 mm dicken Venenverweilkatheter, der an das Perfusionssystem angeschlossen war, mit Präperfusionsmedium über zugängliche Gefäßäste perfundiert (Durchflussrate 20 ml/min). Nach dem Durchspülen von 500 ml des Präperfusionsmediums wurde auf Kollagenasemedium umgestellt und nach weiterer Perfusion das Gewebe in 100 ml Kollagenasemedium mit einem Skapell zerteilt. Daraufhin wurde die Zellsuspension durch zwei Lagen Gaze und durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) in 50 ml Zentrifugegefäße filtriert. In der Gaze verbliebene Leberstücke wurden vorsichtig zerdrückt, um verbleibende Zellen zu gewinnen. Die Leberzellen wurden für 5 min bei 50 g und 10°C zentrifugiert, das Zellpellet viermal in 50 ml Waschmedium resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die ÜS dieser Zentrifugationen wurden gesammelt und bei 300 g und 10°C für 10 min abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen der Zentrifugation bei 50 g, bei denen es sich zum größten Teil um PHH handelt, wurden in 50 ml PHH-Medium (+10% FCS) aufgenommen, mittels Trypanblaufärbung die Zahl der vitalen Zellen bestimmt und mit der in den einzelnen Experimenten gewünschten Dichte ausgesäht (vgl. 4.4.3.4). In einem in Zusammenarbeit mit Mathias Broxterman etablierten Protokoll (verwendet in: (Ebert et al., 2011; Hosel et al., 2011)) wurden aus den pelletierten Zellen der 300 g Zentrifugation, bei denen es sich überwiegend um nicht-parenchymale Leberzellen handelt, Kupffer-Zellen isoliert. Zunächst wurde das Zellpellet in PBS aufgenommen und vorsichtig auf einen vorgelegten Gradienten aus

16% und 9% OptiPrep (in PBS, v/v) geschichtet. Anschließend wurde bei 800 g für 25 min (RT) mit deaktivierter Bremse zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen der OptiPrep-Interphase vorsichtig mit einer 10 ml Pipette abgenommen, in ein Zentrifugengefäß überführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Danach wurden zum Entfernen des Gradientenmediums die Zellen bei 300 g, 10°C pelletiert und erneut in PBS resuspendiert. Dann folgte ein 50 g Zentrifugationsschritt um verbliebene PHH abzutrennen und der ÜS wurde ein letztes Mal bei 300 g, 10°C zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in Makrophagen Medium 1 ohne FCS aufgenommen, mittels Trypanblaufärbung die Zahl der vitalen Zellen bestimmt und mit einer Dichte von 6×10^5 Zellen pro cm^2 in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Die Zellen wurden für 45 min bei 37°C inkubiert, um die Adhärenz der Kupffer-Zellen an die Plastikoberfläche zu ermöglichen. Abschließend wurden die Zellen dreimal gründlich mit PBS gewaschen und in Makrophagen Medium 1 kultiviert.

4.2.3.4 *Trans*-Infektionsversuche mit Kupffer-Zell-PHH-Mischkulturen

Die Inkubation der Kupffer-Zellen mit HBV fand in Makrophagen-Medium 1 mit 5% PEG 6000 (w/v, Merck) statt. Das Makrophagen-Medium 1 wurde gegen Makrophagen-PEG-Medium ausgetauscht, dem HBV mit einer MOI = 200 Virionen/Zelle zugefügt worden war, und für 6h entweder bei 4°C oder bei 37°C inkubiert. Die bei 4°C aufbewahrten Zellen wurden vor Zugabe des Virus für 10 min bei 4°C präinkubiert. Nach der Inkubation mit dem virushaltigen Medium wurde der Zellkulturüberstand entfernt und fünfmal mit Makrophagen-Medium 1 (ohne FCS) gewaschen. Danach wurden die isolierten PHH in PHH-Medium + 10% FCS mit einer Dichte von 4×10^5 Zellen pro cm^2 zu den Kupffer-Zellen ausgesät und bei 37°C inkubiert. Nach 24h wurden nicht angewachsene, tote Zellen durch vorsichtiges Waschen entfernt und das Medium gewechselt. Nach weiteren 24h wurde das FCS-haltige PHH-Medium gegen FCS-freies PHH-Medium ausgetauscht. Es folgte ein Mediumwechsel alle drei Tage.

4.2.3.5 Präparation primärer muriner Leberzellen

Mauslebern wurden nach Narkotisierung der Tiere analog der für die humanen Leberzellen beschriebenen Zwei-Schritt-Collagenaseperfusion über die Pfortader perfundiert und die Hepatozyten von den nicht-parenchymalen Leberzellen wie in 4.2.3.3 für humane Leberzellen beschrieben durch mehrfache Zentrifugation getrennt. Im Gegensatz zu PHH wurden die Maushepatozyten jedoch nicht mit 50 g,

sondern 20 g pelletiert. Zur weiteren Aufreinigung wurden das Zellpellet in MACS-Puffer resuspendiert und durch Anwendung von CD11b magnetischen Beads gemäß dem Herstellerprotokoll (Miltenyi Biotec) verbliebene Kupffer-Zellen depletiert. Anschließend wurden die CD11b-negativen Hepatozyten bei 20 g zentrifugiert und die pelletierten Zellen für spätere RNA- und DNA-Isolationen zur Hälfte vor dem Einfrieren bei -80°C in 1 ml Trizol Reagenz aufgenommen, die andere Hälfte wurde direkt eingefroren. Von den nicht-parenchymalen Leberzellen wurde durch weitere Anwendung von CD11b magnetischen Beads ebenfalls gemäß dem Herstellerprotokoll die Kupffer-Zellen depletiert und zwei Zellpellets für spätere RNA- und DNA-Isolationen bei -80°C weggefroren.

4.2.3.6 Das humane *ex vivo* Lebergewebsperusionsmodell

Um HBV-Interaktionen mit humanen Leberzellen, wie sie *in vivo* stattfinden, untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit ein neuartiges System entwickelt, welches die Perfusion von humanen Lebergewebsstücken *ex vivo* unter Bedingungen ermöglichte, die an die physiologischen Bedingungen *in vivo* angepasst wurden. Hierbei wurde ein bei den Leberteileresektionen anfallendes (vgl. 4.2.3.3), frisches humanes Lebergewebsstück zunächst gewogen und bis zu vier G18-Venenverweilkathetern mit Gewebekleber (Histoacryl[®] tissue glue, Braun) in Ästen der Pfortader befestigt. Danach wurde mit einer Flussrate von 1 ml/g/min das Gewebe mit 37°C warmen PBS für fünf Minuten durchspült, um verbliebenes Blut aus den Gefäßen zu entfernen. Anschließend wurde das Gewebe in ein geschlossenes, rezirkulierendes System überführt, welches die stetige Perfusion mit 50 ml Zellkulturmedium (Williams E+) bei 37°C und 5% CO₂ ermöglichte (vgl. Abb. 4.6). Im Medium war zusätzlich 50% humanes Serum anti-HBsAg-negativer Personen und 1 x 10¹¹ Alexa Fluor[®] 594 markierte VP/ml, oder 20% humanes Serum und 50% Zellkulturüberstand von HepG2.2.15-Zellen (entsprechend 2,5 x 10¹⁰/ml Virionen) enthalten. Vor Zugabe in das Medium wurden die VP-haltigen Lösungen für fünf Minuten bei 3000 g zentrifugiert, um eventuelle Aggregate zu entfernen. Nach Perfusion mit dem VP-haltigen Medium wurde das Gewebe entweder 5 min mit Medium (Williams E+) durchspült und anschließend fünf Minuten mit 4% PFA-Lösung (in PBS, w/v) perfusionsfixiert oder vor Perfusionsfixierung 15 Minuten mit Medium durchspült und 16h im Sinne eines Pulse-Chase-Experimentes (s. 4.2.3.9) mit 100 ml VP-freiem Medium (Williams E+ zusätzlich 20% humanem Serum) bei einer Flussrate von 3 ml/g/min perfundiert. Danach wurde das Gewebe mit einem Skalpell

in 5 x 5 mm große Stücke geschnitten und für 2h bei 4°C postfixiert. Die fixierten Gewebstücke wurden in eine 30% Saccharoselösung (in PBS-EDTA, 1 mM, pH=7,4; w/v) gelegt und ü.N. bei 4°C gelagert. Durch die Diffusion der Saccharose in das, und die Diffusion von H₂O aus dem Gewebe erhöhte sich die Dichte des Gewebes soweit, dass es in der Saccharoselösung absank. Die Einlagerung der Saccharose sollte verhindern, dass bei anschließender Gefrierung des Gewebes Scherkräfte, die bei der Kristallisation von H₂O auftreten, Proteinstrukturen zerstörten und eine Immunfluoreszenzanalyse des Gewebes unmöglich machten. Abschließend wurde das Gewebe in Kryoeinbettmedium („Tissue Taq[®]“, Sakura) eingebettet und bei -80° C eingefroren. Für Immunfluoreszenzanalysen wurden von dem gefrorenen Gewebe an einem CM3050S Cryostaten von Leica 10 µm Schnitte angefertigt und auf Adhäsionsobjektträgern (Marienfeld) fixiert.

Die Aufarbeitung des Gewebes für elektronenmikroskopische Analysen ist in 4.2.4.2 beschrieben.

4.2.3.7 Isolierung primärer humaner Monozyten und Differenzierung zu pro-inflammatorischen Makrophagen

Spenderblut wurde in 50 ml Zentrifugengefäße (Falcon) überführt, in die 10 ml PBS und 25 U/ml Heparin vorgelegt worden war. In weitere 50 ml Gefäße wurden 20 ml Biocoll Separation Reagent (Ficoll) pipettiert und mit dem heparinisierten Blut auf 50 ml aufgefüllt. Die Falcon-Gefäße wurden bei 2000 rpm und RT für 20 min mit deaktivierter Bremse zentrifugiert. Die Erythrozyten wurden bei diesem Vorgang pelletiert und die peripheren Blutleukozyten (PBMC) sammelten sich in der Plasma-Ficoll-Interphase an. Die PBMC wurden vorsichtig mit einer 10 ml Pipette entnommen, in ein neues 50 ml Falcon-Gefäß überführt und dieses mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 300 g und RT für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in GM-CSF-haltigem (800 U/ml) Differenzierungsmedium aufgenommen und mit einer Dichte von $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ in 24-Loch-Platten ausgesät. Nach Kultivierung über sieben Tage in dem Differenzierungsmedium (mit Mediumwechsel nach drei bis vier Tagen) gelten die adhärennten Zellen als differenzierte Makrophagen (Puig-Kroger et al., 2009) und standen für *in vitro* Versuche zur Verfügung.

4.2.3.8 Differenzierung monozytärer THP-1 Zellen zu Makrophagen

Monozytäre THP-1 Zellen wurden in THP-Differenzierungsmedium (100 nM PMA) aufgenommen und mit einer Dichte von $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ in 24-Loch-Platten ausgesät. Nach 48h wurden die nun adhärenenten und zu Makrophagen differenzierten Zellen mit PBS gewaschen und für *in vitro* Versuche verwendet (Dahl et al., 2011; Tsuchiya et al., 1982).

4.2.3.9 Pulse-Chase-Experimente

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, die zelluläre Lokalisation und Rezirkulierung von HBV in kultivierten Makrophagen zu charakterisieren. Hierzu wurden Pulse-Chase-Versuche durchgeführt, da sie es ermöglichen, die Dynamik von Aufnahme und Transport eines Liganden in Zelle, Zellorganellen und ins Medium zu untersuchen. Bei dieser Methode inkubiert man die Zellen für einen bestimmten Zeitraum mit einem Liganden, dessen Zellinteraktionen untersucht werden sollen (Pulse), wäscht intensiv und kultiviert anschließend für einen weiteren Zeitraum in einem Medium ohne diesen Liganden (Chase).

Zunächst wurden die Makrophagen für einen in den Experimenten angegebenen Zeitraum mit VP in Makrophagen Medium 2 mit oder ohne weitere Zusätze bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (Pulse). Abschließend wurde fünf mal mit 1 ml PBS gewaschen und weiter über einen bestimmten Zeitraum ohne den Zusätzen des Pulse-Mediums in Kupffer-Zellen Medium 2 (mit oder ohne anderen Zusätzen) inkubiert (Chase).

4.2.4 Mikroskopie

4.2.4.1 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für immunfluoreszenzmikroskopische Analysen wurden die Zellen in 4-Kammer-Zellkulturobjektträgern (Lab-TekTM II, Nunc) kultiviert. Nach Durchführung des Versuches wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 4% PFA-Lösung (in PBS, w/v) 10 min fixiert. Anschließend wurde die Fixierungslösung abgenommen und für 5 min mit 50 mM Ammoniumchlorid inkubiert, um verbliebenes freies PFA zu inaktivieren. Danach wurden die Zellen mit 0,5% Saponinlösung (in PBS, w/v) für 10 min permeabilisiert und unspezifische Bindestellen durch einstündige Inkubation mit Blockpuffer (0,1% Saponin (w/v) und 10% Ziegenserum (v/v) in PBS) abgesättigt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (anti ApoA1, 1:100; anti NPC1, 1:200) oder 50 µg/ml Filipin (2,5 mg/ml in DMSO) erfolgte in Blockpuffer bei 4°C über Nacht. Durch

dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (0,1% Saponin in PBS, w/v) wurde der Primärantikörper entfernt und anschließend mit dem Sekundärantikörper (Ziege anti Kaninchen, 1:1000) in Blockpuffer (0,1% Saponin (w/v) und 2% Ziegenserum (v/v) in PBS) für 2h bei RT lichtgeschützt inkubiert. Zusätzlich wurde dem Blockpuffer DAPI beigefügt (1:200, 1 mg/ml DAPI-Lösung), um die Zellkern-DNA zu färben. Abschließend wurde zweimal mit Waschpuffer und zweimal mit PBS für 10 min gewaschen, die Zellen mit Mowiol/DABCO-Eindeckelmedium überschichtet, mit einem Deckglas bedeckt und die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Immunfluoreszenzanalysen der Gewebeschnitte wurden in dieser Arbeit analog dem Protokoll für kultivierte Zellen vorgenommen. Die einzelnen Lösungen wurden dabei auf den Objektträgern gehalten, indem um das Gewebe herum mit einem Fettstift (Kisker) eine geschlossene hydrophobe Markierung gesetzt wurde, die ein Abfließen der wässrigen Lösungen verhinderte. Es wurden folgende Primärantikörperverdünnungen gewählt: anti CD68, 1:50; anti HepPar 1, 1:25; anti SR-B1, 1:100. Die Sekundärantikörper (Ziege anti Maus, Ziege anti Kaninchen) wurden 1:250 verdünnt eingesetzt und zu den Lösungen DAPI (1:250) und gegebenenfalls BODIPY₄₉₃₋₅₀₃ (1:100) gegeben.

4.2.4.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Das Lebergewebe wurde mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten (ungefähr 1 mm³) und in 2,5% Glutaraldehydpuffer (in 0,1 M Cacodylate, w/v) (Electron Microscopy Sciences) fixiert. Die Proben wurden bei 4°C für 1h in 1% OsO₄ (w/v) nachfixiert, dreimal gewaschen, in Alkohol dehydriert und in Epoxidharz eingebettet. Ultradünne Schnitte wurden mit einem Ultramikrotom angefertigt, mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt und mit einem Zeiss EM 10 CR Transmissionselektronenmikroskop analysiert. In dieser Arbeit wurden die Präparationen der Schnitte für die Elektronenmikroskopie von dem Institut für Pathologie der Technischen Universität München/Helmholtz Zentrum München durchgeführt.

5 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-bindende Kassetten
acLDL	Acetyliertes LDL
ALT	Alaninaminotransferasen
Apo	Apolipoprotein
APS	Ammoniumpersulfat
ASGPR	Asialoglykoproteinrezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
α 2MR	Alpha2-Makroglobulinrezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
Bq	Becquerel
C	Cystein
C	Cytosin
c	centi
c	Konzentration
Ca	Calcium
CaCl_2	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCD	ladungsgekoppeltes Bauelement
cccDNA	kovalent geschlossene zirkuläre DNA
CD	Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen (sog. „Unterscheidungsgruppen“)
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CE	Cholesterolester
CETP	Cholesterolester-Transferprotein
CHO	Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters
COS-7	Fibroblastenzelllinie
CP	„crossing point“
CPD	Carboxypeptidase D

Abkürzungsverzeichnis

CsCl	Cäsiumchlorid
CTL	zytotoxische T Lymphozyten
C-Terminus	Carboxy-Terminus
°C	Grad Celsius
d	dezi
DABCO	Diazabicyclooctan
DAPI	Diamidinphenylindol
DC-SIGN	„dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin“
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHBV	Enten-HBV
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d.h.	das heißt
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
Enh	Verstärkerelement
ER	endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	Fötale Kälberserum
Fr.	Fraktion
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierungsfaktor
GSHV	Erdhörnchen-HBV
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
³ H	Tritium
h	Stunde
HBcAg	virales Core-Antigen
HBsAg	virales S-Antigen

Abkürzungsverzeichnis

HBSS	gepufferte Salzlösung nach Hank
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HDL	Lipoprotein hoher Dichte
HDV	Hepatitis D Virus
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HepG2	humane Hepatomazelllinie
HLA	humane Leukozytenantigen
HUH-7	humane Hepatomazelllinie
H ₂ O	deionisiertes Wasser
IDL	Lipoprotein mittlerer Dichte
IgA	Immunglobulin A
i.v.	intravenös
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KuZ	Kupffer-Zellen
l	Liter
LCAT	Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte
LMH	Hühnerhepatomazelllinie
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	LDL-Rezeptor verwandtes Protein
LSEC	Leber-Sinus-Endothel-Zellen
L-Protein	großes virales Oberflächenprotein
L-SIGN	„liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin“
M	molar
m	Meter
m	Milli
MEIA	Mikropartikel-Enzym-Immuntest
Mg	Magnesium

Abkürzungsverzeichnis

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MOI	Multiplizität der Infektion
mRNA	Boten-RNA
M-Protein	mittleres virales Oberflächenprotein
μ	mikro
N	Stickstoff
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NBD	Nitrobenzoxadiazole
neg.	negativ
nm	Nanometer
NPC	Niemann-Pick Typ C
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like 1 Protein
N-Terminus	Amino-Terminus
O	Sauerstoff
OD	optische Dichte
ORF	offene Leseraster
³² P	Phosphorisotop 32
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PC 12	Pheochromocytoma Zellen
PEG	Polyethylenglykol
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
pgRNA	prägenomische RNA
PMA	Phorbolmyristataacetat
Pol	Polymerase
preS1	carboxyterminale Domäne des L-Proteins
preS2	carboxyterminale Domäne des M-Proteins

Abkürzungsverzeichnis

qPCR	quantitative PCR
rcDNA	entspannte zirkuläre DNA
Rez.	Rezeptor
rel.	relativ
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
S	Svedberg
SCP-2	Sterol-Carrier-Protein-2
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
sog.	so genannt
SR-B1	Scavengerrezeptor B1
ss	einzelsträngig
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
Strep	Streptomycin
SU	rezeptorbindenden Untereinheit
SVP	subvirale Partikel
S-Protein	kleines virales Oberflächenprotein
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
S/CO	Signal zu Grenzwertverhältnis
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG	Triacylglycerid
THP-1	Humane Monozytenzelllinie
TLM	Translokationsmotif
TNT	„tunneling nanotube“
TRL	TG-reiches Lipoprotein
ÜS	Überstand
UV	ultraviolett
u.a.	unter anderem

Abkürzungsverzeichnis

vgl.	vergleiche
VLDL	Lipoprotein sehr niedriger Dichte
VP	virale Partikel
WHV	Murmeltier-HBV
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht

6 Literatur

- Ahras, M.**, Naing, T. und McPherson, R. (2008). Scavenger receptor class B type I localizes to a late endosomal compartment. *J Lipid Res* 49, 1569-1576.
- Alabraba, E.B.**, Curbishley, S.M., Lai, W.K., Wigmore, S.J., Adams, D.H. und Afford, S.C. (2007). A new approach to isolation and culture of human Kupffer cells. *J Immunol Methods* 326, 139-144.
- Anderson, L.J.**, Boyles, J.K. und Hussain, M.M. (1989). A rapid method for staining large chylomicrons. *J Lipid Res* 30, 1819-1824.
- Andre, P.**, Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J.L., Sodoyer, M., Pol, S., Brechot, C., Paranhos-Baccala, G. und Lotteau, V. (2002). Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 76, 6919-6928.
- Asabe, S.**, Wieland, S.F., Chattopadhyay, P.K., Roederer, M., Engle, R.E., Purcell, R.H. und Chisari, F.V. (2009). The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection. *J Virol* 83, 9652-9662.
- Atshaves, B.P.**, Gallegos, A.M., McIntosh, A.L., Kier, A.B. und Schroeder, F. (2003). Sterol carrier protein-2 selectively alters lipid composition and cholesterol dynamics of caveolae/lipid raft vs nonraft domains in L-cell fibroblast plasma membranes. *Biochemistry* 42, 14583-14598.
- Atshaves, B.P.**, McIntosh, A.L., Payne, H.R., Gallegos, A.M., Landrock, K., Maeda, N., Kier, A.B. und Schroeder, F. (2007). SCP-2/SCP-x gene ablation alters lipid raft domains in primary cultured mouse hepatocytes. *J Lipid Res* 48, 2193-2211.
- Atshaves, B.P.**, Starodub, O., McIntosh, A., Petrescu, A., Roths, J.B., Kier, A.B. und Schroeder, F. (2000). Sterol carrier protein-2 alters high density lipoprotein-mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem* 275, 36852-36861.
- Austyn, J.M.** und Gordon, S. (1981). F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* 11, 805-815.
- Azuma, Y.**, Takada, M., Shin, H.W., Kioka, N., Nakayama, K. und Ueda, K. (2009). Retroendocytosis pathway of ABCA1/apoA-I contributes to HDL formation. *Genes Cells* 14, 191-204.
- Babitt, J.**, Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E.J., Anderson, R.G., Xu, S. und Krieger, M. (1997). Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J Biol Chem* 272, 13242-13249.
- Baer, K.**, Roosevelt, M., Clarkson, A.B., Jr., van Rooijen, N., Schnieder, T. und Frevert, U. (2007). Kupffer cells are obligatory for Plasmodium yoelii sporozoite infection of the liver. *Cell Microbiol* 9, 397-412.
- Bashirova, A.A.**, Geijtenbeek, T.B., van Duijnhoven, G.C., van Vliet, S.J., Eilering, J.B., Martin, M.P., Wu, L., Martin, T.D., Viebig, N., Knolle, P.A., *et al.* (2001). A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med* 193, 671-678.
- Beach, M.J.**, Meeks, E.L., Mimms, L.T., Vallari, D., DuCharme, L., Spelbring, J., Taskar, S., Schleicher, J.B., Krawczynski, K. und Bradley, D.W. (1992). Temporal relationships of hepatitis C virus RNA and antibody responses following experimental infection of chimpanzees. *J Med Virol* 36, 226-237.
- Beasley, R.P.** (1988). Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 61, 1942-1956.
- Beasley, R.P.**, Hwang, L.Y., Lin, C.C. und Chien, C.S. (1981). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 2, 1129-1133.
- Beasley, R.P.**, Trepo, C., Stevens, C.E. und Szmuness, W. (1977). The e antigen and vertical transmission of hepatitis B surface antigen. *Am J Epidemiol* 105, 94-98.
- Beisiegel, U.**, Weber, W., Ihrke, G., Herz, J. und Stanley, K.K. (1989). The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 341, 162-164.
- Berry, M.N.**, Grivell, A.R., Grivell, M.B. und Phillips, J.W. (1997). Isolated hepatocytes--past, present and future. *Cell Biol Toxicol* 13, 223-233.
- Berting, A.**, Hahnen, J., Kroger, M. und 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. und Chisari, F.V. (1991). HLA class I-restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10445-10449.
- Bessems, M.**, t Hart, N.A., Tolba, R., Doorschodt, B.M., Leuvenink, H.G., Ploeg, R.J., Minor, T. und van Gulik, T.M. (2006). The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Lab Anim* 40, 236-246.

- Bhat, P.**, Snooks, M.J. und Anderson, D.A. (2011). Hepatocytes traffic and export hepatitis B virus basolaterally by polarity-dependent mechanisms. *J Virol* **85**, 12474-12481.
- Blumberg, B.S.**, Melartin, L., Guint, R.A. und 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. und London, W.T. (1969). Australia antigen and hepatitis. *JAMA* **207**, 1895-1896.
- Bosch, V.**, Bartenschlager, R., Radziwill, G. und Schaller, H. (1988). The duck hepatitis B virus P-gene codes for protein strongly associated with the 5'-end of the viral DNA minus strand. *Virology* **166**, 475-485.
- Bradley, D.**, McCaustland, K., Krawczynski, K., Spelbring, J., Humphrey, C. und Cook, E.H. (1991). Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose. *J Med Virol* **34**, 206-208.
- Braet, F.** und Wisse, E. (2002). Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol* **1**, 1.
- Breiner, K.M.**, Schaller, H. und Knolle, P.A. (2001). Endothelial cell-mediated uptake of a hepatitis B virus: a new concept of liver targeting of hepatotropic microorganisms. *Hepatology* **34**, 803-808.
- Breiner, K.M.**, Urban, S. und Schaller, H. (1998). Carboxypeptidase D (gp180), a Golgi-resident protein, functions in the attachment and entry of avian hepatitis B viruses. *J Virol* **72**, 8098-8104.
- Brewer, H.B.**, Jr. (2004). High-density lipoproteins: a new potential therapeutic target for the prevention of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 387-391.
- Brown, D.A.** und Rose, J.K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-544.
- Brown, M.S.** und Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34-47.
- Bruss, V.** (1997). A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J Virol* **71**, 9350-9357.
- Bruss, V.** und Ganem, D. (1991). The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1059-1063.
- Bruss, V.**, Lu, X., Thomssen, R. und Gerlich, W.H. (1994). Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *EMBO J* **13**, 2273-2279.
- Bruss, V.** und Vieluf, K. (1995). Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis. *J Virol* **69**, 6652-6657.
- Burgoyne, R.D.** und Clague, M.J. (1994). Annexins in the endocytic pathway. *Trends Biochem Sci* **19**, 231-232.
- Camarota, L.M.**, Chapman, J.M., Hui, D.Y. und Howles, P.N. (2004). Carboxyl ester lipase cofractionates with scavenger receptor BI in hepatocyte lipid rafts and enhances selective uptake and hydrolysis of cholesteryl esters from HDL3. *J Biol Chem* **279**, 27599-27606.
- Carstea, E.D.**, Morris, J.A., Coleman, K.G., Loftus, S.K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M.A., Pavan, W.J., Krizman, D.B., *et al.* (1997). Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* **277**, 228-231.
- Cheng, K.C.**, Smith, G.L. und Moss, B. (1986). Hepatitis B virus large surface protein is not secreted but is immunogenic when selectively expressed by recombinant vaccinia virus. *J Virol* **60**, 337-344.
- Chinnery, H.R.**, Pearlman, E. und McMenamin, P.G. (2008). Cutting edge: Membrane nanotubes in vivo: a feature of MHC class II+ cells in the mouse cornea. *J Immunol* **180**, 5779-5783.
- Chisari, F.V.** (1995). Hepatitis B virus transgenic mice: insights into the virus and the disease. *Hepatology* **22**, 1316-1325.
- Chisari, F.V.** (1997). Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest* **99**, 1472-1477.
- Chojnacki, J.**, Anderson, D.A. und Grgacic, E.V. (2005). A hydrophobic domain in the large envelope protein is essential for fusion of duck hepatitis B virus at the late endosome. *J Virol* **79**, 14945-14955.
- Connelly, M.A.**, Klein, S.M., Azhar, S., Abumrad, N.A. und Williams, D.L. (1999). Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake. *J Biol Chem* **274**, 41-47.
- Cormier, E.G.**, Durso, R.J., Tsamis, F., Boussemart, L., Manix, C., Olson, W.C., Gardner, J.P. und Dragic, T. (2004). L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14067-14072.
- Crowther, R.A.**, Kiselev, N.A., Bottcher, B., Berriman, J.A., Borisova, G.P., Ose, V. und Pumpens, P. (1994). Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* **77**, 943-950.
- Dahl, T.**, Ranheim, T., Holm, S., Berge, R., Aukrust, P. und Halvorsen, B. (2011). Nicotinamide phosphoribosyltransferase and lipid accumulation in macrophages. *Eur J Clin Invest* **41**, 1098-1104.

- 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. und Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* **1**, 695-698.
- Davies, J.P.** und Ioannou, Y.A. (2000). Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein. *J Biol Chem* **275**, 24367-24374.
- Davis, C.G.**, Goldstein, J.L., Sudhof, T.C., Anderson, R.G., Russell, D.W. und Brown, M.S. (1987). Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* **326**, 760-765.
- De Falco, S.**, Ruvoletto, M.G., Verdoliva, A., Ruvo, M., Raucci, A., Marino, M., Senatore, S., Cassani, G., Alberti, A., Pontisso, P., *et al.* (2001). Cloning and expression of a novel hepatitis B virus-binding protein from HepG2 cells. *J Biol Chem* **276**, 36613-36623.
- De Meyer, S.**, Gong, Z., Depla, E., Maertens, G. und Yap, S.H. (1999). Involvement of phosphatidylserine and non-phospholipid components of the hepatitis B virus envelope in human Annexin V binding and in HBV infection in vitro. *J Hepatol* **31**, 783-790.
- Delton-Vandenbroucke, I.**, Bouvier, J., Makino, A., Besson, N., Pageaux, J.F., Lagarde, M. und Kobayashi, T. (2007). Anti-bis(monoacylglycero)phosphate antibody accumulates acetylated LDL-derived cholesterol in cultured macrophages. *J Lipid Res* **48**, 543-552.
- Deng, Q.**, Zhai, J.W., Michel, M.L., Zhang, J., Qin, J., Kong, Y.Y., Zhang, X.X., Budkowska, A., Tiollais, P., Wang, Y., *et al.* (2007). Identification and characterization of peptides that interact with hepatitis B virus via the putative receptor binding site. *J Virol* **81**, 4244-4254.
- Diakonova, M.**, Gerke, V., Ernst, J., Liautard, J.P., van der Vusse, G. und Griffiths, G. (1997). Localization of five annexins in J774 macrophages and on isolated phagosomes. *J Cell Sci* **110** (Pt 10), 1199-1213.
- Diaz, O.**, Delers, F., Maynard, M., Demignot, S., Zoulim, F., Chambaz, J., Trepo, C., Lotteau, V. und Andre, P. (2006). Preferential association of Hepatitis C virus with apolipoprotein B48-containing lipoproteins. *J Gen Virol* **87**, 2983-2991.
- Do, H.**, Healey, J.F., Waller, E.K. und Lollar, P. (1999). Expression of factor VIII by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J Biol Chem* **274**, 19587-19592.
- Duclos-Vallee, J.C.**, Capel, F., Mabit, H. und Petit, M.A. (1998). Phosphorylation of the hepatitis B virus core protein by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein kinase activity. *J Gen Virol* **79** (Pt 7), 1665-1670.
- Ebert, G.**, Poeck, H., Lucifora, J., Baschuk, N., Esser, K., Esposito, I., Hartmann, G. und Protzer, U. (2011). 5' Triphosphorylated small interfering RNAs control replication of hepatitis B virus and induce an interferon response in human liver cells and mice. *Gastroenterology* **141**, 696-706, 706 e691-693.
- Eble, B.E.**, Lingappa, V.R. und Ganem, D. (1986). Hepatitis B surface antigen: an unusual secreted protein initially synthesized as a transmembrane polypeptide. *Mol Cell Biol* **6**, 1454-1463.
- Eble, B.E.**, MacRae, D.R., Lingappa, V.R. und Ganem, D. (1987). Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol Cell Biol* **7**, 3591-3601.
- Engelke, M.**, Mills, K., Seitz, S., Simon, P., Gripon, P., Schnolzer, M. und Urban, S. (2006). Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site. *Hepatology* **43**, 750-760.
- Eugenin, E.A.**, Gaskill, P.J. und Berman, J.W. (2009a). Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: a potential mechanism for intercellular HIV trafficking. *Cell Immunol* **254**, 142-148.
- Eugenin, E.A.**, Gaskill, P.J. und Berman, J.W. (2009b). Tunneling nanotubes (TNT): A potential mechanism for intercellular HIV trafficking. *Commun Integr Biol* **2**, 243-244.
- Falcon, V.**, Menendez, I., Acosta-Rivero, N., Shibayama, M., de la Rosa, M.C., Luna-Munoz, J., Miranda-Sanchez, M., Gavilondo, J., Lopez, D., Duenas-Carrera, S., *et al.* (2008). Ultrastructural Evidences of Hepatitis B Infection in Human Liver Biopsies. Disclose Complex Assembly and Morphogenesis Pathways for Hepatitis B Virus. *Am J Infect Dis* **4**, 96-103.
- Feinberg, H.**, Mitchell, D.A., Drickamer, K. und Weis, W.I. (2001). Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* **294**, 2163-2166.
- Fernholz, D.**, Galle, P.R., Stemler, M., Brunetto, M., Bonino, F. und Will, H. (1993). Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier. *Virology* **194**, 137-148.

- Franco, A.**, Guidotti, L.G., Hobbs, M.V., Pasquetto, V. und Chisari, F.V. (1997). Pathogenetic effector function of CD4-positive T helper 1 cells in hepatitis B virus transgenic mice. *J Immunol* **159**, 2001-2008.
- Frevert, U.**, Engelmann, S., Zougbede, S., Stange, J., Ng, B., Matuschewski, K., Liebes, L. und Yee, H. (2005). Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol* **3**, e192.
- Frolov, A.**, Petrescu, A., Atshaves, B.P., So, P.T., Gratton, E., Serrero, G. und Schroeder, F. (2000). High density lipoprotein-mediated cholesterol uptake and targeting to lipid droplets in intact L-cell fibroblasts. A single- and multiphoton fluorescence approach. *J Biol Chem* **275**, 12769-12780.
- Funk, A.**, Mhamdi, M., Hohenberg, H., Will, H. und Sirma, H. (2006). pH-independent entry and sequential endosomal sorting are major determinants of hepadnaviral infection in primary hepatocytes. *Hepatology* **44**, 685-693.
- Funk, A.**, Mhamdi, M., Lin, L., Will, H. und Sirma, H. (2004). Itinerary of hepatitis B viruses: delineation of restriction points critical for infectious entry. *J Virol* **78**, 8289-8300.
- Gagescu, R.**, Demaurex, N., Parton, R.G., Hunziker, W., Huber, L.A. und Gruenberg, J. (2000). The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *Mol Biol Cell* **11**, 2775-2791.
- Gaillard, R.K.**, Barnard, J., Lopez, V., Hodges, P., Bourne, E., Johnson, L., Allen, M.I., Condreay, P., Miller, W.H. und Condreay, L.D. (2002). Kinetic analysis of wild-type and YMDD mutant hepatitis B virus polymerases and effects of deoxyribonucleotide concentrations on polymerase activity. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1005-1013.
- Galibert, F.**, Chen, T.N. und Mandart, E. (1982). Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: comparison with the hepatitis B virus sequence. *J Virol* **41**, 51-65.
- Gallina, A.**, Bonelli, F., Zentilin, L., Rindi, G., Muttini, M. und Milanesi, G. (1989). A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids. *J Virol* **63**, 4645-4652.
- Ganem, D.** (1982). Persistent infection of humans with hepatitis B virus: mechanisms and consequences. *Rev Infect Dis* **4**, 1026-1047.
- Ganem, D.**, Greenbaum, L. und Varmus, H.E. (1982). Virion DNA of ground squirrel hepatitis virus: structural analysis and molecular cloning. *J Virol* **44**, 374-383.
- Ganem, D.**, Pollack, J.R. und Tavis, J. (1994). Hepatitis B virus reverse transcriptase and its many roles in hepadnaviral genomic replication. *Infect Agents Dis* **3**, 85-93.
- Ganem, D.** und Prince, A.M. (2004). Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* **350**, 1118-1129.
- Ganem, D.** und Schneider, R. (2001). Hepadnaviridae The viruses and their replication. In: Field's Virology (Philadelphia, Lipincott-Raven).
- Gao, P.J.**, Shi, Y., Gao, Y.H., Liu, Y.W. und Tan, Y. (2007). The receptor for beta(2)GP I on membrane of hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 is annexin II. *World J Gastroenterol* **13**, 3364-3368.
- Gardner, J.P.**, Durso, R.J., Arrigale, R.R., Donovan, G.P., Maddon, P.J., Dragic, T. und Olson, W.C. (2003). L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4498-4503.
- Gastaminza, P.**, Kapadia, S.B. und Chisari, F.V. (2006). Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J Virol* **80**, 11074-11081.
- Gavilanes, F.**, Gonzalez-Ros, J.M. und Peterson, D.L. (1982). Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. *J Biol Chem* **257**, 7770-7777.
- Gerber, M.A.**, Hadziyannis, S., Vissoulis, C., Schaffner, F., Paronetto, F. und Popper, H. (1974). Electron microscopy and immunoelectronmicroscopy of cytoplasmic hepatitis B antigen in hepatocytes. *Am J Pathol* **75**, 489-502.
- Gerdes, H.H.**, Bukoreshtliev, N.V. und Barroso, J.F. (2007). Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett* **581**, 2194-2201.
- Gerlich, W.H.** und Robinson, W.S. (1980). Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* **21**, 801-809.
- Gianturco, S.H.**, Bradley, W.A., Gotto, A.M., Jr., Morrisett, J.D. und Peavy, D.L. (1982). Hypertriglyceridemic very low density lipoproteins induce triglyceride synthesis and accumulation in mouse peritoneal macrophages. *J Clin Invest* **70**, 168-178.
- Glass, C.**, Pittman, R.C., Weinstein, D.B. und Steinberg, D. (1983). Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and gonad. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 5435-5439.
- Glebe, D.** und Gerlich, W.H. (2004). Study of the endocytosis and intracellular localization of subviral particles of hepatitis B virus in primary hepatocytes. *Methods Mol Med* **96**, 143-151.

- Glebe, D.** und Urban, S. (2007). Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* 13, 22-38.
- Glebe, D.**, Urban, S., Knoop, E.V., Cag, N., Krass, P., Grun, S., Bulavaite, A., Sasnauskas, K. und **Gerlich, W.H.** (2005). Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology* 129, 234-245.
- Goldstein, J.L.** und Brown, M.S. (2009). The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 431-438.
- Goldstein, J.L.**, Dana, S.E., Faust, J.R., Beaudet, A.L. und Brown, M.S. (1975). Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. *J Biol Chem* 250, 8487-8495.
- Goldstein, J.L.**, Ho, Y.K., Basu, S.K. und Brown, M.S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 333-337.
- Gousset, K.**, Schiff, E., Langevin, C., Marijanovic, Z., Caputo, A., Browman, D.T., Chenouard, N., de Chaumont, F., Martino, A., Enninga, J., *et al.* (2009). Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol* 11, 328-336.
- Greaves, D.R.** und Gordon, S. (2005). Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res* 46, 11-20.
- Gripon, P.**, Cannie, I. und Urban, S. (2005). Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol* 79, 1613-1622.
- Gripon, P.**, Diot, C. und Guguen-Guillouzo, C. (1993). Reproducible high level infection of cultured adult human hepatocytes by hepatitis B virus: effect of polyethylene glycol on adsorption and penetration. *Virology* 192, 534-540.
- Gripon, P.**, Diot, C., Theze, N., Fourel, I., Loreal, O., Brechot, C. und Guguen-Guillouzo, C. (1988). Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Virol* 62, 4136-4143.
- Gripon, P.**, Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C. und Guguen-Guillouzo, C. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15655-15660.
- Gruenberg, J.** und Emans, N. (1993). Annexins in membrane traffic. *Trends Cell Biol* 3, 224-227.
- Gu, X.**, Trigatti, B., Xu, S., Acton, S., Babitt, J. und Krieger, M. (1998). The efficient cellular uptake of high density lipoprotein lipids via scavenger receptor class B type I requires not only receptor-mediated surface binding but also receptor-specific lipid transfer mediated by its extracellular domain. *J Biol Chem* 273, 26338-26348.
- Guidotti, L.G.**, Rochford, R., Chung, J., Shapiro, M., Purcell, R. und Chisari, F.V. (1999). Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 284, 825-829.
- Hao, M.**, Lin, S.X., Karylowski, O.J., Wustner, D., McGraw, T.E. und Maxfield, F.R. (2002). Vesicular and non-vesicular sterol transport in living cells. The endocytic recycling compartment is a major sterol storage organelle. *J Biol Chem* 277, 609-617.
- Hao, X.**, Shang, X., Wu, J., Shan, Y., Cai, M., Jiang, J., Huang, Z., Tang, Z. und Wang, H. (2011). Single-particle tracking of hepatitis B virus-like vesicle entry into cells. *Small* 7, 1212-1218.
- Harder, C.J.**, Vassiliou, G., McBride, H.M. und McPherson, R. (2006). Hepatic SR-BI-mediated cholesteryl ester selective uptake occurs with unaltered efficiency in the absence of cellular energy. *J Lipid Res* 47, 492-503.
- Hasty, A.H.**, Plummer, M.R., Weisgraber, K.H., Linton, M.F., Fazio, S. und Swift, L.L. (2005). The recycling of apolipoprotein E in macrophages: influence of HDL and apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* 46, 1433-1439.
- Heeren, J.**, Grewal, T., Jackle, S. und Beisiegel, U. (2001). Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J Biol Chem* 276, 42333-42338.
- Heeren, J.**, Grewal, T., Laatsch, A., Rottke, D., Rinninger, F., Enrich, C. und Beisiegel, U. (2003). Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization. *J Biol Chem* 278, 14370-14378.
- Heeren, J.**, Niemeier, A., Merkel, M. und Beisiegel, U. (2002). Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *J Mol Med (Berl)* 80, 576-584.
- Heeren, J.**, Weber, W. und Beisiegel, U. (1999). Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. *J Cell Sci* 112 (Pt 3), 349-359.
- Heermann, K.H.** und Gerlich, W.H. (1991). Surface Proteins of Hepatitis B Viruses. In: *Molecular Biology of the Hepatitis B Viruses*, A. McLachlan, Ed. (CRC Press, Boca Raton), S. 109-144.
- Heermann, K.H.**, Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H. und Gerlich, W.H. (1984). Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol* 52, 396-402.

- Hertogs, K.**, Leenders, W.P., Depla, E., De Bruin, W.C., Meheus, L., Raymackers, J., Moshage, H. und Yap, S.H. (1993). Endonexin II, present on human liver plasma membranes, is a specific binding protein of small hepatitis B virus (HBV) envelope protein. *Virology* **197**, 549-557.
- Higgins, M.E.**, Davies, J.P., Chen, F.W. und Ioannou, Y.A. (1999). Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. *Mol Genet Metab* **68**, 1-13.
- Hirsch-Kaufmann** (2009). *Biologie und molekulare Medizin*, Georg Thieme Verlag KG.
- Hogle, J.M.** (2002). Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu Rev Microbiol* **56**, 677-702.
- Hollinger, F.B.** und Liang, T.J. (2001). Hepatitis B Virus. In: *Fields Virology*, D.M. Knipe, *et al.*, eds. (Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins), S. 2971-3036.
- Holness, C.L.** und Simmons, D.L. (1993). Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* **81**, 1607-1613.
- Holtta-Vuori, M.**, Tanhuanpaa, K., Mobius, W., Somerharju, P. und Ikonen, E. (2002). Modulation of cellular cholesterol transport and homeostasis by Rab11. *Mol Biol Cell* **13**, 3107-3122.
- Hoofnagle, J.H.** (1981). Serologic markers of hepatitis B virus infection. *Annu Rev Med* **32**, 1-11.
- Hornick, C.A.**, Hui, D.Y. und DeLamatre, J.G. (1997). A role for retosomes in intracellular cholesterol transport from endosomes to the plasma membrane. *Am J Physiol* **273**, C1075-1081.
- Hornick, C.A.**, Thouron, C., DeLamatre, J.G. und Huang, J. (1992). Triacylglycerol hydrolysis in isolated hepatic endosomes. *J Biol Chem* **267**, 3396-3401.
- Hosel, M.**, Broxtermann, M., Janicki, H., Esser, K., Arzberger, S., Hartmann, P., Gillen, S., Kleeff, J., Stabenow, D., Odenthal, M., *et al.* (2011). Toll-like receptor 2-mediated innate immune response in human nonparenchymal liver cells toward adeno-associated viral vectors. *Hepatology* **55**, 287-297.
- Huang, R.T.**, Lichtenberg, B. und Rick, O. (1996). Involvement of annexin V in the entry of influenza viruses and role of phospholipids in infection. *FEBS Lett* **392**, 59-62.
- Hugo-Wissemann, D.**, Anundi, I., Lauchart, W., Viebahn, R. und de Groot, H. (1991). Differences in glycolytic capacity and hypoxia tolerance between hepatoma cells and hepatocytes. *Hepatology* **13**, 297-303.
- Hyams, K.C.** (1995). Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. *Clin Infect Dis* **20**, 992-1000.
- Ikonen, E.** (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 125-138.
- Infante, R.E.**, Radhakrishnan, A., Abi-Mosleh, L., Kinch, L.N., Wang, M.L., Grishin, N.V., Goldstein, J.L. und Brown, M.S. (2008a). Purified NPC1 protein: II. Localization of sterol binding to a 240-amino acid soluble luminal loop. *J Biol Chem* **283**, 1064-1075.
- Infante, R.E.**, Wang, M.L., Radhakrishnan, A., Kwon, H.J., Brown, M.S. und Goldstein, J.L. (2008b). NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15287-15292.
- Ishibashi, S.**, Herz, J., Maeda, N., Goldstein, J.L. und Brown, M.S. (1994). The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4431-4435.
- Ito, J.**, Nagayasu, Y. und Yokoyama, S. (2000). Cholesterol-sphingomyelin interaction in membrane and apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Lipid Res* **41**, 894-904.
- Iwarson, S.**, Tabor, E., Thomas, H.C., Goodall, A., Waters, J., Snoy, P., Shih, J.W. und Gerety, R.J. (1985). Neutralization of hepatitis B virus infectivity by a murine monoclonal antibody: an experimental study in the chimpanzee. *J Med Virol* **16**, 89-96.
- Jaoude, G.A.** und Sureau, C. (2005). Role of the antigenic loop of the hepatitis B virus envelope proteins in infectivity of hepatitis delta virus. *J Virol* **79**, 10460-10466.
- Jilbert, A.R.**, Freiman, J.S., Gowans, E.J., Holmes, M., Cossart, Y.E. und Burrell, C.J. (1987). Duck hepatitis B virus DNA in liver, spleen, and pancreas: analysis by in situ and Southern blot hybridization. *Virology* **158**, 330-338.
- Jilbert, A.R.**, Miller, D.S., Scougall, C.A., Turnbull, H. und 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* **226**, 338-345.
- Jilbert, A.R.**, Wu, T.T., England, J.M., Hall, P.M., Carp, N.Z., O'Connell, A.P. und Mason, W.S. (1992). Rapid resolution of duck hepatitis B virus infections occurs after massive hepatocellular involvement. *J Virol* **66**, 1377-1388.
- Johnson, W.J.**, Mahlberg, F.H., Rothblat, G.H. und Phillips, M.C. (1991). Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* **1085**, 273-298.
- Kaito, M.**, Ohba, H., Chiba, J., Kohara, M., Tanaka, H., Fujita, N., Gabazza, E.C., Watanabe, S., Konishi, M. und Adachi, Y. (2006). The ultrastructural morphology of native hepatitis B virus. *Med Mol Morphol* **39**, 136-145.

- Kajino, K.**, Jilbert, A.R., Saputelli, J., Aldrich, C.E., Cullen, J. und Mason, W.S. (1994). Woodchuck hepatitis virus infections: very rapid recovery after a prolonged viremia and infection of virtually every hepatocyte. *J Virol* **68**, 5792-5803.
- Kanazawa, T.**, Uemura, T., Osanai, T., Fukushi, Y., Imura, T., Oike, Y., Onodera, K., Akasaka, K., Okubo, K. und Takahashi, S. (1994). Plasma peroxidized low-density lipoprotein with hydroperoxidized cholesteryl linoleates estimated in patients with familial hypercholesterolemia. *Pathobiology* **62**, 269-282.
- Kaplan, P.M.**, Ford, E.C., Purcell, R.H. und Gerin, J.L. (1976). Demonstration of subpopulations of Dane particles. *J Virol* **17**, 885-893.
- Karten, B.**, Peake, K.B. und Vance, J.E. (2009). Mechanisms and consequences of impaired lipid trafficking in Niemann-Pick type C1-deficient mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 659-670.
- Kempka, G. und Kolb-Bachofen, V. (1988). Binding, uptake, and transcytosis of ligands for mannose-specific receptors in rat liver: an electron microscopic study. *Exp Cell Res* **176**, 38-48.
- Kennedy, M.A.**, Barrera, G.C., Nakamura, K., Baldan, A., Tarr, P., Fishbein, M.C., Frank, J., Francone, O.L. und Edwards, P.A. (2005). ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab* **1**, 121-131.
- Kindberg, G.M.**, Magnusson, S., Berg, T. und Smedsrod, B. (1990). Receptor-mediated endocytosis of ovalbumin by two carbohydrate-specific receptors in rat liver cells. The intracellular transport of ovalbumin to lysosomes is faster in liver endothelial cells than in parenchymal cells. *Biochem J* **270**, 197-203.
- Klinke, R.** und Silbernagl, S. (2003). "Lehrbuch der Physiologie", 4., korrigierte Auflage (Gerog Thieme Verlag).
- Klucken, J.**, Buchler, C., Orso, E., Kaminski, W.E., Porsch-Ozcurumez, M., Liebisch, G., Kapinsky, M., Diederich, W., Drobnik, W., Dean, M., *et al.* (2000). ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 817-822.
- Ko, D.C.**, Gordon, M.D., Jin, J.Y. und Scott, M.P. (2001). Dynamic movements of organelles containing Niemann-Pick C1 protein: NPC1 involvement in late endocytic events. *Mol Biol Cell* **12**, 601-614.
- Kock, J.**, Borst, E.M. und Schlicht, H.J. (1996). Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment. *J Virol* **70**, 5827-5831.
- Kock, J.** und Schlicht, H.J. (1993). Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J Virol* **67**, 4867-4874.
- Kodama, K.**, Ogasawara, N., Yoshikawa, H. und Murakami, S. (1985). Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: evolutionary relationship between hepadnaviruses. *J Virol* **56**, 978-986.
- Kuroki, K.**, Cheung, R., Marion, P.L. und Ganem, D. (1994). A cell surface protein that binds avian hepatitis B virus particles. *J Virol* **68**, 2091-2096.
- Kurushima, H.**, Ramprasad, M., Kondratenko, N., Foster, D.M., Quehenberger, O. und Steinberg, D. (2000). Surface expression and rapid internalization of macrosialin (mouse CD68) on elicited mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* **67**, 104-108.
- Kwon, H.J.**, Abi-Mosleh, L., Wang, M.L., Deisenhofer, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S. und Infante, R.E. (2009). Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell* **137**, 1213-1224.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lai, W.K.**, Sun, P.J., Zhang, J., Jennings, A., Lalor, P.F., Hubscher, S., McKeating, J.A. und Adams, D.H. (2006). Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on human sinusoidal endothelium: a role for capturing hepatitis C virus particles. *Am J Pathol* **169**, 200-208.
- Lau, J.Y.** und Wright, T.L. (1993). Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet* **342**, 1335-1340.
- Laub, O.**, Rall, L.B., Truett, M., Shaul, Y., Standring, D.N., Valenzuela, P. und Rutter, W.J. (1983). Synthesis of hepatitis B surface antigen in mammalian cells: expression of the entire gene and the coding region. *J Virol* **48**, 271-280.
- Lawn, R.M.**, Wade, D.P., Couse, T.L. und Wilcox, J.N. (2001). Localization of human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1) in normal and atherosclerotic tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 378-385.
- Le Seyec, J.**, Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C. und Gripon, P. (1998). Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity. *J Virol* **72**, 5573-5578.

- Lee, A.K.**, Ip, H.M. und Wong, V.C. (1978). Mechanisms of maternal-fetal transmission of hepatitis B virus. *J Infect Dis* 138, 668-671.
- Lee, W.M.** (1997). Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 337, 1733-1745.
- Leistner, C.M.**, Gruen-Bernhard, S. und Glebe, D. (2008). Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol* 10, 122-133.
- Li, B.L.**, Qu, Q., Zhao, Y.P., He, X.D., Wang, L., Chen, C.Z. und Liu, Z.Y. (2005). [Expression of albumin during hepatocyte differentiation by human bone marrow stem cells]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 43, 713-715.
- Liemann, S.**, Chandran, K., Baker, T.S., Nibert, M.L. und Harrison, S.C. (2002). Structure of the reovirus membrane-penetration protein, Mu1, in a complex with its protector protein, Sigma3. *Cell* 108, 283-295.
- Lien, J.M.**, Aldrich, C.E. und Mason, W.S. (1986). Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis. *J Virol* 57, 229-236.
- Lien, J.M.**, Petcu, D.J., Aldrich, C.E. und Mason, W.S. (1987). Initiation and termination of duck hepatitis B virus DNA synthesis during virus maturation. *J Virol* 61, 3832-3840.
- Liscum, L.** und Faust, J.R. (1989). The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one. *J Biol Chem* 264, 11796-11806.
- Liscum, L.** und Munn, N.J. (1999). Intracellular cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* 1438, 19-37.
- Liu, C.C.**, Yansura, D. und Levinson, A.D. (1982). Direct expression of hepatitis B surface antigen in monkey cells from an SV40 vector. *DNA* 1, 213-221.
- Lok, A.S.** (2002). Chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 346, 1682-1683.
- Lok, A.S.**, Heathcote, E.J. und Hoofnagle, J.H. (2001). Management of hepatitis B: 2000--summary of a workshop. *Gastroenterology* 120, 1828-1853.
- Lottspeich, F.** und Zorbach, H. (1998). Bioanalytik. Heidelberg - Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Lowry, O.H.**, Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Lusa, S.**, Blom, T.S., Eskelinen, E.L., Kuismanen, E., Mansson, J.E., Simons, K. und Ikonen, E. (2001). Depletion of rafts in late endocytic membranes is controlled by NPC1-dependent recycling of cholesterol to the plasma membrane. *J Cell Sci* 114, 1893-1900.
- Ma, K.**, Simantov, R., Zhang, J.C., Silverstein, R., Hajjar, K.A. und McCrae, K.R. (2000). High affinity binding of beta 2-glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II. *J Biol Chem* 275, 15541-15548.
- Macovei, A.**, Radulescu, C., Lazar, C., Petrescu, S., Durantel, D., Dwek, R.A., Zitzmann, N. und Nichita, N.B. (2010). Hepatitis B virus requires intact caveolin-1 function for productive infection in HepaRG cells. *Journal of Virology* 84, 243-253.
- Mahley, R.W.**, Huang, Y. und Rall, S.C., Jr. (1999). Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *J Lipid Res* 40, 1933-1949.
- Mahley, R.W.**, Innerarity, T.L., Rall, S.C., Jr. und Weisgraber, K.H. (1984). Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 25, 1277-1294.
- Mahley, R.W.** und Ji, Z.S. (1999). Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 40, 1-16.
- Mahoney, F.J.** (1999). Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 12, 351-366.
- Maiti, S.N.**, Balasubramanian, K., Ramoth, J.A. und Schroit, A.J. (2008). Beta-2-glycoprotein 1-dependent macrophage uptake of apoptotic cells. Binding to lipoprotein receptor-related protein receptor family members. *J Biol Chem* 283, 3761-3766.
- Majeed, M.**, Ernst, J.D., Magnusson, K.E., Kihlstrom, E. und Stendahl, O. (1994). Selective translocation of annexins during intracellular redistribution of *Chlamydia trachomatis* in HeLa and McCoy cells. *Infect Immun* 62, 126-134.
- Malarkey, D.E.**, Johnson, K., Ryan, L., Boorman, G. und Maronpot, R.R. (2005). New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol* 33, 27-34.
- Mangold, C.M.** und Streeck, R.E. (1993). Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein. *J Virol* 67, 4588-4597.
- Marion, P.L.**, Oshiro, L.S., Regnery, D.C., Scullard, G.H. und Robinson, W.S. (1980). A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2941-2945.
- Mason, W.S.**, Seal, G. und Summers, J. (1980). Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* 36, 829-836.

- Matveev, S.**, van der Westhuyzen, D.R. und Smart, E.J. (1999). Co-expression of scavenger receptor-BI and caveolin-1 is associated with enhanced selective cholesteryl ester uptake in THP-1 macrophages. *J Lipid Res* 40, 1647-1654.
- Maxfield, F.R.** und McGraw, T.E. (2004). Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 121-132.
- Mayor, S.**, Presley, J.F. und Maxfield, F.R. (1993). Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *J Cell Biol* 121, 1257-1269.
- Mayor, S.**, Sabharanjak, S. und Maxfield, F.R. (1998). Cholesterol-dependent retention of GPI-anchored proteins in endosomes. *EMBO J* 17, 4626-4638.
- Mehdi, H.**, Kaplan, M.J., Anlar, F.Y., Yang, X., Bayer, R., Sutherland, K. und Peebles, M.E. (1994). Hepatitis B virus surface antigen binds to apolipoprotein H. *J Virol* 68, 2415-2424.
- Melkonian, K.A.**, Ostermeyer, A.G., Chen, J.Z., Roth, M.G. und Brown, D.A. (1999). Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem* 274, 3910-3917.
- Mellman, I.** (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 575-625.
- Mellman, I.** und Warren, G. (2000). The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* 100, 99-112.
- Merkel, M.**, Eckel, R.H. und Goldberg, I.J. (2002). Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* 43, 1997-2006.
- Miyazawa, T.**, Fujimoto, K. und Oikawa, S. (1990). Determination of lipid hydroperoxides in low density lipoprotein from human plasma using high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Biomed Chromatogr* 4, 131-134.
- Mjos, O.D.**, Faergeman, O., Hamilton, R.L. und Havel, R.J. (1975). Characterization of remnants produced during the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins of blood plasma and intestinal lymph in the rat. *J Clin Invest* 56, 603-615.
- Moestrup, S.K.**, Gliemann, J. und Pallesen, G. (1992). Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res* 269, 375-382.
- Moll, K.J.** und Moll, M. (2002). "Kurzlehrbuch Anatomie", 17. Auflage (Urban & Fischer).
- Monceccchi, D.**, Murphy, E.J., Prows, D.R. und Schroeder, F. (1996). Sterol carrier protein-2 expression in mouse L-cell fibroblasts alters cholesterol uptake. *Biochim Biophys Acta* 1302, 110-116.
- Moriyama, T.**, Guilhot, S., Klopchin, K., Moss, B., Pinkert, C.A., Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Kanagawa, O. und Chisari, F.V. (1990). Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Science* 248, 361-364.
- Muakkassah-Kelly, S.F.**, Bieri, F., Waechter, F., Bentley, P. und Staubli, W. (1987). Long-term maintenance of hepatocytes in primary culture in the presence of DMSO: further characterization and effect of nafenopin, a peroxisome proliferator. *Exp Cell Res* 171, 37-51.
- Mukherjee, S.**, Zha, X., Tabas, I. und Maxfield, F.R. (1998). Cholesterol distribution in living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog. *Biophys J* 75, 1915-1925.
- Naito, M.** und Wisse, E. (1978). Filtration effect of endothelial fenestrations on chylomicron transport in neonatal rat liver sinusoids. *Cell Tissue Res* 190, 371-382.
- Nakajima, K.**, Nakano, T., Tokita, Y., Nagamine, T., Inazu, A., Kobayashi, J., Mabuchi, H., Stanhope, K.L., Havel, P.J., Okazaki, M., *et al.* (2011). Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons. *Clin Chim Acta* 412, 1306-1318.
- Nassal, M.** (1992). The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol* 66, 4107-4116.
- Natarajan, K.**, Li, H., Mariuzza, R.A. und Margulies, D.H. (1999). MHC class I molecules, structure and function. *Rev Immunogenet* 1, 32-46.
- Naureckiene, S.**, Sleat, D.E., Lackland, H., Fensom, A., Vanier, M.T., Wattiaux, R., Jadot, M. und Lobel, P. (2000). Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science* 290, 2298-2301.
- Neufeld, E.B.**, Cooney, A.M., Pitha, J., Dawidowicz, E.A., Dwyer, N.K., Pentchev, P.G. und Blanchette-Mackie, E.J. (1996). Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J Biol Chem* 271, 21604-21613.
- Neurath, A.R.**, Kent, S.B., Strick, N., Taylor, P. und Stevens, C.E. (1985). Hepatitis B virus contains pre-S gene-encoded domains. *Nature* 315, 154-156.
- Neurath, A.R.** und Strick, N. (1990). Antigenic mimicry of an immunoglobulin A epitope by a hepatitis B virus cell attachment site. *Virology* 178, 631-634.
- Neurath, A.R.**, Strick, N. und Li, Y.Y. (1992a). Cells transfected with human interleukin 6 cDNA acquire binding sites for the hepatitis B virus envelope protein. *J Exp Med* 176, 1561-1569.

- Neurath, A.R.**, Strick, N. und Sproul, P. (1992b). Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin 6 on the virus envelope protein. *J Exp Med* **175**, 461-469.
- Nielsen, S.U.**, Bassendine, M.F., Burt, A.D., Martin, C., Pumeechockchai, W. und Toms, G.L. (2006). Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol* **80**, 2418-2428.
- Noorman, F.**, Barrett-Bergshoeff, M.M., Biessen, E.A., van de Bilt, E., van Berkel, T.J. und Rijken, D.C. (1997). Cluster mannosides can inhibit mannose receptor-mediated tissue-type plasminogen activator degradation by both rat and human cells. *Hepatology* **26**, 1303-1310.
- Novacek, M.J.** (1992). Mammalian phylogeny: shaking the tree. *Nature* **356**, 121-125.
- Oess, S.** und Hildt, E. (2000). Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. *Gene Ther* **7**, 750-758.
- Ogata, N.**, Cote, P.J., Zanetti, A.R., Miller, R.H., Shapiro, M., Gerin, J. und Purcell, R.H. (1999). Licensed recombinant hepatitis B vaccines protect chimpanzees against infection with the prototype surface gene mutant of hepatitis B virus. *Hepatology* **30**, 779-786.
- Olenina, L.V.**, Kuzmina, T.I., Sobolev, B.N., Kuraeva, T.E., Kolesanova, E.F. und Archakov, A.I. (2005). Identification of glycosaminoglycan-binding sites within hepatitis C virus envelope glycoprotein E2*. *J Viral Hepat* **12**, 584-593.
- Onfelt, B.**, Nedvetzki, S., Benninger, R.K., Purbhoo, M.A., Sowinski, S., Hume, A.N., Seabra, M.C., Neil, M.A., French, P.M. und Davis, D.M. (2006). Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol* **177**, 8476-8483.
- Onfelt, B.**, Nedvetzki, S., Yanagi, K. und Davis, D.M. (2004). Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol* **173**, 1511-1513.
- Onfelt, B.**, Purbhoo, M.A., Nedvetzki, S., Sowinski, S. und Davis, D.M. (2005). Long-distance calls between cells connected by tunneling nanotubules. *Sci STKE* **2005**, pe55.
- Oram, J.F.**, Johnson, C.J. und Brown, T.A. (1987). Interaction of high density lipoprotein with its receptor on cultured fibroblasts and macrophages. Evidence for reversible binding at the cell surface without internalization. *J Biol Chem* **262**, 2405-2410.
- Ostapchuk, P.**, Hearing, P. und Ganem, D. (1994). A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *EMBO J* **13**, 1048-1057.
- Out, R.**, Hoekstra, M., Spijkers, J.A., Kruijt, J.K., van Eck, M., Bos, I.S., Twisk, J. und Van Berkel, T.J. (2004). Scavenger receptor class B type I is solely responsible for the selective uptake of cholesteryl esters from HDL by the liver and the adrenals in mice. *J Lipid Res* **45**, 2088-2095.
- Owada, T.**, Matsubayashi, K., Sakata, H., Ihara, H., Sato, S., Ikebuchi, K., Kato, T., Azuma, H. und Ikeda, H. (2006). Interaction between desialylated hepatitis B virus and asialoglycoprotein receptor on hepatocytes may be indispensable for viral binding and entry. *J Viral Hepat* **13**, 11-18.
- Pagler, T.A.**, Rhode, S., Neuhofer, A., Laggner, H., Strobl, W., Hinterdorfer, C., Volf, I., Pavelka, M., Eckhardt, E.R., van der Westhuyzen, D.R., *et al.* (2006). SR-BI-mediated high density lipoprotein (HDL) endocytosis leads to HDL resecretion facilitating cholesterol efflux. *J Biol Chem* **281**, 11193-11204.
- Pagnan, A.**, Havel, R.J., Kane, J.P. und Kotite, L. (1977). Characterization of human very low density lipoproteins containing two electrophoretic populations: double pre-beta lipoproteinemia and primary dysbetalipoproteinemia. *J Lipid Res* **18**, 613-622.
- Pante, N.** und Kann, M. (2002). Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* **13**, 425-434.
- Patsch, J.R.** (1987). Postprandial lipaemia. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **1**, 551-580.
- Patzer, E.J.**, Nakamura, G.R., Simonsen, C.C., Levinson, A.D. und Brands, R. (1986). Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum. *J Virol* **58**, 884-892.
- Patzer, E.J.**, Nakamura, G.R. und Yaffe, A. (1984). Intracellular transport and secretion of hepatitis B surface antigen in mammalian cells. *J Virol* **51**, 346-353.
- Pavenstadt, H.**, Kriz, W. und Kretzler, M. (2003). Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* **83**, 253-307.
- Penna, A.**, Chisari, F.V., Bertoletti, A., Missale, G., Fowler, P., Giuberti, T., Fiaccadori, F. und 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.
- Penna, A.**, Fowler, P., Bertoletti, A., Guilhot, S., Moss, B., Margolskee, R.F., Cavalli, A., Valli, A., Fiaccadori, F., Chisari, F.V., *et al.* (1992). Hepatitis B virus (HBV)-specific cytotoxic T-cell (CTL) response in humans: characterization of HLA class II-restricted CTLs that recognize endogenously synthesized HBV envelope antigens. *J Virol* **66**, 1193-1198.

- Pentchev, P.G.**, Comly, M.E., Kruth, H.S., Vanier, M.T., Wenger, D.A., Patel, S. und Brady, R.O. (1985). A defect in cholesterol esterification in Niemann-Pick disease (type C) patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8247-8251.
- Persing, D.H.**, Varmus, H.E. und Ganem, D. (1985). A frameshift mutation in the pre-S region of the human hepatitis B virus genome allows production of surface antigen particles but eliminates binding to polymerized albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 3440-3444.
- Persing, D.H.**, Varmus, H.E. und Ganem, D. (1987). The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid. *J Virol* 61, 1672-1677.
- Pertoft, H.** und Smedsrod, B. (1987). Separation and characterization of liver cells. In: *Cell Separation, Methods and Selected Applications*, T.G. Pretlow, *et al.*, eds. (New York, Academic Press), S. 1-24.
- Petersen, J.**, Dandri, M., Mier, W., Lutgehetmann, M., Volz, T., von Weizsacker, F., Haberkorn, U., Fischer, L., Pollok, J.M., Erbes, B., *et al.* (2008). Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nat Biotechnol* 26, 335-341.
- Petit, M.A.**, Capel, F., Dubanchet, S. und Mabit, H. (1992). PreS1-specific binding proteins as potential receptors for hepatitis B virus in human hepatocytes. *Virology* 187, 211-222.
- Pittman, R.C.**, Knecht, T.P., Rosenbaum, M.S. und Taylor, C.A., Jr. (1987). A nonendocytotic mechanism for the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesterol esters. *J Biol Chem* 262, 2443-2450.
- Platt, N.** und Gordon, S. (1998). Scavenger receptors: diverse activities and promiscuous binding of polyanionic ligands. *Chem Biol* 5, R193-203.
- Polz, E.** und Kostner, G.M. (1979). The binding of beta 2-glycoprotein-I to human serum lipoproteins: distribution among density fractions. *FEBS Lett* 102, 183-186.
- Pontisso, P.**, Ruvoletto, M.G., Tiribelli, C., Gerlich, W.H., Ruol, A. und Alberti, A. (1992). The preS1 domain of hepatitis B virus and IgA cross-react in their binding to the hepatocyte surface. *J Gen Virol* 73 (Pt 8), 2041-2045.
- Pradel, G.** und Frevert, U. (2001). Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology* 33, 1154-1165.
- Prince, A.M.**, Huima-Byron, T., Parker, T.S. und Levine, D.M. (1996). Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins. *J Viral Hepat* 3, 11-17.
- Protzer, U.**, Nassal, M., Chiang, P.W., Kirschfink, M. und Schaller, H. (1999). Interferon gene transfer by a hepatitis B virus vector efficiently suppresses wild-type virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10818-10823.
- Puglielli, L.**, Rigotti, A., Amigo, L., Nunez, L., Greco, A.V., Santos, M.J. und Nervi, F. (1996). Modulation of intrahepatic cholesterol trafficking: evidence by in vivo antisense treatment for the involvement of sterol carrier protein-2 in newly synthesized cholesterol transport into rat bile. *Biochem J* 317 (Pt 3), 681-687.
- Puig-Kroger, A.**, Sierra-Filardi, E., Dominguez-Soto, A., Samaniego, R., Corcuera, M.T., Gomez-Aguado, F., Ratnam, M., Sanchez-Mateos, P. und Corbi, A.L. (2009). Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages. *Cancer Res* 69, 9395-9403.
- Rabe, B.**, Glebe, D. und Kann, M. (2006). Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events. *J Virol* 80, 5465-5473.
- Rabe, B.**, Vlachou, A., Pante, N., Helenius, A. und Kann, M. (2003). Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9849-9854.
- Reaven, E.**, Tsai, L. und Azhar, S. (1996). Intracellular events in the "selective" transport of lipoprotein-derived cholesteryl esters. *J Biol Chem* 271, 16208-16217.
- Rehermann, B.** und Nascimbeni, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 5, 215-229.
- Ribeiro, R.M.**, Lo, A. und Perelson, A.S. (2002). Dynamics of hepatitis B virus infection. *Microbes Infect* 4, 829-835.
- Rinninger, F.**, Brundert, M., Jackle, S., Galle, P.R., Busch, C., Izbicki, J.R., Rogiers, X., Henne-Bruns, D., Kremer, B., Broelsch, C.E., *et al.* (1994). Selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl esters by human hepatocytes in primary culture. *Hepatology* 19, 1100-1114.
- Robinson, W.S.** (1995). Hepatitis B virus and hepatitis D virus. In: *Principles and Practise of Infectious Diseases*, G.L. Mandell, *et al.*, eds. (New York, Churchill Livingstone), S. 1406-1439.
- Robinson, W.S.**, Clayton, D.A. und Greenman, R.L. (1974). DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol* 14, 384-391.

- Rodrigueza, W.V.**, Thuahnai, S.T., Temel, R.E., Lund-Katz, S., Phillips, M.C. und Williams, D.L. (1999). Mechanism of scavenger receptor class B type I-mediated selective uptake of cholesteryl esters from high density lipoprotein to adrenal cells. *J Biol Chem* 274, 20344-20350.
- Rohlmann, A.**, Gotthardt, M., Hammer, R.E. und Herz, J. (1998). Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J Clin Invest* 101, 689-695.
- Roingeard, P.** und Sureau, C. (1998). Ultrastructural analysis of hepatitis B virus in HepG2-transfected cells with special emphasis on subviral filament morphogenesis. *Hepatology* 28, 1128-1133.
- Rudolf, M.** und Curcio, C.A. (2009). Esterified cholesterol is highly localized to Bruch's membrane, as revealed by lipid histochemistry in wholemounts of human choroid. *J Histochem Cytochem* 57, 731-739.
- Rustom, A.**, Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P. und Gerdes, H.H. (2004). Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 303, 1007-1010.
- Sabahi, A.** (2009). Hepatitis C Virus entry: the early steps in the viral replication cycle. *Virology* 6, 117.
- Salvayre, R.**, Negre, A., Radom, J. und Douste-Blazy, L. (1989). Independence of triacylglycerol-containing compartments in cultured fibroblasts from Wolman disease and multisystemic lipid storage myopathy. *FEBS Lett* 250, 35-39.
- Santantonio, T.**, Jung, M.C., Schneider, R., Fernholz, D., Milella, M., Monno, L., Pastore, G., Pape, G.R. und Will, H. (1992). Hepatitis B virus genomes that cannot synthesize pre-S2 proteins occur frequently and as dominant virus populations in chronic carriers in Italy. *Virology* 188, 948-952.
- Schettler, C.H.** (1971). Goose virus hepatitis in the Canada Goose and Snow Goose. *J Wildl Dis* 7, 147-148.
- Schmitz, G.**, Robenek, H., Lohmann, U. und Assmann, G. (1985). Interaction of high density lipoproteins with cholesteryl ester-laden macrophages: biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis and resecretion of high density lipoproteins by macrophages. *EMBO J* 4, 613-622.
- Schneider, W.J.**, Kovanen, P.T., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Utermann, G., Weber, W., Havel, R.J., Kotite, L., Kane, J.P., Innerarity, T.L., *et al.* (1981). Familial dysbetalipoproteinemia. Abnormal binding of mutant apoprotein E to low density lipoprotein receptors of human fibroblasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits, and cows. *J Clin Invest* 68, 1075-1085.
- Schroeder, F.**, Frolov, A., Schoer, J., Gallegos, A., Atshaves, B.P., Stolowich, N.J., Scott, A.I. und Freeman, D.A. (1998). In: *Intracellular Cholesterol Trafficking*, T.Y. Chang, *et al.*, eds. (Boston, MA, Kluwer Academic Publishers), S. 213-234.
- Schroeder, F.**, Gallegos, A.M., Atshaves, B.P., Storey, S.M., McIntosh, A.L., Petrescu, A.D., Huang, H., Starodub, O., Chao, H., Yang, H., *et al.* (2001). Recent advances in membrane microdomains: rafts, caveolae, and intracellular cholesterol trafficking. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 873-890.
- Schuck, S.** und Simons, K. (2004). Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J Cell Sci* 117, 5955-5964.
- Schulze, A.**, Gripon, P. und Urban, S. (2007). Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* 46, 1759-1768.
- Seeger, C.**, Ganem, D. und Varmus, H.E. (1986). Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* 232, 477-484.
- Seglen, P.O.** (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13, 29-83.
- Sells, M.A.**, Chen, M.L. und Acs, G. (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.
- Shearer, M.H.**, Sureau, C., Dunbar, B. und Kennedy, R.C. (1998). Structural characterization of viral neutralizing monoclonal antibodies to hepatitis B surface antigen. *Mol Immunol* 35, 1149-1160.
- Sherer, N.M.** und Mothes, W. (2008). Cytonemes and tunneling nanotubules in cell-cell communication and viral pathogenesis. *Trends Cell Biol* 18, 414-420.
- Silver, D.L.**, Wang, N. und Tall, A.R. (2000). Defective HDL particle uptake in ob/ob hepatocytes causes decreased recycling, degradation, and selective lipid uptake. *J Clin Invest* 105, 151-159.
- Silver, D.L.**, Wang, N., Xiao, X. und Tall, A.R. (2001). High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *J Biol Chem* 276, 25287-25293.
- Simons, K.** und Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Skibbens, J.E.**, Roth, M.G. und Matlin, K.S. (1989). Differential extractability of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and nonpolar fibroblasts. *J Cell Biol* 108, 821-832.
- Slimane, T.A.**, Trugnan, G., Van, I.S.C. und Hoekstra, D. (2003). Raft-mediated trafficking of apical resident proteins occurs in both direct and transcytotic pathways in polarized hepatic cells: role of distinct lipid microdomains. *Mol Biol Cell* 14, 611-624.

- Smart, E.J.**, De Rose, R.A. und Farber, S.A. (2004). Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3450-3455.
- Soccio, R.E.** und Breslow, J.L. (2004). Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1150-1160.
- Sowinski, S.**, Jolly, C., Berninghausen, O., Purbhoo, M.A., Chauveau, A., Kohler, K., Oddos, S., Eissmann, P., Brodsky, F.M., Hopkins, C., *et al.* (2008). Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol* 10, 211-219.
- Sprengel, R.**, Kaleta, E.F. und Will, H. (1988). Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol* 62, 3832-3839.
- Stanford, K.I.**, Bishop, J.R., Foley, E.M., Gonzales, J.C., Niesman, I.R., Witztum, J.L. und Esko, J.D. (2009). Syndecan-1 is the primary heparan sulfate proteoglycan mediating hepatic clearance of triglyceride-rich lipoproteins in mice. *J Clin Invest* 119, 3236-3245.
- Stangl, H.**, Cao, G., Wyne, K.L. und Hobbs, H.H. (1998). Scavenger receptor, class B, type I-dependent stimulation of cholesterol esterification by high density lipoproteins, low density lipoproteins, and nonlipoprotein cholesterol. *J Biol Chem* 273, 31002-31008.
- Stefas, I.**, Rucheton, M., D'Angeac, A.D., Morel-Baccard, C., Seigneurin, J.M., Zarski, J.P., Martin, M., Cerutti, M., Bossy, J.P., Misse, D., *et al.* (2001). Hepatitis B virus Dane particles bind to human plasma apolipoprotein H. *Hepatology* 33, 207-217.
- Steinberg, D.** (1997). Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 272, 20963-20966.
- Storey, S.M.**, Gallegos, A.M., Atshaves, B.P., McIntosh, A.L., Martin, G.G., Parr, R.D., Landrock, K.K., Kier, A.B., Ball, J.M. und Schroeder, F. (2007). Selective cholesterol dynamics between lipoproteins and caveolae/lipid rafts. *Biochemistry* 46, 13891-13906.
- Sugii, S.**, Reid, P.C., Ohgami, N., Du, H. und Chang, T.Y. (2003). Distinct endosomal compartments in early trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol. *J Biol Chem* 278, 27180-27189.
- Summers, J.**, O'Connell, A. und Millman, I. (1975). Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 4597-4601.
- Summers, J.**, Smolec, J.M. und Snyder, R. (1978). A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 4533-4537.
- Swarnakar, S.**, Temel, R.E., Connelly, M.A., Azhar, S. und Williams, D.L. (1999). Scavenger receptor class B, type I, mediates selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl ester. *J Biol Chem* 274, 29733-29739.
- Tabas, I.**, Lim, S., Xu, X.X. und Maxfield, F.R. (1990). Endocytosed beta-VLDL and LDL are delivered to different intracellular vesicles in mouse peritoneal macrophages. *J Cell Biol* 111, 929-940.
- Takahashi, Y.**, Zhu, H., Xu, W., Murakami, T., Iwasaki, T., Hattori, H. und Yoshimoto, T. (2005). Selective uptake and efflux of cholesteryl linoleate in LDL by macrophages expressing 12/15-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 128-135.
- Tall, A.R.**, Costet, P. und Wang, N. (2002). Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux. *J Clin Invest* 110, 899-904.
- Testut, P.**, Renard, C.A., Terradillos, O., Vitvitski-Trepo, L., Tekaia, F., Degott, C., Blake, J., Boyer, B. und Buendia, M.A. (1996). A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J Virol* 70, 4210-4219.
- Thery, C.**, Zitvogel, L. und Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2, 569-579.
- Thomssen, R.**, Bonk, S., Propfe, C., Heermann, K.H., Kochel, H.G. und Uy, A. (1992). Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol* 181, 293-300.
- Thuahnai, S.T.**, Lund-Katz, S., Williams, D.L. und Phillips, M.C. (2001). Scavenger receptor class B, type I-mediated uptake of various lipids into cells. Influence of the nature of the donor particle interaction with the receptor. *J Biol Chem* 276, 43801-43808.
- Toniutto, P.**, Fattovich, G., Fabris, C., Minisini, R., Burlone, M., Pravadelli, C., Peraro, L., Falletti, E., Caldera, F., Bitetto, D., *et al.* (2010). Genetic polymorphism at the apolipoprotein E locus affects the outcome of chronic hepatitis B. *J Med Virol* 82, 224-331.
- Treichel, U.**, Meyer zum Buschenfelde, K.H., Dienes, H.P. und Gerken, G. (1997). Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells. *Arch Virol* 142, 493-498.
- Treichel, U.**, Meyer zum Buschenfelde, K.H., Stockert, R.J., Poralla, T. und Gerken, G. (1994). The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carriers. *J Gen Virol* 75 (Pt 11), 3021-3029.
- Tsuchiya, S.**, Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T. und Tada, K. (1982). Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* 42, 1530-1536.

- Tsuchiya, S.**, Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T. und Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26, 171-176.
- Uittenbogaard, A.**, Everson, W.V., Matveev, S.V. und Smart, E.J. (2002). Cholesteryl ester is transported from caveolae to internal membranes as part of a caveolin-annexin II lipid-protein complex. *J Biol Chem* 277, 4925-4931.
- Underwood, K.W.**, Andemariam, B., McWilliams, G.L. und Liscum, L. (1996). Quantitative analysis of hydrophobic amine inhibition of intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res* 37, 1556-1568.
- Urano, Y.**, Watanabe, H., Murphy, S.R., Shibuya, Y., Geng, Y., Peden, A.A., Chang, C.C. und Chang, T.Y. (2008). Transport of LDL-derived cholesterol from the NPC1 compartment to the ER involves the trans-Golgi network and the SNARE protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16513-16518.
- Urban, S.**, Schwarz, C., Marx, U.C., Zentgraf, H., Schaller, H. und Multhaupt, G. (2000). Receptor recognition by a hepatitis B virus reveals a novel mode of high affinity virus-receptor interaction. *EMBO J* 19, 1217-1227.
- van Dijk, M.C.**, Ziere, G.J. und van Berkel, T.J. (1992). Characterization of the chylomicron-remnant-recognition sites on parenchymal and Kupffer cells of rat liver. Selective inhibition of parenchymal cell recognition by lactoferrin. *Eur J Biochem* 205, 775-784.
- Vaughan, A.M.** und Oram, J.F. (2005). ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J Biol Chem* 280, 30150-30157.
- Veniant, M.M.**, Zlot, C.H., Walzem, R.L., Pierotti, V., Driscoll, R., Dichek, D., Herz, J. und Young, S.G. (1998). Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient "Apo-B48-only" and "Apo-B100-only" mice. *J Clin Invest* 102, 1559-1568.
- Verges, M.**, Bensadoun, A., Herz, J., Belcher, J.D. und Havel, R.J. (2004). Endocytosis of hepatic lipase and lipoprotein lipase into rat liver hepatocytes in vivo is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 279, 9030-9036.
- Vidulescu, C.**, Clejan, S. und O'Connor K, C. (2004). Vesicle traffic through intercellular bridges in DU 145 human prostate cancer cells. *J Cell Mol Med* 8, 388-396.
- Vigne, J.L.** und Havel, R.J. (1981). Metabolism of apolipoprotein A-I of chylomicrons in rats and humans. *Can J Biochem* 59, 613-618.
- Wallin, M.**, Ekstrom, M. und Garoff, H. (2004). Isomerization of the intersubunit disulphide-bond in Env controls retrovirus fusion. *EMBO J* 23, 54-65.
- Wallin, M.**, Ekstrom, M. und Garoff, H. (2005). The fusion-controlling disulfide bond isomerase in retrovirus Env is triggered by protein destabilization. *J Virol* 79, 1678-1685.
- Walter, E.**, Keist, R., Niederost, B., Pult, I. und Blum, H.E. (1996). Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology* 24, 1-5.
- Wang, N.** und Tall, A.R. (2003). Regulation and mechanisms of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1178-1184.
- Warren, K.S.**, Heeney, J.L., Swan, R.A., Heriyanto und Verschoor, E.J. (1999). A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J Virol* 73, 7860-7865.
- Wartiovaara, J.**, Ofverstedt, L.G., Khoshnoodi, J., Zhang, J., Makela, E., Sandin, S., Ruotsalainen, V., Cheng, R.H., Jalanko, H., Skoglund, U., *et al.* (2004). Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J Clin Invest* 114, 1475-1483.
- Watkins, S.C.** und Salter, R.D. (2005). Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity* 23, 309-318.
- Willekens, F.L.**, Werre, J.M., Kruijt, J.K., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Dopp, Y.A., van den Bos, A.G., Bosman, G.J. und van Berkel, T.J. (2005). Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood* 105, 2141-2145.
- Wilsie, L.C.**, Gonzales, A.M. und Orlando, R.A. (2006). Syndecan-1 mediates internalization of apoE-VLDL through a low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-independent, non-clathrin-mediated pathway. *Lipids Health Dis* 5, 23.
- Wojtanik, K.M.** und Liscum, L. (2003). The transport of low density lipoprotein-derived cholesterol to the plasma membrane is defective in NPC1 cells. *J Biol Chem* 278, 14850-14856.
- Wraith, J.E.**, Guffon, N., Rohrbach, M., Hwu, W.L., Korenke, G.C., Bembi, B., Luzy, C., Giorgino, R. und Sedel, F. (2009). Natural history of Niemann-Pick disease type C in a multicentre observational retrospective cohort study. *Mol Genet Metab* 98, 250-254.
- Wustner, D.**, Mondal, M., Huang, A. und Maxfield, F.R. (2004). Different transport routes for high density lipoprotein and its associated free sterol in polarized hepatic cells. *J Lipid Res* 45, 427-437.
- Wynne, S.A.**, Crowther, R.A. und Leslie, A.G. (1999). The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol Cell* 3, 771-780.
- Xiang, S.Q.**, Cianflone, K., Kalant, D. und Sniderman, A.D. (1999). Differential binding of triglyceride-rich lipoproteins to lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 40, 1655-1663.

- Yan, R.Q.**, Su, J.J., Huang, D.R., Gan, Y.C., Yang, C. und Huang, G.H. (1996). Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. I. Experimental infection of tree shrews with hepatitis B virus. *J Cancer Res Clin Oncol* 122, 283-288.
- Yancey, P.G.**, Bortnick, A.E., Kellner-Weibel, G., de la Llera-Moya, M., Phillips, M.C. und Rothblat, G.H. (2003). Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscl Throm Vas* 23, 712-719.
- Ye, J.** (2007). Reliance of host cholesterol metabolic pathways for the life cycle of hepatitis C virus. *PLoS Pathog* 3, e108.
- Ying, C.**, Van Pelt, J.F., Van Lommel, A., Van Ranst, M., Leyssen, P., De Clercq, E. und Neyts, J. (2002). Sulphated and sulphonated polymers inhibit the initial interaction of hepatitis B virus with hepatocytes. *Antivir Chem Chemother* 13, 157-164.
- You, Q.**, Cheng, L., Kedl, R.M. und Ju, C. (2008). Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology* 48, 978-990.

Danksagung

Ich möchte hier vielen Kollegen und Freunden danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben und ohne deren Hilfe ich die Arbeit nicht hätte fertig stellen können.

Zuerst möchte ich Frau Prof. Dr. Ulrike Protzer für die Überlassung des Themas, die Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit und ihre stetige Diskussionsbereitschaft danken.

Frau Prof. Dr. Dagmar Knebel-Mörsdorf und Herrn Prof. Herbert Pfister danke ich für die Begleitung meiner Arbeit in ihrer Funktion als Tutoren im Rahmen des Promotionsstudienganges „Molekulare Medizin“ der Universität zu Köln sowie als Gutachter dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Xiaoming Cheng bedanken, mit der ich einige Versuche zusammen durchgeführt habe. Hier sind die Isolierung, Kultivierung und Versuche mit den primären humanen Monozyten und Leberzellen zu erwähnen.

Ich möchte unbedingt auch Mathias Broxtermann nennen, mit dem ich schon in Köln oft bis spät in die Nacht humanes Lebergewebe präpariert habe. Mit ihm habe ich auch das Protokoll für die Isolierung der einzelnen Leberzelltypen etabliert, welches bereits Verwendung in mehreren Publikationen unserer Kooperationspartner gefunden hat.

Wichtig ist mir, die Zusammenarbeit mit Georg Gasteiger zu erwähnen, der sich immer sehr für mein Thema interessiert hat und bei dem ich mich für die vielen angeregten Diskussionen bedanken möchte.

Prof. Dr. Heikenwälder danke ich für die Präparation der murinen Gewebeschnitte sowie für seine vielen Anregungen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jörg Heeren bedanken, der mir viele Protokolle zur Verfügung gestellt hat und mir viele Ratschläge und

Hilfestellungen gegeben hat. Seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft hat mich bei meiner Arbeit sehr vorangebracht.

Ein besonderer Dank gilt unseren Kooperationspartnern an der Uniklinik Bonn: Herrn Prof. Dr. Percy Knolle für die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft und Dirk Wohlleber für die tatkräftige Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen am murinen Modell.

Frau Dr. Anja Langenkamp danke ich für die Unterstützung bei der Isolierung der viralen Partikel und Frau Jennen für die Präparation der Gewebeschnitte und die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Analysen.

Besonders danken möchte ich unseren technischen Assistenten, die mich bei vielen Arbeiten unterstützt haben und eine große Hilfe waren: Raindy Tedjokusumo, Theresa Asen, Andrea Weicht und Kerstin Ackermann.

Christian Bach danke ich sehr für die gewissenhafte Korrektur dieser Arbeit und Silke Arzberger für viele wichtige Hilfestellungen. Hier möchte ich allen Leuten des Labors im 2. und 3. OG für die nette Arbeitsatmosphäre und die tägliche Unterstützung danken. Gerade außerhalb der Arbeit hat sich gezeigt, wie gut das Verhältnis der Leute untereinander bei uns ist. Ich werde viele legendäre Feiern nie vergessen und bin mir sicher, dass da noch einige kommen werden.

Steffi danke ich von Herzen für die Geduld, die sie mit mir und meiner Arbeit gezeigt hat sowie ihre stetige Unterstützung durch ihre (ihr schon in die Wiege gelegte) Ordentlichkeit. Mit Carsten verbindet mich eine lange und schöne gemeinsame Zeit an der Universität, dem ich dafür an dieser Stelle danken möchte.

Am Ende möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mein Leben am meisten geprägt und diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben. Meinen Eltern Hella und Hans-Peter, meinen Geschwistern Simon und Christina sowie meiner Patentante und Oma Maria, die leider während meiner Arbeit verstorben ist und immer ein wichtiger Teil unserer ganzen Familie sein wird. Ihnen allen möchte ich diese Arbeit widmen.

Erklärung

Ich versichere, dass 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 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 Frau Prof. Dr. Ulrike Protzer betreut worden.

Köln, 14. Mai 2012