

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Andreas Untergasser

aus Erbach

Tag der mündlichen Prüfung:

Rekombinante Hepatitis B Viren-Vektoren
als Werkzeuge für Molekularbiologie und Therapie:
Optimierung eines Systems

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich
Prof. Dr. Richard Herrmann

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Virologie des Hygieneinstitutes der Universität Heidelberg in der Zeit von Februar 2001 bis September 2002 unter Anleitung von Pd. Dr. Ulrike Protzer ausgeführt.

Ich danke Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich, dass er mich in seinem Labor aufgenommen hat und sich bereit erklärte meine Doktorarbeit zu betreuen. Prof. Dr. Richard Hermann möchte ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferates danken. Ganz herzlich danke ich PD Dr. Ulrike Protzer, sie übernahm die direkte Betreuung meiner Arbeit. Die Zusammenarbeit war ausgesprochen kollegial und produktiv, was die Zeit im Labor sehr angenehm machte. Besonderer Dank gilt ihr für die sorgfältigen Korrekturen am vorliegenden Text kurz vor der Abgabe.

Heike Oberwinkler, Dr. Uta Klöcker und Jérôme Dumortier danke ich für eine gute Zeit im Labor und für die vielen lustigen Mittagspausen im botanischen Garten. Elisa Kieback danke ich für eine sehr gute Zusammenarbeit, eine bessere Laborpraktikantin kann man sich nicht wünschen. Dr. Andreas Knaust und Marc Windisch danke ich für die Freundschaft über das Labor hinaus und die kreativen Frisörbesuche. Frank Weissmann möchte ich für die vielen Cola-Pausen und Fritz-Besuche danken, die einen wichtigen Ausgleich zum Laboralltag darstellten.

Besonderer Dank gilt auch Dr. Peter Büchler, Dr. Henning Schulze-Bergkamen und Andreas Dax, durch deren unkomplizierte Kooperation die PHH eine Qualität erreichten, die vorher nicht denkbar war. Ich möchte mich bei allen Mitgliedern des Labors bedanken, die mir mit ihrem Erfahrungsschatz und unzähligen Ratschlägen bei allen wissenschaftlichen Problemen zur Seite standen. Ein Dankeschön gilt auch den Mitarbeitern des ZMBHs, der AG Bartenschlager und des Hygieneinstitutes, die mir immer aushalfen, wenn es durch meine Fehlplanungen zu Engpässen kam oder ich mal wieder irgendwelche Geräte brauchte.

Danken möchte ich auch Dr. Henning Schulze-Bergkamen, Dr. Jochen Bodem für ihre Verbesserungsvorschläge und meinem Onkel Prof. Klaus Schmidt, der dem Text den letzten grammatikalischen Schliff gab.

Tina Ötzmann danke ich für eine Beziehung, die ich nicht mit Worten beschreiben kann. Sie gibt mir Kraft in einer Form, die ich bisher nicht für möglich gehalten hatte - Sie hat mein Leben verändert.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mich während dieser Zeit in jeder erdenklichen Hinsicht unterstützten.

| | Seite |
|---|-----------|
| 1. Zusammenfassung | 1 |
| 2. Einleitung | 2 |
| 2.1. Gentherapie mit viralen Vektoren | 2 |
| 2.2. Vektoren für eine lebergerichtete Gentherapie | 4 |
| 2.3. Interaktion der HBV mit dem Wirt | 5 |
| 2.4. Partikel Aufbau von HBV | 6 |
| 2.5. Genomorganisation von HBV | 6 |
| 2.6. Replikation von HBV | 8 |
| 2.7. HBV als Vektor | 9 |
| 2.8. Fragestellung der vorliegenden Arbeit | 12 |
| 3. Ergebnisse | 13 |
| 3.1. Etablierung primärer humaner Hepatozyten (PHH)-Kulturen | 13 |
| 3.1.1. Anwachverhalten in Abhängigkeit von der Ausplattierungsdichte | 13 |
| 3.1.2. Einfluss von Polyethylenglycol (PEG) auf die Infektion von PHH | 14 |
| 3.1.3. Abhängigkeit der Anzahl infizierter Zellen von der Viruskonzentration während der Infektion | 15 |
| 3.1.4. Dauer und Höhe der Genexpression in infizierten PHH | 16 |
| 3.1.5. Infektion PHH zu späten Zeitpunkten | 17 |
| 3.1.6. Genexpression der HBV-Vektoren mit GFP oder GFP-NLS als Transgen | 18 |
| 3.2. Weiterentwicklung der HBV-Vektor-Produktion | 20 |
| 3.2.1. Einfluss der Transfektionsmethode und des Kulturmediums | 21 |
| 3.2.2. Einfluss des Klärens auf die Virusqualität | 23 |
| 3.2.3. Vergleich der Anreicherungsverfahren | 24 |
| 3.2.4. Optimierung der Anreicherung mittels Ultrazentrifugation | 26 |
| 3.3. Produktion leberspezifischer Vektoren mit Interferon als Transgen | 27 |
| 3.3.1. rHBV mit Interferonen als Transgen | 27 |
| 3.3.2. Herstellung rekombinanter Adenoviren | 31 |

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|---|-----------|
| 3.4. HBV-Vektoren, die den Nachweis eines Gentransfers erleichtern | 33 |
| 3.4.1. rHBV mit dsRed 2 als Transgen | 33 |
| 3.4.2. rHBV mit Renilla-Luziferase als Transgen | 34 |
| 3.4.3. rHBV mit TTR-Promoter anstelle des preS2-Promoters | 35 |
| 3.5. Vergrößerung der Transgen-Kapazität | 39 |
| 3.5.1. Produktion von rHBV mit einer Genomüberlänge | 39 |
| 3.5.2. Produktion von rHBV mit verschiedenen Genomdeletionen | 41 |
| 3.5.3. Kombination verschiedener Genomdeletionen | 45 |
| 3.5.4. Insertion großer Fremdgene in HBV-Vektoren mit verschiedenen Genomdeletionen | 47 |
| 3.6. Ausblick: Wechselwirkung von HBV-Replikation auf die Apoptose-Induktion in PHH | 52 |
| 4. Diskussion | 54 |
| 4.1. PHH als Infektionssystem | 54 |
| 4.2. Verbesserung des Infektionsnachweises | 57 |
| 4.3. Erhöhung der Transgenkapazität | 59 |
| 4.4. Produktion und Nachweis der Expression von Interferon exprimierenden Viren | 61 |
| 4.5. HBV induziert keine Apoptose in PHH | 63 |
| 4.6. Ausblick: Gentherapie von HCV mit HBV-Vektoren | 64 |
| 5. Material und Methoden | 65 |
| 5.1. Molekularbiologische Methoden | 65 |
| 5.1.1. Kompetente Zellen | 65 |
| 5.1.2. Transformation kompetenter Zellen | 66 |
| 5.1.3. Plasmidpräparation | 66 |
| 5.1.3.1. "Rapid boiling"-Methode | 66 |
| 5.1.3.2. Minisäulchen | 67 |
| 5.1.3.3. Maxi-Präparation | 68 |
| 5.1.4. DNA-Verdau, Duplexformation und Ligation | 68 |
| 5.1.5. Klonierung adenoviraler Expressionsplasmide | 69 |

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|--|------------|
| 5.1.6. Cäsiumchlorid (CsCl) - Dichtegradient | 70 |
| 5.1.7. DNA-Dotblot | 70 |
| 5.1.8. Proteinbestimmung | 71 |
| 5.1.9. Immunocapture und Southern Blot | 71 |
| 5.2. Zellbiologische Methoden | 72 |
| 5.2.1. Kulturmedien | 72 |
| 5.2.2. Transfektion von Zellen | 72 |
| 5.2.3. Einfrieren / Auftauen von Zellen | 73 |
| 5.2.4. Detektion der GFP-Fluoreszenz | 73 |
| 5.2.5. Detektion der Luciferase-Expression | 73 |
| 5.2.6. HBs-Ag und HBe-Ag Bestimmung | 74 |
| 5.2.7. Virenproduktion | 74 |
| 5.2.7.1. Produktion rekombinanter HBV | 74 |
| 5.2.7.2. Produktion rekombinanter Adenoviren | 75 |
| 5.2.8. Virenpräparation | 75 |
| 5.2.9. Primäre humane Hepatozyten | 77 |
| 5.2.9.1. Medien und Zusätze | 77 |
| 5.2.9.2. Präparation primärer humaner Leberzellkulturen | 78 |
| 5.2.9.3. Infektion von primären humanen Hepatozyten mit rHBV | 80 |
| 5.2.9.4. Infektion von primären humanen Hepatozyten mit Adenoviren | 81 |
| 5.3. Plasmidkonstrukte | 82 |
| 5.3.1. Ausgangsplasmide und benutzte Plasmide | 83 |
| 5.3.2. Eigene Plasmidkonstrukte | 84 |
| 5.4. Primer | 96 |
| | |
| 6. Abkürzungen und Einheiten | 98 |
| 6.1. Abkürzungen | 98 |
| 6.2. Einheiten | 99 |
| | |
| 7. Literaturverzeichnis | 100 |
| | |
| 8. Publikationen, Vorträge, Poster | 109 |

1. Zusammenfassung

Hepatitis B Virus (HBV) - Vektoren sind vielversprechende Kandidaten für einen lebergerichteten Gentransfer, da sie bevorzugt Hepatozyten infizieren und ihre Genexpression hepatozytenspezifisch ist. Es war bekannt, dass infektiöse HBV produziert werden konnten, in denen das kleine Hüllprotein (S) durch das grün fluoreszierende Protein (GFP) ersetzt wurde. Nach Infektion primärer humaner Hepatozyten (PHH) mit diesen Viren zeigten einzelne Zellen eine grüne Fluoreszenz.

Der Einsatz von HBV-Vektoren ist einerseits als Werkzeug in der Molekularbiologie und andererseits in der Therapie von Lebererkrankungen denkbar. In der vorliegenden Arbeit sollte der Nachweis eines Gentransfers verbessert sowie die Transgenkapazität exakt bestimmt und vergrößert werden. Im Hinblick auf eine mögliche Therapie von chronischer Hepatitis B oder C sollte ein lebergerichteter Interferontransfer etabliert werden.

Der Gentransfer in Hepatozyten durch Infektion konnte erst reproduzierbar untersucht werden, als PHH als Testsystem für die Vektoren etabliert waren und die Virusausbeute durch die Verwendung von Lipofektion sowie serumfreiem Medium bei der Virusproduktion 10fach erhöht wurde. Durch das Ersetzen des preS2/S-Promoters durch den Transthyretin-Promoter konnte eine Infektion von lebenden PHH zu einem früheren Zeitpunkt nachgewiesen werden, ohne die Leberspezifität des Promotors zu verlieren. Mit Renilla-Luziferase als Transgen gelang es, den Nachweis einer Infektion zu vereinfachen und quantifizierbare Ergebnisse zu erhalten. Diese Viren ermöglichten es, die Transgenkapazität und die Genexpression der HBV-Vektoren genauer zu untersuchen. Da die HBV-Vektoren eine über 400 bp hinausgehende Überlänge des Genoms nicht tolerierten, konnte die Transgenkapazität von ca. 800 bp nur durch Einführung weiterer Deletionen im viralen Genom vergrößert werden. Eine andere genomische Deletion erhöhte die Genexpression 5fach. Für einen lebergerichteten Interferontransfer wurden sowohl adenovirale Vektoren als auch HBV-Vektoren benutzt. Mit beiden Systemen gelang es, Viren zu produzieren, und mit beiden Vektoren war es auch möglich, Interferon-Expression in infizierten PHH nachzuweisen.

Durch diese Verbesserungen stellen die HBV-Vektoren ein Werkzeug zur mikroskopischen Identifikation infizierter, lebender PHH in Zellkultur da. Mit den Luziferase exprimierenden Viren ist es möglich, die Infektion einer gesamten Kulturschale zu quantifizieren und den Einfluss von Änderungen im viralen Genom auf Infektiosität, Transkription und Genexpression zu untersuchen. Interferon exprimierende HBV-Vektoren werden aktuell im Schimpansen Modell der chronischen Hepatitis C getestet.

2. Einleitung

2.1. Gentherapie mit viralen Vektoren

Gentherapie ist ein neues Konzept zur Behandlung menschlicher Erkrankungen. Es basiert auf dem Transfer von genetischem Material in Zellen des Patienten. In den Zellen wird das genetische Material exprimiert und hat einen therapeutischen Effekt zur Folge. Diese Technik hat das Potential, sowohl genetische Erkrankungen als auch erworbene Krankheiten, wie z.B. Krebs und Infektionserkrankungen, zu behandeln. Dabei bleiben der Transport genetischer Information in die Zielzellen und die Expression der Gene die kritischen Schritte in der Gentherapie.

Viren haben keinen eigenen Stoffwechsel und nutzen für ihre Vermehrung die lebenden Zellen eines Wirtes. Dort wird die genetische Information repliziert und die virale Proteine werden translatiert. Aus den produzierten Proteinen und der replizierten Nukleinsäuren bilden sich Nachkommen-Viren, die aus der Zelle freigesetzt werden. Aufgrund dieses Lebenszyklus sind Viren auf einen Transfer ihrer genetischen Information in die Zielzelle spezialisiert. Deswegen ist es naheliegend, Viren für den Transfer genetischer Information in die Zellen einzusetzen.

Obwohl die Anforderungen an die Genfähren sehr unterschiedlich sind, gibt es Eigenschaften, die alle Vektorsysteme haben sollten. Rekombinanten Viren sollten leicht und in hohen Konzentrationen produzierbar sein. Sie sollten das Transgen langfristig und ohne Schwankungen in den infizierten Zellen exprimieren. Eine Reaktion des Immunsystems des Patienten auf die Vektoren sollte vermieden werden. Für viele Anwendungen ist es wichtig, dass nur bestimmte Zielzellen infiziert werden. Wenn die Zielzellen eine niedrige Teilungsfrequenz haben, sollten die Viren auch ruhende Zellen infizieren können. Zuletzt sollte im Genom des Virus genügend Platz für das Transgen sein (Walther, 2000).

Vier verschiedene virale Vektoren sind besonders weit verbreitet: Adenovirale Vektoren, Adenoassoziierte-Viren-Vektoren, retrovirale Vektoren und lentivirale Vektoren. Lentiviren sind eine Untergruppe der Retroviren. In dieser Arbeit werden sie aber aufgrund ihrer Fähigkeit, ruhende Zellen zu infizieren, getrennt besprochen. Auch Herpesviren und Vakziniaviren wurden erfolgreich als Vektoren eingesetzt. Die verschiedenen Vektoren zeichnen sich durch unterschiedliche Vor- und Nachteile aus:

Adenovirale-Vektoren sind in Mengen bis zu 10^{10} pfu/ml produzierbar, können Transgene von 7-8 kb tragen und ruhende sowie teilende Zellen infizieren (Ballay, 1985; Karlsson, 1985). Nachteile sind eine unregelmäßige Expression des Transgens und eine starke

Immunreaktion auf die viralen Partikel. Sie integrieren nicht in das Genom, was ihre Anwendung auf Fälle beschränkt, bei denen nur ein vorübergehender Effekt erwünscht ist.

Adenoassoziierte-Viren-Vektoren können ruhende und teilende Zellen infizieren, können in das Genom integrieren und haben eine gleichmäßige Expression des Transgens. Sie induzieren keine starke Immunantwort und sind nicht pathogen. Nachteile sind niedrige Virustiter bei der Produktion und die geringe Transgenkapazität von 4 kb. Die Herstellung von Adenoassoziierten-Viren war aufgrund der bei der Produktion anwesenden Adenoviren oder Herpesviren schwierig. Besser geeignet sind Systeme, die ohne Wildtyp-Viren während der Produktion auskommen (Matsushita, 1998).

Retrovirale-Vektoren sind in Titern von 10^6 - 10^7 pfu/ml zu produzieren und exprimieren konstant das Transgens, da sie in das Genom integriert werden. Es wird keine starke Immunreaktion induziert und die Transgenkapazität beträgt 7-8 kb (Guild, 1988). Die Nachteile liegen in der Schwierigkeit, ruhende Zellen zu infizieren und den Transfer zielzellspezifisch zu gestalten. Eine zusätzliche Gefahr geht von der zufälligen Integration in das Genom des Wirtes aus, wodurch es unter Umständen zu einer Aktivierung von Genen oder zur Insertionsmutagenese kommen kann.

Lentivirale-Vektoren können ruhende wie auch teilende Zellen infizieren und haben eine Transgenkapazität von 10 kb. Die Genexpression ist nach Integration in das Wirtsgenom stabil (Naldini, 1998; Naldini, 1996; Walther, 2000). Eine Gefahr geht auch bei diesen Viren von der zufälligen Integration in das Genom und der damit verbundenen Möglichkeit der Dysregulation der zellulären Genexpression aus.

Herpesvirus-Vektoren zeichnen sich durch ein großes Spektrum infizierbarer Zellen und eine hohe Transgenkapazität von bis zu 50 kb aus. Die Partikel sind stabil, wodurch die Viren bis auf 10^{12} pfu/ml angereichert werden können. Die Nachteile sind eine mögliche Toxizität der Viren und das Risiko der Rekombination. Da die Viren nicht in das Genom integrieren, ist die Genexpression transient (Krisky, 1997).

Pockenvirus-Vektoren können große Transgene exprimieren und zeigen eine hohe Transgenexpression. Sie eignen sich besonders für replikationskompetente Impfstoffe, bei denen die Viren sich in der geimpften Person lokal vermehren. Das hat eine starke Reaktion des Immunsystems zur Folge. Es besteht das Risiko von cytopathischen Effekten durch das Virus (Paoletti, 1996).

Aufgrund der verschiedenen Anforderungen, die je nach gewünschter Therapie unterschiedlich sind, kann es kein optimales Vektorsystem für alle Anwendungen geben. So sind retrovirale Vektoren zum Beispiel eine geeignete Genfährer für eine Krebstherapie. Da sie

nur sich teilende Zellen infizieren können, würden sie bevorzugt schnellteilende Krebszellen erreichen. Retrovirale Vektoren sind aber eher ungeeignet für einen Gentransfer in die Leber. Aufgrund der niedrigen Teilungsrate der Leberzellen infizieren sie nur wenige Zellen.

2.2. Vektoren für eine lebergerichtete Gentherapie

Die Leber spielt eine wichtige Rolle bei der Entgiftung toxischer Stoffe. Sie reguliert den Kohlenhydrat-Spiegel im Blut, synthetisiert wichtige Stoffe wie Fette und Bluteiweiße und bildet die Galle. Aufgrund der vielfältigen Aufgaben gibt es eine große Anzahl angeborener, metabolischer Erkrankungen, die schwerwiegende Folgen für den Patienten haben und sich bislang nur unzureichend behandeln lassen. Die Leber ist aber auch der Ort der Replikation vieler Krankheitserreger, wie zum Beispiel von Hepatitis B und C Viren. Deshalb ist die Leber ein wichtiges Zielorgan einer Gentherapie.

Die Leber besteht zum Großteil aus ruhenden Hepatozyten und ist deshalb nur mit wenigen Vektorsystemen effektiv infizierbar. Adenovirale Vektoren infizieren nach intravenöser Injektion bevorzugt und sehr effizient Hepatozyten. Deshalb stellen sie zur Zeit das System der ersten Wahl dar. Allerdings weisen sie eine erhebliche Toxizität auf. Adenovirale Vektoren sind in der Lage, komplette HBV-Genome in Hepatozytenkulturen von Mäusen, Ratten, Tupaias und Menschen zu transferieren. Die mit dem Vektor infizierten Zellen sekretieren Hepatitis B Viren (HBV) in das Kulturmedium. Wurden adenovirale Vektoren in die Schwanzvene von Mäusen injiziert, konnte Enten-HBV im Serum der Tiere nachgewiesen werden (Sprinzl, 2001). Mit Adenoassoziierten-Viren-Vektoren gelang es, den humanen Faktor IX in den Lebern von Mäusen zu produzieren. Die erreichten Konzentrationen wären für einen therapeutischen Effekt ausreichend (Nakai, 1998). Da beide Vektoren nicht gerichtet die Leber infizieren, wird ein Teil dieser Vektoren auch andere Zellen im Körper infizieren, wo es, durch die Expression des Transgens, zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen kann. Das Murinen-Leukämie-Virus zeigt keine Leberspezifität. Durch Pseudotypisierung mit Oberflächenproteinen von HBV konnte der Gentransfer leberspezifisch gestaltet werden und primäre humane Hepatozyten (PHH) konnten in Zellkultur infiziert werden (Sung, 2002). Die Effizienz des Transfers war jedoch sehr gering, da Retroviren eine Zellteilung benötigen, um ihre Infektion etablieren zu können; Leberzellen haben eine niedrige Teilungsrate. Eine Anwendung in vivo kommt deshalb nicht in Frage.

HBV infiziert ruhende Hepatozyten effektiv. Im Entenmodellsystem war ein Virusgenom ausreichend für eine Infektion (Jilbert, 1996) und die Genexpression ist leberspezifisch. HBV

ist nicht zytopathisch. Aus diesen Gründen bietet sich HBV als Kandidat für eine lebergerichtete Gentherapie an.

2.3. Interaktion der HBV mit dem Wirt

Weltweit sind 350 Millionen Menschen chronisch mit HBV infiziert (WHO, 1996). Das Virus wird sowohl durch Blut oder sexuelle Kontakte übertragen. Chronisch infizierte Mütter übertragen HBV bei der Geburt auf ihre Kinder. Eine akute Infektion im Erwachsenenalter verläuft in der Hälfte der Fälle ohne Symptome. In den anderen Fällen entwickelt sich eine akute Hepatitis mit unterschiedlich starker temporärer Schädigung der Leber. Weniger als 1 % der Infizierten entwickeln eine fulminante Hepatitis mit schlechter Prognose. Bei 5 - 10 % der akut infizierten Erwachsenen und 90 % der infizierten Neugeborenen entwickelt sich eine chronische Hepatitis B mit einem deutlich erhöhten Risiko für eine Leberzirrhose und ein hepatozelluläres Karzinom (Ganem, 1996).

Seit längerer Zeit gibt es einen wirksamen Impfstoff gegen HBV (McAlleer, 1984), dennoch ging bisher die Zahl der weltweit neu Infizierten nicht zurück. Chronisch Infizierte werden unter anderem mit Interferon- α (INF- α) behandelt, welches aber nur in 20 - 35 % der Fälle wirksam ist (Hoofnagle, 1997; Lammert, 2000). Daneben kommt auch der RT-Inhibitor 3TC (Lamivudin[®]) zum Einsatz (Lau, 2000).

Aufgrund spezifischer Promotoren und der Bindung an spezifische Rezeptoren zeigt HBV eine hohe Organ- und Wirtsspezifität. So kann das HBV nur Menschen und höhere Primaten infizieren, und die Replikation der Viren ist auf die Leber beschränkt. Da erst kürzlich eine infizierbare Zelllinie verfügbar wurde (Gripon, 2002), ist für Infektionsexperimente bisher auf PHH zurückgegriffen worden. Dies ist ein Nachteil, da diese Zellen nur selten und in sehr unterschiedlicher Qualität verfügbar sind. Aus diesem Grund werden viele Experimente mit verwandten Viren durchgeführt, die unter anderem in Waldmurmeltieren (woodchuck hepatitis virus, WHV, Summers, 1978), Erdhörnchen (ground squirrel hepatitis Virus, GSHV, Marion, 1980), Reiher (heron hepatitis B virus, HHBV, Sprengel, 1988), Gänsen (snow goose hepatitis B virus, SGHBV, Chang, 1999) und Enten (duck hepatitis B virus, DHBV, Mason, 1980) vorkommen.

2.4. Partikelbau von HBV

HBV gehört zur Gruppe kleiner, membranumhüllter DNA - Viren mit ausgeprägtem Lebertropismus, den Hepadnaviren. Die Replikation der Hepadnaviren erfolgt über ein RNA-Intermediat, aus dem noch im Zytoplasma der Wirtszelle durch reverse Transkription das DNA - Genom gebildet wird. Aus diesem Grund werden sie zu den Pararetroviren gezählt.

Die Virionen bestehen aus einer äußeren Lipid-Doppelschicht, die von der Wirtszelle stammt und in die virale Oberflächenproteine eingelagert sind. Bei HBV sind das drei Proteine: das große L - (large) Protein, das mittlere M - (middle) Protein und das kleine S - (small) Protein. Diese Proteine werden von einem ORF transkribiert. Die Länge der Proteine unterscheidet sich nur durch verschiedene Startstellen, das Carboxy-terminale Ende ist identisch (Abb. 2.1, innerer Kreis). Auf der Hülle der 42 - 47 nm großen Virionen ist das L-Protein angereichert. Zusätzlich bilden die Zellen subvirale Partikel, auf denen fast nur S-Protein zu finden ist. Subvirale Partikel können sphärischer oder filamentöser Gestalt von 20 nm Breite und variabler Länge sein. Sie enthalten keine Kapside oder DNA. In der Hülle der Virionen befindet sich das Kapsid, dessen einziges Strukturprotein das Core-Protein ist. In dem Kapsid ist die partiell doppelsträngige DNA mit der kovalent gebundenen viralen Polymerase (reverse Transkriptase) enthalten. Im Serum infizierter Menschen findet man durchschnittlich 10^9 Virionen, 10^{10} filamentöse und 10^{13} sphärische Partikel pro Milliliter (Heermann, 1991). Die Funktion der subviralen Partikel ist bis heute unklar, es wird aber davon ausgegangen, dass neutralisierende Antikörper von ihnen abgefangen werden.

2.5. Genomorganisation von HBV

Das Genom besteht aus einem zirkulären, partiell doppelsträngigen DNA - Molekül von 3,2 kb Größe. Die virale Polymerase ist über ihr terminales Protein kovalent an das 5' Ende des DNA - Stranges gebunden, welcher relativ zur ursprünglichen genomischen RNA Negativorientierung hat. Das terminale Protein dient bei der reversen Transkription als Primer (Bartenschlager, 1988). Zur Synthese des kürzeren DNA - Strangs (in Positivorientierung, relativ zur genomischen RNA) dient ein dort verbleibender RNA-Rest als Primer (Lien, 1986). Der Plusstrang variiert am 3' Ende in der Länge, wodurch ein Teil des Genoms einzelsträngig bleibt.

Insgesamt hat HBV vier Promotoren: den Core-, preS1-, preS2/S- und X-Promoter. Auf diese Promotoren wirken zwei Enhancer-Elemente ein, Enh I und Enh II (Abb. 2.1, als Box auf dem mittleren Kreis dargestellt). Enhancer I erhöht die Transkription aller vier Promotoren, während Enhancer II in erster Linie die Transkription des Promotors preS2/S erhöht.

HBV hat 4 offene Leseraster (ORF), die ganz oder teilweise überlappen und auf diese Weise die geringe Genomgröße der Viren ermöglichen (Abb. 2.1, innere Kreise). Die Proteine werden von verschiedenen mRNAs translatiert (Abb. 2.1, äußere Kreise). Die Transkription aller mRNAs wird am gleichen Polyadenylierungssignal beendet (Cattaneo, 1984), startet aber von unterschiedlichen Transkriptionsinitiationsstellen (Abb. 2.1, durch Dreiecke dargestellt). Von dem Überlängenprodukt wird das Core-Protein und durch einen internen Translationsstart das Polymerase-Protein gebildet. Die Hüllproteine L, M und S werden von mRNAs translatiert, die von 2 internen Promotoren induziert werden. Die mRNA, von der das X-Protein translatiert, wird von einem weiteren internen Promotor induziert. X-Protein ist essentiell für die Replikation in Tieren, doch in Zellkultur ist es nicht für die Bildung viraler Partikel notwendig. Die genaue Funktion des X-Proteins ist noch immer unklar. In Zellkultur wirkt es als Transaktivator und es wird vermutet, dass es bei der Tumorentstehung eine Rolle spielt (Seeger, 2000).

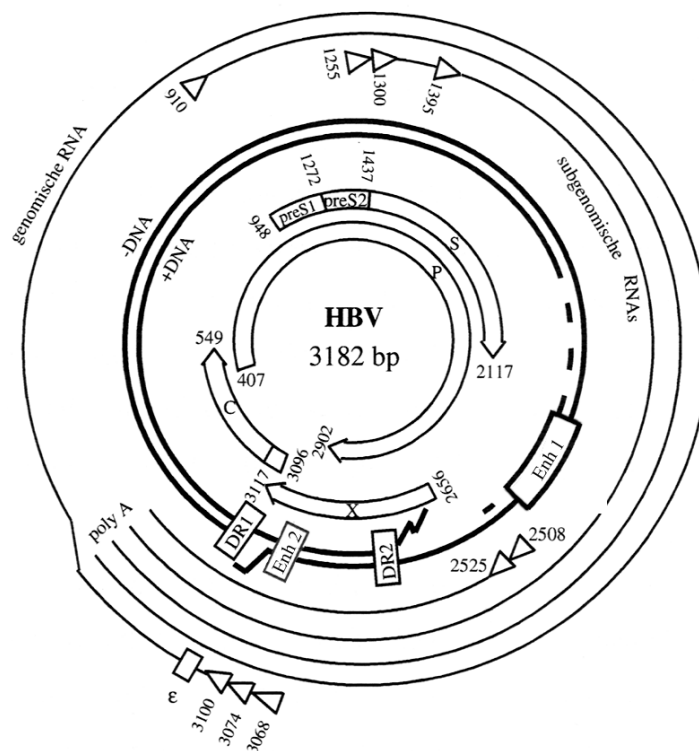


Abb. 2.1: Genomkarte von HBV und DHBV. Die äußeren Kreise stellen die genomischen und subgenomischen RNAs dar, die aufsitzenden Dreiecke die jeweiligen Startstellen der Transkription. Die Kreise in der Mitte symbolisieren das partiell doppelsträngige Genom der Viren, die inneren Kreise die ORF, von denen die viralen Proteine produziert werden.

2.6. Replikation von HBV

Um einen Hepatozyten infizieren zu können, muss ein Virion in das Zytoplasma der Zelle gelangen. Es wird angenommen, dass es mit den viralen Oberflächenproteinen an einen oder mehrere, noch unbekannte Rezeptor-Proteine bindet. Danach müssen die virale- und die Wirtsmembran fusionieren und das Kapsid in das Zytoplasma freisetzen (Abb.2.2). Es ist unklar, ob die Nukleokapside in den Nukleus transportiert werden und dort entpackt werden oder ob sie an der nukleären Membran dissoziieren und das Genom freisetzen, welches in den Nukleus transportiert wird (Ganem, 1996). Das partiell doppelsträngige DNA-Genom wird im Nukleus vervollständigt und liegt anschließend in kovalent geschlossener, zirkulärer Form (covalently closed circular; cccDNA) vor. Die zelluläre Polymerase II transkribiert von der cccDNA die genomischen und subgenomischen RNAs (Köck, 1993). Diese werden ungespleißt ins Zytoplasma transportiert, wo die viralen Proteine translatiert werden. Das Verpackungssignal ϵ am 5' Ende der genomischen RNA wird von der viralen Polymerase erkannt. Nach Bindung der Polymerase beginnt die Enkapsidierung des RNA-Polymerasekomplexes durch Anlagern von Core-Dimeren (Junker-Niepmann, 1990; Beck, 1997) (Abb.2.2). Noch in der Wirtszelle schreibt die Polymerase durch ihre reversen Transkriptaseaktivität die RNA in DNA um. Ein kritischer Schritt der reversen Transkription ist die Translokation des RNA-Primers von dem 5' DR 1 zum 3' DR 2. Unterbleibt die Translokation, so werden nicht-infektiöse, lineare Genome anstelle von infektiösen, kreisförmig geschlossenen Genomen gebildet. Für die Translokation ist neben DR 1 und DR 2 ein zentral im Genom liegendes Element (RC) wichtig (Chiang, 1992; siehe Abb. 2.1). Die neu entstandenen Nukleokapside können in den Kern reimportiert werden und dort die Kopienzahl der cccDNA erhöhen. Alternativ können sie in das Lumen des endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie des Golgi-Apparats knospen (Patzner, 1986; Huovila, 1992) und werden vermutlich über sekretorische Wege aus der Zelle freigesetzt (Abb.2.2).

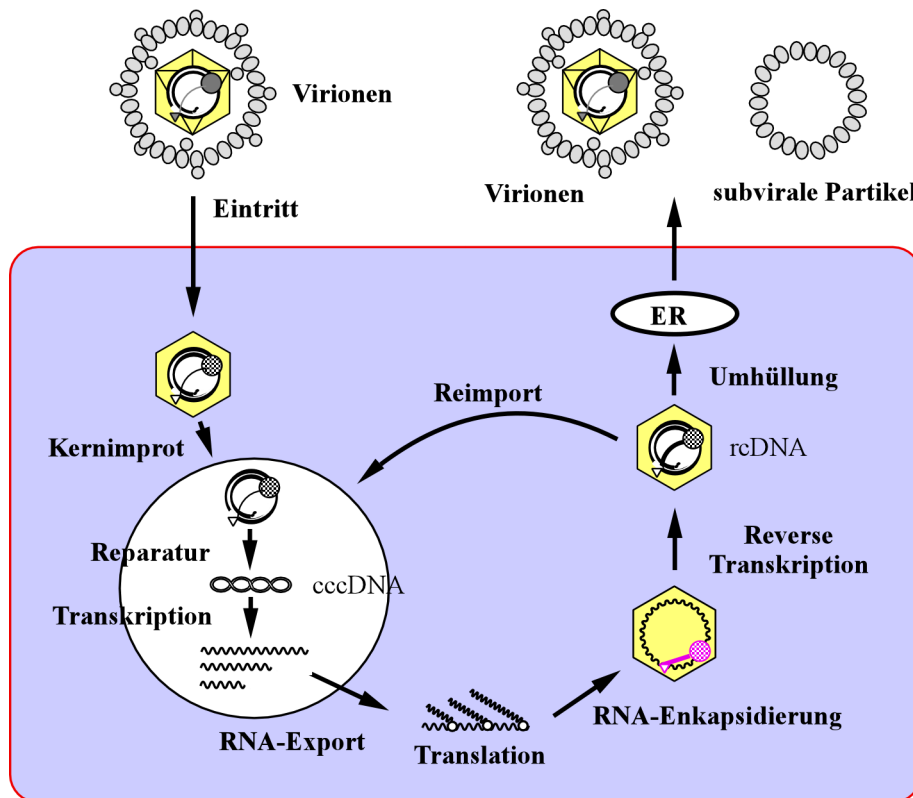


Abb. 2.2: Replikation der HBV. Die viralen Kapside werden nach der Fusion mit der Membran zum Kern transportiert. Die cccDNA wird im Kern transkribiert und die RNA ungespleißt exportiert. Von den mRNAs werden die Proteine translatiert, mit denen die genomische RNA in Kapside verpackt wird. Die Kapside knospen in das endoplasmatische Retikulum (ER) oder erhöhen den cccDNA-Pool im Kern. Nach der Knospung in das ER werden die Virionen sekretiert.

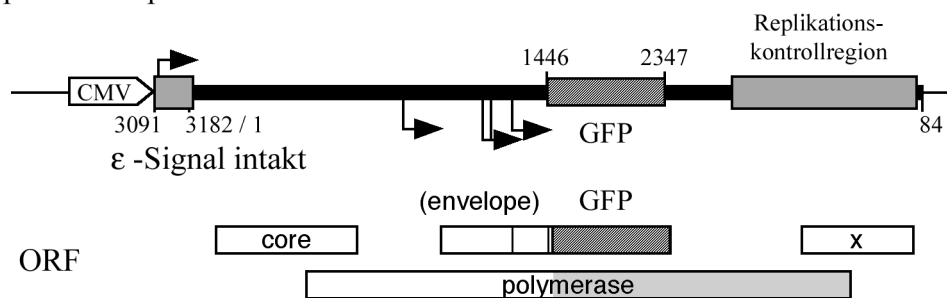
2.7. HBV als Vektor

Hepatitis B Viren eignen sich als Vektoren, da sie in der Lage sind, ruhende Hepatozyten zu infizieren. Dies ist aufgrund der niedrigen Teilungsaktivität der Hepatozyten wichtig. Weitere Vorteile sind die hohe Leberspezifität der Hepadnaviren sowie die Möglichkeit, rekombinante Viren in hohen Konzentrationen zu produzieren. Sie integrieren nur in seltenen Fällen in die genomische DNA. Ein Nachteil ist jedoch die Größenrestriktion des Genoms, da die reverse Transkription ab Genomlängen von über 110 % ineffizient wird. Ca. 25 % des Genoms bestehen aus cis-aktiven Elementen, die nicht ausgetauscht werden können.

HBV-Vektoren werden durch Kotransfektion eines Transfer- und eines Helferplasmid in Hepatomazelllinien produziert. Im Transferplasmid wurde das Gen für das S-Protein durch ein GFP-Gen ersetzt. Dabei wurden das Startkodon und die ersten beiden Aminosäuren des S-Proteins erhalten (Abb. 2.3). Durch diese Veränderung wurden die offenen Leserahmen für

das L-, M- und S-Protein sowie der für die Polymerase zerstört (in Abb. 2.3 durch grauen Balken dargestellt). Diese Proteine sind aber zur Produktion von infektiösen Partikeln essentiell und müssen von einem Helferplasmid in trans zur Verfügung gestellt werden (Protzer, 1999). Um eine Verpackung der vom Helferplasmid transkribierten prägenomischen RNA zu verhindern, wurde das Verpackungssignal ϵ am 5' Ende deletiert (Junker-Niepmann, 1990). Das hatte keinen Einfluss auf die Produktion viraler Proteine.

Transferplasmid - pCH GFP



Helferplasmid - pCH 3142

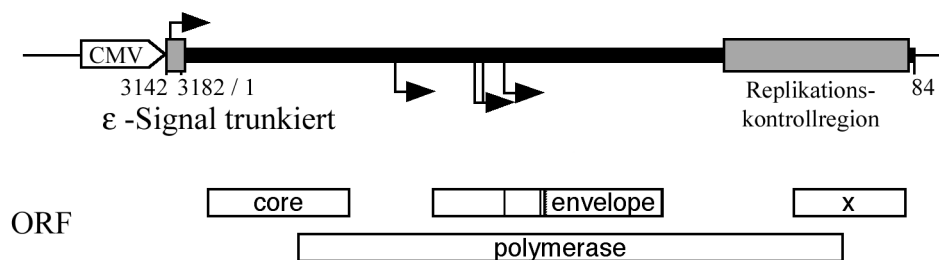


Abb. 2.3: Das Transferplasmid hat das GFP-Gen anstelle des S-Genes inseriert. Es ist nicht mehr in der Lage, die viralen Proteine L, M, S und Polymerase zu bilden. Das Helferplasmid ist in der Lage alle HBV-Proteine zu produzieren und stellt sie in trans zur Verfügung. Die mRNA des Helfers kann aufgrund des trunzierten ϵ -Signals nicht verpackt werden.

Nach Transfektion des Transfer- und des Helferplasmides in HuH 7-Zellen, werden von beiden Plasmiden RNAs transkribiert (Abb. 2.4, gewellte Linien). Die vom Helferplasmid transkribierte mRNA (Abb. 2.4, blau dargestellt) produzieren alle viralen Proteine, können aber durch die Deletion des Verpackungssignals nicht in Kapside verpackt werden. Das Transferplasmid transkribiert die prägenomische RNA (Abb. 2.4, grün dargestellt), die die Polymerase bindet und in ein Kapsid verpackt wird. Dieses wird von einer Membran umhüllt und sekretiert.

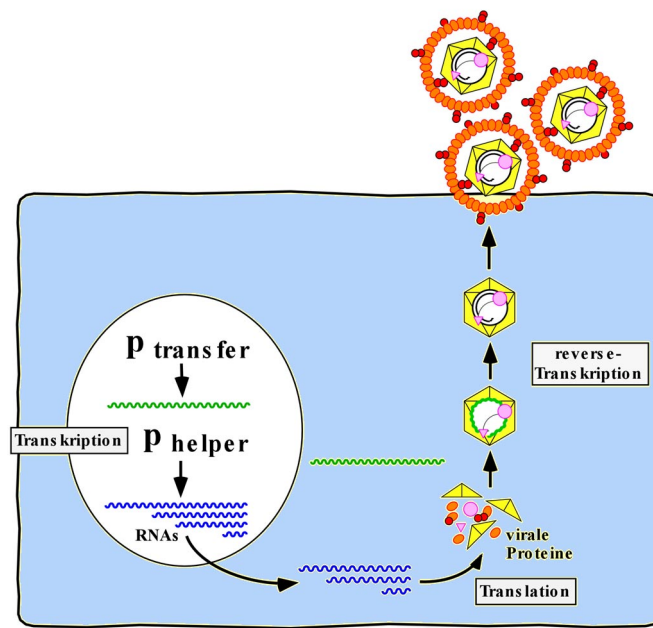


Abb. 2.4: Produktion der HBV-Vektoren. (b) Das Transferplasmid transkribiert eine pregenomische RNA (grün dargestellt), die mit den vom Helferplasmid (blau dargestellt) in trans zur Verfügung gestellten Proteinen virale Partikel aufbaut. Diese knospen in das ER und verlassen die Zelle.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit gelang es zu zeigen, dass in HBV-Vektoren alle viralen Gene ausgeschaltet werden können. Weder die Titer der Vektoren bei der Produktion noch die Infektiosität wurden reduziert (Untergasser, 2001). Außerdem konnte der preS 2 - Promotor gegen einen CMV-Promotor ausgetauscht werden. Diese Vektoren führten nach Infektion zu einer starken GFP-Fluoreszenz. Damit war es möglich, infizierte Zellen zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt zu identifizieren. Um Wechselwirkungen mit dem Immunsystem bei einer späteren Anwendung im Tiermodell zu vermeiden, wurden in der vorliegenden Arbeit nur Transferplasmide verwendet, bei denen alle viralen ORF durch eingeführte Stop-Kodons ausgeschaltet waren.

2.8. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der Arbeit war es, HBV-Vektoren weiterzuentwickeln, einerseits für einen Einsatz in der Gentherapie und andererseits als Werkzeug, um die frühen Schritte einer HBV-Infektion in Zellkultur untersuchen zu können.

Da HBV-Vektoren nur durch Infektion von primären humanen Hepatozyten (PHH) auf ihre Funktionalität getestet werden können, sollten zunächst die Kulturbedingungen im Hinblick auf die Infektion mit HBV optimiert werden. Wenn eine reproduzierbare HBV-Infektion in PHH möglich ist, sollten diese Zellen auch für Untersuchung der Virus-Zell-Interaktionen benutzt werden.

Die Infektion von PHH mit rekombinanten Viren wurde bisher durch die Expression von GFP im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. PHH haben ein hohes Hintergrundsignal, was den Nachweis GFP-positiver Zellen erschwert. In der vorliegenden Arbeit sollte das Nachweisverfahren verbessert werden. Einerseits sollte durch Verwendung verschiedener Promotoren, unter denen das Transgen exprimiert wird, die Genexpression erhöht werden, ohne die Leberspezifität der Genexpression zu verlieren. Andererseits sollte mit anderen Transgenen, versucht werden, einen einfacheren und quantifizierbaren Nachweis der Infektion zu etablieren.

In den bisher verwendeten Transferplasmiden waren ca. 800 bp große Transgene enthalten, aber die genaue Transgenkapazität der HBV-Vektoren war unbekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte die Transgenkapazität der HBV-Vektoren bestimmt werden. Da viele Transgene größer als 800 bp sind, sollte zudem versucht werden, die Kapazität der HBV-Vektoren zu erhöhen.

HBV-Vektoren wären aufgrund ihrer Leberspezifität für einen therapeutischen Einsatz bei chronische Hepatitis B oder C geeignet. Zu diesem Zweck sollten humane Interferone mittels HBV-Vektoren in der Leber exprimiert werden. Um die Mengen an Vektor produzieren zu können, die für eine Therapie benötigt werden, war es notwendig, die Produktionsbedingungen der Viren hinsichtlich der Ausbeute zu optimieren.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung primärer humaner Hepatozyten (PHH)-Kulturen

Hepatitis B Viren können nur Menschen und Schimpansen infizieren. Die Replikation der Viren ist auf Hepatozyten beschränkt. Da weder eine infizierbare Zelllinie noch ein Kleintiermodell verfügbar war, mussten PHH-Kulturen etabliert werden, um den Gentransfer der Hepatitis B Viren (HBV)-Vektoren in Zellkultur zu untersuchen. Die Effizienz des Gentransfers in PHH ist von den verwendeten Viruspräparationen, von der Qualität der PHH und den Kulturbedingungen während der Infektion abhängig. In diesem Abschnitt sollten die Kulturbedingungen verbessert und die Infektion charakterisiert werden, um die Effizienz des Gentransfers zu erhöhen.

3.1.1. Anwachsverhalten in Abhängigkeit von der Ausplattierungsdichte

Wurden PHH mit GFP exprimierenden HBV-Vektoren infiziert, so konnte GFP-Fluoreszenz nur in einzelnen Zellen beobachtet werden (Untergasser, 2001). Um einen Bereich zu finden, in dem möglichst viele Zellen anwachsen und einen dichten Rasen ausbilden, wurden PHH in verschiedenen Dichten ausgesät und am 3. Tag nach Ausplattierung im Lichtmikroskop untersucht (Abb. 3.1).

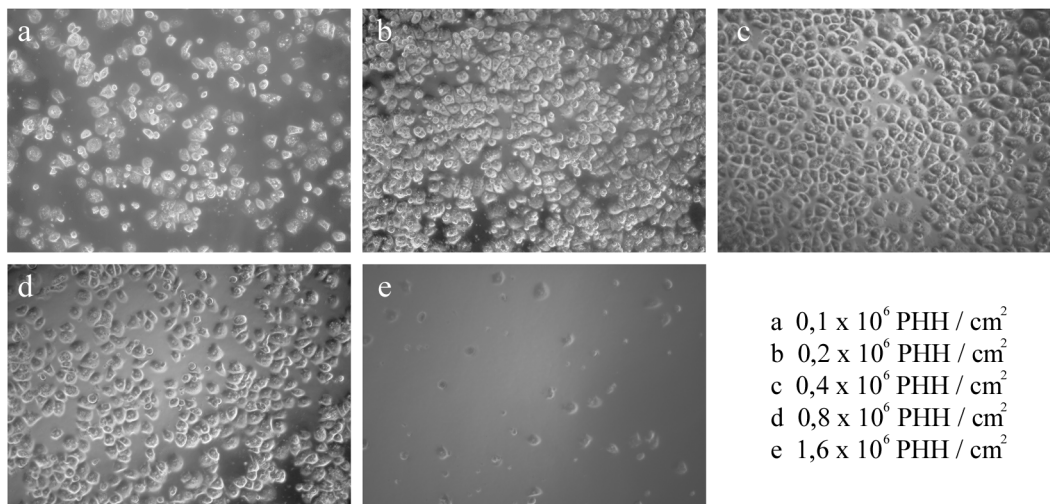


Abb. 3.1: Anwachsverhalten PHH in Abhängigkeit von der Ausplattierungsdichte. PHH wurden in unterschiedlicher Dichte ausgesät und am 3. Tag nach Ausplattierung im Phasenkontrast fotografiert, um einen Bereich zu finden, in dem sie möglichst dicht anwachsen.

Es wurde festgestellt, dass die Zelldichte bei Aussaat sehr kritisch ist. Konfluent wuchsen nur Kulturen, bei denen $0,4 \times 10^6$ PHH / cm^2 ausplattiert wurden (Abb. 3.1, Bild c). Höhere (Abb. 3.1, Bild b) oder niedrigere Konzentrationen (Abb. 3.1, Bild d) führten nicht zur Ausbildung eines dichten Zellrasens. PHH, die in Konzentrationen unter $0,2 \times 10^6$ PHH / cm^2 (Abb. 3.1, Bild a) und über $0,8 \times 10^6$ PHH / cm^2 (Abb. 3.1, Bild e) ausplattiert wurden, konnten nicht für Experimente verwendet werden. Um ein gutes Anwachsen der Zellen sicherzustellen, wurden alle folgenden Kulturen mit $0,4 \times 10^6$ PHH / cm^2 ausgesät.

3.1.2. Einfluss von Polyethylenglycol (PEG) auf die Infektion von PHH

Gripon konnte zeigen, dass die Anwesenheit von PEG die Infektion von PHH mit HBV erleichtert (Gripon, 1993).

Diese Ergebnisse sollten mit unsere PHH-Präparationen reproduziert werden. Dazu wurden drei Ansätze PHH mit 100 viralen Partikeln (VP) pro Zelle (multiplicity of infection, moi) infiziert. Der zweite Ansatz wurde in Gegenwart von 5% PEG, der dritte in Gegenwart von 5% PEG und neutralisierenden Antikörpern infiziert (anti HBs-Ag, Hepatect[®]). Nach 18 Stunden wurden die Zellen durch dreimaligen Mediumwechsel gewaschen und Viren, PEG und Antikörper abgespült. Jeden zweiten Tag wurde das Medium abgenommen und das von infizierten Zellen sekretierte HBs-Ag bestimmt (Abb. 3.2).

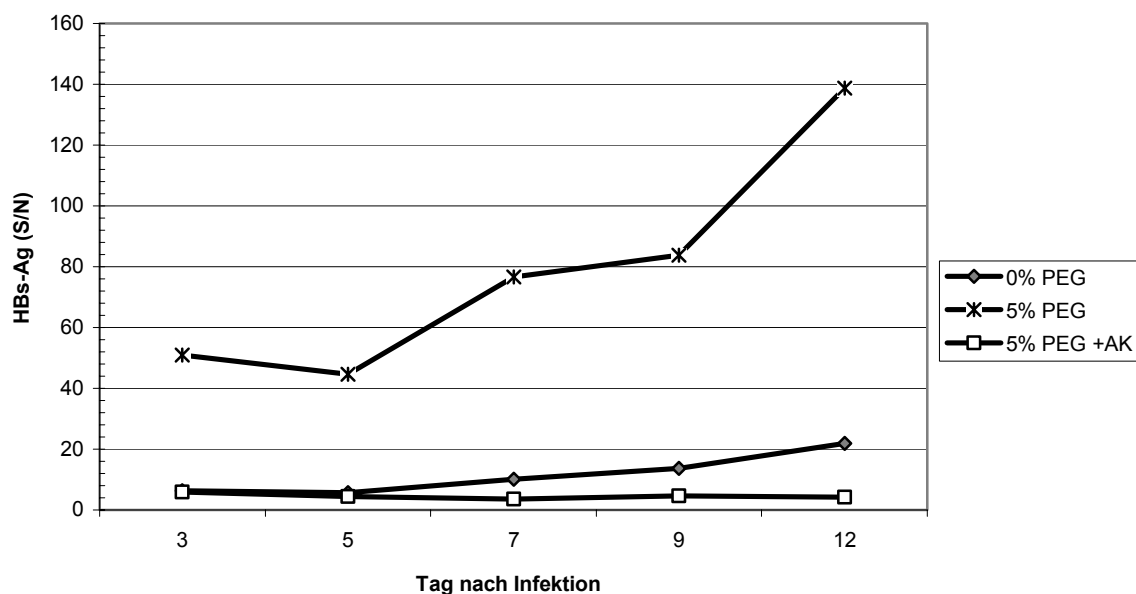


Abb. 3.2: PEG erhöht die Infizierbarkeit von PHH. PHH wurden am 2. Tag nach Aussaat mit Wildtyp-HBV in einer moi 100 VP/Zelle infiziert. Im zweiten Ansatz wurde 5% PEG zugegeben. Der dritte Ansatz wurde in Anwesenheit von 5% PEG und neutralisierenden Antikörpern infiziert. Jeden zweiten Tag nach Infektion wurde HBs-Ag im Überstand gemessen.

Da HBs-Ag sehr früh nach Infektion exprimiert wird, wurde es bereits ab der ersten Bestimmung detektiert. Der Anstieg ab dem 5. Tag könnte durch eine Ausbreitung des Virus in der Kultur bedingt sein. Die Infektion, die in Anwesenheit von 5% PEG durchgeführt wurde, produzierte 8-10fach mehr Antigen als der Kontrollansatz. Ein neutralisierender Antikörper blockierte die Infektion auch in Anwesenheit von 5% PEG so effizient, dass keine Produktion von Antigen nachgewiesen werden konnte. Daraus kann gefolgert werden, dass die Infektion durch PEG erleichtert wird, aber virusspezifisch blockierbar ist. Diese Ergebnisse sind durch Messung des HBe-Ag bestätigt worden (Daten nicht gezeigt). HBe-Ag wird erst in den PHH nach Infektion gebildet und eine Detektion der Viren sowie Wechselwirkungen des neutralisierenden Antikörpers mit dem HBe-Ag-Nachweis können ausgeschlossen werden. In allen Ansätzen wurde HBs-Ag detektiert, auch wenn neutralisierende Antikörper zugegeben wurden. 5% PEG wurde bei allen folgenden Infektionen verwendet.

3.1.3. Abhängigkeit der Anzahl infizierter Zellen von der Viruskonzentration während der Infektion

Es ist für spätere Versuche wichtig, zu wissen, in welchem Bereich die Anzahl der positiven Zellen oder die Antigenproduktion linear mit der Anzahl der eingesetzten Viren korreliert. In diesem Bereich, in dem noch nicht alle suszeptiblen Zellen infiziert sind, kann die Infektiosität der Viren quantifiziert werden. PHH wurden mit Wildtyp-HBV in verschiedenen *moi* infiziert und HBs-Ag sowie HBe-Ag im Überstand am 6. Tag gemessen (Abb. 3.3a). Um einen Infektionsnachweis auf Einzelzellebene durchzuführen zu können, wurde parallel mit einem GFP exprimierenden HBV-Vektor in verschiedenen *moi* infiziert (rHBV CMV-GFP 4⁻; Untergasser, 2001). Dieses Virus produziert nach Infektion GFP unter der Kontrolle eines CMV-Promotors, und infizierte Zellen zeigen im Fluoreszenzmikroskop grüne Fluoreszenz. Am 9. Tag nach Infektion wurden die GFP-positiven Zellen pro Sichtfeld ausgezählt. Zusätzlich wurde die Anzahl aller sichtbaren Hepatozyten ausgezählt. Um statistische Schwankungen zu vermeiden, wurden pro Ansatz zehn Sichtfelder ausgezählt (Abb. 3.3b).

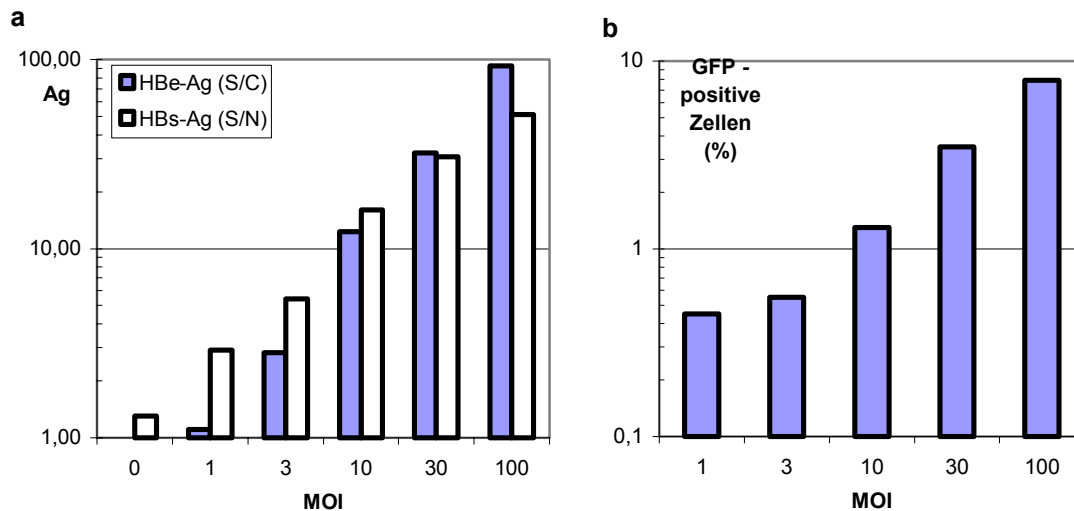


Abb. 3.3: Abhängigkeit der Anzahl infizierter Zellen von der Viruskonzentration während der Infektion. a) PHH infiziert mit unterschiedlichen moi Wildtyp-HBV. HBe-Ag und HBs-Ag wurden am 6. Tag im Überstand der Kultur gemessen. b) PHH infiziert mit unterschiedlichen moi eines GFP exprimierenden HBV-Vektors. GFP-positive Zellen wurden am 9. Tag mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

Eine Verdoppelung der HBV-Konzentration im Inokulum führte zu einer Verdoppelung der Antigenproduktion (Abb. 3.3a). Ebenso hatten Infektionen mit doppelten Mengen GFP exprimierender HBV-Vektoren doppelt so viele GFP exprimierenden PHH zur Folge (Abb. 3.3b). Diese Abhängigkeit blieb über den gesamten untersuchten Bereich bestehen. Das bedeutet, dass wir in unserem System nicht in der Lage waren, die Infektion zu sättigen.

3.1.4. Dauer und Höhe der Genexpression in infizierten PHH

Es sollte untersucht werden, wie lange PHH in Zellkultur überleben und wie konstant die Genexpression ist. Dies ist wichtig, da die Transgenexpression mancher HBV-Vektoren (rHBV-GFP) erst 8 bis 10 Tage nach Infektion nachgewiesen werden kann. Wildtyp-HBV haben den Vorteil, dass infizierte Zellen nach dem 2. Tag nach Infektion HBe-Ag in das Medium sekretieren. Das sekretierte HBe-Ag kann im Überstand quantifiziert werden. PHH wurden am 3. Tag nach Ausplattierung mit einer moi von 1, 10 und 100 VP/Zelle infiziert und die HBe-Ag Produktion jeden zweiten Tag gemessen. Da am 28. Tag nicht gemessen werden konnte, wurde dieser Wert am 27. Tag bestimmt (Abb. 3.4).

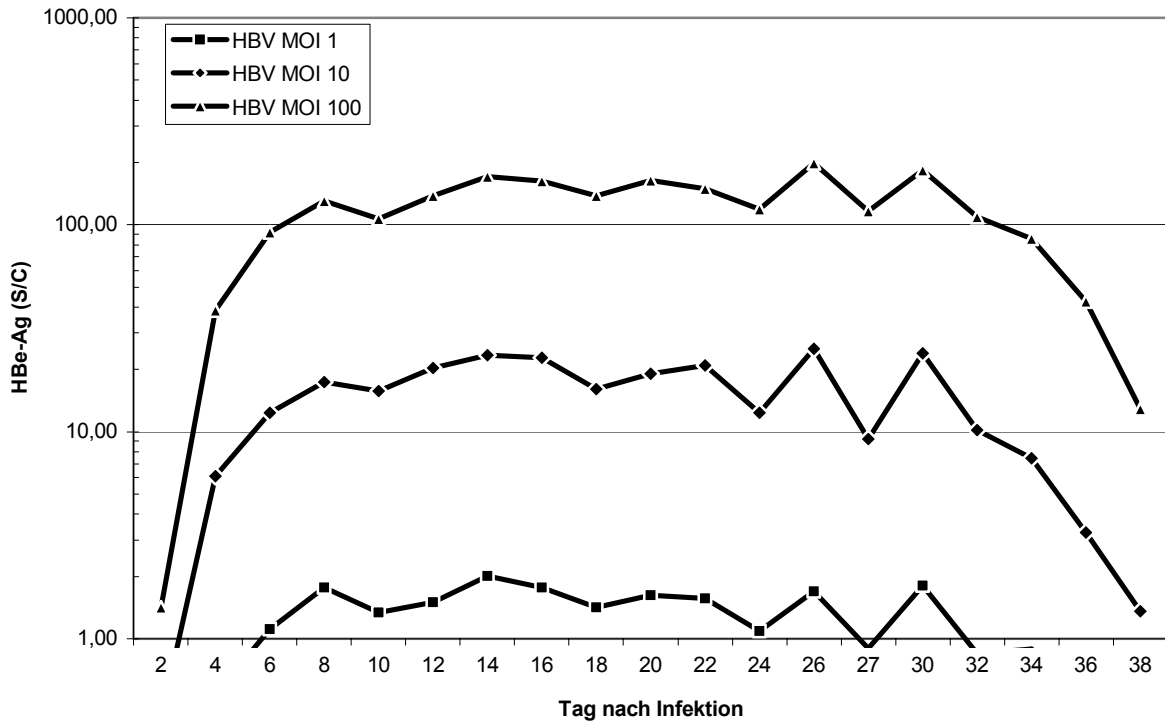


Abb. 3.4: Antigenexpression HBV infizierter PHH im Verlauf der Kulturdauer. PHH wurden mit Wildtyp-HBV in unterschiedlichen moi am 3. Tag nach Ausplattierung infiziert. HBe-Ag wurde jeden zweiten Tag im Überstand gemessen.

Die Ergebnisse zeigten, dass PHH über einen Zeitraum von über 30 Tagen in Zellkultur gehalten werden konnten. Nach einem Anstieg der Antigenproduktion bis zum 8. Tag produzierten die PHH gleichmäßig HBe-Ag. Unterschiede in der Antigenproduktion, die mit unterschiedlichen moi bei der Infektion korrelieren, bleiben über die gesamte Kulturdauer bestehen.

3.1.5. Infektion PHH zu späten Zeitpunkten

Für eine Präparation von PHH aus Leberresektaten ist es notwendig, frisches Material aus der Klinik zu erhalten (siehe 5.2.9). Da sich ausdifferenzierte PHH in Kultur nicht teilen, ist es nicht möglich, sie zu vermehren oder zu expandieren. Deshalb war es wichtig, herauszufinden, über welchen Zeitraum sie mit HBV infizierbar sind. Am 17. und 29. Tag nach Ausplattierung wurden die gleichen Zellen wie in 3.1.4 mit Wildtyp-HBV (moi 40 VP/Zelle) infiziert und HBe-Ag im Überstand gemessen (Abb. 3.5).

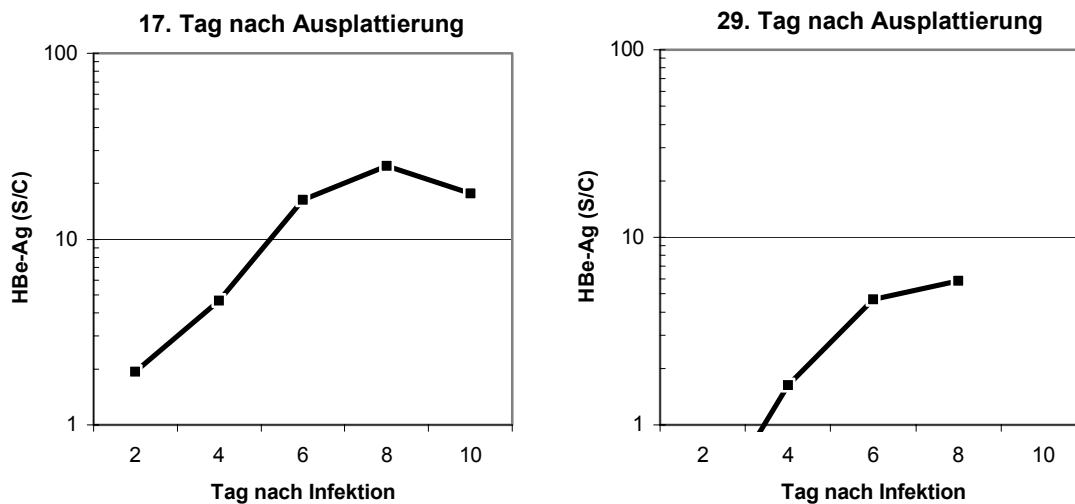


Abb. 3.5: Infektion von PHH zu späten Zeitpunkten. PHH wurden mit Wildtyp-HBV am 17. oder 29. Tag nach Ausplattierung mit einer moi 40 VP/Zelle infiziert. HBe-Ag wurde jeden zweiten Tag im Überstand gemessen.

Auch zu späteren Zeitpunkten, nach 2 bzw. 4 Wochen, war eine Infektion möglich. Die Infektionseffizienz nahm mit der Zeit allerdings ab, was ein niedrigeres HBe-Ag zur Folge hatte (im Vergleich zu Abb. 3.4). Daraus folgt, dass die Infektion am effizientesten in den ersten Tagen nach Ausplattierung der PHH ist. Alle folgenden PHH-Präparationen wurden aus diesem Grund innerhalb der ersten Woche nach Ausplattierung infiziert.

3.1.6. Genexpression der HBV-Vektoren mit GFP oder GFP-NLS als Transgen

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden HBV-Vektoren produziert (siehe Kapitel 2.7), deren Genome Stop-Kodons in allen offenen Leserahmen (ORF) der viralen Proteine tragen (rHBV GFP CPLX⁻; Untergasser, 2001). Als Transgen wurde entweder GFP oder GFP mit einem Kernlokalisierungssignal am C-terminalen Ende (GFP-NLS) benutzt. Mit diesen HBV-Vektoren wurden PHH infiziert. GFP exprimierende Zellen konnten nur bei HBV-Vektoren mit GFP als Transgen beobachtet werden. Im Gegensatz zu dem vergleichbaren Experiment mit DHBV-Vektoren, war bei den HBV-Vektoren mit GFP-NLS als Transgen keine nukleare GFP-Expression detektierbar. Daraus ergab sich die Frage, ob Viren mit GFP-NLS als Transgen nicht infektiös waren oder ob die Infektion der PHH der limitierende Faktor war. Um diese Frage zu beantworten, wurden PHH am 2. Tag nach dem Ausplattieren mit rHBV GFP L⁻ und rHBV GFP-NLS L⁻, infiziert. Bei diesen

Vektoren waren die ORFs für Core, trunkierte Polymerase und X-Protein aktiv. Parallel dazu wurden PHH mit rHBV GFP CPLX⁻ und rHBV GFP-NLS CPLX⁻, bei denen alle viralen ORF ausgeschaltet wurden, infiziert. Alle Infektionen wurden in Anwesenheit von 5% PEG durchgeführt. Am 9. Tag nach Infektion wurden positive Zellen im Fluoreszenzmikroskop photographiert (Abb. 3.6).

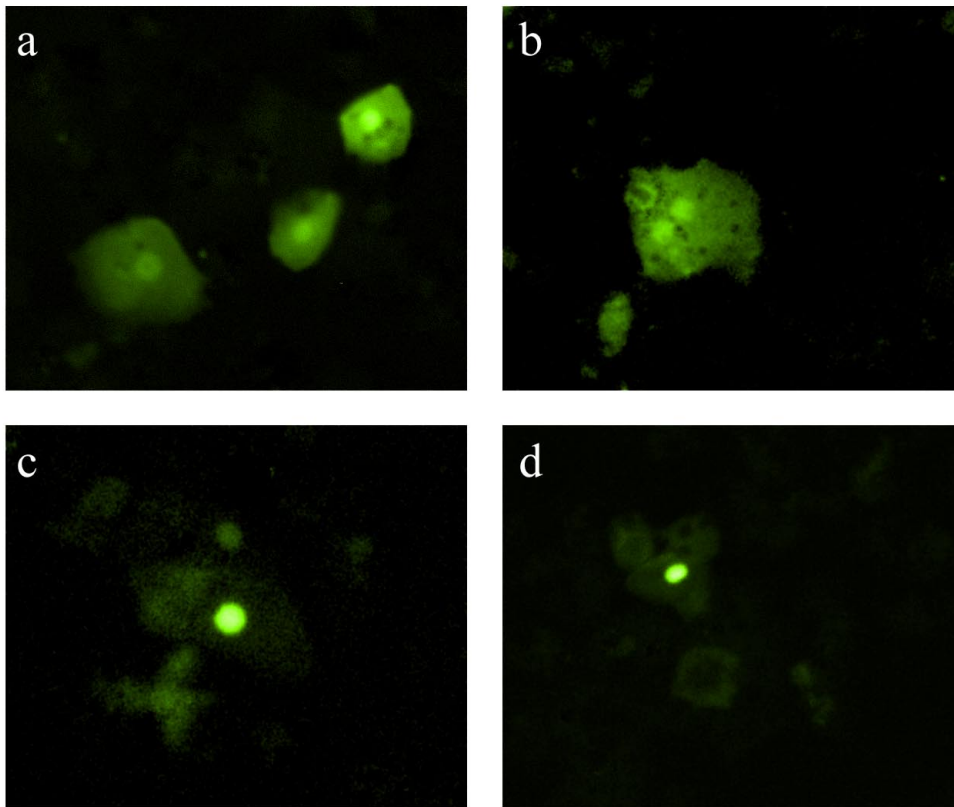


Abb. 3.6: Infektion mit GFP exprimierenden HBV-Vektoren. PHH wurden am 2. Tag nach Plattierung mit (a) rHBV GFP L⁻, (b) rHBV GFP CPLX⁻, (c) rHBV GFP-NLS L⁻ und (d) rHBV GFP-NLS CPLX⁻ infiziert. GFP-Fluoreszenz wurde am 9. Tag nach Infektion photographiert.

Es konnten GFP exprimierende Zellen bei allen vier HBV-Vektoren nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob GFP oder GFP-NLS als Transgen benutzt wurde. GFP-NLS zeigte, wie zu erwarten war, eine deutlich stärkere Akkumulation im Nukleus als GFP ohne NLS.

3.2. Weiterentwicklung der HBV-Vektor-Produktion

Der Einsatz von HBV-Vektoren ist einerseits als molekulare Werkzeuge, andererseits in der Therapie gegen Lebererkrankungen denkbar. Besonders attraktiv für eine Therapie gegen chronisch Hepatitis B und C scheinen HBV-Vektoren mit Interferonen als Transgen. Da HBV-Vektoren nicht in der Lage sind, zu replizieren und Nachkommenviren zu bilden, die benachbarte Zellen infizieren, müssen möglichst viele Zellen durch die erste Injektion der Vektoren getroffen werden. Soll ein Vektor-Partikel pro Leberzelle injiziert werden, so entspricht das bei einem Menschen oder Schimpanse ca. 10^{11} Partikeln. Bei einer durchschnittlichen Partikelausbeute von 5×10^7 Vp/ml Kulturmedium würde das einen großen Aufwand an Material und Arbeitszeit bedeuten. Unter diesen Gesichtspunkten war es sinnvoll, die Produktion von Viren weiter zu optimieren.

In diesem Teil meiner praktischen Arbeit wurde untersucht, welche Schritte der Vektor-Produktion zu einer erhöhten Ausbeute infektiöser Partikel führen (Abb. 3.7).

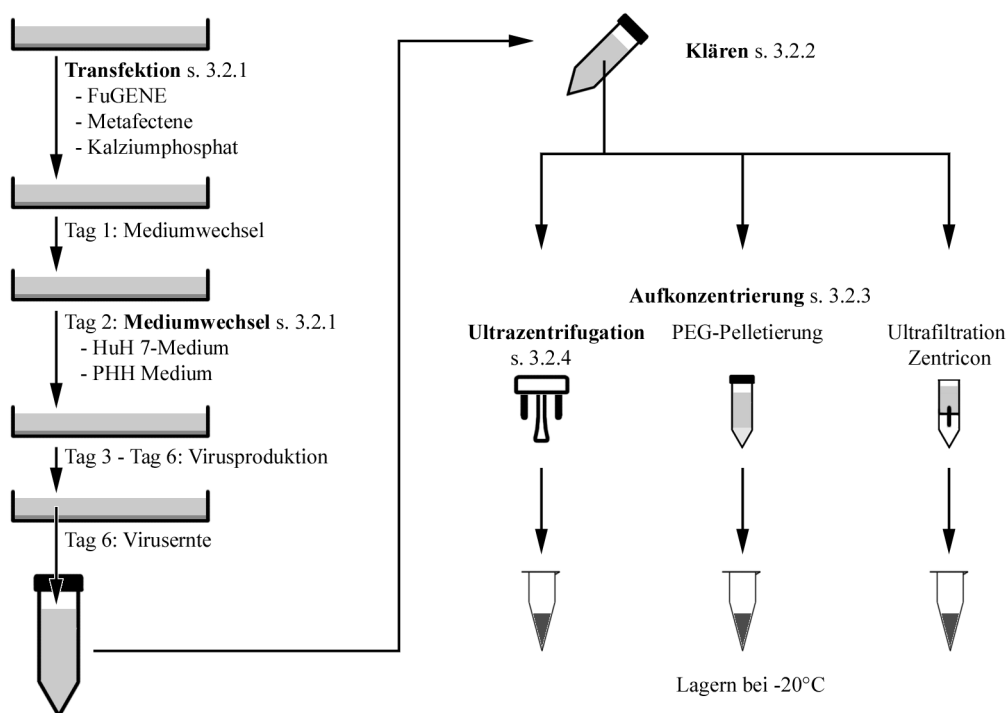


Abb. 3.7: Schema der entscheidenden Schritte einer rHBV-Produktion. Schritte, die optimiert wurden, sind in fetter Schrift mit Verweis auf die jeweiligen Abschnitte gedruckt.

Es sind unterschiedliche Transfektionsmethoden miteinander verglichen worden (s. 3.2.1). Die Zellen sekretieren ab dem 3. Tag nach Transfektion virale Partikel in das Medium. Die HuH 7-Zellen wurden während der Vektorproduktion in zwei verschiedene Medien kultiviert (s. 3.2.1). Bevor die viralen Partikel aus der Lösung aufkonzentriert werden konnten, wurde das Medium von Zelltrümmern befreit (s. 3.2.2). Drei unterschiedliche Anreicherungsverfahren sind getestet worden (s. 3.2.3). Die Bedingungen für die Ultrazentrifugation wurden getrennt optimiert (s. 3.2.4).

3.2.1 Einfluss der Transfektionsmethode und des Kulturmediums

Es gibt zwei Möglichkeiten, virale Partikel zu produzieren, abhängig davon, ob Wildtyp-Virus oder HBV-Vektoren produziert werden sollen. Wildtyp-HBV wurde durch Transfektion eines Plasmids (pCH -9/3091), von dem eine prägenomische RNA mit Wildtyp-Sequenz transkribiert wird, in HuH 7-Zellen produziert. Virale Vektoren wurden durch Kotransfektion gleicher Mengen eines gewünschten Transferplasmides, von dem die prägenomische RNA transkribiert wird, und eines Helferplasmides (pCH 3142 An β -Glob), welches alle viralen Proteine in trans zur Verfügung stellt, produziert (siehe 2.7). Da die Menge der transferierten DNA in beiden Fällen unterschiedlich ist, wurde die Transfektionsmethode und die Kulturbedingungen mit den HBV-Vektoren und nicht mit Wildtyp-HBV verbessert.

Es gibt mehrere Methoden, mit denen DNA in Zellen transferiert werden kann. Die klassische Transfektionsmethode ist das Ausbilden eines Präzipitates mit Kalziumphosphat, welches von den Zellen aufgenommen wird. Diese Methode wurde mit den Lipid-Transfektionsmethoden FuGENE 6[®] und Metafectene[®] verglichen. Während der Virusproduktion wurden die Zellen entweder in HuH 7-Medium oder PHH-Medium gehalten. HuH 7-Medium ist auf ein gutes Wachstum der HuH 7-Krebszelllinie optimiert und ist bisher verwendet worden. Es basiert auf DMEM-Medium mit FCS und weiteren Zusätzen (siehe 5.2.1). PHH-Medium wurde für PHH entwickelt, die sich in diesem Medium kaum noch teilen. Das Grundmedium ist Williams-E-Medium mit DMSO, Hydrocortison und weiteren Zusätzen, aber ohne FCS (siehe 5.2.9.1). Da sowohl die Transfektionsmethode als auch das Kulturmedium einen Einfluss auf die Produktion viraler Partikel haben kann, wurden alle Kombinationen getestet. Nach der Transfektion (siehe 5.2.2) wurde am nächsten Tag das Medium gewechselt. Sollte später PHH-Medium für die Virusproduktion eingesetzt werden, so wurde eine 1:1 Mischung aus HuH 7- und PHH-Medium verwendet. Am 2. Tag nach Transfektion wurde das Medium gegen frisches HuH 7- oder PHH-Medium ausgetauscht, in dem sich über vier Tage die

viralen Partikel angereichert hatten. Das Medium wurde am 6. Tag abgenommen, durch Zentrifugation bei 1250 g von Zelltrümmern befreit, und die viralen Partikel durch Ultrazentrifugation bei 120.000 g angereichert (siehe 5.2.8). Um die Viruskonzentrationen dieser Konzentrate zu bestimmen, wurden die viralen Partikel in einem analytischen CsCl-Gradient sedimentiert (siehe 5.1.6). Der Gradient wurde ausgetropft, die Fraktionen auf einen Dotplot aufgetragen und mit ^{32}P markierten HBV-Sonde hybridisiert. Ein parallel aufgetragenes Serum eines HBV positiven Patienten markierte den Bereich, in dem virale Partikel erwartet werden (Abb. 3.8). Die Signalstärke wurde mittels eines Phosphorimagers im Vergleich zu einem DNA-Standard quantifiziert (siehe 5.1.7).

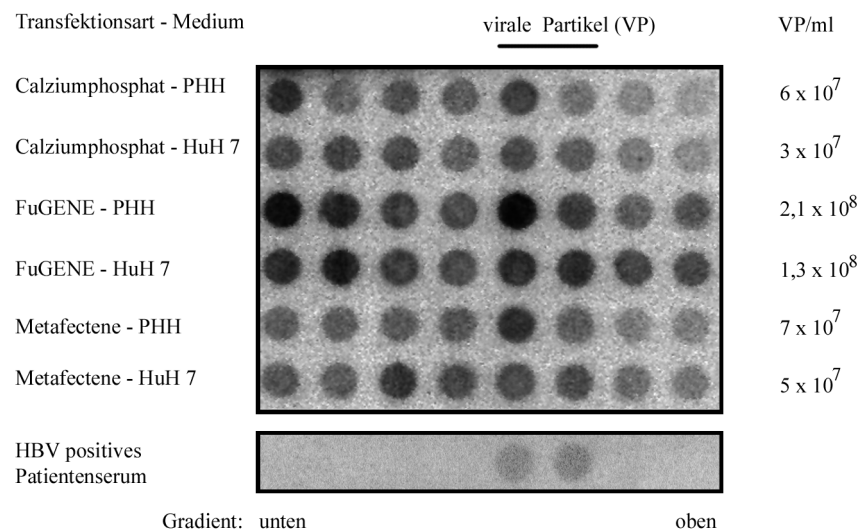


Abb. 3.8: Einfluss der Transfektionsmethode und des Kulturmediums auf die Virusproduktion. Die viralen Partikel aus den verschiedenen Transfektionsansätzen wurden in einen CsCl-Gradient sedimentiert (siehe 5.1.6). Die Fraktionen des Gradienten wurden im Dotplot aufgetragen und die viralen Partikel (VP) quantifiziert (siehe 5.1.7). Die Konzentrationen der VP sind pro ml Kulturmedium angegeben.

Als Titer wurden die Konzentration die HBV-DNA enthaltenden Partikel pro ml Kulturmedium bestimmt, die im Dichtebereich der viralen Partikel des HBV positiven Patientenserums sedimentieren. Die Titer waren in den Fällen, in denen PHH-Medium verwendet wurde, 1,5-2fach erhöht. Bei den Transfektionsreagenzien war FuGENE 6[®] den anderen überlegen, und die Ausbeute viraler Partikel war, je nach Experiment, 3-5fache höher verglichen mit Titern nach Calziumphosphat-Transfektion. Bei Verwendung des Transfektionsreagenz Metafectene konnte Ausbeute um den Faktor 1,5-2 erhöhen werden. Die Einfluss des Mediums und der Transfektionsmethode auf die Ausbeute addierten sich. Wurde FuGENE 6[®] und PHH-Medium verwendet, so konnten 8-10fach höhere Titer erzielt

werden (im Vergleich zu Calciumphosphat-Transfektion und anschließender Kultur in HuH 7-Medium).

3.2.2 Einfluss des Klärens auf die Virusqualität

Die viralen Partikel von Wildtyp-HBV sollten sich in ihren physikalischen Eigenschaften nicht von viralen Partikeln der HBV-Vektoren unterscheiden. Wildtyp-HBV hatte den Vorteil, dass infektiöse Viren leicht durch Antigenexpression nach Infektion von PHH nachgewiesen werden können. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Experimente zur Verbesserung der Virusproduktion mit Wildtyp-HBV durchgeführt.

Wildtyp-HBV wurde durch Transfektion eines Plasmids (pCH -9/3091) in HuH 7-Zellen produziert. Nach der Virusproduktion wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation aus dem Medium pelletiert und entfernt (auch "Klären" genannt). Wenn virale Partikel bei der Produktion miteinander oder mit zellulären Membranen aggregieren würden, bestünde die Möglichkeit, einen Teil dieser Aggregate durch diese Zentrifugation zu pelletieren und mit den Zelltrümmern zu entfernen. Um das zu untersuchen, wurde bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten 10 min geklärt. Anschließend wurden die viralen Partikel per Ultrazentrifugation 50fach angereichert (siehe 5.2.8). Die Titer der unterschiedliche Ansätze wurden, wie in 5.1.6-7 beschrieben, quantifiziert (Abb. 3.9a). Die PHH wurden in einer moi 100 VP/Zelle infiziert und am 6. Tag wurden das HBe-Ag im Überstand der PHH bestimmt (Abb. 3.9).

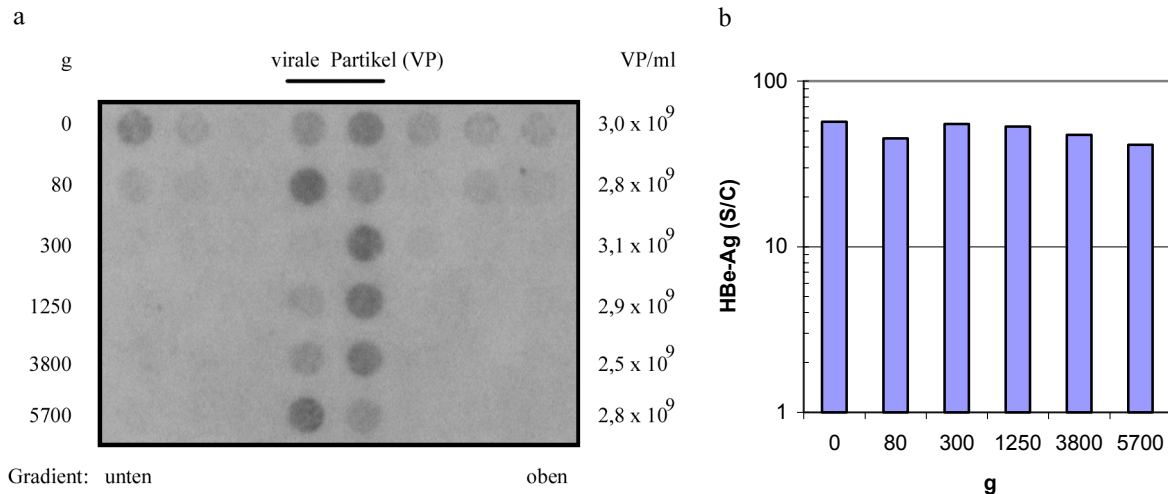


Abb. 3.9: Einfluss der Klärungsgeschwindigkeit auf die Virusmenge. Die rHBV wurden mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten geklärt und aufkonzentriert. (a) Die viralen Partikel aus den verschiedenen Ansätzen wurden in einen CsCl-Gradient sedimentiert (siehe 5.1.6). Die Fraktionen des Gradienten wurden im Dotblot aufgetragen und die viralen Partikel (VP) quantifiziert (siehe 5.1.7). Die Konzentrationen der VP sind pro ml Lösung nach 50facher Anreicherung angegeben. (b) PHH wurden mit den verschiedenen Ansätze in einer moi 100 VP/Zelle infiziert und HBe-Ag im Medium am 6. Tag nach der Infektion gemessen.

Das Klären mit Geschwindigkeiten bis zu 5700 g hatte keinen Einfluss auf die Konzentration der viralen Partikel (Abb. 3.9a). Nach Infektion von PHH mit den unterschiedlichen Ansätzen produzierten die Zellen vergleichbare Mengen HBe-Ag (Abb.3.9b). Bei Geschwindigkeiten unter 300 g werden Membranfragmente nicht vollständig entfernt, was aber keinen Einfluss auf die Infektion gemessen an der Produktion von HBe-Ag hatte. In weiteren Experimenten wurde bei 1250 g geklärt.

3.2.3 Vergleich der Anreicherungsverfahren

Viren können, wie schon zuvor beschrieben, aus dem Zellkulturmedium angereichert werden. Bei der Ultrazentrifugation wurden die viralen Partikel durch 20% Saccharose sedimentiert und am Boden des Gefäßes pelletiert, von dem sie anschließend gelöst wurden. Die PEG-Präzipitation nutzte die wasserbindende Eigenschaft des PEG, um die Hydrophilie des Mediums soweit zu reduzieren, dass die Viren miteinander aggregierten und bei niedrigen Geschwindigkeiten pelletiert werden konnten. Zentricon-Röhrchen filterten das Medium durch eine Membran, von der alle Partikel ab einer Größe von 10.000 (Zc 10) oder 100.000 Da (Zc 100) zurückgehalten wurden. Die Viren wurden dadurch in dem Restvolumen, welches die Membran nicht durchflossen hatte, angereichert und konnten von der Membran eluiert werden.

Die drei beschriebenen Methoden wurden in diesem Abschnitt miteinander verglichen. Wildtyp-HBV wurde durch Transfektion eines Plasmids (pCH -9/3091) in HuH 7-Zellen produziert, bei 1250 g geklärt und mit den verschiedenen Methoden angereichert. Obwohl mit der Membranfiltration eine deutlich höhere Anreicherung möglich (ca. 250fach) ist als mit den beiden anderen Methoden, wurden alle Lösungen 50fach angereichert. Die Konzentration der viralen Partikel nach Anreicherung mit den verschiedenen Methoden wurden, wie in 5.1.6-7 beschrieben, bestimmt (Abb. 3.10a). Da die Konzentrationen viraler Partikel in allen Ansätze ähnlich waren, wurden gleiche Mengen dieser Lösungen zur Infektion von PHH benutzt. Am 6. Tag wurden das HBe-Ag im Überstand der PHH bestimmt (Abb. 3.10b).

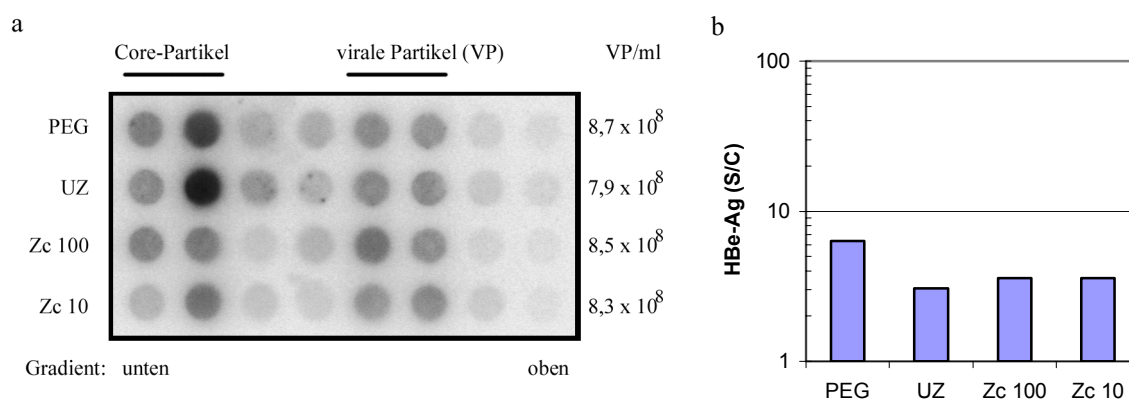


Abb. 3.10: Einfluss der Anreicherungsart auf die Virusmenge. Die rHBV wurden mit identischen Geschwindigkeiten geklärt und mittels Ultrazentrifugation, PEG-Pelletierung oder zwei verschiedenen Zentricon-Röhrchen aufkonzentriert. (a) Die viralen Partikel aus den verschiedenen Ansätzen wurden in einen CsCl-Gradient sedimentiert (siehe 5.1.6). Die Fraktionen des Gradienten wurden im Dotblot aufgetragen und die viralen Partikel (VP) quantifiziert (siehe 5.1.7). Die Konzentrationen der VP sind pro ml Lösung nach 50facher Anreicherung angegeben. (b) PHH wurden mit gleichen Mengen rHBV der verschiedenen Ansätze infiziert und HBe-Ag im Medium am 6. Tag nach Infektion gemessen.

Es konnten keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Konzentration viraler Partikel festgestellt werden (Abb. 3.10a). Sowohl mit Ultrazentrifugation als auch durch PEG-Präzipitation wurden die Core-Partikel im Vergleich zur Membranfiltration stärker angereichert. Die leichten Unterschiede in der HBe-Ag-Produktion, die in Abb. 3.10b zwischen PEG-Präzipitation und Ultrazentrifugation auftraten, ließen sich nicht reproduzieren. Ultrazentrifugation und Membranfiltration, die reine Viren lieferten, wurden für Viren verwendet, die für Tierversuche benötigt wurden. PEG-Präzipitation, die einfach und kostengünstig ist, wurde für die in Zellkulturexperimenten verwendeten Viren benutzt.

3.2.4 Optimierung der Anreicherung mittels Ultrazentrifugation

Da große Virusmengen für Tierexperimente angereichert werden sollten, wurde überprüft, wie weit die Zentrifugationsdauer verkürzt werden konnte, ohne virale Partikel zu verlieren, und ob längeres Zentrifugieren (über Nacht) die Infektiosität der viralen Partikel reduziert. Wildtyp-HBV wurde durch Transfektion eines Plasmids (pCH -9/3091) in HuH 7-Zellen produziert und bei 1250 g 10 Minuten geklärt. Die viralen Partikel eines Aliquots wurden 3 Stunden, eines 6 Stunden und eines 18 Stunden per Ultrazentrifugation bei 120.000 g pelletiert. Die Konzentration der viralen Partikel dieser angereicherten Lösungen sowie 2 ml des abgereicherten Mediums wurden, wie in 5.1.6-7 beschrieben, quantifiziert (Abb. 3.11a). PHH wurden mit diesen Lösungen in einer moi 100 VP/Zelle infiziert und das HBe-Ag im Überstand der PHH am 6. Tag bestimmt (Abb. 3.11).

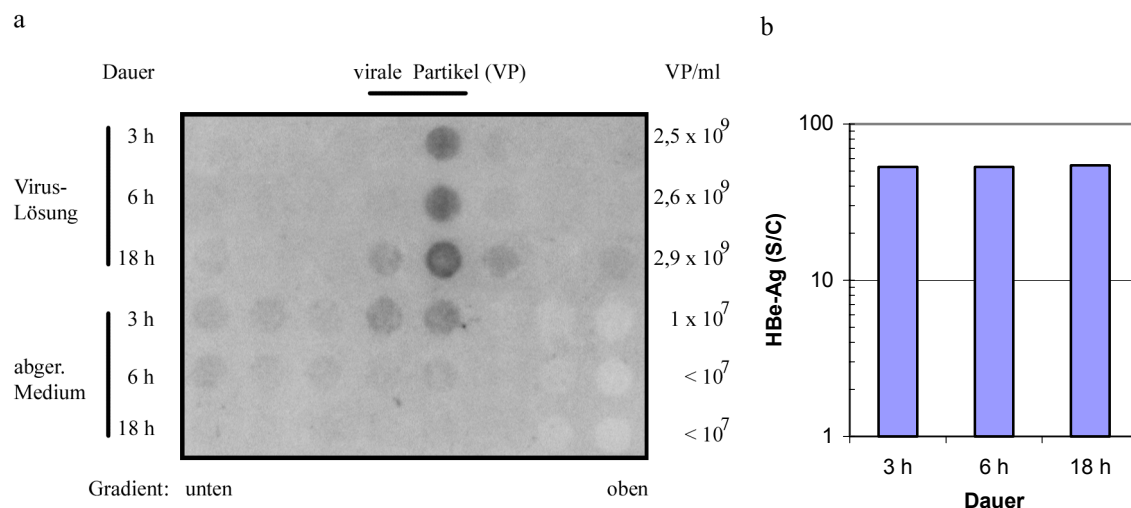


Abb. 3.11: Einfluss der Ultrazentrifugations-Geschwindigkeit auf die Virusmenge. Das virushaltige Medium wurde unterschiedlich lange zentrifugiert. (a) Die viralen Partikel aus den angereicherten Lösungen sowie den zugehörigen Überständen wurden in einen CsCl-Gradient sedimentiert (siehe 5.1.6). Die Fraktionen des Gradienten wurden im Dotblot aufgetragen und die viralen Partikel (VP) quantifiziert (siehe 5.1.7). Die Konzentrationen der VP sind pro ml Lösung nach 50facher Anreicherung angegeben. (b) PHH wurden in einer moi 100 VP/Zelle infiziert und HBe-Ag im Medium am 6. Tages nach Infektion gemessen.

Nach drei Stunden waren über 85 % der Viren pelletiert. Obwohl die Viruslösungen keine Unterschiede in der HBe-Ag Produktion zeigten, wurden alle folgenden Präparationen für 6 Stunden oder 18 Stunden zentrifugiert. Eine längere Zentrifugationsdauer hatte keinen Einfluss auf die HBe-Ag-Produktion.

3.3. Produktion leberspezifischer Vektoren mit Interferon als Transgen

Patienten mit chronischer Hepatitis B oder C werden mit systemischen Gaben von Interferon alfa behandelt. In vielen Fällen muss die Dosis im Verlauf der Therapie aufgrund starker Nebenwirkungen reduziert werden. Mit einer lebergerichteten Gentherapie wäre es möglich, Interferone direkt in der Leber zu produzieren. Dadurch wäre die lokale Konzentrationen in der Leber hoch und im restlichen Körper niedrig. Das würde voraussichtlich zu weniger Nebenwirkungen führen. Verglichen mit den bisher verwendeten Reportertransgenen, besteht ein Problem bei der Entwicklung von Vektoren mit Interferon als Transgen darin, dass die Interferone schwerer nachweisbar sind. Die Interferon-mRNA kann direkt mittels quantitativer RT-PCR gemessen werden. Indirekt kann der Effekt von Interferon gamma durch die Induktion der Gene *Interferon γ inducible Protein 10* (IP 10) und *Monokine induced by Interferon γ* (MIG) nachgewiesen werden. Interferon alfa und beta induzieren *2' 5' Oligoadenylat Synthetase* (OAS) und im geringen Ausmaß IP10. Die Kopienzahl der RNAs wurden von Thomas Giese (Abteilung Immunologie der Universitätsklinik Heidelberg) mittels RT-PCR aus PHH-Lysat quantifiziert.

3.3.1. rHBV mit Interferonen als Transgen

Die HBV-Vektoren bieten sich aufgrund ihrer Leberspezifität für einen lebergerichteten Interferontransfer an. Deshalb wurden die Interferone alfa, beta und gamma anstelle des GFP in je ein Transferplasmid (pCH 1452 Ifn alfa CPLX, pCH 1452 Ifn beta CPLX, pCH 1452 Ifn gamma CPLX) kloniert. Um die Plasmide auf Funktion zu überprüfen, wurden die Plasmide in HuH7-Zellen transfiziert. Am 4. Tag nach Transfektion wurden die Zellen und eine nicht transfizierte Negativkontrolle lysiert. Im Lysat konnten die Interferon-mRNAs (Abb. 3.12a) und die Interferon-induzierten mRNAs (Abb. 3.12b) mittels quantitativer RT-PCR nachgewiesen werden.

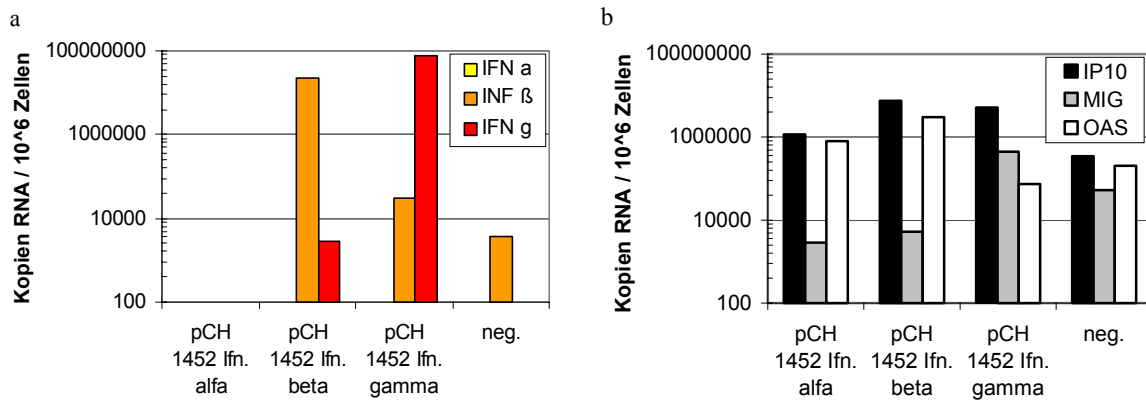


Abb. 3.12: mRNA-Produktion nach Transfektion Interferon exprimierender Plasmide in HuH7-Zellen. Die Transferplasmide wurden in HuH7-Zellen transfiziert. Am 4. Tag nach Transfektion wurden die Zellen parallel zu einer unbehandelten Negativkontrolle lysiert. Die Interferon-mRNAs (a) und induzierten mRNAs (b) wurden durch quantitative RT-PCR bestimmt.

Nach Transfektion des Plasmides pCH 1452 Inf. alfa wurde IP 10-mRNA 3fach und OAS-mRNA 4fach induziert. Die Kopienzahl der MIG-mRNA wurde 20fach reduziert. Interferon alfa-mRNA konnten nicht nachgewiesen werden. Das verwendete Interferon alfa Typ-2 wies einige Fehlpaarungen zu den verwendeten Primern auf und konnte aus diesem Grund nicht direkt nachgewiesen werden. Durch Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass ein intakter ORF ohne Mutationen in das Plasmid kloniert wurde.

Die Transfektion des Plasmids pCH 1452 Inf. beta induzierte IP 10-mRNA 20fach und OAS-mRNA 15fach. Die Kopienzahl der MIG-mRNA wurde 10fach reduziert. $2,1 \times 10^7$ Kopien Interferon beta-mRNAs konnten nachgewiesen werden, was 21 Kopien pro Zelle entspricht.

Plasmides pCH 1452 Inf. gamma erhöht nach Transfektion die Kopienzahl IP 10-mRNA 15fach und MIG-mRNA 8fach. Die Kopienzahl der OAS-mRNA wurde 3fach reduziert. In 10^6 Zellen konnten $7,9 \times 10^7$ Kopien Interferon gamma-mRNAs nachgewiesen werden, was 79 Kopien pro Zelle entspricht.

Die Interferone wurden nach Transfektion der Plasmide produziert, was sich in einem Anstieg der mRNAs Interferon induzierten Gene zeigte. Bei den Plasmiden pCH 1452 Inf. beta und pCH 1452 Inf. gamma konnten viele Kopien der mRNA des jeweiligen Interferons nachgewiesen werden. Mit diesen Transferplasmiden und mit dem Helferplasmid (pCH 3142 An β-Glob) wurden Viren produziert. Die Titer der unterschiedliche Ansätze wurden, wie in 5.1.6-7 beschrieben, bestimmt (Abb. 3.13 a). PHH wurden mit rHBV Ifn. alfa, rHBV Ifn. beta und rHBV Ifn. gamma in einer moi 100 VP/Zelle infiziert. Als Kontrolle wurde in einem zweiten, identischen Ansatz ein neutralisierenden Antikörper zugegeben. Am 4. Tag wurden

Im Verlauf der Arbeit wurden große Mengen rHBV Ifn. gamma produziert. Diese HBV-Vektoren wurden (in Kooperation mit Barbara Rehermann) zwei Schimpansen injiziert, die eine chronische Hepatitis C hatten. PHH wurden mit einer Mischung rHBV Ifn. gamma aus mehreren Produktionen infiziert. Am 4. Tag wurden die Zellen parallel zu einer unbehandelten Kontrolle lysiert. Die mRNAs von IP 10 und MIG sind per quantitativer RT-PCR gemessen worden (Abb. 3.14).

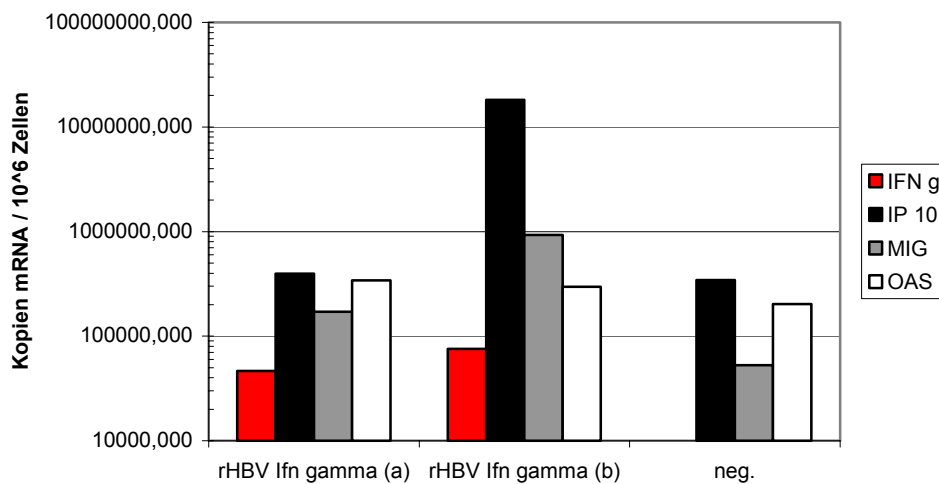


Abb. 3.14: Transgenexpression nach Infektion PHH mit rHBV Ifn. gamma. PHH wurden mit zwei verschiedenen Präparationen rHBV gamma infiziert. Am 4. Tag nach Infektion wurden die PHH parallel zu einer unbehandelten Negativkontrolle lysiert.

Die Ergebnisse dieser Infektion deuteten auf eine Funktionalität der Vektoren hin. 50.000 - 70.000 Kopien Interferon gamma-mRNA konnten nach Infektion PHH mit rHBV Ifn gamma nachgewiesen werden (3.14). Präparation (a) induzierte nach Infektion PHH MIG-mRNA 3fach. Präparation (b) induzierte nach Infektion PHH MIG-mRNA 20fach und IP 10-mRNA 50fach (3.14). Die Kopienzahl der OAS-mRNA blieb unbeeinflusst. Analoge Nachweise für rHBV Ifn. alfa und rHBV Ifn. beta sollen folgen.

Um sicher zu sein, dass die HBV-Vektoren rcDNA enthalten, wurden die in den viralen Partikel enthaltene DNA untersucht. rHBV Ifn. alfa, rHBV Ifn. beta und rHBV Ifn. gamma wurden dafür per Immunocapture mit einem Antikörper gegen das S-Protein aufgereinigt, im Southernblot analysiert und die vorhandene HBV-DNA nachgewiesen (siehe 5.1.9).

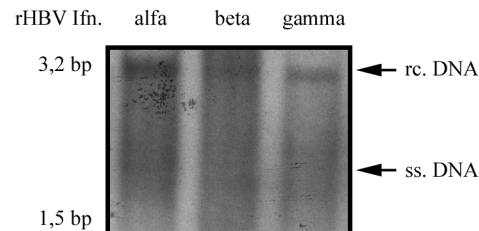


Abb. 3.15: Virale Partikel enthalten rcDNA der erwarteten Größe. Virale Partikel wurden per Immunocapture mit einem polyklonalen Antikörper gegen S-Protein aufgereinigt und die DNA im Southernblot aufgetrennt.

Alle drei HBV-Vektoren zeigten eine Bande für rcDNA, die nur nach reverser Transkription nachgewiesen werden kann (Abb. 3.15). Obwohl 10^8 virale Partikel aufgereinigt wurden, ist die Bande der rHBV Inf gamma schwächer, was wahrscheinlich auf einen Verlust während der Aufreinigung zurückzuführen ist. Damit kann davon ausgegangen werden, dass Interferon exprimierende HBV-Vektoren funktionell sind.

3.3.2. Herstellung rekombinanter Adenoviren

Der Gentransfer mittels HBV-Vektoren ist in vivo nicht etabliert. Aus diesem Grund wurden adenovirale Vektoren als eine etablierte Alternative für den Gentransfer ausgewählt. Adenoviren infizieren eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen, unter anderem auch Hepatozyten. Ihre Genexpression ist nicht leberspezifisch. Dennoch lässt sich der Gentransfer leberspezifisch gestalten, indem die Expression des Transgen von einem leberspezifischen Promotor kontrolliert wird. Es wurden rekombinante Adenoviren mit einer Kasette aus einem leberspezifischen TTR-Promotor (Costa, 1991), dem gewünschten Interferon und einem β -Globin-Polyadenylierungssignal produziert (siehe 5.2.7.2). Mit diesen adenoviralen Vektoren Ad Ifn alfa, Ad Ifn beta und Ad Ifn gamma wurden PHH in einer moi 3 VP/Zelle infiziert. Am 4. Tag wurden die Zellen parallel zu einer nicht infizierten Kontrolle lysiert und die mRNAs per quantitativer PCR gemessen (Abb. 3.16).

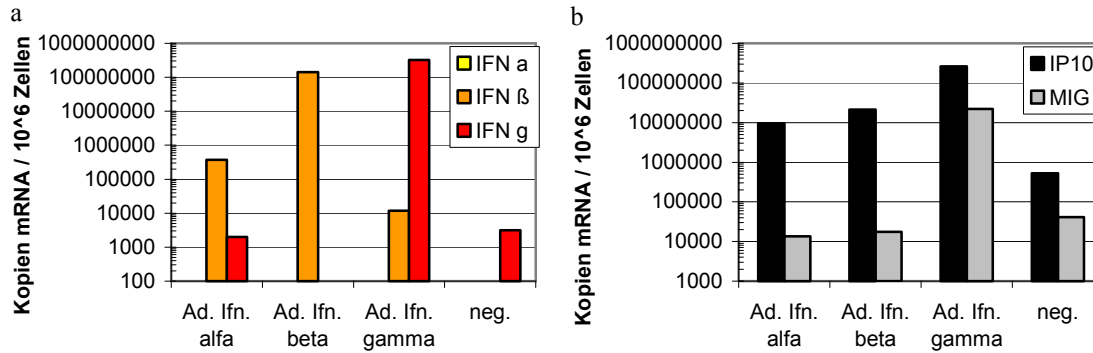


Abb. 3.16: Transgenexpression nach Infektion von PHH mit Interferon exprimierenden adenoviralen Vektoren. PHH sind mit den verschiedenen Adenoviren in einer moi 3 VP/Zelle infiziert worden. Vier Tage nach Infektion wurden sie parallel zu einer unbehandelten Negativkontrolle lysiert. Die Interferon mRNAs (a) und induzierten mRNAs (b) wurden durch quantitative RT-PCR bestimmt.

PHH, die mit dem adenoviralen Vektor Ad Ifn. alfa infiziert wurden, produzierten 370.000 Kopien Interferon beta-mRNA (Abb. 3.16a). Das verwendete Interferon alfa Typ-2 konnte, wie zuvor erwähnt, nicht direkt in der rt-PCR nachgewiesen werden. Die Induktion von Interferon beta wurde vermutlich sekundär durch die Sekretion von Interferon alfa induziert. Die Expression der IP 10-mRNA war nach Infektion 20fach erhöht, und es konnte keine Induktion von MIG-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 3.16b).

Wurden PHH mit Ad Ifn. beta infiziert, so waren $1,4 \times 10^8$ Kopien Interferon beta-mRNA nachweisbar, was 140 Kopien pro Zelle entspricht (Abb. 3.16a). Die Expression der IP 10-mRNA wurde 40fach erhöht, ebenfalls konnte keine Induktion von MIG-mRNA beobachtet werden (Abb. 3.16b).

Die stärksten Effekte traten nach Infektion von PHH mit Ad Inf. gamma auf. Es konnten $3,2 \times 10^8$ Kopien Interferon gamma-RNA gemessen werden, was 320 Kopien pro Zelle entspricht (Abb. 3.16a). Die Menge der IP 10-mRNA wurde 400fach erhöht, die Menge der MIG-mRNA 500fach (Abb. 3.16b).

Alle drei adenoviralen Vektoren produzierten funktionelle Interferone, welche die Expression der Interferon-induzierten Gene stimulierten.

3.4. HBV-Vektoren, die den Nachweis eines Gentransfers erleichtern

HBV-Vektoren können in der Molekularbiologie benutzt werden, um die frühen Phasen einer HBV-Infektion zu untersuchen. Werden PHH mit einem GFP exprimierenden HBV-Vektor infiziert, so ist ab dem 8. Tag eine GFP-Fluoreszenz in den Zellen sichtbar. In diesem Teil der Arbeit soll der Nachweis des Gentransfers verbessert werden.

3.4.1. rHBV mit dsRed 2 als Transgen

PHH haben ein starkes Hintergrundsignal im grünen Fluoreszenzbereich. Dieses Hintergrundsignal überlagert das GFP-Signal, was die Detektion von GFP-positiven Zellen erschwert. In dem roten Fluoreszenzbereich ist das Hintergrundsignal deutlich schwächer. Aus diesem Grund wurde ein dsRed 2-Gen anstelle des GFP-Gens in ein Transferplasmid (pCH C312 dRFP) kloniert (erhalten von Timo Kürschner, ZMBH, Universität Heidelberg). Mit diesem Transferplasmid und dem Helfer (pCH 3142 An β -Glob) sind Viren produziert worden. Die Konzentration der viralen Partikel wurde so bestimmt, wie es in 5.1.6-7 beschrieben worden ist (Abb. 3.17a). Zum Nachweis der Genexpression wurden PHH mit rHBV dsRed 2 infiziert und am 8. Tag im Fluoreszenzmikroskop beobachtet (Abb. 3.17b).

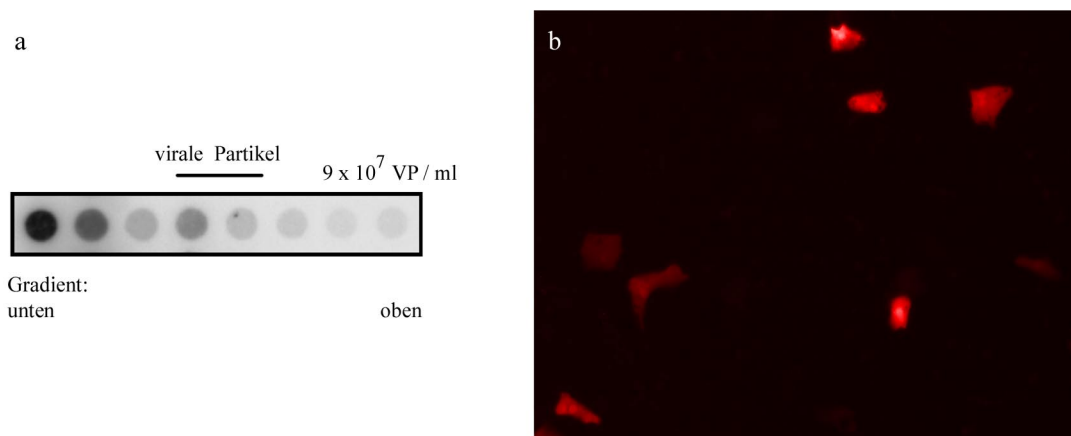


Abb. 3.17: Produktion und Nachweis des Gentransfers von rHBV dsRed 2. (a) rHBV dsRed 2 wurden in einen CsCl-Gradient sedimentiert (siehe 5.1.6). Die Fraktionen des Gradienten wurden im Dotblot aufgetragen und die viralen Partikel (VP) quantifiziert (siehe 5.1.7). Die Konzentrationen der VP sind pro ml Kulturmedium angegeben. (b) PHH wurden mit rHBV dsRed 2 in einer moi 100 VP/Zelle infiziert und am 8. Tag nach Infektion im Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

Die rHBV dsRed 2 konnten in zu anderen Vektoren vergleichbaren Titern produziert werden (Abb. 3.17a). Nach Infektion von PHH konnten positive Zellen leichter nachgewiesen

werden, da dsRed 2 stabiler als GFP ist und das Signal von einer geringeren Hintergrundfluoreszenz überlagert wird.

3.4.2. rHBV mit Renilla-Luziferase als Transgen

Werden PHH mit Wildtyp-HBV infiziert, so lässt sich die Sekretion des viralen HBs- und HBe-Ag quantifizieren. Da es zu einer Virusausbreitung in der Zellkultur kommen kann, lässt sich die Infektion schlecht quantifizieren. Ein Problem bei Infektionen von PHH mit GFP- oder RFP-exprimierenden Vektoren ist die nur begrenzte quantitative Auswertbarkeit. Die Vektoren exprimieren keine viralen Gene mehr, die quantifiziert werden könnten. Alle Versuche, PHH im FACS zu messen, waren erfolglos. Das lag einerseits an dem hohen Hintergrundsignal der Zellen, andererseits wurden die positiven Zellen beim Ablösen oder im FACS beschädigt. Selbst PHH, bei denen 50 % der Zellen mit einem GFP exprimierenden, adenoviralen Vektor infiziert waren, ließen sich im FACS nicht in eine GFP positive und eine negative Population auftrennen. Der einzige Weg, die Infektionseffizienz zu quantifizieren, bestand im Auszählen mehrerer Sichtfelder. Dies ist jedoch erst am 6.-10. Tag nach Infektion möglich und erwies sich als sehr langwierig.

Renilla-Luziferase kann durch einen enzymatischen Nachweis leicht gemessen werden. In der Hoffnung, infizierte Zellen mit diesem enzymatischen Nachweis zu quantifizieren, wurde das Renilla-Luziferase-Gen anstelle des GFP in ein Transferplasmid (pCH 1452 rLuci CPLX) kloniert. Mit diesem Transferplasmid und mit dem Helfer (pCH 3142 An β -Glob) wurden Viren produziert. Die Konzentration der viralen Partikel wurde, wie in 5.1.6-7 beschrieben, bestimmt (Abb. 3.18a). PHH wurden mit rHBV rLuci in An- und Abwesenheit eines neutralisierenden Antikörpers infiziert. Am 4. Tag wurden die Zellen parallel zu einer unbehandelten Kontrolle lysiert. Die Luziferase-Aktivität wurde gemessen und auf Proteinmenge normalisiert. Gezeigt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von drei parallelen Ansätzen (Abb. 3.18b).

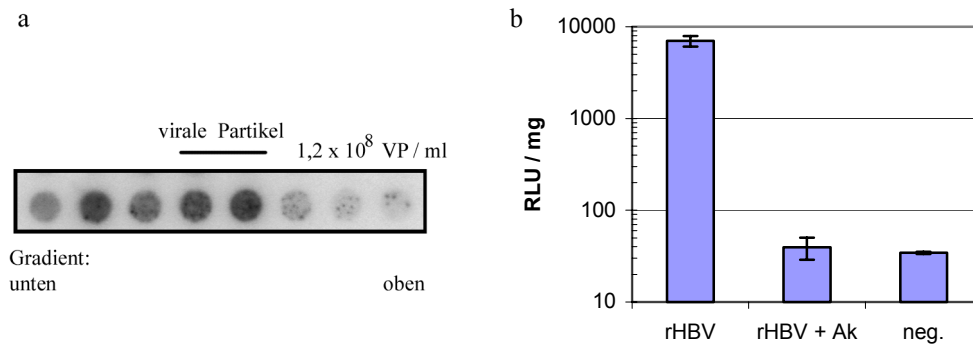


Abb. 3.18: Produktion und Transgenexpression von rHBV rLuci. (a) rHBV rLuci wurden in einen CsCl-Gradient sedimentiert (siehe 5.1.6). Die Fraktionen des Gradienten wurden im Dotblot aufgetragen und die viralen Partikel (VP) quantifiziert (siehe 5.1.7). Die Konzentrationen der VP sind pro ml Kulturmedium angegeben. (b) PHH wurden mit rHBV rLuci in einer 10^6 VP/Zelle in An- und Abwesenheit eines inhibitorischen Antikörpers infiziert. Am 4. Tag nach Infektion sind die Zellen parallel zu einer unbehandelten Negativkontrolle lysiert und die Luziferase-Aktivität gemessen worden.

Die rHBV rLuci konnten in hohen Titern produziert werden (Abb. 3.18). Nach der Infektion von PHH mit rHBV rLuci kann, im Vergleich zu einer nicht infizierten Kontrolle, eine 200fach höhere Luziferase-Aktivität gemessen werden. Es war keine Luziferase-Aktivität nachweisbar, wenn ein neutralisierender Antikörper während der Infektion zugegeben wurde. Mit rHBV rLuci ist es nun möglich, die Transgenexpression und damit die Infektionseffizienz an einem frühen Zeitpunkt zu quantifizieren.

3.4.3. rHBV mit TTR-Promoter anstelle des preS2-Promoters

Es war bekannt, dass der preS2-Promotor gegen einen CMV-Promoter ausgetauscht werden konnte (Untergasser, 2001). Dies hatte eine stärkere GFP-Fluoreszenz in infizierten PHH zur Folge, die zu einem früheren Zeitpunkt detektierbar war. Da ein Teil der Leberspezifität der Vektoren durch den Promoter gewährleistet wird, ist die Verwendung eines ubiquitär aktiven Promotors nachteilig. Im Hinblick auf eine lebergerichtete Gentherapie ist es nicht sinnvoll, die Leberspezifität zu reduzieren, auch wenn eine höhere Genexpression wünschenswert wäre. Der Transthyretin (TTR)-Promoter (Costa, 1991) ist ausgesprochen leberspezifisch und zeichnet sich durch eine starke Expression aus. Deswegen wurde ein Transferplasmid kloniert (pCH TTR GFP CPLX), in welchem der preS2-Promotor gegen den TTR-Promoter ausgetauscht wurde. Mit diesem Transferplasmid und dem Helfer (pCH 3142 An β -Glob) konnten Viren produziert werden. Die Konzentration der viralen Partikel wurde, entsprechend der Beschreibung in 5.1.6-7, bestimmt (Abb. 3.19a). Die Genexpression der Viren ist durch

Infektion von PHH mit rHBV TTR-GFP 4^- überprüft worden (Abb. 3.19b). Um Unterschiede zu sehen, wurde parallel dazu mit rHBV GFP 4^- (Abb. 3.19c) und rHBV CMV-GFP 4^- infiziert (Abb. 3.19d). Alle HBV-Vektoren sind in einer 10^8 VP/Zelle benutzt worden.

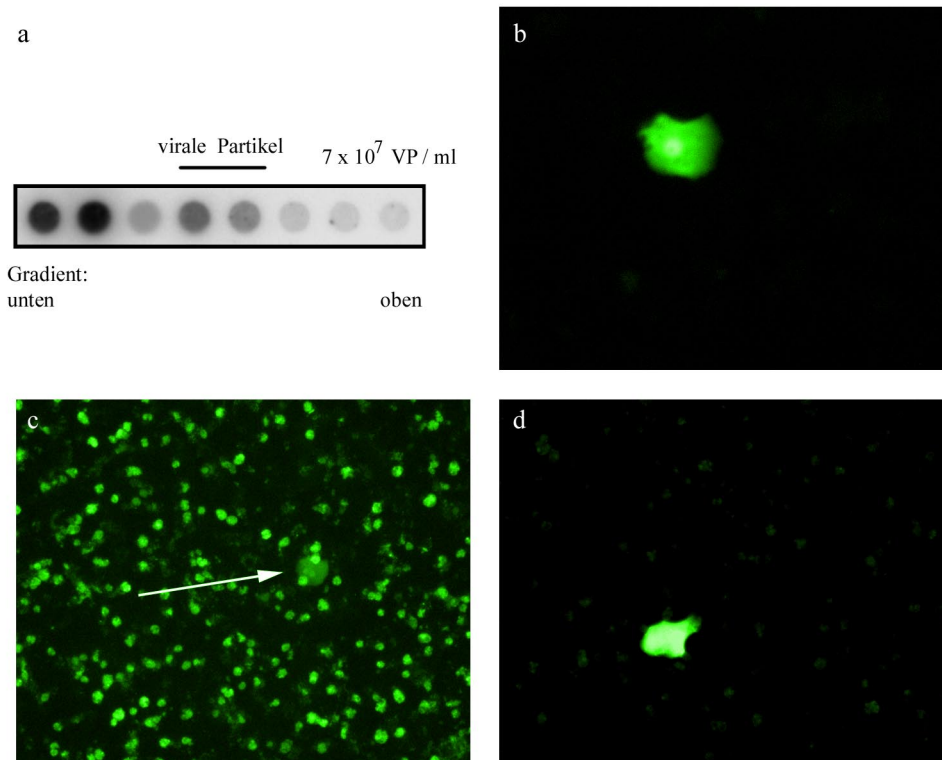


Abb. 3.19: Produktion und Genexpression von rHBV TTR-GFP 4^- . (a) rHBV TTR-GFP 4^- wurden in einen CsCl-Gradient sedimentiert (siehe 5.1.6). Die Fraktionen des Gradienten wurden im Dotblot aufgetragen und die viralen Partikel (VP) quantifiziert (siehe 5.1.7). Die Konzentrationen der VP sind pro ml Kulturmedium angegeben. (b) PHH wurden mit rHBV TTR-GFP 4^- infiziert und am 5. Tag nach Infektion im Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Der Pfeil deutet auf eine infizierte, GFP exprimierende Zelle. PHH wurden mit rHBV GFP 4^- (c) und mit rHBV CMV-GFP 4^- (d) infiziert und am 8. Tag nach Infektion im Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

rHBV TTR-GFP konnten in hohen Konzentrationen produziert werden (Abb. 3.19a). Nach Infektion PHH mit rHBV TTR-GFP trat eine starke GFP-Fluoreszenz auf (Abb. 3.19b), die vergleichbar mit rHBV CMV-GFP 4^- war (Abb. 3.19d) und weit über der von rHBV GFP 4^- lag (Abb. 3.19c). Das Hintergrundsignal der Zellen auf Bild 3.19b und 3.19d war mit dem auf Bild 3.19c vergleichbar. Da das GFP-Signal der infizierten Zellen aber wesentlich stärker ist als das der infizierten Zelle in Bild 3.19c (mit Pfeil markiert), wurden die Bilder mit einer wesentlich kürzeren Belichtungszeit aufgenommen.

Um die drei verwendeten Promotoren (CMV, TTR und HBV preS2/S) vergleichen zu können, wurde in den Konstrukten GFP durch Renilla-Luziferase ersetzt. Die Transferplasmid pCH TTR rLuci CPLX, pCH CMV rLuci CPLX sowie pCH 1452 rLuci CPLX, wurden zur Quantifizierung der Genexpression in HuH7-Zellen transfiziert. Dazu wurden 6 Vertiefungen einer Zwölflochplatte mit je einem der klonierten Plasmide sowie einem GFP-exprimierenden Plasmid transfiziert. Drei Vertiefungen wurden am 4. Tag nach Transfektion lysiert und die Luziferase-Aktivität gemessen. Die anderen drei wurden zur Bestimmung der Transfektionseffizienz im FACS benutzt. Die Luziferase-Aktivität ist anschließend auf Proteinmenge und Transfektionseffizienz normalisiert worden. Gezeigt ist der Mittelwert und die Standardabweichung der drei parallelen Ansätze (Abb. 3.20).

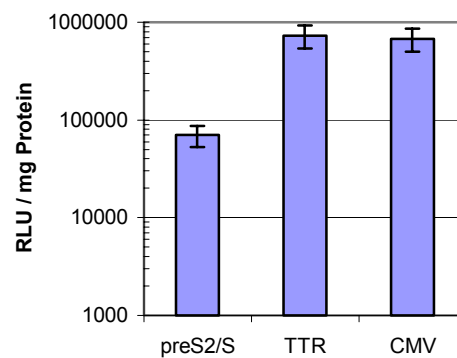


Abb. 3.20: Unterschiede der Genexpression unter den verschiedenen Promotoren. HuH 7 - Zellen wurden mit den Plasmiden pCH TTR rLuci CPLX (TTR), pCH CMV rLuci CPLX (CMV) und pCH 1452 rLuci CPLX (preS2/S) sowie einem GFP-exprimierenden Plasmid transfiziert. Die Zellen wurden am 4. Tag lysiert und die Luziferase-Aktivität bestimmt. Die Werte sind normalisiert auf Proteinmenge und Transfektionseffizienz.

Die Plasmide pCH TTR rLuci CPLX und pCH CMV rLuci CPLX mit den Fremdpromotoren zeigen eine 10fach höhere Luziferase-Aktivität als das Plasmid pCH 1452 rLuci CPLX mit dem HBV preS2/S-Promoter. Zwischen dem CMV- und dem TTR-Promoter war kein Unterschied in der Genexpression feststellbar.

Mit diesen verschiedenen Plasmiden und dem Helfer (pCH 3142 An β -Glob) wurden virale Partikel produziert. Der Titer ist, wie in 5.1.6-7 beschrieben, bestimmt worden. Es konnte kein deutlicher Unterschied in der Virusproduktion zwischen den Konstrukten festgestellt werden (Abb. 3.21 a). PHH wurden mit rHBV TTR-rLuci, rHBV CMV-rLuci und rHBV S-rLuci in einer moi 100 VP/Zelle infiziert. Die Zellen sind parallel zu einer unbehandelten Kontrolle am 4. Tag lysiert worden. Die Luziferase-Aktivität wurde gemessen

3.5. Vergrößerung der Transgen-Kapazität

Eine wichtige Eigenschaft eines jeden Vektorsystems ist seine Transgenkapazität. Sie limitiert die Auswahl an Transgenen, die mit dem Vektor transportiert werden können. In HBV-Vektoren konnten Gene bis zu einer Größe von 900 bp transportiert werden. Es war aber unbekannt, wie hoch die maximale Transgenkapazität ist. Aus vorausgehenden Versuchen war bekannt, dass ab einer Überlänge von ungefähr 300 bp die reverse Transkription beeinträchtigt ist. Es werden vorwiegend lineare Genome anstelle von ringförmig geschlossenen Genome gebildet (Chiang, 1992). Mit den Luziferase exprimierenden HBV-Vektoren konnte durch Insertion von DNA-Fragmenten herausgefunden werden, ab welcher Überlänge des Genoms die viralen Partikel nicht mehr infektiös sind. In den folgenden Experimenten wurde die Luziferase unter dem preS2/S-Promoter exprimiert, da er zu der stärksten Genexpression nach Infektion führte (siehe 3.5.3.).

3.5.1. Produktion von rHBV mit einer Genomüberlänge

Um ein größeres Transgen zu simulieren, wurden nicht-kodierende GFP-Fragmente am 3' Ende des Luziferase-Gens inseriert. Das Ausgangsplasmid wird im Folgenden "0" genannt (Abb. 3.22) und hat eine Überlänge von 47 bp.

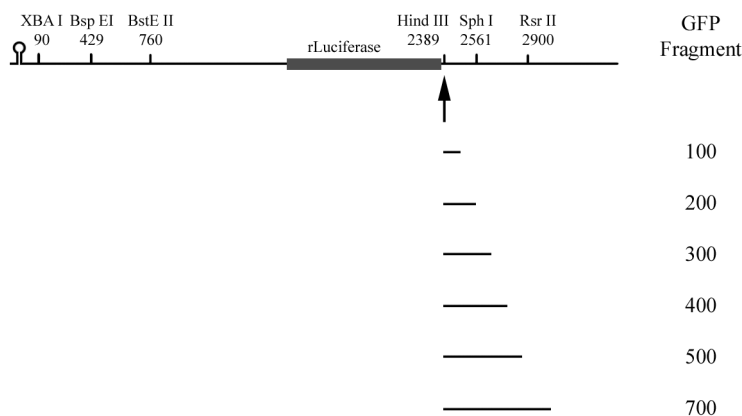


Abb. 3.22: Genomübersicht der rHBV Luziferase mit einem inserierten GFP-Fragment.

Luziferase-Expression kann nur nach erfolgter Infektion, reverser Transkription, Transkription und Translation stattfinden. Bevor Virus produziert wurde, sollte überprüft werden, ob die Veränderungen der DNA Einfluss auf die Genexpression hatten. Dies ist denkbar, da sich die Abstände der cis-aktiven Elemente, wie z. B. preS2/S-Promoter und Enhancer 1, zueinander ändern. HuH 7-Zellen in 6 Vertiefungen einer Zwölflochplatte

wurden mit je 1 µg der klonierten Luziferase exprimierenden Plasmide sowie 1 µg GFP-exprimierenden Plasmid transfiziert. Die Zellen in drei Vertiefungen wurden am 4. Tag nach Transfektion lysiert und die Luziferase-Aktivität gemessen. Die Zellen in den drei anderen Vertiefungen wurden zur Bestimmung der Transfektionseffizienz im FACS benutzt. Die Luziferasewerte wurden auf Proteinmenge und Transfektionseffizienz normalisiert. Gezeigt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von drei parallelen Ansätzen (Abb. 3.23).

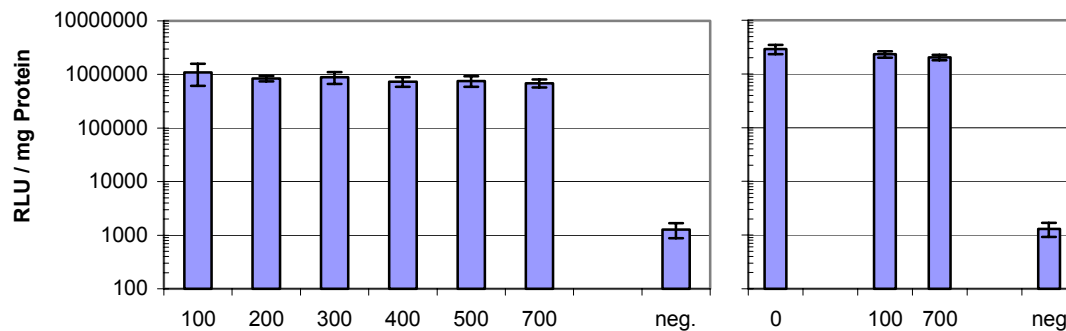


Abb. 3.23: Luziferase-Aktivität nach Transfektion der Plasmide mit GFP-Fragmenten (100-700 bp) 3' des Luziferase ORF. HuH 7 - Zellen wurden mit den unterschiedlichen Plasmiden sowie einem GFP-exprimierenden Plasmid transfiziert. Am 4. Tag wurden die Zellen lysiert und die Luziferase-Aktivität gemessen. Die Werte sind normalisiert auf Proteinmenge und Transfektionseffizienz. Die beiden Messungen stammen von unabhängigen Experimenten.

Es war kein Unterschied der Luziferase-Expression nach Transfektion der verschiedenen Plasmide feststellbar (Abb. 3.23a). Mit den klonierten Konstrukten und Helferplasmid (pCH 3142 An β -Glob) ist Virus produziert worden. Um die Viruskonzentrationen zu bestimmen, wurden die viralen Partikel in einem analytischen CsCl-Gradient sedimentiert (siehe 5.1.6). Der Gradient wurde von unten angestochen und ausgetropft. Die Fraktionen wurden auf einen Dotblot aufgetragen und mit ^{32}P markierten HBV-Sonde hybridisiert. Ein parallel aufgetragenes Serum eines HBV positiven Patienten definierte den Bereich, in dem virale Partikel sedimentierten (nicht gezeigt). Die Signalstärke wurde im Vergleich zu einem DNA-Standard quantifiziert (siehe 5.1.7). Mit allen Konstrukten erhielt man vergleichbare Mengen umhüllter Partikel (Abb. 3.24 a). PHH wurden mit gleichen Mengen der verschiedenen rHBV (ca. moi 100 VP/Zelle) infiziert. Die Zellen wurden am 4. Tag nach Infektion parallel zu einer unbehandelten Negativkontrolle lysiert und die Luziferase-Aktivität quantifiziert. Die Luziferasewerte ist auf Proteinmenge normalisiert worden. Gezeigt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von drei identischen Ansätzen (Abb. 3.24 b).

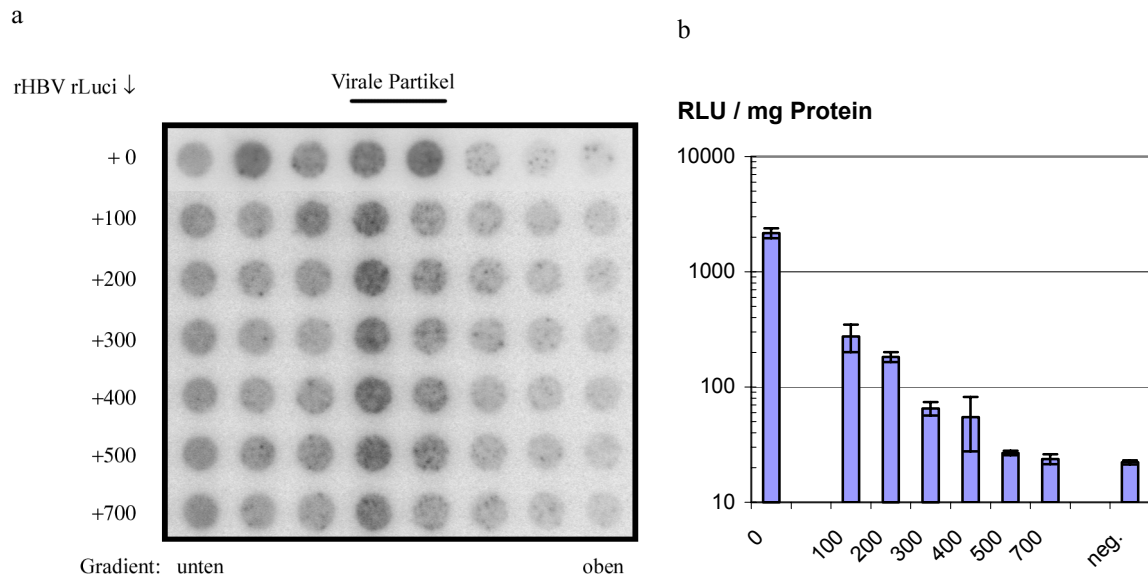


Abb. 3.24: HBV-Vektoren mit Genomüberlängen. (a) Die HBV-Vektoren wurden produziert. Die viralen Partikel wurden in einen CsCl-Gradient sedimentiert (siehe 5.1.6). Die Fraktionen des Gradienten wurden im Dotblot aufgetragen und die viralen Partikel (VP) quantifiziert (siehe 5.1.7). (b) PHH wurden in Dreifachwerten mit gleichen Mengen der verschiedenen rHBV (ca. 10^6 VP/Zelle) infiziert. Am 4. Tag nach Infektion wurden die Zellen parallel zu einer unbehandelten Negativkontrolle lysiert.

Es konnten von allen HBV-Vektoren, unabhängig von der Überlänge des Genoms, 6×10^7 VP/ml Kulturmedium produziert werden (Abb. 3.24a). Wurden gleiche Mengen dieser Vektoren zur Infektion von PHH benutzt, so unterschied sich die Luziferase-Expression deutlich. Die Luziferase-Expression der PHH änderte sich nach Infektion mit den unterschiedlichen Präparationen deutlich. Schon eine Überlänge von 100 bp führte zu einer 8fach reduzierten Luziferase-Expression (Abb. 3.24b). Ab einer Überlänge von 500 bp war Luziferase-Expression im Bereich der Negativkontrolle. Daraus konnte geschlossen werden, dass HBV-Partikel, deren Genom über 450 bp Überlänge hat, nicht mehr infektiös sind.

3.5.2. Produktion von rHBV mit verschiedenen Genomdeletionen

Da die HBV-Vektoren keine Überlänge des Genoms über 400 bp tolerieren, besteht die einzige Möglichkeit, größere Transgene zu verwenden, darin, weitere Bereiche des Genoms zu deletieren. Auf den Transferplasmiden sind alle viralen Gene ausgeschaltet. Aus diesem Grund können große Teile der viralen ORF deletiert werden, ohne transkriptionell aktive Gene zu betreffen. Die viralen Proteine werden vom Helferplasmid in trans zur Verfügung gestellt. Dennoch sind manche Bereiche für die reverse Transkription oder die Genexpression des Transgens nach Infektion von Bedeutung und sollten nicht verändert werden. Es war eine

Region bekannt (RC), die bei der reversen Transkription eine Rolle spielt und nicht deletiert werden konnte (Chiang, 1992). Deletionen, die keinen starken Einfluss auf die reverse Transkription hatten, wurden auf unser Vektorsystem adaptiert. Es wurden sechs verschiedene Konstrukte mit unterschiedlichen Deletionen im Transferplasmid kloniert (Abb. 3.25). Um eine Unterlänge zu vermeiden, wurden die HBV-Genome parallel dazu mit GFP-Fragmenten wieder auf Normallänge gebracht (Überlänge zwischen 0-100 bp).

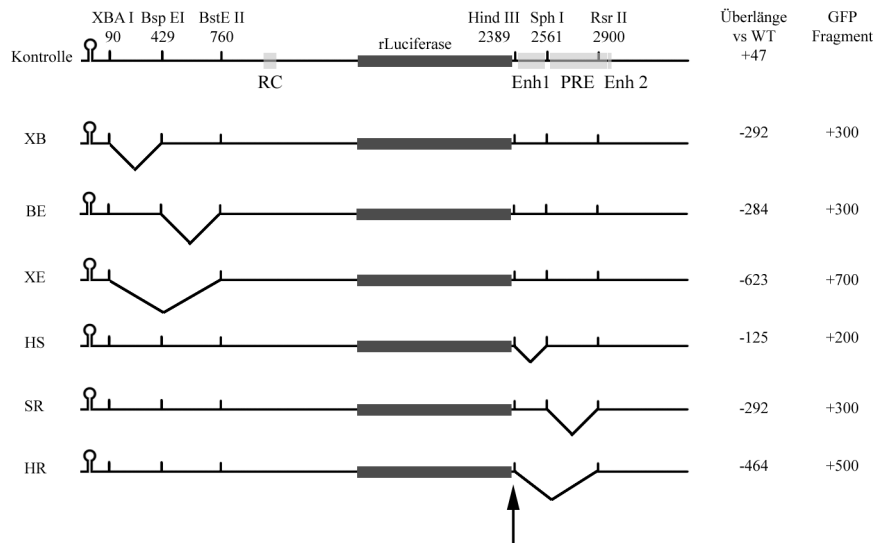


Abb. 3.25: Genomübersicht über die rHBV Luziferase mit verschiedenen Genomdeletionen. GFP-Fragmente wurden an der Hind III - Schnittstelle eingefügt, die mit einem Pfeil markiert ist.

Vor der Virusproduktion wurde überprüft, ob die Deletionen einen Einfluss auf die Genexpression hatten. Dazu wurden die klonierten Plasmide in HuH 7-Zellen, wie in 3.6.1. beschrieben, transfiziert und Luziferase-Aktivität quantifiziert (Abb. 3.26).

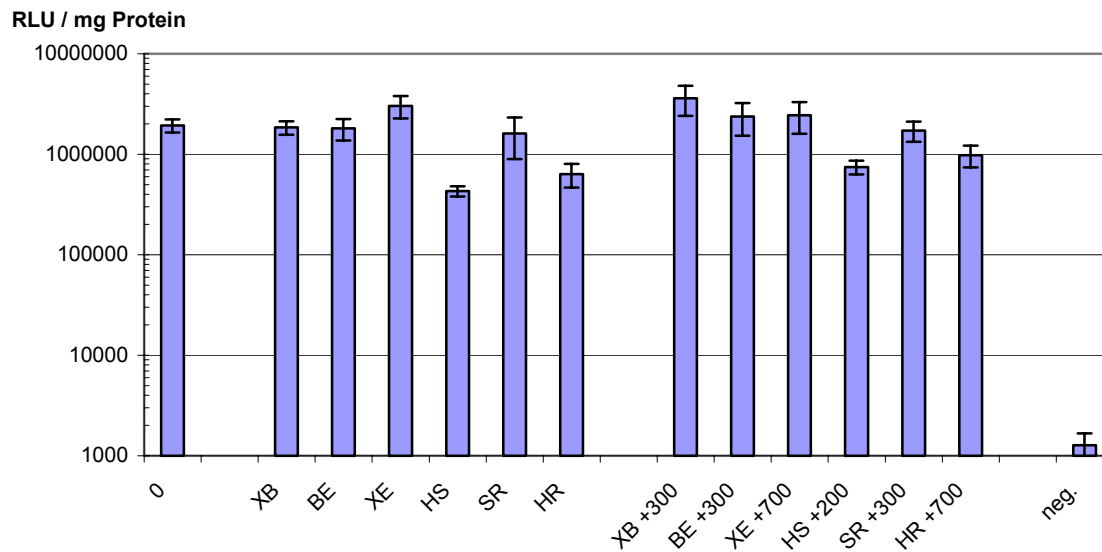


Abb. 3.26: HuH 7 - Zellen wurden mit Plasmiden, die zusätzliche Deletionen im HBV-Genom tragen, sowie einem GFP-exprimierenden Plasmid transfiziert. Die Zellen wurden am 4. Tag lysiert und die Luziferase-Aktivität gemessen. Die Werte sind auf Proteinmenge und Transfektionseffizienz normalisiert.

Die Zellysate aller Konstrukte, mit Ausnahme der Konstrukte "HS" und "HR", zeigten eine vergleichbare Luziferase-Expression wie das Ausgangsplasmid "0" (Abb. 3.26). Die Deletion "HS" entfernt den Enhancer 1, der die Genexpression des preS2-Promotors erhöht (Abb. 3.25). Das erklärt die niedrigere Expression dieser beiden Konstrukte. Die Insertion der GFP-Fragmente hat keinen Einfluss auf die Luziferase-Expression.

Mit den klonierten Konstrukten und dem Helfer (pCH 3142 An β -Glob) wurde, wie in 3.6.1. beschrieben, Virus produziert und analysiert (Abb. 3.27 a). Da alle Konstrukte vergleichbare Mengen viraler Partikel produzierten, sind PHH mit gleichen Mengen der verschiedenen HBV-Vektoren (ca. moi 100 VP/Zelle) infiziert worden. Am 4. Tag nach Infektion wurden die Zellen parallel zu einer unbehandelten Negativkontrolle lysiert und die Luziferase-Aktivität gemessen (Abb. 3.27 b).

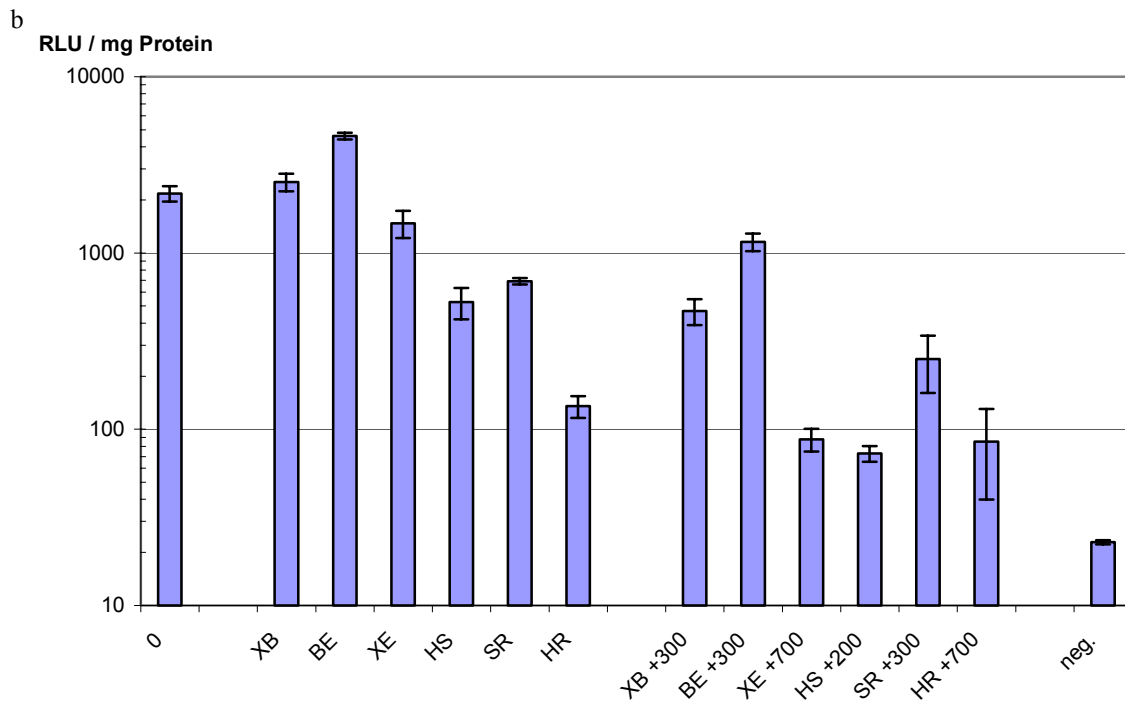
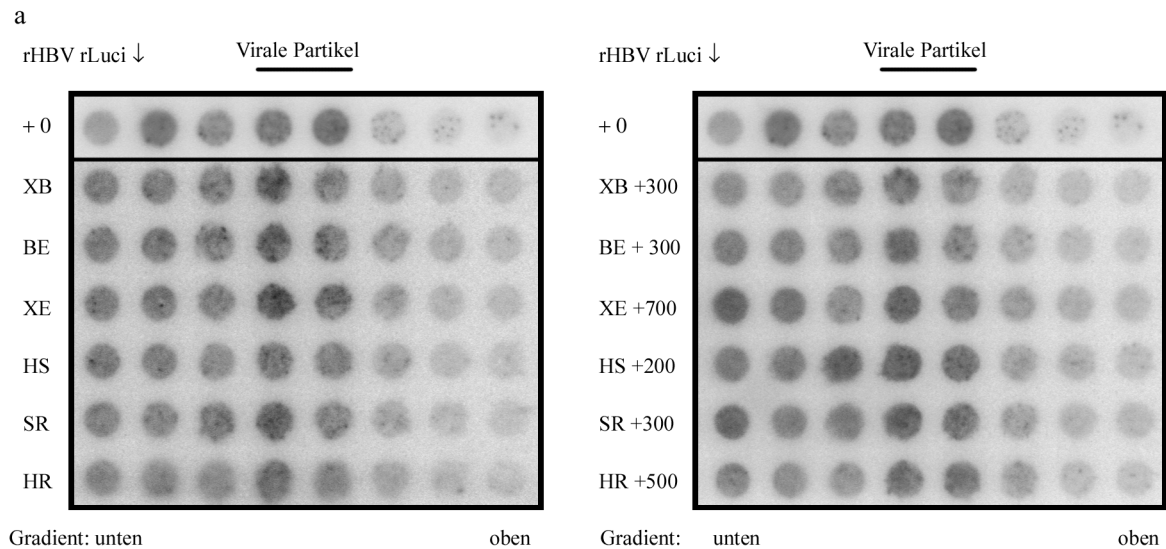


Abb. 3.27: HBV-Vektoren mit Genomdeletionen. (a) Die produzierten HBV-Vektoren sind in einen CsCl-Gradient sedimentiert worden (siehe 5.1.6). Die Fraktionen des Gradienten wurden im Dotblot aufgetragen und die viralen Partikel (VP) quantifiziert (siehe 5.1.7). (b) PHH wurden mit gleichen Mengen der verschiedenen HBV-Vektoren (ca. 10^7 VP/Zelle) infiziert. Am 4. Tag nach Infektion sind die Zellen parallel zu einer unbehandelten Negativkontrolle lysiert und die Luziferase-Aktivität gemessen wurden.

Bei der Produktion aller HBV-Vektoren wurden, unabhängig von in dem Genom eingeführten Deletionen und inserierten GFP-Fragmenten, die gleiche Menge viraler Partikel gebildet (Abb. 3.27a). Mit allen Konstrukten sekretierten die HuH 7-Zellen 6×10^7 VP/ml Kulturmedium. Nachdem PHH mit den Vektoren infiziert wurden, unterschieden sich die gemessenen Luziferase-Aktivitäten deutlich voneinander (Abb. 3.27b). HBV-Vektoren mit

der Deletion "XB" führten zu einer vergleichbaren Luziferase-Aktivität wie das Ausgangskonstrukt "0". Nach Infektion von PHH mit den HBV-Vektoren der Deletion "BE" wurde eine 3fach erhöhte Luziferase-Aktivität gemessen. Durch Kombination der beiden Deletionen wurde die Luziferase-Expression um 25% reduziert. Die Deletion "HS", die den Enhancer 1 entfernt, führte zu einer um 75% reduzierten Luziferase-Expression. Deletion "SR" hat eine niedrigere Expression als die Kontrolle "0", aber eine deutlich höhere als Deletion "HS". In diesem Experiment wurde die Luziferase-Expression nur um 60% gesenkt; der Unterschied ist in anderen Infektionsexperimenten deutlicher. Die Kombination der beiden Deletionen "HS" und "SR" führte zu dem größten Einbruch um 95%.

Durch die Insertion der GFP-Fragmente reduzierte sich die Genexpression nochmals 3-12fach, doch die relativen Änderungen der Luziferase-Expression durch die Deletionen blieben erhalten (rechte Seite Abb. 3.14b). Alle Werte lagen deutlich über der Negativkontrolle.

Keine der Deletionen inaktivierte die Vektoren. Auf die Reduktion der Genexpression wird in 3.5.4 exakter eingegangen. Besonders interessant ist die Deletion "BE", die unerwarteterweise zu einer erhöhten Genexpression führte.

3.5.3. Kombination verschiedener Genomdeletionen

Die Deletionen "BE" und "XE" hatten keine deutliche Reduktion der Luziferase-Expression zur Folge. Aus diesem Grund wurden sie mit der Deletion "SR" kombiniert, um die Transgenkapazität noch weiter zu erhöhen. In diese beiden Konstrukte wurden ebenfalls ein 700 bp Fragment an der Hind III - Schnittstelle inseriert (Abb. 3.28).

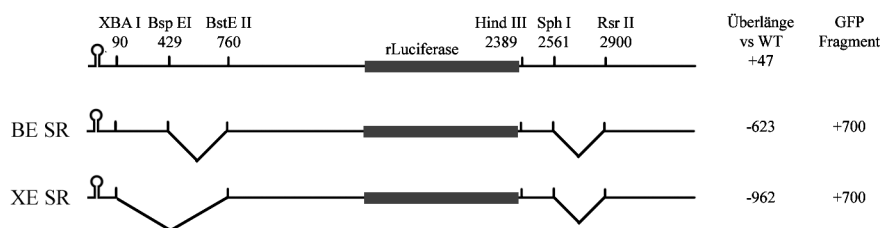


Abb. 3.28: rHBV Luziferase-Transferplasmide mit Kombinationen der verschiedenen Genomdeletionen.

Vor der Virusproduktion wurde durch Transfektion überprüft, ob die kombinierten Deletionen einen Einfluss auf die Genexpression haben. Dazu wurden HuH 7-Zellen, wie in 3.6.1. beschrieben, transfiziert und Luziferase-Aktivität gemessen (Abb. 3.29).

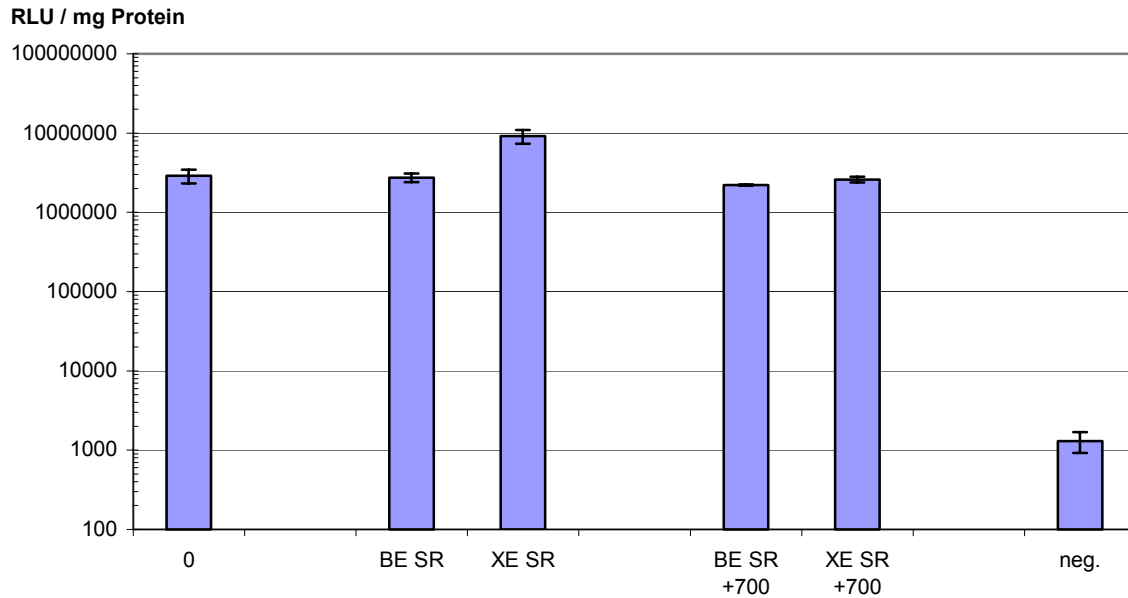


Abb. 3.29: HuH 7 - Zellen wurden mit den Plasmiden, die zwei zusätzliche Deletionen im HBV-Genom tragen, sowie einem GFP-exprimierenden Plasmid transfiziert und am 4. Tag lysiert. Die Werte sind normalisiert auf Proteinmenge und Transfektionseffizienz.

Alle Transfektionsansätze mit Ausnahme der des Konstruktes "XE SR" zeigten vergleichbare Luziferase-Expression wie der Ansatz des Ausgangsplasmides "0". Die Insertion der GFP-Fragmente änderte die Genexpression nicht. Die höhere Expression des Konstruktes "XE SR" ließ sich nicht mit inseriertem GFP-Fragment reproduzieren. Auch die Erhöhung der Expression durch die Deletion "BE" trat in Kombination mit der Deletion "SR" nicht auf.

Mit den klonierten Konstrukten und dem Helfer pCH 3142 An β -Glob wurde, wie in 3.6.1. beschrieben, Virus produziert und anschließend quantifiziert (Abb. 3.30 a). Da keine Unterschiede der Virustiter festzustellen waren, wurden PHH mit gleichen Mengen der verschiedenen HBV-Vektoren (ca. 10^6 VP/Zelle) infiziert. Die Zellen wurden am 4. Tag nach Infektion parallel zu einer Negativkontrolle lysiert und die Luziferase-Aktivität bestimmt (Abb. 3.30 b).

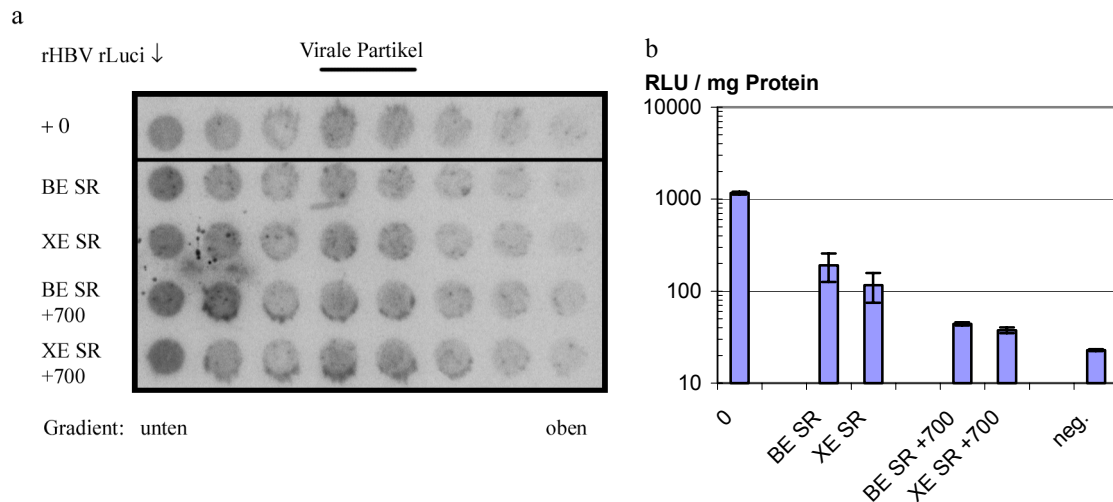


Abb. 3.30: HBV-Vektoren mit kombinierten Genomdeletionen. (a) Die produzierten HBV-Vektoren wurden in einen CsCl-Gradient sedimentiert (siehe 5.1.6). Die Fraktionen des Gradienten wurden im Dotblot aufgetragen und die viralen Partikel (VP) quantifiziert (siehe 5.1.7). (b) PHH sind mit gleichen Mengen der verschiedenen HBV-Vektoren (ca. moi 100 VP/Zelle) infiziert worden. Am 4. Tag nach Infektion wurden die Zellen parallel zu einer unbehandelten Negativkontrolle lysiert und die Luziferase-Aktivität quantifiziert.

Die Kombinationen der Deletionen führte, verglichen mit dem Ausgangskonstrukt "0", zu einer 10fach niedrigeren Luziferase-Expression. Die Reduktion ist stärker als bei Deletion "SR" in Abb. 3.27b beobachtet. Durch die Insertion der GFP-Fragmente reduzierte sich die Genexpression nochmals, die Werte liegen aber um den Faktor 2 über denen der Negativkontrolle. Damit waren die Vektoren trotz einer Genom-Unterlänge von 700 bp noch funktionell. Die Insertion einer nicht kodierenden GFP-DNA wurde schlecht toleriert.

3.5.4. Insertion großer Fremdgene in HBV-Vektoren mit verschiedenen Genomdeletionen

Alle bisher verwendeten Konstrukte zeigten geringere Luziferaseexpression nach Infektion der Viren, sobald ein nicht kodierendes GFP-Fragment an der Hind III-Schnittstelle inkloniert wurde. Dafür kann es mehrere Gründe geben. Durch die Insertion des Fragmentes wird der Enhancers 1 relativ zum preS2-Promotor verschoben, was möglicherweise seine Funktion einschränkt. Ein negativen Einfluss der GFP-Sequenz ist auch denkbar, z.B. durch dreidimensionale Faltung der RNA oder Einführung von Spleißsignalen. Um einen negativen Einfluss der inserierten Sequenz auszuschließen, wurden zwei neue Transgene verwendet. Als erstes Transgen wurde ein 1600 bp großes Gen inseriert, das ein Fusionsprotein aus GFP und Renilla-Luziferase exprimiert. Dieses würde die Vorteile eines quantitativen Testsystems mit

der Möglichkeit kombinieren, einzelne infizierte Zellen zu beobachten (Liu, 2000; Greer, 2002). Als zweites Transgen wurde das 1600 bp große Gen der Firefly-Luziferase ausgewählt. Damit wird in diesem Experiment der umgekehrte Weg eingeschlagen. Ein zu großes Transgen wird in die Transferplasmide kloniert und es wird versucht, ob eine oder zwei genomische Deletionen die Luziferase-Expression verbessern können. Als aussichtsreiche Deletionen wurde "BE" ausgesucht, da sie die Transgenexpression erhöht. Deletion "XE" wurde verwendet, da sie ein großes Fragment deletiert ohne die Transgenexpression zu beeinflussen. Zusätzlich wurden "BE SR" und "XE SR" ausgewählt (Abb. 3.31).

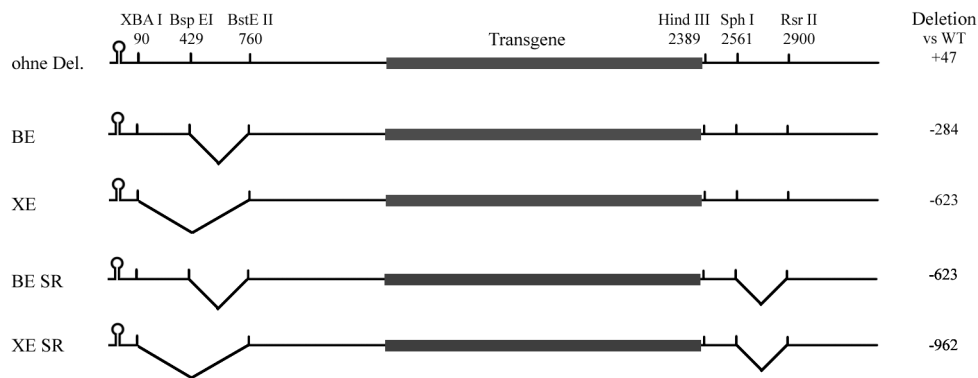


Abb. 3.31: rHBV Transferplasmide mit Kombinationen der verschiedenen Genomdeletionen.

Vor der Virusproduktion wurde überprüft, ob die Konstrukte eine vergleichbare Genexpression haben. Dazu wurden HuH 7-Zellen, wie in 3.6.1. beschrieben, mit den Plasmiden transfiziert und die Luziferase-Expression gemessen (Abb. 3.32).

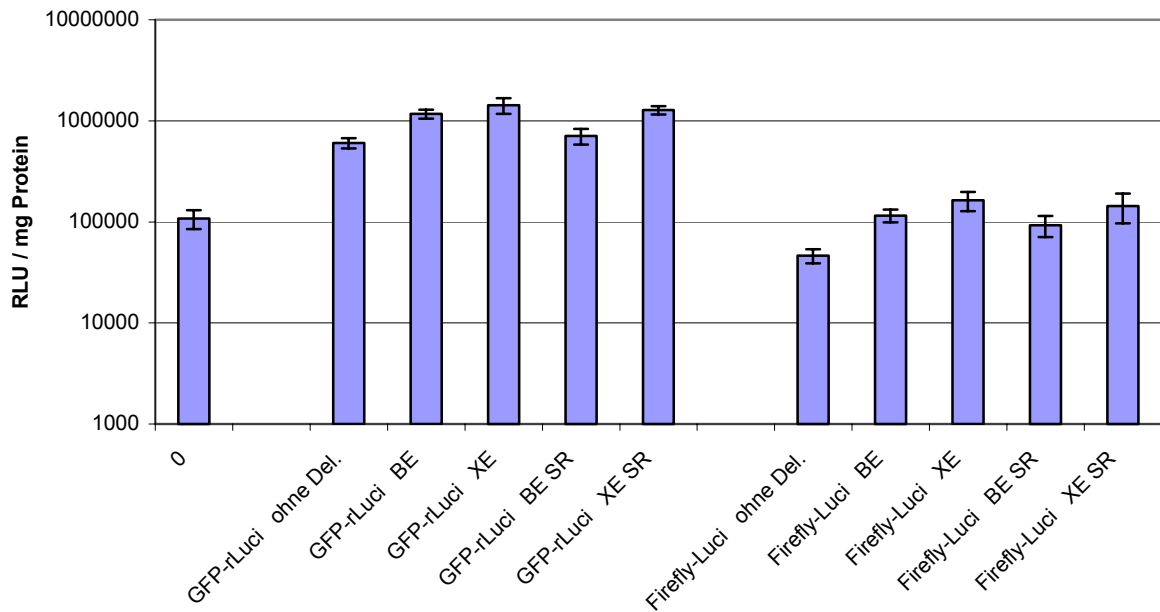


Abb. 3.32: HuH 7 - Zellen wurden mit den Plasmiden, die große Transgene tragen, oder dem Ausgangsplasmid "0" sowie einem GFP-exprimierenden Plasmid transfiziert. Am 4. Tag wurden die Zellen lysiert und Luziferase-Aktivität gemessen. Die Werte sind normalisiert auf Proteinmenge und Transfektionseffizienz.

Nach der Transfektion der Plasmide fiel auf, dass das Fusionsprotein aus GFP und Renilla-Luziferase eine etwa 10fach höhere Luziferase-Aktivität aufwies als Renilla-Luziferase allein. Die Aktivität der Firefly-Luziferase war mit der Renilla-Luziferase vergleichbar. Bei HuH 7-Zellen, die das Fusionsprotein exprimierten, konnte, im Vergleich zu GFP exprimierenden Zellen, eine etwas schwächere GFP-Fluoreszenz beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Nach Kotransfektion der klonierten Konstrukten mit dem Helfer (pCH 3142 An β -Glob) wurde, wie in 3.6.1. beschrieben, Virus produziert und analysiert (Abb. 3.33 a). PHH wurden mit den erhaltenen HBV-Vektoren infiziert. Die Vektoren, die das Fusionsprotein exprimierten, wurden in einer moi 100 VP/Zelle auf die Zellen gegeben. Die Firefly-Luziferase exprimierenden Vektoren, mit einer moi 50 VP/Zelle. Die Zellen wurden am 4. Tag nach Infektion lysiert und die Luziferase-Aktivität gemessen (Abb. 3.33 b).

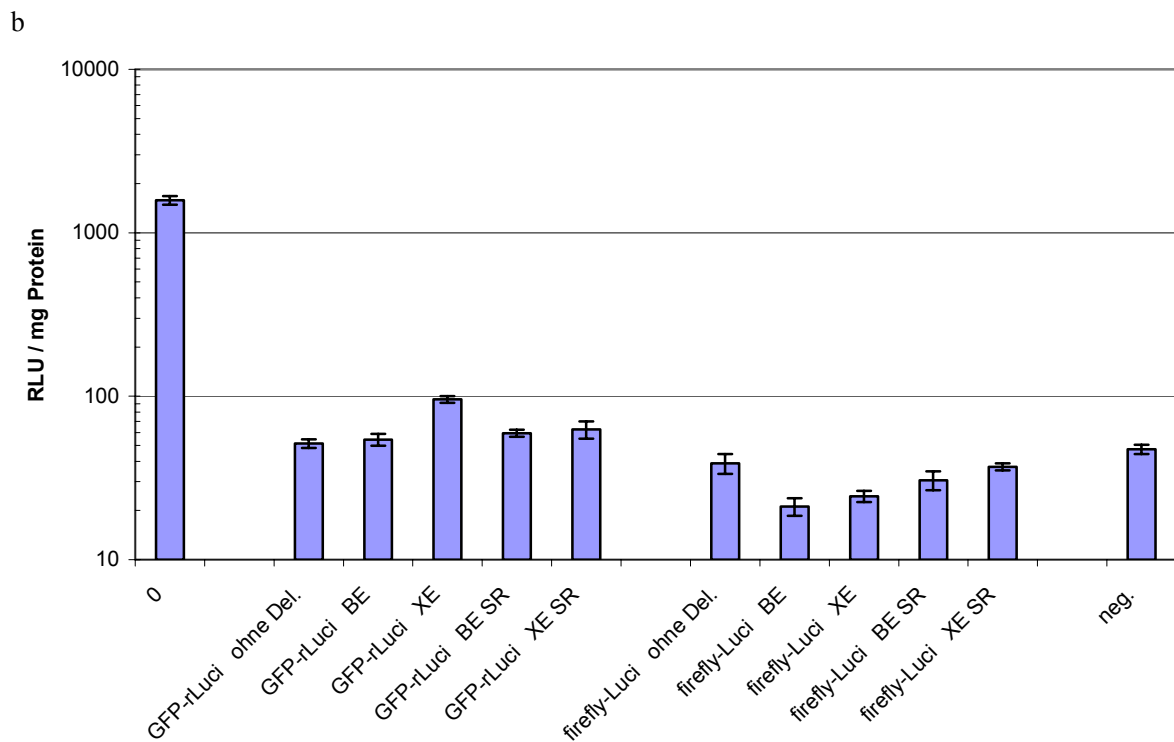
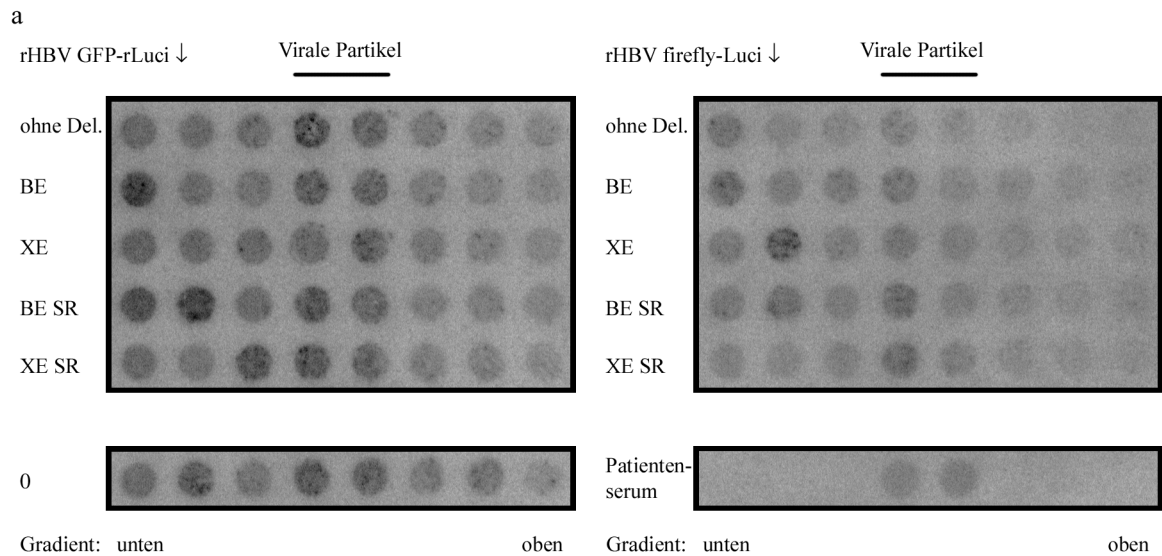


Abb. 3.33: Produktion und Funktionstest von rHBV mit großen Transgenen. (a) Die produzierten HBV-Vektoren wurden in einen CsCl-Gradient sedimentiert (siehe 5.1.6). Die Fraktionen des Gradienten wurden im Dotblot aufgetragen und die viralen Partikel (VP) quantifiziert (siehe 5.1.7). Zum Vergleich wurde Serum eines HBV-positiven Patienten aufgetragen. (b) PHH wurden wie beschrieben mit HBV-Vektoren infiziert. Die Zellen wurden am 4. Tag nach Infektion parallel zu einer unbehandelten Negativkontrolle lysiert und die Luziferase-Aktivität gemessen.

Die Vektoren mit dem Renilla-Luziferase-GFP als Transgen konnten in vergleichbaren Mengen zu dem Ausgangskonstrukt "0" produziert werden (4×10^7 VP/ml Kulturmedium). Die Titer der Viren mit dem Firefly-Luziferase-Gen lagen mit 1×10^7 VP/ml Kulturmedium deutlich niedriger.

Die verwendeten PHH ließen sich effizient infizieren, wie die hohe Luziferase-Aktivität der mit rHBV Luci ("0") infizierten Zellen zeigt. Bei Verwendung des GFP-Renilla-Luziferase Fusionskonstruktes war es nur mit der Deletion "XE" möglich, eine reproduzierbare Genexpression zu beobachten. Diese lag weit unter dem Wert, der bei der Kontrolle gemessen wurde, aber um den Faktor 2 über dem Hintergrundsignal. Es konnte keine GFP-Fluoreszenz in den infizierten PHH nachgewiesen werden. Alle anderen Konstrukte zeigten keine über das Hintergrundsignal hinausreichende Genexpression.

Eine Expression der Firefly-Luziferase konnte nach Infektion nicht nachgewiesen werden. In keinem der Infektionsexperimente war eine höhere Luziferase-Aktivität als die des Hintergrunds zu beobachten.

Durch Einführen der Deletion "XE" war es möglich, 1600 bp große Transgene mit HBV-Vektoren zu exprimieren. Die Genexpression lag jedoch nur um den Faktor 2 über dem Hintergrundsignal.

3.6. Ausblick: Wechselwirkung von HBV-Replikation auf die Apoptose-Induktion in PHH

Durch die Optimierung der Infektion PHH mit Wildtyp-HBV gelang es, PHH reproduzierbar zu infizieren. Damit war es möglich, den Einfluss replizierender HBV auf die Apoptose-Induktion zu untersuchen. Die Experimente in diesem Abschnitt wurden in Kooperation mit Henning Schulze-Bergkamen durchgeführt (aus dem Labor von Peter H. Krammer, DKFZ Heidelberg).

Hepatitis B Viren könnten Apoptose über irreguläre DNA-Synthese, Interferenz mit dem Zellzyklus oder Induktion von Typ 1 Interferonen auslösen (Tanaka, 1998). Andererseits haben viele Viren Mechanismen entwickelt, Apoptose zu verhindern. Im Tierversuch sinkt die Konzentration der vorhandenen HBV-DNA in der Leber, bevor es zu Apoptose kommt (Guidotti, 1999). Hepatozyten sind sensitiv gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose. So führt zum Beispiel die Aktivierung des Todesrezeptors CD95 (APO-1/FAS) zur Apoptose von Hepatozyten. CD 95, das zur Tumornekrosefaktor-Großfamilie (TNF) gehört, ist ein Typ I - Transmembranrezeptor, der konstitutiv auf Hepatozyten exprimiert wird. PHH bieten die Möglichkeit, den Einfluss von HBV-Replikation auf Todesrezeptor-vermittelte Apoptose in Abwesenheit eines Immunsystems zu untersuchen.

Dazu wurden PHH mit Wildtyp-HBV in verschiedenen *moi* infiziert. Aus den vorausgehenden Experimenten war bekannt, dass selbst bei einer *moi* 100 VP/Zelle nicht alle Zellen infiziert werden. Da nur bei diesen Zellen Effekte erwartet werden, kann es sein, dass die Effekte durch die Schwankungen im MTT-Assay überlagert werden. Eine Alternative zur Infektion mit HBV stellt die Transduktion der Zellen mit einem HBV-Genom durch adenovirale Vektoren (Sprinzl, 2001) dar. Sie ermöglicht bei einer *moi* 3 VP/Zelle in jede Zelle ein Genom zu transferieren. Am 6. Tag nach Infektion wurde die Viabilität der Zellen im MTT-Test bestimmt (Hussain, 1993). Bei einem Teil der Zellen wurde Apoptose mit einem trimerisierenden Antikörper gegen CD 95 (Anti-Apo-1) ausgelöst (Peter, 1998). Der MTT-Test wurde von Henning Schulze-Bergkamen durchgeführt (Abb. 3.8).

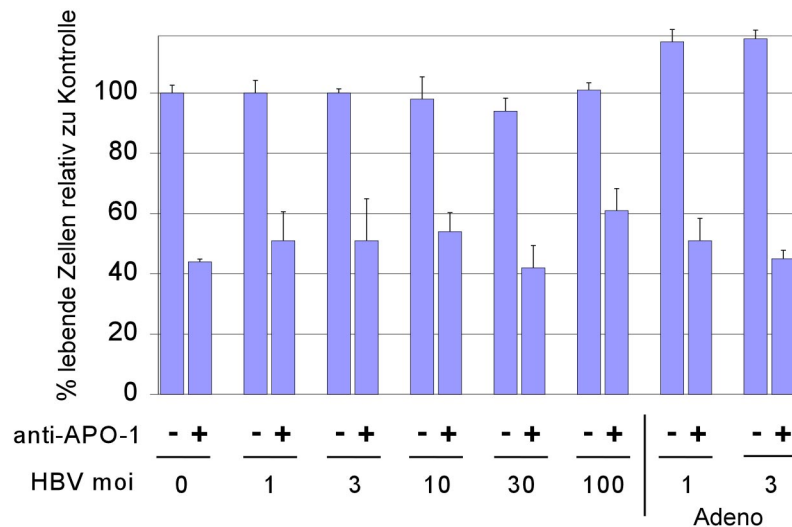


Abb. 3.34: Apoptose-Induktion in PHH nach Infektion mit rHBV. PHH wurden am 2. Tag nach Aussaat mit HBV oder Adeno-HBV in verschiedenen moi infiziert und am 6. Tag nach Infektion mit 1 µg / ml Anti-APO-1 für 6 h behandelt. Die Viabilität der Zellen wurde im MTT-Assay bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle wurde als 100 % definiert. Alle Experimente wurden dreimal durchgeführt, angegeben ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung. (MTT-Assay von Henning Schulze-Bergkamen durchgeführt)

Intrazelluläre HBV-Replikation führte nicht zu einer Reduktion der Viabilität. Es konnte keine spontane Apoptose nach Infektion der PHH, weder mit Wildtyp-HBV noch nach Transduktion durch adenovirale Vektoren, nachgewiesen werden. Die Induktion CD95-vermittelter Apoptose zeigte keine wesentlichen Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen. Die Daten deuten darauf hin, dass HBV-Replikation keinen Einfluss auf die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose von PHH hat.

4. Diskussion

4.1. PHH als Infektionssystem

Hepatitis B Viren (HBV) zeigten eine hohe Wirts- und Zellspezifität. Sie infizieren nur Menschen und Schimpansen, bei denen die Replikation der Viren auf die Leber beschränkt ist. Bisher waren primäre humane Hepatozyten (PHH) das einzige System, in dem Infektionsversuche mit HBV oder HBV-Vektoren durchgeführt werden konnten. Dies war eine der größten Limitierungen, der die HBV-Forschung im Moment unterworfen ist.

PHH werden aus frischen Leberstücken isoliert, welche von den Chirurgen noch im OP von Leberresektaten abgeschnitten werden (nach Berry, 1969; Reese, 1981; Guguen-Guillouzo, 1983; Hsu, 1985; Berry, 1997). Verschiedene Präparationen isolierter PHH unterscheiden sich stark untereinander, und die Zellen teilen sich nicht mehr in Zellkultur (Galle, 1994). Dadurch wurde die Auswertung von Experimenten sehr erschwert. Bis heute ist kein einfaches System für Infektionsversuche mit HBV verfügbar, weshalb viele Fragestellungen mit verwandten Viren, wie zum Beispiel Enten-HBV, bearbeitet werden.

Neuste Berichte über eine infizierbare Hepatomazelllinie, HepaRG, stimmen optimistisch (Gripon, 2002). Dennoch ist die Handhabung dieser Linie nicht unkompliziert, da die Zellen in zwei Ausdifferenzierungen vorliegen können. In der einen Ausdifferenzierung sind sie in der Lage, sich zu teilen und können dadurch vermehrt werden. In diesem Zustand haben sie nur wenige leberspezifische Eigenschaften. Durch Verwendung eines anderen Mediums, das 2 % DMSO enthält, können die Zellen nach einigen Wochen in die andere Ausdifferenzierung überführt werden. In diesem Zustand sind sie mit HBV infizierbar und weisen viele lebertypische Eigenschaften auf, wie Albumin- oder Aldolase B-Produktion. Für meine Experimente war diese Linie nicht verfügbar, deshalb musste auf PHH zurückgegriffen werden.

Bei der Etablierung der PHH-Kulturen konnte gezeigt werden, dass Polyethylenglykol (PEG) die Infizierbarkeit der PHH erhöht. Dieser Effekt war aus der Literatur bekannt (Gripon, 1993). PHH, die mit gleichen Mengen HBV infiziert wurden, produzierten in meinen Experimenten 8-10fach mehr Antigen, wenn 5 % PEG während der Infektion zugegeben wurde. Die Infektion blieb mit einem inhibierenden Antikörper komplett blockierbar. In meinen Experimenten konnte auch eine Infektion ohne PEG beobachtet werden. In Publikationen gab es zu diesem Punkt widersprüchliche Daten, da einerseits Infektion gezeigt wurde (Galle, 1994) und andererseits keine reproduzierbaren Infektionen festgestellt werden konnten (Gripon, 1993).

Als letzter Punkt wurde untersucht, wie lange PHH infizierbar bleiben und wie lange eine Antigen-Expression der Wildtyp-Viren nachweisbar ist. Es war beschrieben, dass sich PHH über 4-6 Wochen kultivieren lassen und dass die Antigenexpression nach dem 12. Tag abnimmt (Galle, 1994). Die Kulturdauer von über dreißig Tagen ließ sich mit meinen PHH-Präparationen reproduzieren. Die Antigenproduktion nach Infektion war jedoch über einen längeren Zeitraum auf hohem Niveau stabil und endete erst, als die Zellen anfangen zu sterben. Die Infizierbarkeit der Zellen nahm zwar mit zunehmender Kulturdauer ab (in Übereinstimmung mit Galle, 1994), dennoch war ein kleiner Teil der Zellen auch noch nach 27 Tagen nach Ausplattieren infizierbar.

Die Antigenexpression der PHH war linear abhängig von der Menge an viralen Partikeln im Inokulum. Wurden PHH mit der doppelten Menge HBV infiziert, so verdoppelte sich auch die Antigenproduktion der Zellen. Diese Abhängigkeit blieb bis zu einer moi 100 VP/Zelle bestehen, dem höchsten getesteten Wert. Das ist unerwartet, da alle infizierbaren PHH ab einer bestimmten Viruskonzentration infiziert sein sollten. Dies ließ sich auch mit GFP exprimierenden Vektoren reproduzieren; eine Verdoppelung der Virusmenge führte immer zu der doppelten Anzahl GFP positiver PHH, obwohl eine hohe moi verwendet wurde.

Dies wirft eine Frage auf: Warum ist die Infektion bei PHH-Kulturen so ineffizient, dass selbst in Konzentrationen von hundert viralen Partikeln pro Zelle die Infektion nicht gesättigt ist? Die Gründe dafür können auf der Seite der Zellen oder auf der Seite der Viren liegen.

Auf der Seite der Zellen müssen zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen werden. Es ist denkbar, dass nicht alle Viren die Zellen erreichen, oder, dass nicht alle Zellen einer Kultur gleichgut infizierbar sind. Ersteres wäre der Fall, wenn eine physikalische Barriere verhindert, dass die Viren die Zellen erreichen. Dies könnte zum Beispiel eine extrazelluläre Matrix sein, die von PHH sekretiert wird. Wenn nur ein Virus aus hundert diese Barriere überwindet, so würde das die Ergebnisse erklären. Erhöht man die Konzentration der Viren, so würden proportional mehr Viren diese Barriere überwinden. Auch der Effekt des PEG ließe sich durch einer Schwächung der Barriere gut erklären. Dagegen spricht, dass adenovirale Vektoren ab einer moi 3 VP/Zelle über 95 % der Zellen einer PHH-Kulturen infizieren können. Falls es diese physikalische Barriere gibt, so müsste sie selektiv für HBV sein, was nur schwer denkbar ist.

Der zweite Fall, dass nicht alle Zellen einer Kultur zu jedem Zeitpunkt infizierbar sind, kann wieder mehrere Ursachen haben. PHH-Kulturen sind mit einem Teil Endothelzellen und Kupferzellen verunreinigt. Es wäre denkbar, dass HBV von Endothelzellen aufgenommen wird und von diesen an die PHH transzytiert wird (Breiner, 2001a). Dann wären nur PHH in

unmittelbarer Umgebung von Endothelzellen infizierbar. Gegen dieses Modell spricht die HepaRG-Zelllinie, die nur aus einer Zellpopulation besteht und infizierbar ist. Aus diesem Grund scheint die Limitierung auf der Seite jeder einzelnen Zelle zu liegen. Denkbar wäre, dass der Zellzyklus oder die Konzentration des unbekanntes Rezeptors auf der Membran eine Rolle spielt. Bekannt ist, dass die Infektion ein langsamer Prozess ist und die Zellen über sechzehn Stunden mit dem Virus inkubiert werden müssen, um eine optimale Infektion zu erhalten (Ganem, 1996). Im Entenmodell führte eine Verlängerung der Infektionsdauer zu mehr infizierten Zellen und die Anzahl DHBV infizierter Zellen nahm ebenfalls linear mit der Menge an Virus im Inokulum zu (Klöcker, 2002; T. Kürschner, persönliche Mitteilung). Das spricht dafür, dass Zellen in der gleichen Kultur zu unterschiedlichen Zeiten infizierbar sind. Die Beobachtung, dass die Infizierbarkeit der Zellen mit der Kulturdauer abnimmt, deutet auch darauf hin, dass Veränderungen der Zellen in Kultur die Infizierbarkeit bestimmen.

Auf Seite der Viren stellt sich folgende Frage: Wie infektiös sind die produzierten Viren? Virustiter werden in Ermangelung einer gut infizierbaren Zelllinie als membranumhüllte, DNA-enthaltende Partikel bestimmt, die in der Dichte von HBV aus Patientenserum sedimentieren. Es ist unsicher, ob jedes dieser Partikel infektiös ist. Sollte weniger als einer aus hundert infektiös sein, so wäre erst ab einer moi über 100 VP/Zelle jede Zelle infiziert. Dafür spricht, dass auch defekte Partikel effizient umhüllt und sekretiert werden können, wie im Fall von HBV-Vektoren mit Genomüberlängen gezeigt werden konnte. Dagegen spricht, dass im DHBV-System Infektionsereignisse bis zu einer moi von 0.001 VP/Zelle in Zellkultur nachgewiesen werden konnten (Klöcker, 2002). In vivo genügen kleinste Virenmengen, um die Leber einer Ente zu infizieren. Schon ein einziges Virus ist dafür ausreichend (Jilbert, 1996). Die Situation bei HBV ist ähnlich. Geringe HBV-Mengen, wie sie bei Nadelstichverletzungen übertragen werden, reichen aus, um betreffende Person zu infizieren. Die großen Unterschiede, die zwischen der Infektion in Zellkultur und Infektion in Versuchstieren beobachtet wurden, lassen sich nicht ohne ein deutlich effizienteres Infektionssystem, das den Nachweis einzelner infektiöser Partikel ermöglicht, beantworten. Die etablierten PHH-Kulturen waren in ihrer Qualität mit denen von P. Gripon isolierten vergleichbar, da Infektionen mit demselben Virusstock in Heidelberg und in Rennes ähnliche Ergebnisse lieferten (Daten nicht gezeigt).

4.2. Verbesserung des Infektionsnachweises

Bisher konnten einzelne infizierte Zellen nur über das vom Transferplasmid produzierte GFP nachgewiesen werden. Das GFP wird nur exprimiert, wenn alle frühen Schritte im Replikationszyklus durchlaufen sind. Das beinhaltet die Aufnahme des Virus, den Transport in den Kern, das Schließen der cccDNA, die Transkription der mRNA im Kern, deren Transport in das Zytoplasma und deren Translation. An dieser Stelle produziertes GFP akkumuliert im Zytoplasma und ist nach 5 bis 7 Tagen mit dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar (Protzer, 1999). Es war bekannt, dass der preS2/S-Promotor gegen einen CMV-Promotor ausgetauscht werden konnte, ohne dass die Viren ihre Infektiosität verlieren (Untergasser, 2001). Diese Vektoren zeichnen sich durch eine schnellere und stärkere GFP-Fluoreszenz in PHH aus, jedoch verlieren sie einen Teil ihrer Leberspezifität, die durch den preS2/S-Promotor und Enhancer 2 gewährleistet wird (Benedict Yen, 1993).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der preS2/S-Promotor auch durch einen TTR-Promotor ersetzt werden kann. Diese Vektoren zeichnen sich durch eine schnelle, hohe GFP-Expression bei erhaltener Leberspezifität des Promotors aus (Costa, 1991). Sie sind gut geeignet, um einzelne infizierte Zellen nachzuweisen.

Eine Quantifizierung der infizierten Zellen mit dem FACS gelang aufgrund der starken Hintergrundsignale und Empfindlichkeit der PHH beim Ablösen nicht (Schulze-Bergkamen, 2002). Die Zellen im Mikroskop auszuzählen, ist sehr umständlich. Aus diesem Grund wurden Luziferase exprimierende HBV-Vektoren entwickelt. Mit diesen Vektoren vereinfachte sich der Nachweis drastisch, da die Zellen nach Infektion nur noch lysiert werden müssen und im Luminometer die Luziferase-Aktivität gemessen werden muss.

Unterschiede in der Genexpression unter Kontrolle der verschiedenen Promotoren sollten nach Transfektion der Transferplasmide in HuH 7-Zellen quantifiziert werden. Die Expression unter dem preS2/S-Promotor war, verglichen mit den Fremdpromotoren, um 90 % niedriger. Wurden Vektoren mit diesen Transferplasmiden produziert und PHH infiziert, so exprimierte unter dem preS2/S-Promotor jedoch 3mal mehr Luziferase.

Dies ist ein sehr unerwartetes Resultat, da es den Ergebnissen mit GFP exprimierenden Vektoren widerspricht und nur nach Infektion von PHH auftrat. Obwohl das Konstrukt und die Zellen identisch sind, führte der TTR-Promotor zu einer deutlich stärkeren GFP-Expression als der preS2/S-Promotor. Wird anstelle des GFP Luziferase exprimiert, so ist die Expression unter dem preS2/S-Promotor 3fach stärker. Dies kann einerseits durch die Veränderungen der DNA erklärt werden, die eine unterschiedliche Genexpression zur Folge

haben können. Andererseits ist, möglicherweise durch exprimierte Genprodukte, eine unterschiedliche Regulation der Promotoren denkbar.

Wenn man in diesem Zusammenhang die Veränderungen der DNA betrachtet, so fällt auf, dass die Sequenz des GFP 200 bp kürzer ist als die Sequenz der Luziferase. Dadurch ist der Enhancer I im Fall des GFP näher an dem Promotor. Es ist bekannt, dass der Enhancer I sowohl den preS2/S-Promotor als auch andere Promotoren aktivieren kann (Benedict Yen, 1993). Vorausgesetzt, dass der Enhancer I auch den TTR- und CMV-Promotor aktiviert, wäre es denkbar, dass eine Verkürzung des Abstandes zwischen Enhancer I und Promotor eine Rolle spielt und bei einem GFP zu einer stärkeren Aktivierung der Fremdpromotoren führt. Wurden HBV-Vektoren mit Genomüberlängen konstruiert, so hatte eine Erhöhung des Abstandes zwischen Promotor und Enhancer 1 jedoch eine deutlich geringere Genexpression zur Folge. Extrapoliert man die Ergebnisse aus den Überlängenkonstrukten, so müsste für ein kürzeres Transgen eine höhere Genexpression erwartet werden. Andererseits wäre denkbar, dass in der GFP- oder der Luziferase-Sequenz weitere aktivierende oder inhibitorische Elemente enthalten sind, die nur auf einen der Promotoren wirken.

Es ist auch möglich, dass der Effekt nicht auf Ebene der Transkription liegt. Die RNA-Polymerase beginnt schon in der Promotorregion mit der Transkription und RNAs haben daher unterschiedliche 5' Enden. Dies kann in Kombination mit der Transgensequenz zu einer unterschiedlichen RNA-Stabilität führen, die eine unterschiedliche Genexpression zur Folge haben kann. Alle diese Effekte ließen sich im Prinzip durch einfache molekularbiologische Experimente klären, in denen Plasmide kloniert und transfiziert werden. Da diese Effekte nur in PHH auftreten und PHH nicht transfizierbar sind, ist dieser Weg versperrt. Für jedes Konstrukt müsste ein Vektor konstruiert werden, was die Arbeit sehr erschwert. Zudem ist nicht sicher, ob alle Vektoren gleich infektiös sind.

Denkbar ist auch, dass die Zellen die verschiedenen Promotoren, als Reaktion auf das Transgen, unterschiedlich regulieren. Genexpression von HBV wird als Reaktion auf Cytokine reduziert (Guidotti, 1994). Die Viren können dadurch in einem Teil der Fälle dem Immunsystem entkommen. Daraus folgt, dass die HBV-Promotoren auf den Zustand der Zelle oder intrazellulären Mediatoren reagieren können. Es ist bekannt, dass GFP toxisch auf Hepatomazelllinien wirkt und in der Lage ist, Apoptose auszulösen (Liu, 1999). Es wäre also auch denkbar, dass der preS2/S-Promotor von der Zelle, die durch GFP in Mitleidenschaft gezogen wurde, herunterreguliert wird. Renilla-Luziferase führt nicht zu einer Apoptose-Induktion, aus diesem Grund würde die Herabregulierung des preS2/S-Promotors

unterbleiben. Geht man davon aus, dass diese Regulation bei dem CMV- und TTR-Promotor jedoch unterbleibt, wären die Unterschiede erklärbar.

4.3. Erhöhung der Transgenkapazität

Eine der wichtigsten Kenngrößen eines jeden Vektorsystems ist die Transgenkapazität. Sie limitiert die Auswahl der Transgene, die in dem Vektorsystem verwendet werden können. Bisher wurde die Transgenkapazität der HBV-Vektoren nicht genauer untersucht, und es waren nur Transgene bis zu einer Größe von 750 bp verwendet worden. Die zuvor beschriebenen Renilla-Luziferase exprimierenden HBV-Vektoren machen es nun möglich, die Genexpression der Viren zu quantifizieren. Dadurch können geringe Unterschiede zwischen Viruspräparationen festgestellt werden.

In einem ersten Schritt wurde die Überlängkapazität der HBV untersucht. In 100 bp Schritten wurden HBV mit Überlängen produziert, und es zeigte sich, dass nach Infektion die Luziferase-Expression schon ab der Insertion 100 bp langer Stücke abnimmt und bei einer Überlänge des Genoms von über 450 bp auf Null zurückgeht. Obwohl Vektoren mit den verschiedenen Konstrukten in vergleichbaren Titern produziert werden konnten, gab es also große Unterschiede der Transgenexpression nach Infektion. Daraus ergab sich folgende Frage: Welcher Anteil der im Dotblot quantifizierten Partikel ist infektiös? Es wurde gezeigt, dass die reverse Transkription im Kapsid ab einer Überlänge von 300 bp fehlerhaft wird (Chiang, 1992). Es wurden in diesem Fall lineare Genome anstelle von ringförmig geschlossenen Genome gebildet. Da kein Unterschied in der Produktion viraler Partikel beobachtet werden konnte, scheint die Verpackung von Kapsiden mit Genomüberlängen nicht beeinträchtigt zu sein. Lineare Genome sind in der Lage, cccDNA zu formen, die meist aufgrund von Deletionen replikationsinkompetent ist (Yang, 1996). Es ist unklar, wie effizient dieser Mechanismus ist, und ob Viren mit einem linearen Genom ebenso infektiös sind wie Viren mit einem zirkulären Genom. Sollte eine Interferenz mit der reversen Transkription bei weniger als 5 % der Viren zu einer zirkulären DNA führen, so ist der Luziferasetest nicht mehr sensitiv genug, um einen Anstieg der Aktivität nachzuweisen.

In einem zweiten Schritt sollte die Transgenkapazität durch weitere genomische Deletionen erhöht werden. Auf virale Proteine musste dabei keine Rücksicht genommen werden, da in den Vektoren alle ORF durch Stop-Kodons ausgeschaltet sind und bei der Vektorproduktion von einem Helferplasmid in trans zur Verfügung gestellt werden. Dennoch gibt es auf dem Genom cis-aktive Signale, die nicht deletiert werden dürfen. Chiang hatte in seiner Promotionsarbeit Sequenzen beschrieben, die nicht deletiert werden konnten, ohne dass die

reverse Transkription dadurch beeinflusst wird. Dieses sogenannte RC-Element wurde bei allen hier verwendeten Vektoren unverändert belassen (Chiang, 1992). Um weitere Deletionen einzuführen, mussten also Regionen ohne cis-aktive Sequenzen identifiziert werden. Dafür lagen eine Region 5' des RC-Elements, und eine Region am 3' Ende des Transgens nahe.

Keine der Deletionen am 5' Ende hatte einen negativen Effekt auf die Transgenexpression nach Infektion, die Deletion der Nucleotide 429-760 (BE) erhöhte sogar die Transgenexpression 3-6fach. Möglicherweise bringt diese Deletion das Transkript unter die Kontrolle des Core-Promotors oder begünstigt den Einfluss der Enhancer auf den Promotor.

Die Deletion am 3' Ende wurde an Position 2514 in zwei kleinere Deletionen unterteilt und getestet. Alle Deletionen, welche die Sequenz zwischen dem Transgen und der Position 2514 entfernten, führten zu einer deutlich niedrigeren Genexpression. Das war nicht unerwartet, da in diesem Bereich der Enhancer 1 liegt. Dieser Enhancer hat einen positiven Effekt auf alle viralen Promotoren (Benedict Yen, 1993), was sich auch nach Transfektion der Plasmide in HuH 7-Zellen bestätigte. Die Deletion der Nukleotide 2514-2853 (SR) hatte keinen oder nur einen geringen, negativen Effekt auf die Genexpression.

Wurde zur Simulation eines größeren Transgenes ein Fragment GFP-DNA an das Transgen angehängt, so dass die Viren eine leichte Überlänge bekamen, so brach in allen Fällen die Genexpression deutlich ein, die relativen Verhältnisse der Luziferase-Expression zueinander blieben jedoch erhalten. Mit Ausnahme der erwähnten Konstrukte, in denen der Enhancer I deletiert wurde, fand sich bei allen Konstrukten eine vergleichbare Genexpression nach Transfektion in HuH 7-Zellen. Daraus folgt, dass die Unterschiede der Luziferase-Expression nach Infektion nicht auf unterschiedlicher Genexpression der Genome beruhten.

Alle weiteren Veränderungen der HBV-Vektoren führten zu einer deutlich niedrigeren Genexpression nach Infektion. Dennoch gelang es, die Genexpression eines 1600 bp großen Fusionsproteins reproduzierbar nachzuweisen.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die in antisense inserierte GFP-Sequenz einen negativen Einfluss auf die Expression des Transgens hat, wurden die vielversprechendsten Konstrukte ausgewählt und zwei große Transgene inkloniert. Hierfür wurde einmal die 1,6 kb große Firefly-Luziferase benutzt. Nach Infektion der PHH konnte aber bei keinem der Firefly-Luciferase-Konstrukte eine Luciferase-Expression nachgewiesen werden. Als zweites Transgen wurde ein Fusionsprotein aus GFP und Renilla-Luziferase ausgewählt, da es die Vorzüge beider Systeme kombiniert. Es erlaubt, einzelne, infizierte Zellen durch die GFP-Fluoreszenz des Fusionsproteins zu detektieren und die Infektionseffizienz über Luciferase-

Expression zu quantifizieren (Liu, 2000; Greer, 2002). Die Renilla-Luziferase und die Firefly-Luziferase zeigten untereinander eine vergleichbare Luziferase-Aktivität. Im Vergleich zur Renilla-Luziferase war die Aktivität des Fusionsproteins etwa 10fach erhöht. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass das Fusionsprotein eine längere Halbwertszeit in den Zellen hat. Nach Infektion mit einem HBV-Vektor mit der genomischen Deletion der Nukleotide 91-760 (XE) konnte eine Luziferaseaktivität gemessen werden, die um den Faktor 2 über dem Hintergrundsignal lag. Es konnte aber keine eindeutige GFP-Fluoreszenz des Fusionsproteins nachgewiesen werden. Wahrscheinlich ist die vorhandene Menge des Fusionsproteins für einen Nachweis im Fluoreszenz-Mikroskop nicht ausreichend.

Zwei wichtige Erkenntnisse wurden bei der Optimierung der HBV-Vektoren gewonnen. Ist man nicht auf die Verwendung eines größeren Transgenes angewiesen, so ist es sinnvoll, die Nukleotide 429-760 (BE) in dem Vektor zu deletieren. Die Transgenexpression wird dadurch deutlich erhöht. Die Deletion der Nukleotide 91-760 (XE) ermöglicht es auf der anderen Seite, Transgene von einer Größe maximal 1600 Bp mit den HBV-Vektoren in PHH zu exprimieren, dabei muss aber mit zunehmender Größe des Transgens eine Abnahme der Genexpression in Kauf genommen werden.

4.4. Produktion und Nachweis der Expression von Interferon exprimierenden Viren

Die HBV-Vektoren wurden auch im Hinblick auf eine mögliche Anwendung in der Gentherapie entwickelt (Protzer, 1999). Die Vektoren könnten zur Therapie von chronischer Hepatitis B und C eingesetzt werden und therapeutisch wirksame Interferone in der Leber produzieren. Da die Expression dieser Interferone auf die Leber beschränkt sein sollte, ist die Hoffnung, dass auf diesem Weg höhere Interferonkonzentrationen in der Leber bei tolerablen Nebenwirkungen erreicht werden können. Dies ist ein Vorteil gegenüber einer systemischen Interferonbehandlung, da dabei in vielen Fällen aufgrund starker Nebenwirkungen die Interferondosis reduziert werden muss.

Die Behandlung eines Menschen oder Schimpansen stellt die Virus-Produktion vor neue Herausforderungen. Da HBV-Vektoren replikationsdefizient sind, ist die primäre Infektion der wichtigste Schritt der Behandlung. Es müssen möglichst viele Zellen infiziert werden, um eine ausreichende Genexpression zu erhalten. Werden Interferone exprimiert, ist es aber nicht notwendig, jede einzelne Zelle zu infizieren, da sie sekretiert werden und auf die Nachbarzellen einwirken (Samuel, 2001). Werden etwa 10^{11} virale Partikel infiziert, so

entspricht das einem Virus pro Hepatozyte. Um diese Menge zu erhalten, wurde versucht, die Produktion und die Anreicherung der Viren zu optimieren. Selbst eine Verbesserung um den Faktor 2 hätte eine deutliche Reduktion der Produktionskosten und des damit verbundenen Aufwandes zur Folge gehabt. Mehrere Faktoren wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Durch Verwendung von FuGENE 6[®] bei der Transfektion und anschließender Kultivierung der Zellen in PHH-Medium konnte die Ausbeute an viralen Partikeln um das 8-10fache gesteigert werden. Da durch Lipofektion deutlich weniger Zellen starben und eine höhere Transfektionseffizienz erreicht wurde, waren mehr transfizierte Zellen vorhanden. Das führte zu einer verbesserten Vektorproduktion.

Ein Teil der Arbeit beschäftigte sich mit dem Entwickeln von Interferon exprimierenden HBV-Vektoren. Die Interferon exprimierenden Vektoren konnten produziert werden. Im Souternblot war nachzuweisen, dass virale Partikel zirkuläre HBV-DNA enthielten. In einigen Experimenten konnte nach Infektion von PHH mit Interferon gamma exprimierenden HBV-Vektoren eine Transgen-Expression nachgewiesen werden. In anderen Versuchen gelang das nicht. Dafür kann es mehrere Gründe geben. Es ist nur ein kleiner Teil der PHH infizierbar, der je nach Präparation zwischen 1 % und 10 % schwankt. Im DHBV-System ließ sich belegen, dass der Rezeptor nach der Infektion herunterreguliert wird (Breiner, 2001b). Wahrscheinlich dringt nur jeweils ein Partikel in eine Zelle ein, das heißt im Fall der Vektoren nur eine Transkriptions-Matrize. Das hat zur Folge, dass nur ein Genom pro Zelle enthalten ist und nur in einem kleinen Teil der Zellen mRNA von einem Genom abgeschrieben wird. Wahrscheinlich reicht die Sensitivität des verwendeten Tests nicht aus, um diese kleine Menge nachzuweisen. Bei den Luziferase exprimierenden Konstrukten war die Genexpression nach Transfektion der Plasmide um den Faktor 1000 höher als nach Infektion mit den produzierten Vektoren. Wenn die Interferon exprimierenden Konstrukte einen ähnlichen Unterschied zwischen Transfektion und Infektion aufweisen, wovon man ausgehen kann, ist die RT-PCR für einen Nachweis bei niedrigen Infektionseffizienzen nicht mehr sensitiv genug. Eine andere Möglichkeit besteht in einer negativen Wechselwirkung des Interferons auf die eigene Transkription. Interferone sind in der Lage, virale Replikation in den Zellen zu beenden, ohne diese zu zerstören (Guidotti, 1999). HBV-Vektoren verhalten sich in den Zellen wie Viren, und deshalb ist es nicht ausgeschlossen, dass sie durch ihre initiale Interferonproduktion in negativer Rückkopplung ihre eigenen viralen Promotoren herunterregeln.

Adenoviren können viele Zelltypen effektiv infizieren, unter anderem auch Leberzellen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Adenoviren, die Maus-Interferon alfa unter der Kontrolle eines Transthyretin (TTR)-Promotors leberspezifisch exprimieren, vor Maus-Hepatitis-Virus Typ 3 schützen (Auricchio, 2000). Da für unsere Fragestellung die Leberspezifität der Genexpression eine große Rolle spielt, wurden verschiedene adenovirale Vektoren konstruiert, die Interferone unter einem leberspezifischen TTR-Promotor exprimieren. Wurde mit diesen Vektoren PHH infiziert, so war ein deutlicher Anstieg der mRNAs des jeweiligen Interferons und der Interferon-induzierten Gene festzustellen. Nur bei Infektionen mit dem Interferon alfa produzierenden Adenovirus-Vektor war der Anstieg der interferoninduzierten Gene nicht so deutlich wie bei den beiden anderen adenoviralen Vektoren. Es wäre denkbar, dass die Sekretion von Interferon alfa die Expression der adenoviralen Gene reduziert. Dem widerspricht jedoch ein Bericht, dass adenovirale Replikation nur von Interferon gamma und nicht von Interferon alfa reduziert wird (Mistchenko, 1987).

4.5. HBV induziert keine Apoptose in PHH

Die zuverlässige Infektion der PHH mit HBV ermöglichte es, den Einfluss der HBV-Infektion auf die Apoptose von PHH zu untersuchen. Bei chronischer Hepatitis B und C ist der Apoptose-Rezeptor CD 95 auf der Oberfläche von Hepatozyten hochreguliert und Apoptose wurde als Hauptursache der Leberschäden postuliert (Galle, 1995; Mochizuki, 1996; Müller, 2001).

Apoptose kann durch virale Genprodukte ausgelöst werden. Es ist umstritten, ob der virale Transaktivator HBx nach Überexprimierung Apoptose auslöst (Su, 1997) oder verhindert (Pan, 2001; Diao, 2001). Über CD95-vermittelte Apoptose in HBV-infizierten PHH ist nur wenig bekannt (Rumin, 1996). Die Infektion von PHH mit Wildtyp-HBV hatte in den Experimenten keinen Effekt auf CD95-vermittelte Apoptose. Möglicherweise ist der Anteil der infizierten PHH zu gering, um einen Effekt zu sehen. Um das auszuschließen, wurden HBV-Genome mit adenoviralen Vektoren transferiert, die es erlauben, alle PHH zu transduzieren (Sprinzel, 2001). Auch hier konnte kein Unterschied zwischen den infizierten und nichtinfizierten Zellen festgestellt werden. Dieser Befund wird von einer anderen Beobachtung unterstützt. Mit Wildtyp-rHBV infizierte PHH produzieren virale Antigene über einen Zeitraum von einem Monat. Unterschiede in der Antigenproduktion, die auf Infektion mit verschiedenen moi beruhen, bleiben über den gesamten Zeitraum bestehen. Würde HBV Apoptose in den Zellen induzieren, so müsste die Antigenproduktion mit der Zeit abnehmen.

Apoptose könnte aber auch durch infiltrierende Lymphozyten ausgelöst werden (Guidotti, 2001; Ando, 1994). Andererseits ist es für das Überleben der Viren aber von Bedeutung, eine Apoptose der Wirtszelle zu verhindern. In meinen Experimenten konnte HBV eine experimentelle, CD 95-vermittelte Apoptose nicht verhindern. Daher kann die CD95-vermittelte Apoptose in der Pathogenese der Erkrankung durchaus von Bedeutung sein.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass HBV keinen Einfluss auf CD95-induzierte Apoptose hat. Hier wäre es Interessant zu untersuchen, ob weitere Apoptosewege inhibiert werden.

4.6. Ausblick: Gentherapie von HCV mit HBV-Vektoren

Wie in Abschnitt 4.4 dargestellt worden ist, wurden HBV-Vektoren in der Hoffnung entwickelt, durch den Gentransfer von Interferonen eine chronische Hepatitis B oder C zu therapieren. Das einzige verfügbare Modell, in dem das studiert werden kann, sind chronisch infizierte Schimpansen. Durch eine Kooperation mit Barbara Rehermann (NIH) standen uns zwei Schimpansen mit einer chronischen Hepatitis C zur Verfügung. Aus diesem Grund wurden große Mengen Interferon gamma exprimierende HBV-Vektoren produziert. Jedem der beiden Schimpansen sollten zwei mal 10^{11} virale Partikel injiziert werden. Hierdurch wird sich zeigen, ob ein in vivo Gentransfer möglich ist und ob HBV-Vektoren für den therapeutischen Einsatz geeignet sind.

Selbst wenn HBV-Vektoren die Virenlast nur reduzieren könnten, ist es denkbar, dass dadurch in vielen Fällen eine Leberzirrhose vermieden werden kann.

5. Material und Methoden

5.1. Molekularbiologische Methoden

In diesem Abschnitt werden die standardmäßig verwendeten Methoden erläutert. Abweichungen davon wurden im Ergebnisteil vermerkt.

5.1.1. Kompetente Zellen

Lösungen:

TfB I (500 ml):

| Substanz: | Menge: |
|--------------------------------------|--------|
| Kaliumazetat | 1,5 g |
| Mangan(II)chlorid | 5,0 g |
| Kaliumchlorid | 3,8 g |
| 1 M Calciumchlorid | 0,9 g |
| Glyzerol 86 % | 75 ml |
| Auf pH 5,8 mit Salzsäure einstellen. | |

TfB II (500ml):

| Substanz: | Menge: |
|------------------------------------|--------|
| MOPS | 1 g |
| Kaliumchlorid | 0,4 g |
| 1 M Calciumchlorid | 4,2 g |
| Glyzerol 86 % | 75 ml |
| Auf pH 7 mit Kalilauge einstellen. | |

Die Lösungen wurden mit Wasser aufgefüllt und steril filtriert.

Die Zellen wurden zuerst auf einer LB Platte ohne Antibiotikum ausgestrichen. Eine Kolonie wurde am nächsten Tag gepickt und in 3 ml LB Medium auf einem Schüttler bei 37°C kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde 400 ml LB Medium mit 2 ml dieser Kultur angeimpft. Diese Kultur wurde bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 10 min auf Eis gestellt und 5 min bei 3200 Upm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 160 ml TFB I resuspendiert. Nachdem die Suspension 10 min auf Eis stand, wurde 12 min bei 3200 Upm und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 40 ml TFB II aufgenommen, 10 min inkubiert und anschließend aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Es wurden DH 5 α -Bakterien verwendet, nur für Versuche, bei denen die Dam-Methylase-Aktivität störte, wurde auf GM-33-Bakterien ohne Dam-Methylase zurückgegriffen. Für die Rekombination der Adenoviren-Expressionsplasmide wurden BJ 5183 AdEasier-Bakterien benutzt.

5.1.2. Transformation kompetenter Zellen

Ein Aliquot kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut. In einem Eppendorfgefäß wurden 10 µl Ligationsansatz oder 10 fmol Plasmidlösung vorgelegt und auf Eis vorgekühlt. Zu dieser DNA wurden 50 µl der Lösung kompetenter Zellen (aus 5.1.1.) pipettiert und gemischt. Diese Bakterienlösung wurde 5 min auf Eis und anschließend 5 min in einem 37°C Wasserbad inkubiert. Zu jeden Ansatz wurde 900 µl LB-Bakterienmedium gegeben. Nach weiteren 30 min Inkubation in einem 37°C Wasserbad wurden die Bakterien 2 min in einer Tischzentrifuge bei 5000 Upm pelletiert, anschließend wurden 850 µl des Überstandes abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in den verbleibenden 100 µl des Ansatzes resuspendiert und auf eine Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert, am nächsten Tag konnten einzelne Klone gepickt werden. Für minikulturen wurde ein Klon in 3 ml LB-Bakterienmedium mit Antibiotikum überführt und über Nacht auf einen Schüttler bei 37°C gestellt.

5.1.3. Plasmidpräparation

5.1.3.1. "rapid boiling"-Methode

STET-Puffer:

| | |
|--------------|------------|
| Saccharose | 8% (w/v) |
| Triton X-100 | 0,1% (v/v) |
| EDTA pH8,0 | 50mM |
| TrisCl pH8,0 | 50mM |

Isopropanol / (NH₄)Ac:

| | |
|--|---------|
| Isopropanol 100% | 75 ml |
| Ammoniumacetat | 19,27 g |
| Mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen (löst sich leichter unter Erwärmen). | |

Enzyme:

| | |
|---------|------------|
| Lysozym | 50 mg / ml |
| RNase A | 10 mg / ml |

1,5 ml einer Über-Nacht-Kultur wurden für 5 min bei 12000 Upm in der Tischzentrifuge pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 300 µl STET Puffer resuspendiert, dem zuvor 5 µl Lysozymlösung und 1µl RNase A - Lösung frisch zugesetzt wurden. Anschließend wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde exakt 2 min auf 95°C erhitzt und danach 10 min bei 12000 Upm zentrifugiert. Das weiße Pellet wurde mit einer gelben Pipettenspitze entfernt und verworfen. 500 µl Isopropanol / (NH₄)Ac wurden zum Überstand

gegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA zu fällen. Nach 10 min Zentrifugation bei 12000 Upm wurde der Überstand verworfen und das feste und sehr fein verteilte Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach weiteren 10 min Zentrifugation bei 12000 Upm wurde der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet. Das DNA - Pellet wurde in 30µl Wasser aufgenommen.

Für einen Restriktionsverdau in 30 µl Gesamtvolumen reichen 3 µl der Präparation aus, 7 µl des Verdau wurden auf das Gel aufgetragen.

5.1.3.2. Minisäulchen

Kit: "NucleoSpin[®] Extract 2 in 1" von Macherey-Nagel

Gelextraktion:

Die DNA wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen. Es wurde das dreifache Gelgewicht an Puffer NT1 zugegeben und 10 min bei 50°C inkubiert, bis sich das Gel vollständig aufgelöst hatte.

PCR-Reinigung:

Das vierfache PCR-Volumen wurde an Puffer NT2 zugegeben.

Die NucleoSpin-Säulchen wurden in einem 2 ml Sammelbehälter platziert und die DNA-haltige Lösung in das Säulchen pipettiert. Damit die DNA an das Säulenmaterial binden kann, wurde 1 min bei 6000 Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und anschließend der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde noch mit 600 µl Waschpuffer NT3 beladen und 1 min mit 12000 Upm zentrifugiert, dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Um Reste des Waschpuffers vollständig zu entfernen, wurde nochmals 1 min mit 12000 Upm zentrifugiert. Das Säulchen wurde in ein leeres Eppendorfgefäß gestellt und die an der Säule gebundene DNA mit 50 µl Puffer NE für 1 min bei 12000 Upm eluiert.

5.1.3.3. Maxi-Präparation

Kit: "Nucleobond[®] AX" von Macherey-Nagel

200 ml einer über Nacht inkubierten Bakterienkultur wurden 5 min bei 5000 Upm zentrifugiert und das Bakterienpellet in 12 ml S1 aufgenommen. Sofort wurden 12 ml S2 zugegeben und die Bakterien 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde die Lyse mit 12 ml S3 gestoppt. Es wurde 6-8 mal invertiert, dann 10 min auf Eis inkubiert und die Lösung filtriert. Die AX 500-Kartusche wurde in der Zwischenzeit mit 5 ml N2 äquilibriert und das Filtrat aufgetragen. Die Säule wurde 2 mal mit 16 ml N3 gewaschen, danach wurde die DNA mit 15 ml N5 eluiert. Zum Fällen der DNA wurden 11 ml Isopropanol zugegeben und 15 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen, in ein Eppendorfgesäß überführt und für 15 min bei 12000 Upm zentrifugiert. Nach dem Trocknen wurde es in 500 µl Wasser oder TE aufgenommen.

5.1.4. DNA-Verdau, Duplexformation und Ligation

Nach dem Verdau wurde die DNA über ein Agarosegel von den unerwünschten Gelfragmenten getrennt und die gewünschte Bande mit einem Minisälchen aufgereinigt.

Sollte ein Restriktionsschnitt in ein glattes Ende umgewandelt werden, so wurde der Verdau in 60 µl durchgeführt und auf Vollständigkeit überprüft. Danach wurden 3 µl dNTP's (100 mM) und 3µl T4-Polymerase (1 U/µl, Biolabs) zupipettiert. Die Probe wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wie ein PCR-Fragment mit Minisälchen aufgereinigt.

Wurde ein Vektor für eine Klonierung an beiden Enden mit dem gleichen Enzym geschnitten, so wurde in den Verdauansatz 1 µl alkalische Phosphatase (10 U/µl, Roche) pipettiert. Es entfernt die für die Ligation notwendigen Phosphate, wodurch Ligation des Vektors mit sich selbst verhindert wird.

Sollte ein Duplex aus zwei Oligos produziert werden, wurden je 1 µl Oligolösung (100 pmol), 5µl Natriumchloridlösung (5 M), 2 µl TE⁻⁴ (10x) und 11 µl Wasser gemischt, für 5 min auf 95°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Eine Verdünnung 1:100 und 1:1000 wurden für die Ligation verwendet.

Für die Ligation in 30 µl wurden 3 Ansätze pipettiert:

Aus je 0,1 pmol geschnittener Vektor und

| | | | |
|--------|----------|----------|----------|
| Ansatz | 1 | 2 | 3 |
| Vektor | 0,1 pmol | 0,1 pmol | 0,1 pmol |
| Insert | - | 0,2 pmol | 0,8 pmol |

sowie 1 U T4 Ligase (1U/µl, Roche) in 1 x Ligationspuffer. Für blunt end - Ligation werden 400 U T4 Ligase (400U/µl, Biolabs) eingesetzt. Es wurde für 2 - 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden kompetente Zellen mit 10 µl des Ansatzes transformiert (siehe 5.1.2.) und ausplattiert. Nur wenn ein deutlicher Anstieg zwischen den Ansätzen 1 und 2 oder 3 zu sehen war, wurden Klone gepickt und mit der rapid boiling-Methode (siehe 5.1.3.1.) analysiert.

5.1.5 Klonierung adenoviraler Expressionsplasmide

Die Herstellung rekombinater Adenoviren beruht auf dem AdEasy-System (He, 1998) und ist im wesentlichen ein zweiseitiger Prozess. In dem ersten Schritt wird die Expressionskassette, die einen Promotor, das gewünschte Gen und ein β-Globin Polyadenylierungssignal trägt, in einen Transfer-Plasmid kloniert. Dazu wurden DH 5α - Bakterien verwendet und die beschriebenen Methoden eingesetzt. In dem zweiten Schritt wurde der Transfer-Vektor durch homologe Rekombination in das adenovirale Genom überführt. Dazu wurde der Transfer-Vektor mit Pme I linearisiert, um die Arme für die homologe Rekombination freizulegen, und in BJ 5183 AdEasier-Bakterien transformiert. Diese Bakterien tragen ein Plasmid mit einem adenoviralen Genom in sich, welches durch Deletionen in E1 und E3 replikationsdefizient ist. Durch die hohe Rekombinationsrate dieser Bakterien wurde der Teil des Transfer-Plasmides, der die Expressionskassette zusammen mit einer Kanamycin-Resistenz und weiteren Sequenzen enthält, auf das Plasmid mit dem adenoviralen Genom übertragen. Durch Kanamycin-Selektion überlebten nur die Bakterien, in denen homologe Rekombination stattgefunden hatte. Von diesen wurden Minikulturen angeimpft, die DNA gewonnen und mit Pac I verdaut. In positiven Klonen fällt ein 3 kB oder ein 4,5 kB großes Fragment heraus. Die Größe des Fragmentes hängt von dem Ort der Rekombination ab, dieser ist aber für die Funktion des Konstruktes unwichtig. Die Plasmid-DNA wurde in rekombinationsarmen DH 5α - Bakterien transformiert und in den gewünschten Mengen produziert.

5.1.6. Cäsiumchlorid (CsCl) - Dichtegradient

CsCl-Lösungen:

Die Lösungen wurden in 1x PBS angesetzt und der Brechungsindex im Refraktometer überprüft.

| Dichte der Lösung | g CsCl / Liter |
|-------------------|----------------|
| 1,15 g/l | 203 g |
| 1,3 g/l | 403 g |
| 1,4 g/l | 545 g |

Ein Dichtegradient kann aus allen virenhaltigen Lösungen angefertigt werden. Dazu wurden in einem SW-60 Röhrchen je 500 µl CsCl-Lösung 1,4, CsCl-Lösung 1,3 und CsCl-Lösung 1,15 vorsichtig übereinandergeschichtet. Es wurden 500 µl einer 20 % Saccharose Lösung (in 1x PBS) über den CsCl-Gradient geschichtet und die Probe aufgetragen. Es kann sich hierbei um 1-2 ml Kulturmedium oder um einige Mikroliter konzentrierte Virenlösung handeln. Alle Proben wurden mit 1 x PBS aufgefüllt und auf der Feinwaage austariert.

Die Proben wurden im SW 60 Rotor bei 55000 rpm und 20°C für 4 Stunden oder über Nacht zentrifugiert. Die Virionen und alle anderen Partikel trennten sich nach ihrer Dichte im CsCl-Gradienten auf. Die Röhrchen wurden von unten angestochen und ausgetropft. Je 6 Tropfen ergaben eine Fraktion von ungefähr 175 µl. Die Fraktionen wurden zum quantitativen Nachweis der Virus DNA auf einen Dotblot (siehe 5.1.7) aufgetragen.

5.1.7. DNA-Dotblot

Lösungen:

Soak I: 0,5 M NaOH; 1 M NaCl

Soak II: 0,5 M Tris pH 7,4; 3 M NaCl

Hybridisierungsmix: 6 x SSC; 5 x Denhards; 0,5 % (w/v) SDS; 100 µg / ml Heringssperma-DNA

Waschlösung: 1 x SSC; 0,5 % (w/v) SDS

10 x PBS: 14,3 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 2,8 g NaH₂PO₄ x H₂O; 81,9 g NaCl mit H₂O auf einen Liter auffüllen.

20 x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat

50 x Denhardtts: 1 % (w/v) BSA; 1 % (w/v) Polyvinyl-Pyrolidon; 1 % (w/v) Ficoll 400

Die DNA-Lösung wurde mit einer Dotblot - Apparatur auf eine Nylonmembran (NY 13N, 0,45 µm 102 x 133 mm; Schleicher und Schuell) getropft und mit 200 µl 1 x PBS gespült. Als ein Vergleichswert wurde ein Standard von 1000 pg bis 8 pg HBV-DNA mitaufgetropft. Die Membran wurde 3 min auf einem mit Soak I getränkten 3 mm Papier denaturiert und anschließend 4 min auf einem mit Soak II getränkten 3 mm Papier renaturiert. Die DNA wurde 2 x im UV-Ofen auf der Membran fixiert. Die Membran wurde mit einer ³²P-markierten HBV-DNA-Sonde (Aktivität: 6 x 10⁶ cpm) bei 68°C über Nacht hybridisiert, nachdem die Sonde zuvor bei 100°C für 10 min denaturiert wurde. Am nächsten Tag wurde mit Waschlösung für 20 min bei 68°C gewaschen und der feuchte Filter in Frischhaltefolie verpackt. Die Radioaktivität der DNA wurde mit einem Phosphorimager (Biorad) quantifiziert.

5.1.8. Proteinbestimmung

Je 7 µl Probelösung wurden mit 800 µl Wasser verdünnt und mit 200 µl Protein Assay Lösung (BioRad) versetzt. Nach 20 min Inkubation wurde bei 595 nm die optische Dichte der Lösung in einem Photometer gemessen. Damit die Werte quantifiziert werden konnten, wurde eine Verdünnungsreihe von 2 mg/ml - 0,1 mg/ml Rinderalbumin mitgemessen.

5.1.9. Immunocapture und Southern Blot

Um die Viren aus den Lösungen aufzureinigen, wurden sie mit Antikörpern an beschichtete Sepharosekügelchen gebunden. Dazu wurde Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences) dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde ein Volumenteil Beats in dem zehnfachen Volumen PBS mit 5 % v/v Hepatect für drei Stunden unter Schütteln inkubiert, wobei die Beats mit Antikörper beladen wurden. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurde 20 µl Beats mit der Viruslösung (enthielt ca. 10⁸ virale Partikel) für drei Stunden unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS wurden die DNA der Virenpartikel mit dem "QIAamp DNA Blood Mini Kit" (Qiagen) direkt von den Beats extrahiert und in den Southernblot eingesetzt. Dazu wurde die DNA in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde für 15 min in 0,25 M HCl, 30 min in Soak I und 45 min in Soak II geschüttelt (Soak I und Soak II siehe 5.1.7). Anschließend wurde die DNA durch Kapilartransfer mit 20x SSC auf eine Membran über 12 Stunden transferiert. Die Membran wurde danach zweimal mit 6x SSC gewaschen und nach zweimaligem UV-cross linking mit der ³²P-markierten HBV-DNA-Probe analysiert.

5.2. Zellbiologische Methoden

5.2.1. Kulturmedien

HuH7 Medium:

zu 450 ml DMEM high Glucose

50 ml FCS

5 ml Penicillin / Streptomycin

5 ml NEAA

5 ml Glutamin

5 ml Natriumpyruvat

293 Medium:

zu 450 ml DMEM high Glucose

50 ml FCS

5 ml Penicillin / Streptomycin

5 ml Glutamin

PHH Medium:

siehe 5.2.9.1.

5.2.2. Transfektion von Zellen

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen 1 : 6 gesplittet, so dass sie am Tag der Transfektion ca. 30 % konfluent waren. Alle Angaben beziehen sich auf 15 cm Schalen.

FuGENE 6:

Je 3 µg DNA jedes Plasmides wurden in 100 µl serumfreiem Medium aufgenommen und mit 3 µl FuGENE 6 (Roche) pro µg DNA versetzt. Nach 15 min Inkubation wurde die Lösung auf den Schalen verteilt.

MetafecteneTM:

Je 10 µg DNA jedes Plasmides wurden in 300 µl serumfreiem Medium aufgenommen und mit 3 µl MetafecteneTM (Biontex) pro µg DNA versetzt. Nach 15 min Inkubation wurde die Lösung auf der Schalen verteilt.

CaPO₄:

Je 15 µg DNA jedes Plasmides wurden in 450 µl Wasser aufgenommen und 50 µl 2,5 M CaCl₂ - Lösung zupipettiert. In einem anderen Röhrchen wurden 500 µl 2 x HBS vorgelegt und unter Schütteln auf einem Vortexer die DNA-Lösung langsam hineingetropt. Nach 20 min wurde das Präzipitat auf den Zellen verteilt.

Am Morgen des darauffolgenden Tages wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend frisches Kulturmedium zugegeben.

5.2.3. Einfrieren / Auftauen von Zellen

Einfriermedium:

| | |
|---------------|-------|
| HuH7 - Medium | 70 ml |
| FCS (30 %) | 20 ml |
| DMSO (10 %) | 10 ml |

Die Zellen einer 75 cm² Flasche wurden trypsinisiert, in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und in ein Falconröhrchen überführt. Darin wurden die Zellen für 5 min bei 700 Upm und Raumtemperatur pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in 2 ml gekühltem Einfriermedium aufgenommen und je 1 ml in ein 1,8 ml Gefrieröhrchen überführt. Diese wurden langsam (1°C / min) auf -80°C abgekühlt und bis zum Gebrauch in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Verwendung wurden die Zellen zügig bei 37°C aufgetaut, in 10 ml Kulturmedium verdünnt und auf einer 75 cm² Flasche verteilt. 3 Stunden nach dem Aussähen wurde das Medium gewechselt.

5.2.4. Detektion der GFP-Fluoreszenz

Mittels Fluoreszenzmikroskop:

Die GFP-Fluoreszenz der transfizierten Zellen wurde mit einem Standard Fluorescein-Isothiocyanat-Filterset im blauen Licht (488 nm) angeregt und fotografiert.

Mittels FACS:

Die Zellen eines Wells einer 12-Well-Platte wurden mit 500 µl Trypsin/EDTA (Biochrom) abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen eine Minute bei 3000 Rpm pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS mit 2% FCS aufgenommen. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt und die Zellen anschließend bei 4°C bis zur Messung im FACS aufgehoben.

5.2.5. Detektion der Luciferase-Expression

Renilla-Luziferase setzt das Substrat Coelenterazin unter Lichtemission zu Coelenteramid um. Die Konzentration der Renilla-Luziferase kann anhand der abgestrahlten Lichtmenge quantifiziert werden. Zur Quantifizierung wurde das *Renilla Luciferase Assay System* (Promega) benutzt.

Die Zellen eines 12 Wells wurden mit je 200 µl Lysepuffer am Tag vier nach Transfektion oder Infektion lysiert und bei -20°C eingefroren. Das Substrat und der Assay Buffer wurden unmittelbar vor der Messung gemischt. Anschließend wurden die Proben aufgetaut, gemischt und für 30 s bei 12000 Upm abzentrifugiert.

Transfektion:

10 µl des Lysates wurden in ein Reaktionsgefäß pipetiert und von dem Luminometer (Berthold Technologies) mit 100 µl der Substrat-Buffermischung versetzt. Nach 2 s Wartezeit wurde für 3 s die Lichtemission gemessen.

Infektion:

20 µl des Lysates wurden in ein Reaktionsgefäß pipetiert und von dem Luminometer mit 100 µl der Substrat-Buffermischung versetzt. Nach 2 s Wartezeit wurde für 15 s die Lichtemission gemessen.

5.2.6. HBs-Ag und HBe-Ag Bestimmung

HBs-Ag und HBe-Ag wurden aus dem Überstand der Zellen mittels eines kommerziellen Testes HBeAg 2.0 und HBsAg V2 von Abbott Laboratories, Wiesbaden, Deutschland, mit einem AXSYM[®] bestimmt.

5.2.7. Virenproduktion

5.2.7.1. Produktion rekombinanter HBV

Um Viren zu produzieren, wurden die Zellen (HBV in HuH7, DHBV in LMH) am Tag zuvor gesplittet, so dass sie transfiziert werden konnten. Es wurde mit gleichen Mengen Transferplasmid und Helferplasmid, wie in 5.2.2. beschrieben, transfiziert, und am nächsten Tag gewaschen. Das Medium wurde gegen eine 1:1 Mischung aus HuH 7 und PHH-Medium ausgetauscht. Am 2. Tag nach Transfektion wurde das Medium durch PHH-Medium ausgewechselt. Am Tag 6 nach Transfektion wurde das Medium abgenommen. Die in den Tagen zuvor produzierten Viren sind in diesem Medium enthalten und können, wie in 5.2.8. beschrieben, aufgereinigt werden.

5.2.7.2. Produktion rekombinanter Adenoviren

Die Plasmide wurden vor der Transformation mit Pac I linearisiert, die DNA gefällt und 293-Zellen unter Verwendung der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Diese Zellen stellen das für die Vermehrung der rekombinanten Adenoviren essentielle Gen E1 in trans zur Verfügung, so dass es zu einer Virusproduktion in diesen Zellen kommt. Nach einigen Tagen lösten sich die Zellen von dem Boden der Schale ab. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Viren sowohl in dem Überstand als auch in den Zellen. Die restlichen Zellen wurden mit dem Medium abgespült und in ein verschließbares Röhrchen überführt (Falcon). Anschließend wurden die Zellen dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im 37°C Wasserbad aufgetaut, um die noch intakten Zellen aufzubrechen. Die Zellreste wurden durch eine Zentrifugation bei 2000 Rpm für 5 min abgetrennt und der virenhaltige Überstand nach Zugabe von 10 % Glycerol bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Da die Konzentration der Viren im Medium nach der Transfektion noch sehr niedrig war, wurden frische 293 Zellen mit dem Überstand infiziert. Diese sekretierten größere Mengen Viren in ihrem Überstand, da mehr Zellen zu Beginn infiziert werden, und die Viren wurden aus dem Überstand und den Zellen wie beschrieben aufgereinigt. Die Passagen des Virus auf 293-Zellen wurden solange wiederholt, bis die gewünschte Konzentration erreicht war. Die Konzentration der Viren wurde durch Titration des Virusstockes auf 293-Zellen bestimmt.

5.2.8. Virenpräparation

Zur Präparation der Viren wurde das virenhaltige Kulturmedium 10 min bei Raumtemperatur und 2000 Upm von Zellresten befreit.

Polyethylenglycol (PEG)-Präzipitation:

Auf 10 ml Medium wurden 3,3 ml 26 % PEG (26 % (w/v) PEG 6000; 10 mM Hepes; pH 7,4; autoklaviert) gegeben, gemischt und bei 4°C über Nacht gefällt. Am nächsten Tag wurde 60 min bei 4°C und 3000 Upm die Viren pelletiert und der Überstand verworfen.

Ultrazentrifugation:

30 ml des Mediums wurden in ein SW 28 - Gefäß gegeben und mit 5 ml einer 20% (w/v) Saccharoselösung in PBS unterschichtet. Anschließend wurde für 6 Stunden oder über Nacht bei 25000 Upm in einem SW-28 Rotor bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Centricon®:

Bei der Centricon®-Methode wird das Medium durch eine Membran zentrifugiert, deren Poren Proteine bis zu einer bestimmten Ausschlussgröße durchlassen. Viren und Proteine, die über der Ausschlussgrenze liegen, werden zurückgehalten und somit aufkonzentriert. Diese Viren und Proteine werden anschließend in einem kleinen Volumen von der Membran eluiert. 18 ml des Medium wurden in ein Centricon® Plus-20 Röhrchen (amicon® bioseparations, Millipore) gefüllt und für 30 min bei 3600 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen und die Membran umgedreht. Die aufkonzentrierte Lösung wurde 3 min bei 2600 Upm eluiert.

Es wurden zwei unterschiedliche Typen Centricon®-Röhrchen verwendet:

Ausschlussgrenze: 10.000 Da Membrantyp: PL-10

Ausschlussgrenze: 100.000 Da Membrantyp: Biomax-100

Die Viren wurden fünfzigfach konzentriert in 1x PBS / 10 % Glycerol aufgenommen. Diese Virenlösung kann bei -20°C oder -70°C bis zur Verwendung aufgehoben werden. Ein Teil wurde, wie in 5.1.5. beschrieben, quantifiziert.

5.2.9. Primäre humane Hepatozyten

5.2.9.1. Medien und Zusätze

| | Lösung | ml | Konzentration | Firma |
|---------------------------------|------------------------------|-----|---------------|-------|
| Präperfusions Medium | HBSS (Ca-frei, Mg-frei) | 500 | | Gibco |
| | EGTA | 2,5 | 100 mM | Sigma |
| | Heparin | 1 | 5000 U/ml | Sigma |

| | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------|-------|
| Collagenase Medium | Williams Med.E | 250 | | Gibco |
| | CaCl ₂ | 0,9 | 1 M | |
| | Gentamycin | 2,5 | 10 mg/ml | Gibco |
| | Collagenase TypIV: | 200 mg aliquot. | Lot 88H8620 419 U/mg | Sigma |

Collagenase in ca. 15ml Medium lösen, kurz vor der Perfusion in restliches Medium filtrieren. (Filter: 0,2 µM Sartorius, CA mit GF-Vorfilter, andere verstopfen!)

| | | | | |
|--------------------|----------------|------|-----------|-------|
| Wash Medium | Williams Med E | 500 | | Gibco |
| | *Glutamin | 5,6 | 200 mM | Gibco |
| | *Glucose | 6 | 5% | |
| | *Hepes pH 7,4 | 11,5 | 1M | Gibco |
| | *Pen-Strep | 5,6 | 5000 U/ml | Gibco |

| | | | | |
|-------------------|----------------|------|-----------|-------|
| PHH Medium | Williams Med E | 500 | | Gibco |
| | *Glutamin | 5,6 | 200 mM | Gibco |
| | *Glucose | 6 | 5% | |
| | *Hepes pH 7,4 | 11,5 | 1 M | Gibco |
| | *Pen-Strep | 5,6 | 5000 U/ml | Gibco |
| | Gentamycin | 5 | 10 mg/ml | Gibco |
| | Hydrocortison | 0,5 | | Sigma |
| | Insulin | 1,4 | | Serva |
| | DMSO | 8,7 | 100 % | |
| | Inosine | 2,8 | 2,5 mg/ml | Serva |

*Die Lösungen werden zusammengemischt und bei -20°C als Prämix gelagert.

Herstellung der Zusätze:

| | |
|-------------------|---|
| CaCl ₂ | 1 M in destilliertem Wasser lösen, autoklavieren und bei 4°C aufheben. |
| Collagenase | 200 mg aliquotieren und bei 4°C aufheben. |
| EGTA | 0,1 M in destilliertem Wasser, pH 7,4 (mit NaOH), steril filtrieren und bei 4°C aufheben. |
| Glucose 5% | 50 g/ml in destilliertem Wasser lösen, steril filtrieren und bei 4°C aufheben. |
| Heparin | 5000 U/ml mit sterilem PBS aufnehmen, steril filtrieren und bei 4°C aufheben. |
| Hydrocortison | 100 mg in 20,6 ml 1x Earle's salt solution mit 10mM Hepes pH 7,4 lösen, steril filtrieren, in 0,6 ml aliquotieren und bei -20°C aufheben. |
| Inosin | 2,5 mg/ml in PBS lösen, steril filtrieren, in 20 ml aliquotieren und bei 4°C aufheben. |
| Insulin | 25 mg in 0,5 ml 0,1 M Salzsäure mit 1% FCS 10 min lösen, mit derselben Lösung auf 8,3 ml auffüllen und steril filtrieren. In 0,15 ml Aliquots bei -20°C aufheben. |

5.2.9.2. Präparation primärer humaner Leberzellkulturen

Alle Versuche mit menschlichen Leberstücken fanden mit Zustimmung des lokalen Ethikkomitees statt. Die Präparation basiert auf einer Kollagenaseperfusion (Berry, 1969) die um eine Perfusion mit kalziumfreiem Medium vor dem Kollagenaseverdau erweitert wurde (Seglen, 1976). Diese Methode wurde die Standardtechnik zur Gewinnung PHH (Reese, 1981; Guguen-Guillouzo, 1983; Hsu, 1985; Berry, 1997).

Bei der Präparation primärer humaner Leberzellkulturen (PHH) ist es notwendig, frische Stücke einer gesunden menschlichen Leber zu erhalten. Wir erreichten dies durch eine Kooperation mit Dr. Peter Büchler, der als Chirurg der Universitätsklinik Heidelberg Zugang zu Leberresektaten hat. In den meisten Fällen einer Leberteileresektion wurde ein Teil der Leber aufgrund eines Tumors entfernt, wobei stets ein Teil gesunden Gewebes um den Tumor verbleibt. Direkt nach der Entnahme des Resektates wurde ein Teil des gesunden Gewebes für unsere Präparation abgetrennt und uns übergeben.



Abb. 5.1: Aufbau der Perfusionsapparatur

Vor dem Eintreffen des Leberstückes wurden die Medien vorbereitet und Präperfusions-Medium sowie Collagenase-Medium auf 42°C erwärmt. Waschmedium wurde auf 4°C abgekühlt und PHH-Medium bei 37°C inkubiert. Unter einer Sterilbank wurden ein Wasserbad mit 42°C, eine Perfusionspumpe und eine Absaugvorrichtung aufgebaut (Abb. 33). Zellkulturschalen wurden mit einer 1:10 verdünnten Kollagenlösung (0,2 mg/ml, Worthington Biochemical Corporation) überschichtet und nach 3 Stunden Inkubation bei 37°C zweimal mit sterilen Wasser gespült. Diese kollagenbeschichteten Schalen können getrocknet und bei Raumtemperatur mehrere Monate aufbewahrt werden. Die weiteren Materialien wurden unter der Sterilbank zurechtgelegt. Nachdem das Leberstück aus dem Operationssaal eintraf, wurde es auf einer 15 cm Schale ausgebreitet. Besonders gut geeignet sind Leberstücke, die an zwei Seiten von Kapsel umgeben sind. Das Stück wurde auf eine Seite mit Kapsel gelegt. Ein 0,8 oder 1 mm Venenverweilkatheter (Braun) wurde an den Schlauch der Perfusionspumpe angeschlossen und das andere Ende in das Präperfusions-Medium eingetaucht. Anschließend wurde der Schlauch inklusive Spritze kurz mit Medium gespült. Auf der Schnittfläche wurde in ein großes Blutgefäß die Plastikummantelung eines Venenverweilkatheters möglichst weit (ca. 5 mm) eingeschoben und mit Histoacryl-Klebstoff (Braun) abgedichtet. Nach Aushärten des Klebstoffes (ca. 20 s) wurde das Resektat mit 20 ml/min des Präperfusions-Mediums durchspült. Hierbei ist es besonders wichtig, dass das Resektat möglichst vollständig durchspült wird. Trat an den Schnittstellen großer Gefäße viel Medium aus, so wurden sie ebenfalls mit Histoacryl-Klebstoff verschlossen. Anschließend wurde die Perfusionsgeschwindigkeit erhöht, bis sich das Leberstück leicht aufbläht (ca. 30-40 ml/min). Aus dem Leberstück austretendes Medium wurde abgesaugt und verworfen. Nachdem 500 ml Präperfusionsmedium durchgelaufen waren, wurde das Kollagenase-

Medium, dem zuvor die Kollagenase zugesetzt wurde, perfundiert. Die Farbe des Leberstückes sollte sich zu diesem Zeitpunkt deutlich aufgehellt haben. Die Durchflussmenge wurde nicht variiert. Der erste Teil des aus dem Leberstück austretenden Kollagenase-Mediums wurde verworfen, die letzten 100 ml wurden in der Schale behalten. Nachdem das gesamte Medium perfundiert war, wurde das Stück aufgeschnitten. An der Perfusionsstelle sollte die Leber von breiiger Konsistenz sein, dort werden die Zellen mit einem Skalpell abgeschabt und mit dem restlichen Kollagenase-Medium ausgespült. Der Rest des Stückes wird in kleine Stücke geschnitten. Diese Suspension aus Zellen und Leberstücken werden in ein steriles Becherglas mit Magnetührfisch überführt und für 10 min in dem Kollagenase-Medium bei 37°C auf einem Magnetrührer gerührt. Anschließend wird diese Suspension erst durch zwei Lagen Gaze, dann durch einen 70 µm Filter (Falcon) in 50 ml Gefäße (Falcon) filtriert. Die Zellen wurden für 5 min bei 400 Upm (50 g) und 10°C pelletiert, die Bremse der Zentrifuge wurde ausgeschaltet. Das Pellet wurde in 40 ml Waschmedium aufgenommen und die Zellen wieder, wie beschrieben, pelletiert. Dieser Waschschrift wurde ein zweites Mal wiederholt und anschließend das Zellpellet in 50 ml PHH-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden mit Trypanblau gefärbt und die Zellzahl dieser Suspension bestimmt. Die Zellkonzentration wurde anschließend mit PHH-Medium dem 10 % FCS zugesetzt wurden auf 8×10^5 / ml eingestellt und die Zellen auf kollagenisierte Zellkulturschalen ausgesät. Nach 3 Stunden wurden die nicht angewachsenen Zellen abgesaugt und frisches PHH-Medium mit 10 % FCS zugegeben. Am folgenden Tag wurde das Medium gegen PHH-Medium mit 5 % FCS ausgetauscht. Am Tag zwei nach Perfusion wurde das Medium gegen PHH-Medium ohne FCS ausgewechselt. Die PHH wurden in FCS-freiem Medium gehalten und können für Experimente verwendet werden.

5.2.9.3. Infektion von primären humanen Hepatozyten mit rHBV

5 % (w/v) Polyethylenglykol (PEG) 8000 (Sigma) wurde in PHH-Medium gelöst und steril filtriert. Am späten Nachmittag wurde das Medium gegen PHH-Medium mit 5 % PEG ausgetauscht. In dieses Medium wurde die Virenlösung pipetiert und über Nacht auf den Zellen belassen. Am nächsten Tag wurde die Virensuspension abgesaugt und frisches PHH-Medium auf die Zellen gegeben.

Sollte die Infektion mit einem inhibitorischen Antikörper blockiert werden, so wurde 1 I.E. Hepatect® (Biotest) pro ml Medium zugegeben.

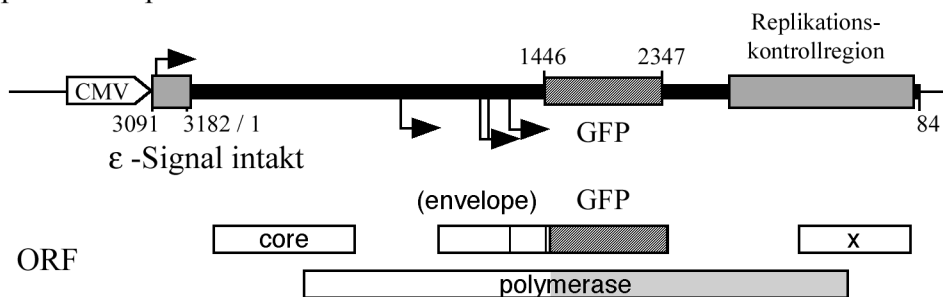
5.2.9.4. Infektion von primären humanen Hepatozyten mit Adenoviren

Vor der Infektion wurde das Medium auf den PHH gewechselt. In dieses Medium wurden die Virenlösung pipetiert und für 3 Stunden auf den Zellen belassen, dann wurde die Virensuspension abgesaugt und frisches PHH-Medium auf die Zellen gegeben.

5.3. Plasmidkonstrukte

Alle Positionsangaben beziehen sich auf die wt HBV-Sequenz, A des Core-Startkodons ist Position 1. Das Ausgangsplasmid pCH -9/3091 enthält ein Überlängenkonstrukt unter Kontrolle eines CMV-Promotors, in dem die HBV-Sequenzen 3091-3182, 1-3182 und 1-84 direkt ineinander übergehen. Im Helfer pCH 3142 wurde die Region 3091-3142 deletiert, im Transferplasmid pCH 1452 GFP_h wurde die Region 1446-2347 gegen das Transgen GFP ausgetauscht (Protzer, 1999).

Transferplasmid - pCH GFP



Helferplasmid - pCH 3142

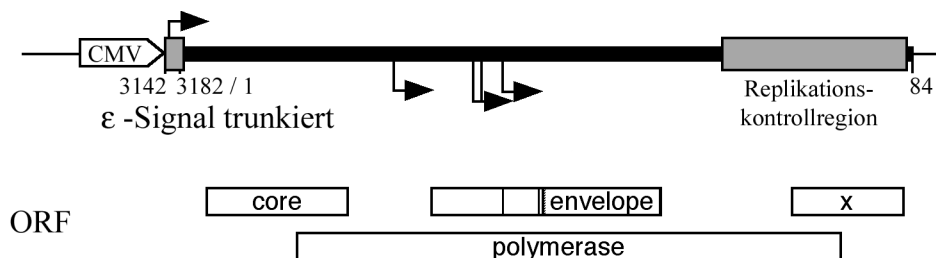


Abb. 5.2: Das Transferplasmid hat das GFP-Gen anstelle des S-Genes inseriert. Es ist nicht mehr in der Lage, die viralen Proteine L, M, S und Polymerase zu bilden. Das Helferplasmid ist in der Lage alle HBV-Proteine zu produzieren und stellt sie in trans zur Verfügung. Die mRNA des Helfers kann aufgrund des trunkeierten ϵ -Signals nicht verpackt werden.

5.3.1. Ausgangsplasmide und benutzte Plasmide

pCH -9/3091 von Ralf Bartenschlager

Dieses Plasmid wurde benutzt, um wt-HBV zu produzieren. Es enthält ein Überlängen-HBV-Konstrukt (Nukleotide 3091-3182, 1-3182, 1-84) unter Kontrolle eines CMV-Promotors.

pCH 1452 GFP CPLX

Dieses Plasmid ist das Ausgangsplasmid für alle HBV-Transferplasmide (Untergasser, 2001). Es trägt Stop-Codons in dem Core-Gen (Codon 6+7), dem Polymerase-Gen (Codon 14), in prä S1, prä S2 (Codon 20 des L-Proteins, 3 des M-Proteins) und dem X-Gen (Codon 8).

pCH C312 dRFP von Timo Kürschner

Dieses Plasmid ist ein HBV-Transferplasmid in dem dsRed II anstelle des GFP sitzt, die Genexpression wird von einem trunktierten CMV-Promotor getrieben. Die ORFs für Core und X sind nicht durch Deletionen ausgeschaltet.

pCH 3142 von Ralf Bartenschlager

Dieses Plasmid ist das Helferplasmid.

pCH 3142 An β -Glob

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 3142, in dem die DR 1 - Region verändert wurde und die Poly A - Region von β -Globin an das X-Gen fusioniert wurde (Untergasser, 2001).

5.3.2. Eigene Plasmidkonstrukte

Übersicht über die klonierten Plasmide:

- Nr. 1: pCH 1452 Ifn alpha CPLX
- Nr. 2: pCH 1452 Ifn beta CPLX
- Nr. 3: pCH 1452 Ifn gamma CPLX
- Nr. 4: pCH 1452 rLuci CPLX
- Nr. 5: pCH TTR GFP CPLX
- Nr. 6: pCH TTR GFP An bGlob
- Nr. 7: pCH TTR Ifn alfa An bGlob
- Nr. 8: pCH TTR Ifn beta An bGlob
- Nr. 9: pCH TTR Ifn gamma An bGlob
- Nr. 10: Suttle TTR Ifn alfa An bGlob
- Nr. 11: Suttle TTR Ifn beta An bGlob
- Nr. 12: Suttle TTR Ifn gamma An bGlob
- Nr. 13: AdEasy TTR Ifn alfa An bGlob
- Nr. 14: AdEasy TTR Ifn beta An bGlob
- Nr. 15: AdEasy TTR Ifn gamma An bGlob
- Nr. 16: pCH TTR rLuci CPLX
- Nr. 17: pCH CMV rLuci CPLX
- Nr. 18: pCH GFP del Xba I - Bst EII
- Nr. 19: pCH rLuci del Xba I - Bst EII
- Nr. 20: pCH rLuci del XbaI - Bsp EI
- Nr. 21: pCH rLuci del Bsp EI - Bst EII
- Nr. 22: pCH rLuci del Hind III - Sph I
- Nr. 23: pCH rLuci del Sph I - Rsr II
- Nr. 24: pCH rLuci del Hind III - Rsr II
- Nr. 25: pCH rLuci plus 100
- Nr. 26: pCH rLuci plus 200
- Nr. 27: pCH rLuci plus 300
- Nr. 28: pCH rLuci plus 400
- Nr. 29: pCH rLuci plus 500
- Nr. 30: pCH rLuci plus 700

- Nr. 31: pCH rLuci del Xba I - Bst EII plus 700
- Nr. 32: pCH rLuci del del XbaI - Bsp EI plus 300
- Nr. 33: pCH rLuci del del Bsp EI - Bst EII plus 300
- Nr. 34: pCH rLuci del Hind III - Sph I plus 200
- Nr. 35: pCH rLuci del Sph I - Rsr I plus 300
- Nr. 36: pCH rLuci del Hind III - Rsr I plus 500
- Nr. 37: pCH rLuci del Bsp EI - Bst EII del SphI - Rsr II
- Nr. 38: pCH rLuci del Xba I - Bst EII del SphI - Rsr II
- Nr. 39: pCH rLuci del Bsp EI - Bst EII del SphI - Rsr II plus 700
- Nr. 40: pCH rLuci del Xba I - Bst EII del SphI - Rsr II plus 700
- Nr. 41: pCH 1452 GFP-rLuci CPLX
- Nr. 42: pCH GFP-rLuci del Xba I - Bst EII
- Nr. 43: pCH GFP-rLuci del XbaI - Bsp EI
- Nr. 44: pCH GFP-rLuci del Bsp EI - Bst EII del SphI - Rsr II
- Nr. 45: pCH GFP-rLuci del Xba I - Bst EII del SphI - Rsr II
- Nr. 46: pCH 1452 firefly-Luci CPLX
- Nr. 47: pCH firefly-Luci del Xba I - Bst EII
- Nr. 48: pCH firefly-Luci del XbaI - Bsp EI
- Nr. 49: pCH firefly-Luci del Bsp EI - Bst EII del SphI - Rsr II
- Nr. 50: pCH firefly-Luci del Xba I - Bst EII del SphI - Rsr II

Nr. 1: pCH 1452 Ifn alpha CPLX

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX, in welchem der GFP-ORF gegen den Interferon alfa ORF ausgetauscht wurde. Dazu wurde der Interferon alpha ORF mit den Primern +Ifna und -Ifna aus dem Plasmid pORF hIFN alpha (Invivogen) amplifiziert und über Kpn I - Hind III in das Plasmid gesetzt.

Nr. 2: pCH 1452 Ifn beta CPLX

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX, in welchem der GFP-ORF gegen den Interferon beta ORF ausgetauscht wurde. Dazu wurde der Interferon beta ORF mit den Primern +Ifnb und -Ifnb aus dem Plasmid pORF hIFN beta (Invivogen) amplifiziert und über Kpn I - Hind III in das Plasmid gesetzt.

Nr. 3: pCH 1452 Ifn gamma CPLX

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX, in welchem der GFP-ORF gegen den Interferon gamma ORF ausgetauscht wurde. Dazu wurde der Interferon gamma ORF mit den Primern +Ifngam und -Ifngam aus dem Plasmid pEF-Bos hIFN-gam amplifiziert und über Kpn I - Hind III in das Plasmid gesetzt.

Nr. 4: pCH 1452 rLuci CPLX

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX, in welchem der GFP-ORF gegen den renilla Luziferase ORF ausgetauscht wurde. Dazu wurde der renilla Luziferase ORF mit den Primern +rLuci und -rLuci aus dem Plasmid phRL-CMV (Promega) amplifiziert und über Kpn I - Hind III in das Plasmid gesetzt.

Nr. 5: pCH TTR GFP CPLX

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX, in welchem der präS 2 Promotor gegen den TTR-Promotor ausgetauscht wurde. Dazu wurde der TTR-Promotor mit den Primern +TTR und -TTR aus dem Plasmid pUHD TTR 0,3 / h-rtTa (von H. Bujard) amplifiziert und über Kpn I - Hind III in das Plasmid gesetzt.

Nr. 6: pCH TTR GFP An bGlob

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH TTR GFP CPLX, in welchem das Poly-Adenylierungssignal des HBV gegen das Poly-Adenylierungssignal von β -Globin ausgetauscht wurde. Dazu wurde das Fragment mit dem β -Globin Poly-Adenylierungssignal mit den Primern +bGlob und -nNhe aus dem Plasmid pCH 3142 An β -Glob amplifiziert und über Hind III - Nhe I in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 7: pCH TTR Ifn alfa An bGlob

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH TTR GFP An bGlob, in welchem der GFP-ORF gegen das den Interferon alfa ORF ausgetauscht wurde. Dazu wurde das Fragment mit dem Interferon alfa ORF aus dem Plasmid pCH 1452 Ifn alfa CPLX mit Kpn I - Hind III ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 8: pCH TTR Ifn beta An bGlob

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH TTR GFP An bGlob, in welchem der GFP-ORF gegen das den Interferon beta ORF ausgetauscht wurde. Dazu wurde das Fragment mit dem Interferon beta ORF aus dem Plasmid pCH 1452 Ifn beta CPLX mit Kpn I - Hind III ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 9: pCH TTR Ifn gamma An bGlob

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH TTR GFP An bGlob, in welchem der GFP-ORF gegen das den Interferon gamma ORF ausgetauscht wurde. Dazu wurde das Fragment mit dem Interferon gamma ORF aus dem Plasmid pCH 1452 Ifn gamma CPLX mit Kpn I - Hind III ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 10: Suttle TTR Ifn alfa An bGlob

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pSuttle (He, 1998), in welches eine Expressionskassette über Hind III eingesetzt wurde. Die Expressionskassette wurde aus dem Plasmid pCH TTR Ifn alfa An bGlob mit Eco RI und Nhe I ausgeschnitten und "blund end" einkloniert.

Nr. 11: Suttle TTR Ifn beta An bGlob

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pSuttle (He, 1998), in welches eine Expressionskassette über Hind III eingesetzt wurde. Die Expressionskassette wurde aus dem Plasmid pCH TTR Ifn beta An bGlob mit Eco RI und Nhe I ausgeschnitten und "blund end" einkloniert.

Nr. 12: Suttle TTR Ifn gamma An bGlob

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pSuttle (He, 1998), in welches eine Expressionskassette über Hind III eingesetzt wurde. Die Expressionskassette wurde aus dem Plasmid pCH TTR Ifn gamma An bGlob mit Eco RI und Nhe I ausgeschnitten und "blund end" einkloniert.

Nr. 13: AdEasy TTR Ifn alfa An bGlob

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid Suttle TTR Ifn alfa An bGlob durch homologe Rekombination mit einem adenoviralen Genom tragenden Plasmid in BJ 5183 AdEasier-Bakterien, die dieses Plasmid in sich tragen.

Nr. 14: AdEasy TTR Ifn beta An bGlob

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid Suttle TTR Ifn beta An bGlob durch homologe Rekombination mit einem adenoviralen Genom tragenden Plasmid in BJ 5183 AdEasier-Bakterien, die dieses Plasmid in sich tragen.

Nr. 15: AdEasy TTR Ifn gamma An bGlob

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid Suttle TTR Ifn gamma An bGlob durch homologe Rekombination mit einem adenoviralen Genom tragenden Plasmid in BJ 5183 AdEasier-Bakterien, die dieses Plasmid in sich tragen.

Nr. 16: pCH TTR rLuci CPLX

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH TTR GFP CPLX, in welchem der GFP-ORF gegen das den renilla Luziferase ORF ausgetauscht wurde. Dazu wurde das Fragment mit dem renilla Luziferase ORF aus dem Plasmid pCH 1452 rLuci CPLX mit Kpn I - Hind III ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 17: pCH CMV rLuci CPLX

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH CMV-GFP CPLX (Untergasser, 2001), in welchem der GFP-ORF gegen das den renilla Luziferase ORF ausgetauscht wurde. Dazu wurde das Fragment mit dem renilla Luziferase ORF aus dem Plasmid pCH 1452 rLuci CPLX mit Kpn I - Hind III ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 18: pCH GFP del Xba I - Bst EII

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX, in welchem die Region zwischen den Schnittstellen Xba I (90) und Bst EII (760) deletiert wurde. Dazu wurde der Bereich zwischen der Schnittstelle Bst EII (760) und der Position (941) mit den Primern +CoreDel und -CoreDel aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX amplifiziert und über Xba I - Bst EII in das Plasmid gesetzt. Die Bst EII (760) Schnittstelle wurde hierbei durch eine Bsp EI Schnittstelle ausgetauscht, die Bst EII (915) wurde unverändert belassen.

Nr. 19: pCH rLuci del Xba I - Bst EII

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 rLuci CPLX, in welchem die Xba I - Bst EII Deletion eingesetzt wurde. Dazu wurde das Fragment mit der Deletion aus dem Plasmid pCH GFP del Xba I - Bst EII mit Pst I - Eco RI ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 20: pCH rLuci del XbaI - Bsp EI

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 rLuci CPLX, in welchem die Xba I - Bsp EI Deletion eingesetzt wurde. Dazu wurde das Fragment mit der Deletion aus dem Plasmid pCH GFP del Xba I - Bst EII mit Pst I - Bsp EI ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 21: pCH rLuci del Bsp EI - Bst EII

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 rLuci CPLX, in welchem die Bsp EI - Bst EII Deletion eingesetzt wurde. Dazu wurde das Fragment mit der Deletion aus dem Plasmid pCH GFP del Xba I - Bst EII mit Bsp EI - Bst EII ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 22: pCH rLuci del Hind III - Sph I

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX, in welchem die Region zwischen den Schnittstellen Hind III (in Wt nicht vorhanden, 2342) und Sph I (2514) deletiert wurde. Dazu wurde ein Duplex mit den Primern +HindSph und -HindSph produziert und über Hind III - Sph I in das Plasmid gesetzt. Beide Schnittstellen bleiben dadurch aktiv.

Anschließend wurde die Deletion in das Plasmid pCH 1452 rLuci CPLX inkloniert. Dazu wurde das Fragment mit der Deletion aus dem Zwischenklon mit Hind III - Nhe I ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 23: pCH rLuci del Sph I - Rsr II

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 rLuci CPLX, in welchem der Bereich zwischen den Schnittstellen Sph I und Rsr II deletiert wurde. Dazu wurde mit den beiden Enzymen geschnitten und die Enden "blund end" zusammenligiert.

Nr. 24: pCH rLuci del Hind III - Rsr II

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del Hind III - Sph I, in welchem der Bereich zwischen den Schnittstellen Hind III und Rsr II deletiert wurde. Da der Bereich zwischen Hind III und Sph I schon im Ausgangsplasmid deletiert war, musste nur noch der Bereich zwischen Sph I und Rsr II deletiert werden. Dazu wurde mit Sph I und Rsr II geschnitten und die Enden "blund end" zusammenligiert.

Nr. 25: pCH rLuci plus 100

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 rLuci CPLX, in welchem ein 100 Bp Fragment einer GFP-Sequenz inseriert wurde. Dazu wurde das Fragment mit den Primern +100 und -nHind aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX amplifiziert und über Hind III in antisense-Richtung in das Plasmid gesetzt.

Nr. 26: pCH rLuci plus 200

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 rLuci CPLX, in welchem ein 200 Bp Fragment einer GFP-Sequenz inseriert wurde. Dazu wurde das Fragment mit den Primern +200 und -nHind aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX amplifiziert und über Hind III in antisense-Richtung in das Plasmid gesetzt.

Nr. 27: pCH rLuci plus 300

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 rLuci CPLX, in welchem ein 300 Bp Fragment einer GFP-Sequenz inseriert wurde. Dazu wurde das Fragment mit den Primern +300 und -nHind aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX amplifiziert und über Hind III in antisense-Richtung in das Plasmid gesetzt.

Nr. 28: pCH rLuci plus 400

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 rLuci CPLX, in welchem ein 400 Bp Fragment einer GFP-Sequenz inseriert wurde. Dazu wurde das Fragment mit den Primern +400 und -nHind aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX amplifiziert und über Hind III in antisense-Richtung in das Plasmid gesetzt.

Nr. 29: pCH rLuci plus 500

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 rLuci CPLX, in welchem ein 500 Bp Fragment einer GFP-Sequenz inseriert wurde. Dazu wurde das Fragment mit den Primern +500 und -nHind aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX amplifiziert und über Hind III in antisense-Richtung in das Plasmid gesetzt.

Nr. 30: pCH rLuci plus 700

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 rLuci CPLX, in welchem ein 700 Bp Fragment einer GFP-Sequenz inseriert wurde. Dazu wurde das Fragment mit den Primern +700 und -nHind aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX amplifiziert und über Hind III in antisense-Richtung in das Plasmid gesetzt.

Nr. 31: pCH rLuci del Xba I - Bst EII plus 700

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del Xba I - Bst EII, in welchem ein 700 Bp Fragment einer GFP-Sequenz inseriert wurde. Dazu wurde das Fragment mit den Primern +700 und -nHind aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX amplifiziert und über Hind III in antisense-Richtung in das Plasmid gesetzt.

Nr. 32: pCH rLuci del del XbaI - Bsp EI plus 300

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del del XbaI - Bsp EI, in welchem ein 300 Bp Fragment einer GFP-Sequenz inseriert wurde. Dazu wurde das Fragment mit den Primern +300 und -nHind aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX amplifiziert und über Hind III in antisense-Richtung in das Plasmid gesetzt.

Nr. 33: pCH rLuci del del Bsp EI - Bst EII plus 300

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del del Bsp EI - Bst EII, in welchem ein 300 Bp Fragment einer GFP-Sequenz inseriert wurde. Dazu wurde das Fragment mit den Primern +300 und -nHind aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX amplifiziert und über Hind III in antisense-Richtung in das Plasmid gesetzt.

Nr. 34: pCH rLuci del Hind III - Sph I plus 200

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del Hind III - Sph I, in welchem ein 200 Bp Fragment einer GFP-Sequenz inseriert wurde. Dazu wurde das Fragment mit den Primern +200 und -nHind aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX amplifiziert und über Hind III in antisense-Richtung in das Plasmid gesetzt.

Nr. 35: pCH rLuci del Sph I - Rsr I plus 300

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del Sph I - Rsr I, in welchem ein 300 Bp Fragment einer GFP-Sequenz inseriert wurde. Dazu wurde das Fragment mit den Primern +300 und -nHind aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX amplifiziert und über Hind III in antisense-Richtung in das Plasmid gesetzt.

Nr. 36: pCH rLuci del Hind III - Rsr I plus 500

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del Hind III - Rsr I, in welchem ein 500 Bp Fragment einer GFP-Sequenz inseriert wurde. Dazu wurde das Fragment mit den Primern +500 und -nHind aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX amplifiziert und über Hind III in antisense-Richtung in das Plasmid gesetzt.

Nr. 37: pCH rLuci del Bsp EI - Bst EII del SphI - Rsr II

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del SphI - Rsr II, in welchem die Bsp EI - Bst EII Deletion eingesetzt wurde. Dazu wurde das Fragment mit der Deletion aus dem Plasmid pCH GFP del Xba I - Bst EII mit Bsp EI - Bst EII ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 38: pCH rLuci del Xba I - Bst EII del SphI - Rsr II

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del SphI - Rsr II, in welchem die Xba I - Bst EII Deletion eingesetzt wurde. Dazu wurde das Fragment mit der Deletion aus dem Plasmid pCH GFP del Xba I - Bst EII mit Pst I - Eco RI ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 39: pCH rLuci del Bsp EI - Bst EII del SphI - Rsr II plus 700

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del Bsp EI - Bst EII del SphI - Rsr II, in welchem ein 700 Bp Fragment einer GFP-Sequenz inseriert wurde. Dazu wurde das Fragment aus dem Plasmid pCH rLuci plus 700 über Hind III ausgeschnitten und in antisense-Richtung in das Plasmid gesetzt.

Nr. 40: pCH rLuci del Xba I - Bst EII del SphI - Rsr II plus 700

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del Xba I - Bst EII del SphI - Rsr II, in welchem die Xba I - Bst EII Deletion eingesetzt wurde. Dazu wurde das Fragment aus dem Plasmid pCH rLuci plus 700 über Hind III ausgeschnitten und in antisense-Richtung in das Plasmid gesetzt.

Nr. 41: pCH 1452 GFP-rLuci CPLX

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 rLuci CPLX, in welchem der GFP-ORF 5' an die renilla-Luziferase fusioniert wurde. Dazu wurde der GFP ORF mit den Primern +fusGFP und -fusGFP aus dem Plasmid pCH 1452 GFP CPLX amplifiziert und über Kpn I einkloniert.

Nr. 42: pCH GFP-rLuci del Xba I - Bst EII

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del Xba I - Bst EII, in welchem das Transgen GFP-rLuci eingesetzt wurde. Dazu wurde das Fragment mit dem Transgen aus dem Plasmid pCH 1452 GFP-rLuci CPLX mit Xho I - Hind III ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 43: pCH GFP-rLuci del XbaI - Bsp EI

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del XbaI - Bsp EI, in welchem das Transgen GFP-rLuci eingesetzt wurde. Dazu wurde das Fragment mit dem Transgen aus dem Plasmid pCH 1452 GFP-rLuci CPLX mit Xho I - Hind III ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 44: pCH GFP-rLuci del Bsp EI - Bst EII del SphI - Rsr II

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del Bsp EI - Bst EII del SphI - Rsr II, in welchem das Transgen GFP-rLuci eingesetzt wurde. Dazu wurde das Fragment mit dem Transgen aus dem Plasmid pCH 1452 GFP-rLuci CPLX mit Xho I - Hind III ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 45: pCH GFP-rLuci del Xba I - Bst EII del SphI - Rsr II

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del Xba I - Bst EII del SphI - Rsr II, in welchem das Transgen GFP-rLuci eingesetzt wurde. Dazu wurde das Fragment mit dem Transgen aus dem Plasmid pCH 1452 GFP-rLuci CPLX mit Xho I - Hind III ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 46: pCH 1452 firefly-Luci CPLX

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH 1452 rLuci CPLX, in welchem die renilla-Luziferase gegen die firefly-Luziferase ausgetauscht wurde. Dazu wurde der firefly-Luziferase ORF mit den Primern +ffLuci und -ffLuci aus dem Plasmid pBi-2 (von H. Bujard) amplifiziert und über Kpn I und Hind III einkloniert.

Nr. 47: pCH firefly-Luci del Xba I - Bst EII

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del Xba I - Bst EII, in welchem das Transgen firefly-Luci eingesetzt wurde. Dazu wurde das Fragment mit dem Transgen aus dem Plasmid pCH 1452 firefly-Luci CPLX mit Kpn I - Hind III ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 48: pCH firefly-Luci del XbaI - Bsp EI

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del Xba I - Bsp EI, in welchem das Transgen firefly-Luci eingesetzt wurde. Dazu wurde das Fragment mit dem Transgen aus dem Plasmid pCH 1452 firefly-Luci CPLX mit Kpn I - Hind III ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 49: pCH firefly-Luci del Bsp EI - Bst EII del SphI - Rsr II

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del Bsp EI - Bst EII del SphI - Rsr II, in welchem das Transgen firefly-Luci eingesetzt wurde. Dazu wurde das Fragment mit dem Transgen aus dem Plasmid pCH 1452 firefly-Luci CPLX mit Kpn I - Hind III ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

Nr. 50: pCH firefly-Luci del Xba I - Bst EII del SphI - Rsr II

Das Plasmid entstand aus dem Plasmid pCH rLuci del Xba I - Bst EII del SphI - Rsr II, in welchem das Transgen firefly-Luci eingesetzt wurde. Dazu wurde das Fragment mit dem Transgen aus dem Plasmid pCH 1452 firefly-Luci CPLX mit Kpn I - Hind III ausgeschnitten und in das Plasmid eingesetzt.

5.4. Primer

Die Primer wurden am Computer unter Verwendung der Programme Primer Express 1.0, Amplify 1.3 und DNA-Strider 1.3 erstellt. Schnittstellen sind kursiv gedruckt, die Sequenz, die auf die zu amplifizierende DNA passt, ist in Großbuchstaben geschrieben.

| Sequenz: | Name: |
|--|--------------|
| <i>agaacgtcgacgtacc</i> ATGGCCCTCCTGTTCC | +Ifna |
| <i>catgcaagctf</i> TCAAGATGAGCCCAG | -Ifna |
| <i>agaacgtcgacgtacc</i> ATGACCAACAAGTGT | +Ifnb |
| <i>catgcaagctf</i> TCAGTTTCGGAGGTA | -Ifnb |
| <i>agaacgtacc</i> ATGAAATATACAAGT | +Ifngam |
| <i>catgcaagctf</i> TTACTGGGATGCTCT | -Ifngam |
| <i>agaacgtacc</i> ATGGCTTCCAAGGTGTACGACC | +rLuci |
| <i>catgcaagctf</i> TTACTGCTCGTTCTTCAGCACG | -rLuci |
| <i>agaactggagcattc</i> GGGCTGCAGGTCGAGGG | +TTR |
| <i>catgcactcgag</i> CCTGTCAGGAGCTTGTGG | -TTR |
| <i>catgcaagcttgc</i> atgcgcccgcTTCAGGGTGAGTTTGGGGACCCTTGATTG | +bGlob |
| <i>cgcgcta</i> GCCAAACTCTAAACC | -nNhe |
| <i>agaactctagaagaactccgga</i> AAATATTTACCATTGGATAAAGGGTATTAAAC | +CoreDel |
| GATCTTGTTCCCAAGAATATGGTGA | -CoreDel |
| <i>AGCTTGCATGCGGGCCATCAGCGCATG</i> | +HindSph |
| <i>CGCTGATGGCCCGCATGCA</i> | -HindSph |
| <i>catgcaagcttcgaattc</i> AGAGACCACATGGTCCTGCTGG | +100 |
| <i>catgcaagcttcgaattc</i> TTATCAACAGAACACTCCAATCGG | +200 |
| <i>catgcaagcttcgaattc</i> ACAATGTGTACATCATGGCCGAC | +300 |
| <i>catgcaagcttcgaattc</i> GAAGGTGACACCCTGGTGAATAGA | +400 |

| | |
|---|---------|
| <i>catgcaagcttcgaattc</i> TGACTTTTTCAAGAGCGCCATGC | +500 |
| <i>catgcaagcttcgaattc</i> CTCGTGGAAGCTGGATGG | +700 |
| GCGAGAAAGTGAAAGCCTGC | -nHind |
| <i>agaacggtacc</i> ATGAGCAAGGGCGAGGAACT | +fusGFP |
| <i>agaacggtacctgac</i> cctccCTTGTACAGCTCGTCCATGCCATGT | -fusGFP |
| <i>agaacggtacc</i> ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG | +ffLuci |
| <i>catgcaagctt</i> TTACAATTTGGACTTTCCGCC | -ffLuci |

6. Abkürzungen und Einheiten

6.1. Abkürzungen

| | |
|--------------|---|
| AK | Antikörper |
| ccc DNA | kovalent geschlossene zirkuläre (<i>covalently closed circular</i>) DNA |
| CMV | Zytomegalievirus |
| CMV-Promotor | CMV - IE - Promotor |
| DHBV | Enten Hepatitis B Virus (<i>duck hepatitis B virus</i>) |
| DR | <i>direct repeat</i> |
| E. coli | Escherichia coli |
| FCS | fötales Kalbsserum |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>) |
| HBV | humanes Hepatitis B Virus |
| moi | virale Partikel pro Zelle (<i>multiplicity of infection</i>) |
| MT | Metallothionin |
| OD | optische Dichte |
| ORF | offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>) |
| p.i. | nach Infektion (<i>post infection</i>) |
| p.p. | nach Plattierung (<i>post plating</i>) |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PHH | primäre humane Hepatozyten (<i>primary human hepatocytes</i>) |
| rHBV | rekombinantes HBV |
| wt | wildtyp |

6.2. Einheiten

| | |
|------|------------------------|
| bp | Basenpaare |
| fmol | femto-Mol |
| kb | kilo-Basenpaare |
| kDa | kilo-Dalton |
| min | Minuten |
| µg | mikro-Gramm |
| ml | mili-Liter |
| nm | nano-Meter |
| nt | Nukleotide |
| s | Sekunden |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| VP | virale Partikel |

7. Literaturverzeichnis

- Ando, K., L.G. Guidotti, S. Wirth, T. Ishikawa, G. Missale, T. Moriyama et al. 1994. Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo. *J Immunol* 152:3245-53.
- Auriscchio, L., P. Delmastro, V. Salucci, O. G. Paz, P. Rovere, G. Ciliberto, N. La Monica, F. Palombo. 2000. Liver-specific alfa 2 interferon gene expression results in protection from induced hepatitis. *J. Virol.* 74:4816-23.
- Bartenschlager, R. und Schaller, H. 1988. The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *EMBO J.*, 7 (13), 4185-92.
- Ballay, A, M. Levrero, M. A. Buendia et al. 1995. In vivo and in vitro synthesis of the hepatitis B surface antigen and of the receptor for polymerized human serum albumin from recombinant human adenoviruses. *EMBO J.* 4:3861-5.
- Beck, J., H. Bartos, and M. Nassal. 1997. Experimental conformation of a hepatitis B virus (HBV) ϵ -like bulge-and-loop structure in avian HBV RNA encapsidation signals. *Virology.* 227:500-4.
- Benedict Yen, T. S. 1993. Regulation of hepatitis B virus gene expression. seminars in virology. 4:33-42.
- Berry, M. N., A. R. Grivell, M. B. Grivell, J. W. Phillips. 1997. Isolated hepatocytes--past, present and futur. *Cell Biol Toxicol.* 13:223-33.
- Berry, M. N., H. J. Halls and M. B. Grivell. 1992. Techniques for pharmacological and toxicological studies with isolated hepatocyte suspensions. *Life Sci.* 51:1-16.
- Berry, M. N., D. S. Friend. 1969. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol.* 43:506-20.

- Breiner, K. M., H. Schaller, P. A. Knolle. 2001a. Endothelial cell-mediated uptake of a hepatitis B virus: a new concept of liver targeting of hepatotropic microorganisms. *Hepatology*. 34:803-8.
- Breiner K. M., S. Urban, B. Glass, H. Schaller. 2001b. Envelope protein-mediated down-regulation of hepatitis B virus receptor in infected hepatocytes. *J Virol*. 75:143-50.
- Cattaneo, R., H. Will, and H. Schaller. 1984. Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *EMBO J*. 3:2191-6.
- Chang, S. F., H. J. Netter, M. Bruns, R. Schneider, K. Frolich, H. Will. 1999. A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA. *Virology*, 262 (1), 39-54.
- Chiang, P.-W. 1992. Characterizing cis elements which are essential for the HBV replication. Promotionsarbeit, Universität Heidelberg.
- Costa, R. H., D. R. Grayson. 1991. Site-directed mutagenesis of hepatocyte nuclear factor (HNF) binding sites in the mouse transthyretin (TTR) promoter reveal synergistic interactions with its enhancer region. *Nucleic Acids Research*. 19:4139-45.
- Diao J., A.A. Khine, F. Sarangi, E. Hsu, C. Iorio, L.A. Tibbles et al. 2001. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem*. 276:8328-40.
- Galle, P. R. und P. H. Krammer. 1998. CD95-induced apoptosis in human liver disease. *Semin Liver Dis*. 18:141-51.
- Galle, P. R., W. J. Hofmann, H. Walczak, H. Schaller, G. Otto, W. Stremmel et al. 1995. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 182:1223-30.

- Galle, P. R., J. Hagelstein, B. Kommerell, M. Volkmann, P. Schranz, H. Zentgraf. 1994. In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus. *Gastroenterology* 106:664-73.
- Ganem, D. 1996. Hepadnaviridae and their replication. In Fields, B. N., D. M. Knipe, and P. M. Howley (eds.). *Field's Virology*, fourth edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 2923-69.
- Greer, L. F., A. A. Szalay. 2002. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence*. 17:43-74.
- Gripon P., S. Rumin, S. Urban, J. Le Seyec, D. Glaise, I. Cannie, C. Guyomard, J. Lucas, C. Trepo, C. Guguen-Guillouzo. 2002. Infection of a new human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci*. 99(24):15655-60.
- Gripon, P., C. Diot and C. Guguen-Guillouzo. 1993. Reproducible high level infection of cultured adult human hepatocytes by hepatitis B virus: effect of polyethylene glycol on adsorption and penetration. *Virology*. 192:534-40.
- Guguen-Guillouzo, C., A. Guillouzo. 1983. Modulation of functional activities in cultured rat hepatocytes. *Mol Cell Biochem*. 54:35-56.
- Guidotti, L. G., R. Rochford, J. Chung, M. Shapiro, R. Purcell und F. V. Chisari. 1999. Viral Clearance Without Destruction of Infected Cells During Acute HBV Infection. *Science*. 284:825-9.
- Guidotti L. G , S. Guilhot, F. V. Chisari. 1994. Interleukin-2 and alpha/beta interferon down-regulate hepatitis B virus gene expression in vivo by tumor necrosis factor-dependent and -independent pathways. *J Virol*. 68:1265-70.
- Guild, B. C., M. F. Finer, D. E. Housman et al. 1988. Development of retroviral vectors useful for expressing genes in cultured embryonal cells and hematopoietic cells in vivo. *J. Virol*. 62:3795-801.

- He, T.C., S. Zhou, L.T. Da Costa, J. Yu, K. Vogelstein. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:2509-14.
- Heermann, K.H. and Gerlich, W.H. 1991. Surface proteins of hepatitis B viruses. In A. McLachlan (ed.), *Molecular biology of the hepatitis B virus*. CRC Press. Boca Raton, Florida, 109-144.
- Hoofnagle, J.H. and DiBisceglie, A.M. 1997. The treatment of chronic viral hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 336, 347-356.
- Hsu, I. C. , M. M. Lipsky, K. E. Cole, C. H. Su, B. F. Trump. 1985. Isolation and culture of hepatocytes from human liver of immediate autopsy. *In Vitro Cell Dev Biol.* 21:154-60.
- Huovila, A. P., A. M. Eder, and S. D. Fuller. 1992. Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J Cell Biol.* 118:1305-20.
- Hussain, R. F., A. M. Nouri and R. T. Oliver. 1993. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J Immunol Methods* 160:89-96.
- Jilbert, A. R., D. S. Miller, C. A. Scougall, H. Turnbull, C. J. Burrell. 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.
- Junker-Niepmann, M., R. Bartenschlager, and H. Schaller. 1990. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J.* 9:3389-96.
- Karlsson, S, K. Van Doren, S. G. Schweiger et al. 1985. Stable gene transfer and tissue-specific expression of a human globin gene using adenoviral vectors. *EMBO J.* 5:2377-85.
- Klöcker, U., T. Kürschner, H. Oberwinkler, U. Protzer. 2002. Presence of replication virus in recombinant hepadnavirus stocks results from homologous recombination and can be eliminated by the use of a packaging cell line. *J. Virology*, in press.

- Köck, J., H. J. Schlicht. 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.* 67:4867-74.
- Krisky, D.M., P. C. Marconi, T. Oligino, R. J. D. Rouse, D.J. Fink and J.C. Glorioso. 1997. Rapid method for construction of recombinant HSV gene transfer vectors. *Gene Therapy* 4:1120–1125.
- Lammert, F., N. Busch, S. Matern. 2000. Klinik und Therapie der Virushepatitiden. *Chirurg* 71: 381-388.
- Lau D. T., M. F. Khokhar, E. Doo, M. G. Ghany et al. 2000. Long-term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine. *Hepatology.* 32:828-34.
- Lien, J.M., Aldrich, C.M. and Mason, W.S. 1986. Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis. *J. Virol.*, 57, 229-36.
- Liu, J., Y. Wang, A. A. Szalay, A. Escher. 2000. Visualizing and quantifying protein secretion using a renilla luciferase-GFP fusion protein. *Luminescence.* 15:45-9.
- Liu, H. S., M. S. Jan, C. K. Chou, P. H. Chen, N. J. Ke. 1999. Is green fluorescent protein toxic to living cells? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260:712-717.
- Marion, P. L., L. Oshiro, D. C. Regnery, G. H. Scullard, and W. S. Robinson. 1980. A virus in Beechy ground squirrels that is related to hepatitis B virus. *PNAS.* 77:2941.
- Mason, W. S., G. Seal, and J. Summers. 1980. Virus of Peking ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol.* 36:829-36.
- Matsushita, T., S. Elliger, C.Elliger et al. 1998. Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther* 5:938-45.
- McAleer, W.J., E.B. Buynak, R.Z. Maigetter, D.E. Wampler, W.J. Miller, and M.R. Hilleman. 1984. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307, 178-180.

- Mistchenko A. S. , Falcoff R. .1987. Recombinant human interferon-gamma inhibits adenovirus multiplication in vitro. *J Gen Virol.* 68:941-4.
- Mochizuki, K., N. Hayashi, N. Hiramatsu, K. Katayama, Y. Kawanishi, A. Kasahara et al. 1996. Fas antigen expression in liver tissues of patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 24:1-7.
- Modriansky, M., J. Ulrichova, P. Bachleda, P. Anzenbacher, E. Anzenbachova, D. Walterova and V. Simanek. 2000. Human hepatocyte--a model for toxicological studies. Functional and biochemical characterisation. *Gen Physiol Biophys.* 19:223-35.
- Müller, M., P.H. Krammer. 2001. Mechanisms of Apoptosis. In: Boyer J., Chisari F., Fausto N., Schachter D., Shafritz D., Arias I., editors. *The Liver: Biology and Pathobiology:* 4th edition, p.187-205.
- Nakai, H., R. W. Herzog, J. N. Hagstrom et al. 1998. Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer of human blood coagulation factor IX into mouse liver. *Blood.* 91:4600-7.
- Naldini, L. 1998. Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Current opinion in biotechnology,* 9:457-463.
- Naldini, L., U. Böhmer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma and D. Trono. 1996. In Vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vektor. *Science,* Vol 272, 12 April 1996.
- Pan, J., L.X. Duan, B.S. Sun, M.A. Feitelson. 2001. Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B. *J Gen Virol* 82:171-82.
- Paoletti, E. 1996. Applications of pox virus vectors to vaccination: An update. *Proc Natl Acad Sci* 93:11349–53.

- Patzer, E. J., G. R. Nakamura, C. C. Simonsen, A. D. Levinson, and R. Brands. 1986. Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 58:884-92.
- Peter, M. E. and P. H. Krammer. 1998. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol.* 10:545-51.
- Protzer, U., M. Nassal, P. W. Chiang, M. Kirschfink, and H. Schaller. 1999. Interferon gene transfer by a hepatitis B virus vector efficiently suppresses wild-type virus infection. *Proc Natl Acad Sci.* 96(19):10818-23.
- Protzer, U., H. Schaller. 2000. Immune escape by hepatitis B viruses. *Virus Genes* 21:27-37.
- Reese, J. A. , J. L. Byard. 1981. Isolation and culture of adult hepatocytes from liver biopsies. *In Vitro.* 17:935-40.
- Rumin, S., P. Gripon, J. Le Seyec, M. Corral-Debrinski, C. Guguen-Guillouzo. 1996. Long-term productive episomal hepatitis B virus replication in primary cultures of adult human hepatocytes infected in vitro. *J Viral Hepat* 3:227-38.
- Samuel, C. E. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews.* 14:778-809.
- Schulze-Bergkamen H., A. Untergasser, A. Dax, H. Vogel, P. Büchler, E. Klar, T. Lehnert, H. Friess, M. W. Büchler, M. Kirschfink, W. Stremmel, P. H. Krammer, M. Müller and U. Protzer. Primary human hepatocytes - a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection. submitted for publication.
- Seglen, P. O. 1976. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* 13:29-83.
- Seeger, C., W. S. Mason. 2000. Hepatitis B Virus Biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 94:51-68.

- Sprengel, R., E. F. Kaleta, and H. Will. 1988. Isolation and characterisation of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol.* 62:3832-9.
- Sprinzel, M. F., H. Oberwinkler, H. Schaller, U. Protzer. 2001. Transfer of hepatitis b virus genomes by adenovirus vectors into cultured cells and mice: crossing the species barrier. *J Virol.* 75:5108-5118.
- Su, F., R.J. Schneider. 1997. Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8744-9.
- Summers, J., J. M. Smolec, and R. Snyder. 1978. A virus similar to hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *PNAS.* 75:4533-40.
- Sung, V. M. H., M. M. C. Lai. 2002. Murine retroviral Pseudotype virus containing hepatitis B virus large and small surface antigens confers specific tropism for primary human hepatocytes: a potential liver-specific targeting system. *J Virol.* 76:912-17.
- Tanaka, N., M. Sato, M. S. Lamphier, H. Nozawa, E. Oda, S. Noguchi, R. D. Schreiber, Y. Tsujimoto, T. Taniguchi. 1998. Type I interferons are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells. *Genes Cells.* 3:29-37.
- Untergasser, A. 2001. Rekombinante Hepatitis B Viren für den Gentransfer. Diplomarbeit, Universität Heidelberg.
- Walczak H., R. E. Miller, K. Ariail, B. Gliniak, T. S. Griffith, M. Kubin et al. 1999. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med.* 5:157-63.
- Walther, W and U. Stein. 2000. Viral vektors for gene transfer. *Drugs.* 60:249-271.
- WHO. 1996. Viral hepatitis prevention board. Prevention and control of hepatitis B in the community. WHO Communicable Series No 1. 1-26.

Yang W. , W. S. Mason, J. Summers. 1996. Covalently closed circular viral DNA formed from two types of linear DNA in woodchuck hepatitis virus-infected liver. *J Virol.* 70:4567-75.

8. Publikationen, Vorträge, Poster**Publikationen:**

Untergasser, A. and U. Protzer. HBV vectors allow to completely knock out all viral gene expression and to insert foreign promoters. In Vorbereitung.

Schulze-Bergkamen H., A. Untergasser, A. Dax, H. Vogel, P. Büchler, E. Klar, T. Lehnert, H. Friess, M. W. Büchler, M. Kirschfink, W. Stremmel, P. H. Krammer, M. Müller and U. Protzer. Primary human hepatocytes - a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection. Zur Veröffentlichung eingereicht.

Untergasser, A. 2001. Rekombinante Hepatitis B Viren für den Gentransfer. Diplomarbeit, Universität Heidelberg.

Vorträge und Präsentationen:

Untergasser, A., H. Oberwinkler und U. Protzer. 2002. Improvement of HBV Vectors as Candidate Vectors for Gene Therapy. Keynote an der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Erlangen.

Klöcker, U., A. Untergasser und U. Protzer, 2002. Recombinant Hepadnavirus Stocks Contain Replicating Virus Generated by Homologous Recombination. Posterpräsentation an der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Erlangen.

Untergasser, A., H. Oberwinkler und U. Protzer. 2002. Verbesserung von HBV - Vektoren als Kandidaten für eine lebergerichtete Gentherapie. Posterpräsentation an der 18. Jahrestagung der GASL in Leipzig (Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber).

Untergasser, A., H. Oberwinkler und U. Protzer. 2001. Pseudo typing of Hepatitis B vectors. Posterpräsentation an dem EMBO Workshop: "The Cell Biology of Virus Infection" in Heidelberg.