

**Identifizierung einer O-Glykosylierungsstelle der
Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) preS2-Domäne und
deren Einfluß auf den intrazellulären Transport des
middle surface antigen (WHmsAg)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs
Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
der

Universität Gesamthochschule Essen

angefertigt im

Institut für Virologie des Universitätsklinikums
der
Universität Gesamthochschule Essen

vorgelegt von

Oliver Schildgen

aus Köln

3. Juli 2001

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Virologie der Universität GH Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Roggendorf

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

3. Gutachter: Priv. Doz. Dr. L. Klein-Hitpaß

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Priv. Doz. Dr. T. Lumbsch

Tag der mündlichen Prüfung: Mittwoch, 09. Januar 2002

Verena gewidmet

I. Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Roggendorf danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Er hat diese Arbeit sowohl fachlich als auch persönlich unterstützt und in vielen Diskussionen wertvolle Anregungen gegeben.

Dr. Mengji Lu als meinem Betreuer danke ich für die fachliche Anleitung die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei den Mitarbeitern des Instituts für Virologie bedanke ich mich für Ihre freundliche Unterstützung. Insbesondere Dr. Melanie Fiedler und Prof. Sergei Viazov haben durch ihre Diskussionsbereitschaft wertvolle Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit geleistet.

Dem Chirurgen-Team Uta Dahmen/ Li Yun danke ich für ihre Hilfe bei den Leberbiopsien.

Für die Unterstützung durch das zentrale Tierlabor des Universitätsklinikums sowie die Einführung in den Umgang mit Woodchucks bedanke ich mich bei Eike Drees, Dr. Gero Hilken, Dr. Ines Bolle und Prof. Dr. K. Militzer.

Den Mitarbeitern des Instituts für Anatomie, insbesondere Herrn Babioch, danke ich für ihre Hilfe bei der Fluoreszenz- und Konfokal-Laser-Mikroskopie.

Meinem Großvater und meinen Eltern möchte ich für die großzügige Unterstützung während dieser Arbeit und während des gesamten Biologiestudiums danken.

Verena, die mich während der gesamten Zeit persönlich unterstützt hat und mir jederzeit zur Seite gestanden hat, möchte ich von ganzem Herzen danken. Ihr ist diese Arbeit gewidmet.

II. Abkürzungsverzeichnis

bp	Base pairs, Basenpaare
cfu	colony forming units
CMV	Cytomegalovirus
DHBV	Duck Hepatitis B Virus, Hepadnavirus der Ente
DSS	DNA Sequenzier Service (der Universitätsklinik Essen)
DTT	Dithiotreitol
EDTA	E thylendi a minotetraacetat
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FBS	Fetal Bovine Serum, Fötales Rinderserum, entspricht FCS
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälber Serum)
GSHV	Ground Squirrel Hepatitis Virus, Hepadnavirus des Erdhörnchens
HBV	Hepatitis B Virus (des Menschen)
HHBV	Heron Hepatitis Virus, Hepadnavirus des Reiher
IF	Immunfluoreszenz-Färbungen
IG1	Institutsgruppe 1
kb	kilobases, Kilobasen
kLSM	konfokale Laser Scanning Mikroskopie
MCS	Multiple Cloning Site
MEM	Minimal Essential Medium
n.d.	nicht durchgeführt
ORF	open reading frame, DNA-Leserahmen
ori	origin of replication
PAGE	P olyacrylamid g elektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PBS-d	phosphate buffered saline, deficient, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
rPCR	recombinant Polymerase Chain Reaction, zur Einführung von Mutationen
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SOE-PCR	Sequence Overlapping Extension-PCR
SV	Simian Virus
UZ	Ultrazentrifugation
WHV	Woodchuck Hepatitis Virus, Hepadnavirus des amerikanischen Waldmurmeltiers
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor - α
IFN- γ	Interferon - γ
IL	Interleukin

IUPAC-Abkürzungen, Abkürzungen für allgemein bekannte physikalische Meßgrößen und im deutschen Sprachgebrauch übliche Abkürzungen werden nicht gesondert aufgeführt. In der deutschen Wissenschaftssprache und in der Literatur gebräuchliche englische Wörter wurden nicht zwangsläufig übersetzt.

III. Inhaltsverzeichnis

- I. Danksagung
- II. Verzeichnis der Abkürzungen
- III. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1. Hepadnaviren S. 14
- 1.2. Morphologie und Genom der Hepadnaviren S. 15
- 1.3. Replikationszyklus der Hepadnaviren S. 19
- 1.4. Die Oberflächenproteine der Hepadnaviren S. 21
- 1.5. Pathogenese S. 23
- 1.6. Das Woodchuckmodell zur Untersuchung von Hepadnaviren S. 29
- 1.7. Ziele der Arbeit S. 30

2. Material und Methoden

2.1. Material

- 2.1.1. Geräte S. 32
- 2.1.2. Chemikalien S. 32
- 2.1.3. Reagenziensysteme S. 33
- 2.1.4. Enzyme und Größenstandards S. 33
- 2.1.5. Puffer und Lösungen S. 34
- 2.1.6. Plastikware S. 36
- 2.1.7. Nährmedien S. 36
- 2.1.8. Zelllinien S. 36
- 2.1.9. Bakterien S. 37
- 2.1.10. Viren S. 37
- 2.1.11. Plasmide S. 37
- 2.1.12. Oligonukleotide S. 39
- 2.1.13. Antikörper S. 40
- 2.1.14. Tiere S. 40

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden	S. 41
2.2.1.1. Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	S. 41
2.2.1.2. Plasmidpräparationen	S. 41
2.2.1.3. Restriktionsspaltungen von DNA	S. 42
2.2.1.4. Klonierungen	S. 42
2.2.1.5. Sequenzierungen	S. 42
2.2.1.6. <i>In vitro</i> Transkription	S. 43
2.2.1.7. Polymerase Kettenreaktion	S. 43
2.2.1.8. SOE-PCR	S. 44
2.2.1.9. Bakterien-Kolonie-PCR	S. 44
2.2.1.10. Klonierung von PCR-Amplifikaten	S. 44
2.2.1.11. DNA-Extraktion	S. 44
2.2.1.12. RNA-Extraktion	S. 44
2.2.1.13. Radioaktive Markierung von DNA	S. 45
2.2.1.14. Elektrophorese von Nukleinsäuren	S. 45
2.2.1.15. Southern Blot	S. 45
2.2.1.16. Elektrophorese von Proteinen	S. 45
2.2.1.17. Coomassie-Färbung von Proteingelen	S. 46
2.2.1.18. Proteinbestimmung	S. 46
2.2.1.19. Western-Blot	S. 46
2.2.1.20. Western-Spot-Blot	S. 46
2.2.1.21. <i>In vitro</i> Translation	S. 47
2.2.1.22. RNase-Protection-Assay	S. 47
2.2.1.23. ELISA	S. 48
2.2.2. Zellkulturtechniken und spezielle virologische Methoden	S. 48
2.2.2.1. Kultivierung von Woodchuck-Hepatocyten WH12/6	S. 48
2.2.2.2. Kultivierung von Woodchuck-Fibroblasten	S. 48
2.2.2.3. Kultivierung von BHK-Zellen	S. 48
2.2.2.4. Kultivierung von SF9-Zellen	S. 48
2.2.2.5. Transfektion eukaryotischer Zellen	S. 49
2.2.2.6. Isolierung von Lymphocyten	S. 49
2.2.2.7. Stimulation von Lymphocyten	S. 49
2.2.2.8. Immunfluoreszenz-Färbungen	S. 49
2.2.2.9. Überexpression des Woodchuck IFN- γ Rezeptors	S. 50
2.2.2.10. Fraktionierung von kultivierten Zellen	S. 50

2.2.3. Tierversuche	S. 50
2.2.3.1. <i>In vivo</i> Transfektion	S. 50
2.2.3.2. Behandlung mit α -Galaktosylceramid	S. 50
2.2.3.3. Blutentnahmen	S. 51
2.2.3.4. Leberbiopsien	S. 51
2.2.3.5. Infektionsversuche	S. 51

3. Ergebnisse

3.1. Konstruktion und Charakterisierung von preS2-Mutanten

3.1.1. Konstruktion von chimären und rekombinanten preS2-Proteinen aus WHV und HBV	S. 52
3.1.2. Sekretion der chimären Proteine	S. 55
3.1.3. <i>In vitro</i> Translation der chimären Proteine	S. 56
3.1.4. Intrazelluläre Lokalisation und Morphologie der Fusionsproteine	S. 58
3.1.5. Kolokalisation der Fusionsproteine mit Zellkompartimenten	S. 60
3.1.6. Restriktionskarte des Vektors pUC119/CMV/WHV	S. 67
3.1.7. Klonierung des Vektors pUC119/CMV/WHV/neo ⁺	S. 68
3.1.8. Klonierung einer WHV-S-Knock-Out-Mutante	S. 68
3.1.9. Klonierung einer WHV-preS2-Knock-Out-Mutante	S. 68
3.1.10. Klonierung einer preS2-Glykosilierungsmutante	S. 69
3.1.11. <i>In vivo</i> Transfektion der S-knock-out Mutante	S. 69
3.1.12. <i>In vivo</i> Transfektion der preS2-knock-out-Mutante	S. 70
3.1.13. <i>In vivo</i> Transfektion der preS2 Glykosylierungs-Mutante	S. 72

3.2. Etablierung eines RNase Protection Assays

3.2.1. Cytokinprofil der Leber infizierter und immuner Woodchucks	S. 74
---	-------

3.3. Anwendungsmöglichkeiten des RPA

3.3.1. Behandlung chronisch WHV infizierter Marmeltiere mit α -Galaktosyl-Ceramid	S. 80
3.3.2. Fluktuationen der Viruslast im Serum	S. 80
3.3.3. Cytokinprofil der Leber vor und nach α -Galaktosyl-Ceramid Gabe	S. 81
3.3.4. Stimulierung von Lymphocyten mit α -Galaktosyl-Ceramid	S. 84
3.3.5. Weitere Anwendungsmöglichkeiten des RPA	S. 87
3.3.6. Umklonierung des Interferon- γ -Rezeptors in den Baculotransfervektor	S. 89
3.3.7. Überexpression und Reinigung des Interferon γ Rezeptors im Baculovirussystem	S. 89

4. Diskussion

4.1. Identifizierung und Charakterisierung einer WHV-preS2-Glykosylierungsstelle

- 4.1.1. Identifizierung einer Glykosylierungsstelle des preS2 Proteins S. 91
- 4.1.2. Einfluß der Glykosylierung auf die intrazelluläre Verteilung des preS2-Proteins S. 92
- 4.1.3. Bedeutung der Kolokalisation des preS2-Proteins mit zellulären Kompartimenten S. 93
- 4.1.4. *In vivo* Transfektionen der preS2-Mutanten S. 94

4.2. Etablierung eines RNase Protection Assays

- 4.2.1. Fluktuationen des Cytokinprofils während der chronischen Infektion S. 97

4.3 Weitere Anwendungsmöglichkeiten des RPA

- 4.3.1. Behandlung chronisch WHV-infizierter Tiere mit α -Galaktosyl-Ceramid S. 99
- 4.3.2. Weitere Anwendungsmöglichkeiten des RPA S. 100
- 4.3.3. Expression des Interferon γ Rezeptors des Murmeltiers S. 100

5. Zusammenfassung S. 102

Anhang: Sequenzen

Literaturverzeichnis

Lebenslauf Oliver Schildgen

Erklärungen gemäß § 6, Abs. 2, 6-8, Promotionsordnung

FB 09 der Universität Gesamthochschule Essen

1. Einleitung

1.1. Hepadnaviren

Bei den Hepadnaviren handelt es sich um Hepatitis auslösende DNA Viren, mit einem zirkulären, partiell doppelsträngigen Genom von etwa 3,2 kB. Der Name Hepadnaviren leitet sich von dem mit diesen Viren assoziierten Krankheitsbild, der **Hepatitis**, und der Art ihrer Nukleinsäure (**DNA**) her. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist das Hepatitis B Virus des Menschen (Dane *et al.*, 1970). Im Tiermodell werden aber auch andere Virustypen untersucht, wie z.B. das Woodchuck Hepatitisvirus (s.u.) (Summers *et al.*, 1978) und das Entenhepatitisvirus (DHBV) (Mason *et al.*, 1980).

Bekannt sind darüber hinaus auch die Hepatitisviren anderer Nager, wie die des Erdhörnchens (GSHV) (Marion *et al.*, 1980) und des arktischen Erdhörnchens (ASHV) (P. Testut *et al.*, 1996), aber auch bei Gänsen und dem Reiher (HHBV) sind Vertreter dieser Virusfamilie beschrieben worden (D. Ganem, 1996; Sprengel *et al.*, 1988). Neuere Arbeiten beschreiben außerdem ein Hepadnavirus in einem Neuweltaffen (Wolly Monkey, Wollaffen), einem weiteren Primaten als dem Menschen (R.E. Lanford *et al.*, 1998 und 2000). Jüngere Untersuchungen zeigen zusätzlich, daß es auch in dem Borneo Orang Utang (*Pongo pygmaeus*) HBV-ähnliche Hepadnaviren gibt (K. Warren *et al.*, 1999).

Hepatotrope Viren kommen darüber hinaus wahrscheinlich bei Känguruhs und Schlangen (Howard, 1986), Tree Squirrels (*Sciurus carolinensis*) (Feitelson *et al.*, 1986) und Präriehunden (Snyder, 1979) vor. Einen Überblick über die gut charakterisierten Hepadnaviren und ihre Wirte gibt die Tabelle 1.

Hepadnavirus	natürlicher Wirt
Hepatitis B Virus (HBV)	Mensch (<i>Homo sapiens</i>) (Dane <i>et al.</i> , 1970)
Woolly Monkey Hepatitis B Virus (WMHBV)	Neuweltaffen (Woolly Monkey; <i>Lagothrix lagothricha</i>) (R.E. Lanford <i>et al.</i> , 1998)
Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)	amerikanisches Waldmurmeltier (<i>Marmota monax</i>) (Summers <i>et al.</i> , 1978)
Ground Squirrel Hepatitis Virus (GSHV)	Erdhörnchen (<i>Spermophilus beecheyi</i>) (Marion <i>et al.</i> , 1980)
Arctic Squirrel Hepatitis Virus (ASHV)	Arktische Erdhörnchen (<i>Spermophilus parryi kennicotti</i>) (P. Testut <i>et al.</i> , 1996),
Duck Hepatitis B Virus (DHBV)	Pekingente (<i>Anas domesticus</i>) (Mason <i>et al.</i> , 1980)
SGHBV	Graugans (<i>Anser caerulescens</i> ; Chang <i>et al.</i> , 1999)
Heron Hepatitis B Virus (HHBV)	Graureiher (<i>Adria cinera</i>) (Sprengel <i>et al.</i> , 1988)

Tabelle 1: Die bekanntesten Vertreter der Familie der Hepadnaviren und ihre natürlichen Wirte

Alle bisher bekannten Hepadnaviren zeichnen sich durch ihren Hepatotropismus sowie sehr hohe Wirts- und Artspezifität aus. So ist zum Beispiel das europäische Murmeltier (*Marmota marmota*) trotz des hohen Verwandtschaftsgrades zu *Marmota monax* nicht mit dem WHV zu infizieren (M. Roggendorf & T.K. Tolle, 1995).

Betrachtet man die Familie der Hepadnaviren erkennt man, daß die Verwandtschaft innerhalb der Gruppe der Säuger-Hepadnaviren (Orthohepadnaviren) und innerhalb der Gruppe der aviären Hepadnaviren größer als zwischen den beiden Gruppen ist (D. Ganem, 1996).

Im weiteren soll nur auf die Unterschiede zwischen WHV und HBV eingegangen werden, da es sich neben dem Duck Hepatitis B Virus zum einen um zwei der am besten untersuchten Vertreter handelt, zum anderen, weil diese Unterschiede für die vorliegende Arbeit eine zentrale Rolle spielen.

Trotz der hohen Homologien beider Viren führt die WHV-Infektion häufiger zur Tumorbildung als die HBV-Infektion. Der Grund dafür liegt vermutlich in der Integration seiner DNA in den N-myc2 oder den c-myc locus des Woodchuck-Genoms (G. Fourel *et al.*, 1990; Y. Wei *et al.*, 1992). Eine derart häufige Integration in einen wichtigen Gen-Locus ist beim Menschen nicht zu beobachten. (M.A. Buendia *et al.*, 1993).

Darüber hinaus fehlt dem WHV-Genom offensichtlich der Enhancer I des HBV (Q. Di *et al.*, 1997). Ein weiterer wichtiger Unterschied, der für diese Arbeit entscheidend ist, ist das Unvermögen des MWHs-Proteins (*Middle WHV surface*) eine Serumalbuminbindung einzugehen, wozu das MHBs-Protein (*Middle HBV surface*) fähig ist (B. Krone *et al.*, 1990; C. Pohl *et al.*, 1986; B. Shamoon *et al.*, 1994). Der letzte, sehr wichtige Unterschied, der hier erwähnt werden soll, ist die wesentlich längere preS1-Domäne des WHV, die sich deutlich von der des HBV unterscheidet (Galibert *et al.*, 1982; T.K. Tolle *et al.*, 1998). Auf die Unterschiede der preS-Region wird unter Punkt 1.5 näher eingegangen..

1.2. Morphologie und Genom der Hepadnaviren

Die Virionen der Hepadnaviren bilden sphärische Partikel, deren Durchmesser bei 40 bis 47 nm liegt (WHV: 45 nm). Sie bestehen aus einer Lipiddoppelschicht (envelope), die ihren Ursprung in der Wirtszelle hat und virale Proteine trägt, und einen Kern (core), der die virale Nukleinsäure und die Polymerase (DNA-Polymerase mit reverser Transkriptaseaktivität; Robinson und Greenman, 1974) beinhaltet.

Die in die Hülle eingelagerten Proteine werden als preS1, preS2 und S-Protein (von engl.: Surface) bezeichnet und sind unterschiedlich glykosiliert. Der Kern setzt sich aus einem einzigen

Protein zusammen, dem core-Protein, das keinerlei posttranslationalen Modifikationen unterworfen ist.

Im Serum infizierter Patienten oder Tiere werden neben den vollständigen Virionen auch zahlreiche unvollständige, tubuläre oder sphärische subvirale Partikel gefunden, die nur S- und preS2-Protein, letzteres allerdings in sehr geringer Menge, enthalten. Virale DNA sowie das preS1-Protein fehlen bei diesen Partikeln völlig, ihre Größe liegt bei etwa 20 nm im Durchmesser und 100 nm oder mehr in der Länge (Dane *et al.*, 1970; Tiollais *et al.*, 1985; Schödel *et al.*, 1989). Die Bildung dieser Partikel erfolgt während der Replikation in den Hepatocyten im Überschuß (Ganem und Varmus, 1987) und beeinflusst die virale Pathogenese (Brunns *et al.*, 1998).

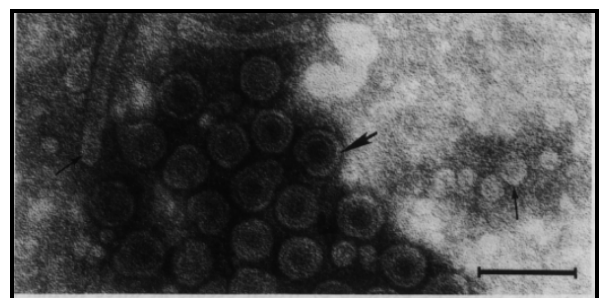
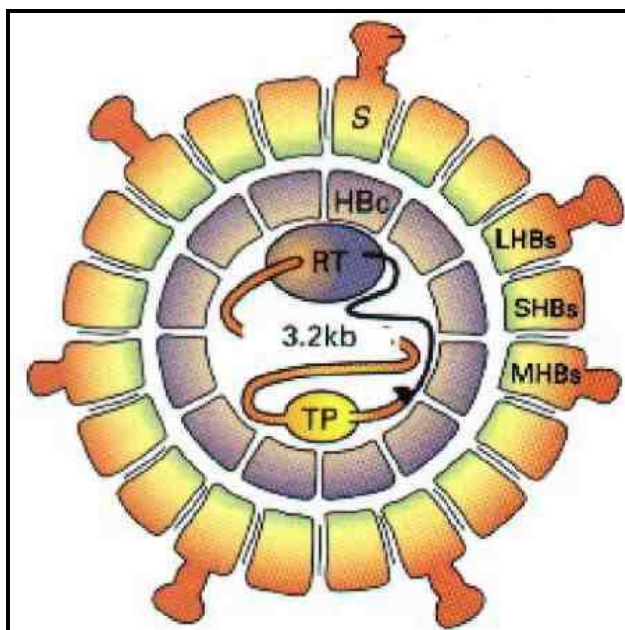


Abbildung 1: Morphologie der Hepadnaviren *links:* Die Abbildung zeigt schematisch ein Virus-Partikel (Dane-Partikel) mit den drei Oberflächenproteinen preS1, preS2 und S sowie das Capsid mit der Polymerase und der viralen Nukleinsäure (aus: Homepage des Instituts für Virologie der Universitätskliniken Essen, 2001). *Oben:* EM-Aufnahme der Dane-Partikel und der subviralen Partikel (aus: White und Fenner, 1994).

Das Genom der Hepadnaviren besteht aus einer etwa 3,2 kB langen, partiell doppelsträngigen zirkulären DNA (3,3 kB bei WHV, 3,2 kB bei HBV). Die Genome der Hepadnaviren gehören somit zu den kleinsten der bisher bekannten tier- und humanpathogenen Viren.

Der komplexe Genomaufbau und die Anordnung der sich überlappenden Leserahmen kompensieren jedoch die geringe Größe (Miller *et al.*, 1989). Der DNA-Minusstrang der Hepadnaviren hat immer eine konstante Länge, während der Plus-Strang stark variiert und in seiner Länge ca. 50-100% des Minus-Stranges umfaßt (Tiollais *et al.*, 1985; Howard, 1986). Dabei ist das 3'-Ende des Plusstranges variabel, wohingegen das 5'-Ende konstant bleibt. Der zirkuläre Aufbau des Genoms kommt durch eine Überlappung des 5'- und des 3'-Endes von bis zu 200 Basen zustande, eine kovalente Bindung erfolgt in diesem Stadium nicht (Tiollais *et al.*, 1988).

Die vier offenen Leserahmen sind im einzelnen wie folgt organisiert:

- 1.) Der ORF für die Oberflächengene (preS1, preS2, S) codiert mit drei Startcodons für die Proteine *small*, *middle* und *large* (S, M, L) *surface antigen*. Diese Proteine werden in die Lipidhülle eingelagert und werden im Abschnitt 1.4 näher behandelt.
- 2.) Das Gen für die virale Polymerase umspannt etwa 75% des gesamten Genoms und hat dementsprechende Überlappungen mit den übrigen Leserahmen. Dieser ORF codiert für die Polymerase/Reverse Transkriptase, die RNase H und das DNA-bindende Protein.
- 3.) Die kleinste codierende Sequenz ist die für das X-Protein, das evtl. eine Rolle bei der Carcinogenese spielt.
- 4.) Der vierte Leserahmen ist der für die core/preCore Region. In diesem Leserahmen liegen zwei ATG-Startcodons für das core-Protein (bildet später das Kapsid) und das e-Antigen. Im Falle von WHV findet man in der core Region ein weiteres Startcodon. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die hepadnaviralen Proteine und deren bisher bekannte Funktionen:

Protein	Molekulargewicht	Modifikation	Funktion
HBsAg	24 kD 27 kD	- glykosyliert	Oberflächenprotein, Induktion neutralisierender Antikörper, Partikelbildung
preS2	33 kD 36 kD	- glykosyliert	Oberflächenprotein, Induktion neutralisierender Antikörper, Bindung an Serumalbumin (nicht bei WHV)
preS1	39 kD 42 kD	acyliert, glykosyliert, acyliert	Oberflächenprotein, Adsorption an Rezeptor (gp180 bei DHBV) Induktion neutralisierender Antikörper
core	22 kD	phosphoryliert	Kapsidprotein, Interaktion mit dem Genom, Partikelbildung
e-Antigen	16 kD		sezerniertes Protein, zu geringem Anteil membranassoziiert
Polymerase	90 kD	?	DNA- und RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase, RNaseH, terminales Protein für die Initiation der Replikation
HBx-Protein	17 kD		Transaktivator für virale und zelluläre Promotoren, Bindung an Tumorsuppressorprotein p53, Stimulation der Proteinkinase C

Tabelle 2: Eigenschaften viraler Proteine; nach Modrow und Falke, 1997

1.3. Replikationszyklus der Hepadnaviren

Die virale Replikation findet in erster Linie in der Leber der infizierten Wirte statt. Das Virus kann jedoch auch in anderen Organen wie der Milz oder Lymphknoten, sowie in zirkulierenden Lymphocyten nachgewiesen werden. Darüber hinaus gibt es Hinweise, daß das Woodchuck Hepatitis Virus auch im Thymus und im Knochenmark infizierter Tiere vorhanden ist (Korba *et al.*, 1986 und 1987). Der Replikationszyklus der Hepadnaviren erinnert an den der Retroviren (Nassal und Schaller, 1996) und wurde erstmalig für das Enten Hepatitis B Virus (DHBV), später dann auch für das humane HBV Virus beschrieben (Miller *et al.*, 1989; Summers und Mason, 1982; Blum *et al.*, 1984; Fowler *et al.*, 1984). Nach Bindung an den bisher nur für DHBV bekannten Rezeptor (Tong *et al.*, 1999; Breiner *et al.*, 2000 und 2001; Klingmüller *et al.*, 1993; Ishikawa *et al.*, 1994) wird das Nukleokapsid mit der partiell doppelsträngigen DNA aus der Hülle freigesetzt und gelangt zum Zellkern. Dort wird mit Hilfe zellulärer Polymerasen die virale, partiell doppelsträngige DNA vervollständigt und in ihre zelluläre Form, die cccDNA (covalently closed circular DNA) überführt (Summers und Mason, 1982; Will *et al.*, 1987). Die Transkription der genomischen und subgenomischen RNAs erfolgt vom Minusstrang der cccDNA, deren Translation dann im Cytoplasma stattfindet (Summers und Mason, 1982). Die Translation des core-Proteins und der viralen Polymerase geht von der genomischen RNA aus, welche auch als Prägenom fungiert. Die Oberflächenproteine werden von den subgenomischen RNA-Spezies translatiert. Ein als Primer der Minusstrang DNA-Synthese wirkendes, DNA-bindendes Protein wird zusammen mit der Polymerase und der pregenomischen RNA in den core Partikel verpackt (Gerlich *et al.*, 1980; Seeger *et al.*, 1986; Will *et al.*, 1987). Das Verpackungssignal für die RNA liegt in deren 5'-Bereich (Junker-Niepmann *et al.*, 1990). Der DNA-Minusstrang wird revers von der pregenomischen RNA transkribiert. Die Transkription erfolgt durch die virale Polymerase, die auch RT-Polymerase und RNaseH-Funktion hat. Die Polymerase erkennt dabei sogenannte ϵ -Strukturen am 5'-Ende der pregenomischen RNA. Alle transkribierten viralen RNA-Moleküle weisen diese stem-loop Struktur an ihrem 3'-Ende auf, aber es wird nur die ϵ -Struktur der 5'-pgRNA als Signal für die reverse Transkription erkannt. Die Transkription erfolgt erst, wenn bereits eine nicht kovalente Wechselwirkung zwischen der Polymerase und dem Kapsid besteht (Ganem, 1996). Einen Überblick über die Transkripte gibt auch die Abbildung 2 im Abschnitt 1.2..

Diese Synthese erfolgt erst nach Anlagerung eines 20 bp langen Oligonukleotids an das 5'-Ende der pregenomischen RNA. Der Transport der Nukleokapside mit vollständiger oder partiell synthetisierter Plusstrang DNA erfolgt entweder zurück zum Kern oder zum endoplasmatischen Retikulum. Am ER werden die core-Partikel in die Lipidhülle, die bereits die Oberflächenproteine

enthält, verpackt und anschließend sezerniert (Tiollais *et al.*, 1985). Die Sekretion der viralen und subviralen Partikel erfolgt wahrscheinlich über den Golgi-Apparat. Während des Transports vom ER zum Golgi-Apparat kommt es zu diversen Modifikationen der Oberflächenproteine, wie z.B. Phosphorylierung und Glykosylierung (s. Tabelle 2).

Zellen, die persistent mit Hepadnaviren infiziert sind enthalten etwa 10000 und mehr Replikationsintermediate der viralen DNA-Synthese. Die Infektion kann in ca. 5 % aller Fälle chronisch werden und ist dann sehr häufig Ursache für hepatozelluläre Karzinome, die unbehandelt (Chemotherapie oder Lebertransplantation) zum Tode führen.

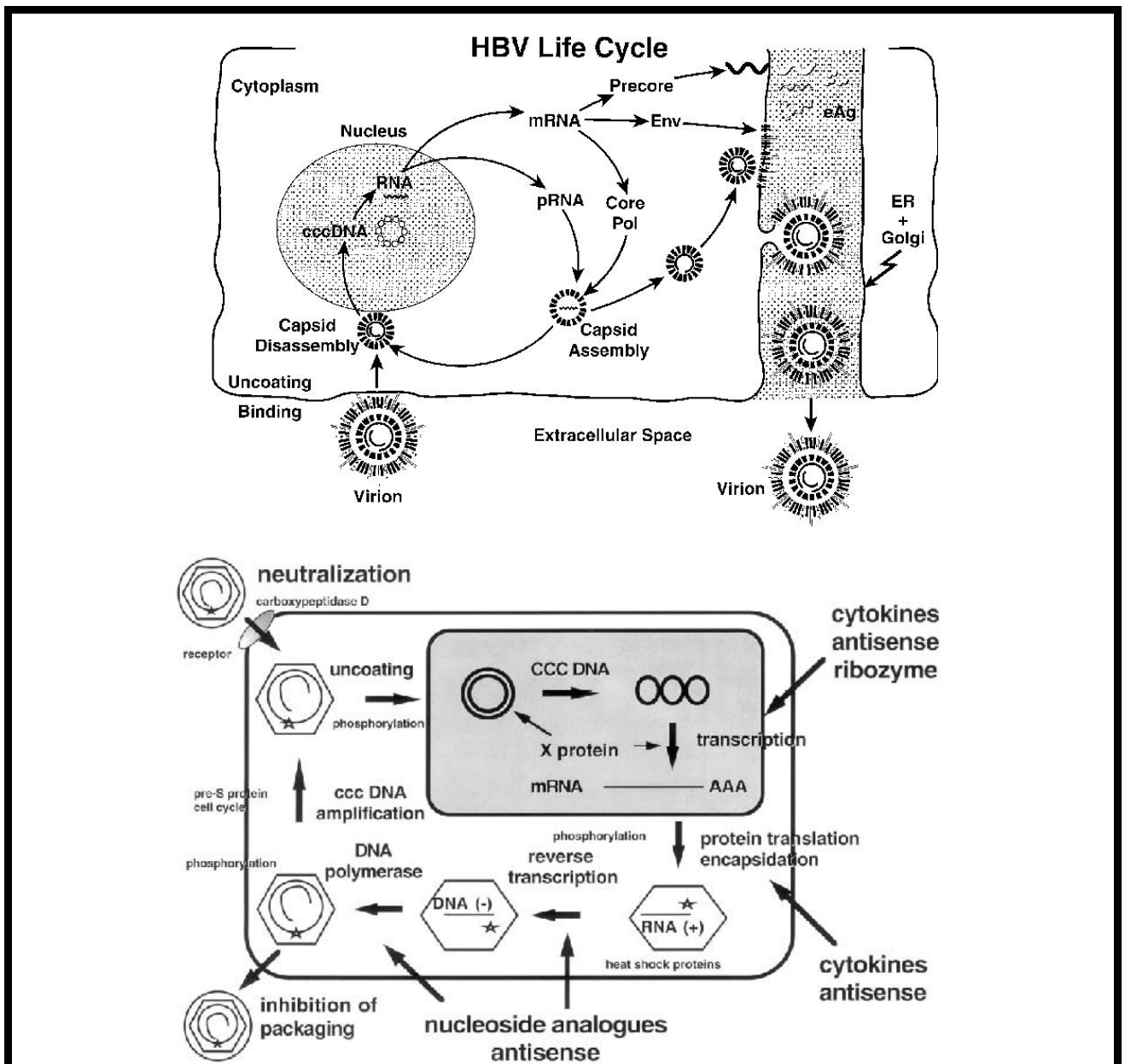


Abbildung 3: Replikationszyklus der Hepadnaviren, schematischer Überblick; Teil A zeigt die Vorgänge innerhalb der infizierten Zellen (Chisari, 2000); Teil B der Abbildung bezieht exogene Signale wie z.B. Cytokine mit ein. (modifiziert nach Seeger und Mason, 2000). Die Replikation der Hepadnaviren ist im Text beschrieben. **ccc**=covalently closed circular DNA; **env**=envelope, Virushülle

1.4. Die Oberflächenproteine der Hepadnaviren

Die viralen Hüllproteine werden ihrer Größe nach als L(arge), M(iddle) und S(mall) Antigen (Ag) bezeichnet (Ueda *et al.*, 1991). Alle haben die C-terminale S-Domäne gemeinsam und unterscheiden sich nur in ihrer N-terminalen Domäne (Heermann *et al.*, 1984; Laub *et al.*, 1983; Cattaneo *et al.*, 1983). Die aminoterminalen Domänen des LAg und des MAg werden als preS1- und preS2-Domäne bezeichnet, wobei das L-Protein neben der S-Domäne beide preS-Domänen besitzt, das mittlere Oberflächenprotein aber nur die S und die preS2-Domäne. Während der Expression der viralen Protein wird überwiegend das S-Protein synthetisiert, in geringerem Maße das M-Protein und in noch geringerem Maße das L-Protein.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte preS2-Domäne des WHV, aber auch die des HBV, werden glykosiliert. Das unglykosylierte preS2-Protein des WHV hat ein Molekulargewicht von 33 kDa, die posttranslational modifizierte Form dagegen 36 kDa. Die Homologie zwischen den beiden homologen Oberflächenproteinen von HBV und WHV liegt bei ca. 60% (Galibert *et al.*, 1982; T.K. Tolle *et al.*, 1998). Die Glykosylierung scheint für den intrazellulären Transport und für die Sekretion der Viren eine wichtige Rolle zu spielen. Notwendig für diese Prozesse ist beim humanen Hepatitis B Virus möglicherweise das preS2-Glykan (T. Block *et al.*, 1998; T.K. Tolle *et al.*, 1998), wenn es, wie die anderen Oberflächenkomponenten nicht sogar essentiell für den Replikationszyklus ist (F.V. Chisari & C. Ferrari, 1995).

Andere Daten sprechen jedoch dafür, daß -zumindest beim HBV- der preS2-Domäne keine essentielle Rolle zukommt, da es Mutanten gibt, in denen kein preS2-Protein exprimiert wird, und die aller Wahrscheinlichkeit nach trotzdem replizieren, deren Morphogenese normal erfolgt und bei denen sowohl Sekretion als auch *in vitro* Infektiosität unbeeinträchtigt bleiben (D. Fernholz *et al.*, 1993). Darüber hinaus findet man in einem, wenn auch geringen, Teil der chronisch infizierten Virusträger preS2-Mutanten in sehr hoher Konzentration. In diesen Fällen verläuft die Hepatitis oft fulminant (T. Pollicino *et al.*, 1995).

Im Gegensatz zu der N-Glykosylierung des HBV erfolgt beim WHV eine O-Glykosylierung des MWHs, also des **m**iddle **W**oodchuck **H**epatitis **s**urface Protein, das dem mittleren Oberflächenprotein des HBV entspricht (T.K. Tolle *et al.*, 1998). Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Oberflächenproteine verschiedener Hepadnaviren:

Virus	ATG-Startcodons pro ORF	Anzahl Aminosäuren [Anzahl Glykosylierungsstellen]		
		preS1	preS2	S
HBV	3	108-119 [1]	55 [1]	226 [1]
WHV	3	144-149 [1]	60 [1]	222 [1]
GSHBV	4	146 [0]	60 [1]	222 [1]
DHBV	7 (6)	52-88 [1]	109 [2(1)]	167 [1]
HHBV	4	50 [0]	113 [1]	169 [1]

Tabelle 3: Oberflächenproteine verschiedener Hepadnaviren (Neurath und Thanavala, 1990)

Die Struktur der Oberflächenproteine ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt, neuere Daten von Lambert und Prange (2001) zeigen aber, daß das L-Protein in zwei verschiedenen Konformationen vorkommt. Die Rezeptorbindungsstelle liegt dabei in der preS1-Region (Tong *et al.*, 1999). Alle drei Oberflächenproteine haben mehrere Transmembrandomänen, wie die folgende Abbildung verdeutlicht:

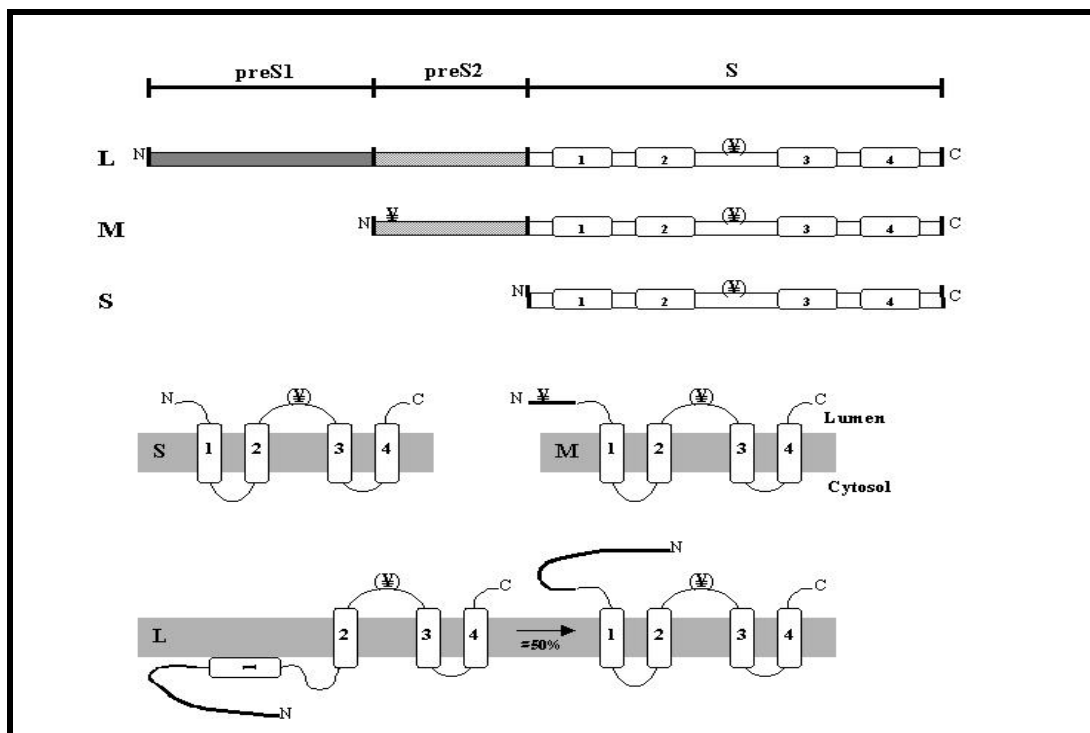


Abbildung 4: Struktur der hepadnaviralen Oberflächenproteine; nach Lambert und Prange, 2001. Die bekannten N-Glykosylierungsstellen sind durch das Symbol Y, die Transmembrandomänen durch Kästchen (1-4) dargestellt. L=large surface Protein, M=middle surface Protein, S=small surface Protein

Desweiteren wurde für das L-Protein des Duck Hepatitis Virus gezeigt, daß es das zelluläre Protein gp180, den DHBV-Rezeptor, bindet und daß durch die L-Protein-Expression der Rezeptor herunterreguliert wird (Breiner *et al.*, 2001). Darüber hinaus wird die 'a'-Determinante der S-Domäne von HBV aufgrund ihrer hohen Immunogenität besonders gut von Antikörpern erkannt, auch solchen, die in der Routinediagnostik eingesetzt werden. Diese Eigenschaft der HBV-'a'-Determinante wurde insbesondere im Rahmen dieser Arbeit bei der Konstruktion chimärer WHV/HBV-Proteine ausgenutzt.

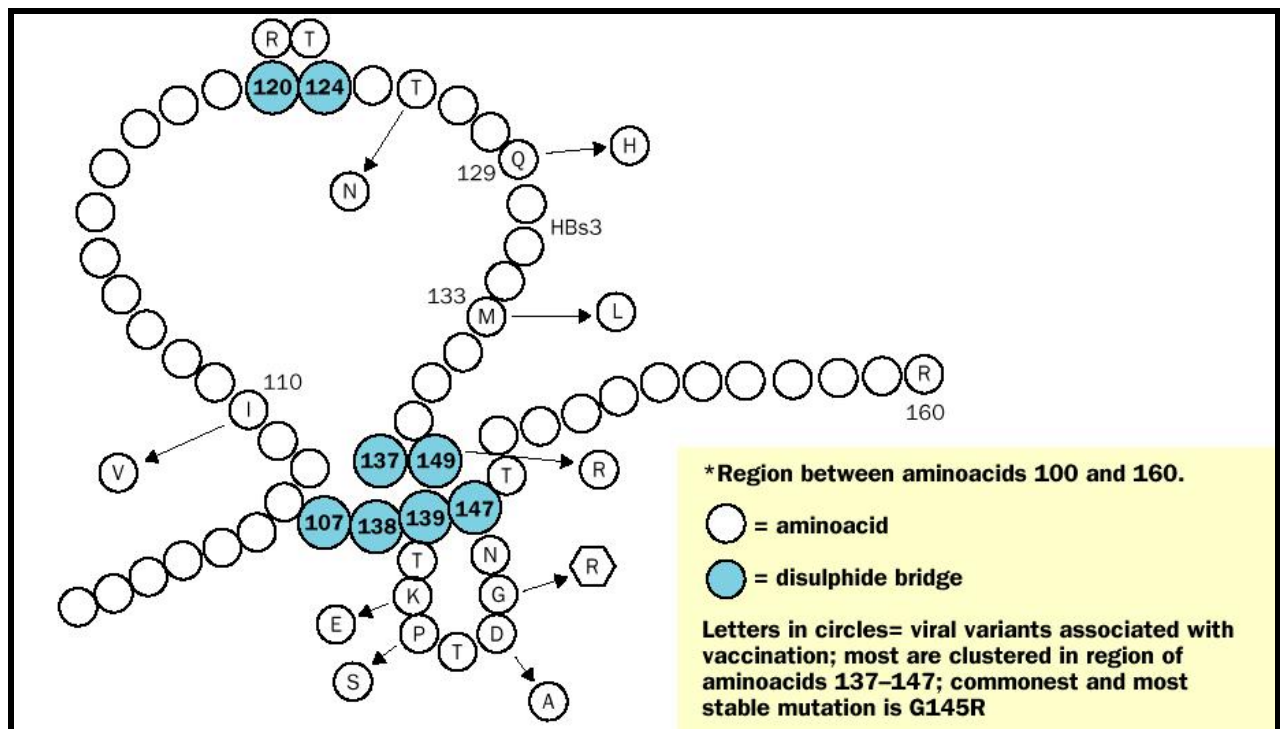


Abbildung 5: HBV-'a'-Determinante (nach Carman und Mimms, 1996); die Aminosäuren 107, 137, 138, 147 und 149 (alles Cysteine) liegen alle in der *major hydrophilic region* des *small surface* Proteins und sind durch Disulfidbrücken quervernetzt. Die 'a'-Determinante wird unter anderem von einem, im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten, Antikörper erkannt.

1.5. Pathogenese

Die Infektion mit HBV erfolgt hauptsächlich parenteral über Blut und Blutprodukte, aber auch über andere Körperflüssigkeiten wie Speichel, Samenflüssigkeit oder Menstruationsblut (Heathcote *et al.*, 1974; Mosley, 1975). Im menschlichen Organismus führt die Infektion zu einer akuten selbstlimitierenden oder chronisch persistierenden Hepatitis, mit milden bis schweren Krankheitssymptomen (z.B. Ikterus, erythematöser maculopapulärer Ausschlag, Urticarien, Arthralgien, Fieber) bishin zur fulminanten Hepatitis mit akutem Leberversagen.

Die akute Infektion verläuft in etwa 50 % ohne klinische Symptome (Ganem, 1996), bei adulten Patienten ist der Verlauf in etwa 90 % der Fälle selbstlimitierend (McLean, 1985). Eine chronische Infektion liegt per definitionem vor, wenn die Infektion länger als 6 Monate andauert,

d.h. HBsAg im Serum nachgewiesen werden kann. Etwa 5-10 % der Erwachsenen, jedoch mehr als 90% der perinatal infizierten Kinder, erkranken chronisch an der Hepatitis B Infektion (Hollinger, 1996). Die chronische Infektion verläuft oft asymptomatisch, führt jedoch nach 5-10 Jahren häufig zur Leberzirrhose mit hepatozellulärem Karzinom (Beasley *et al.*, 1981 und 1984). Während der akuten oder chronischen Infektion sind bis zu 90% aller Hepatocyten mit HBV bzw. WHV infiziert. Die Infektion mit Hepadnaviren führt zu unterschiedlich starken Entzündungsprozessen in der Leber. An diesen Entzündungsprozessen sind u.a. Cytokine beteiligt.

Unter Cytokinen versteht man eine Gruppe nicht-enzymatischer Proteinhormone, die für diverse immunologische Effekte verantwortlich sind. Die Wirkung dieser Hormone ist wie bei den meisten endokrinen Systemen von den Zielzellen abhängig. Unter dem Oberbegriff Cytokine werden mehrere Untergruppen zusammengefaßt, die im folgenden kurz aufgelistet werden sollen. Man unterscheidet die Interleukine (IL-1 bis IL-23, ausgenommen das Chemokin IL-8), die Interferone (IFN- α , IFN- β , IFN- γ), die Tumor Necrose Faktoren (TNF) und die koloniestimulierenden Faktoren (CSF; Makrophagen CSF, Granulocyten CSF, Granulocyten-Makrophagen CSF). In der Regel bestehen Cytokine aus etwa 150 Aminosäuren und liegen in monomerer Form vor (Callard und Gearing, 1994), es gibt aber auch Ausnahmen, wie z.B. TNF- α , LT- α , IFN- γ und andere. Die Cytokinsynthese kann während der Transkription, der Translation und durch die Proteinprozessierung reguliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit ist lediglich ein Regulationsmechanismus, die Stimulation der Synthese durch einen Liganden, von Interesse, da die später untersuchte Substanz α -Galaktosyl-Ceramid in murinen und humanen Zellen die Expression von Interferon- γ stimuliert. Zusammen mit den aus dem Knochenmark stammenden Lymphocyten, die den CD-1d Rezeptor exprimieren, wird α -Galaktosyl-Ceramid von NK-T-Zellen erkannt. Diese zeichnen sich dadurch aus, daß sie neben dem T-Zell-Rezeptor (TCR) auch den Rezeptor NK1.1 exprimieren. Die derart aktivierten T-Zellen schütten Interferon- γ und IL-4 aus, was wiederum im Modell der transgenen Maus zu einer Inhibition der viralen Replikation führt.

Die Cytokinantwort ist wie erwähnt vom Stimulus der Cytokinsynthese abhängig und wurde in parasitären und bakteriellen Infektionsmodellen eingehend studiert. Diese Infektionen verursachen T_H1 oder T_H2 Antworten mit dem entsprechenden Cytokinprofil (s. Tabelle 4).

Cytokin	T _H 1	T _H 2
IL-2	+	-
IFN- γ	++	-
TNF- β	++	-
TNF- α	++	++
GM-CSF	++	+
IL-3	++	++
IL-4	-	++
IL-5	-	++
IL-10	-	++
IL-13	-	++

Tabelle 4: Sekretionsprofil der T_H1 und T_H2 Antwort, nach Kuby *et al.*, 2000

Die protektive Immunantwort gegen virale Infektionen verläuft nach anderen Regeln und Bedingungen als die gegen bakterielle oder parasitäre Infektionen und unterscheidet sich daher auch von den mit diesen Erkrankungen assoziierten T_H1 und T_H2 Immunantworten. Bei der Kontrolle viraler Infektionen spielt aber insbesondere die zelluläre Immunantwort durch die cytotoxischen T-Lymphocyten (CTL) eine Rolle, so daß den Cytokinen eine andere Funktion in der Erregerabwehr zukommt. Neben der Kontrolle der humoralen Immunantwort sorgen die Cytokine für die Aktivierung früh auftretender, natürlicher Killer Zellen (NK-Zellen) und der später auftretenden, CD8⁺ cytotoxischen T-Lymphocyten. Im Gegensatz zu Parasiten und Bakterien sind Viren immer auf eine intrazelluläre Replikation angewiesen. Daher könnte die Stimulation der antiviralen Immunantwort zuerst durch Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle stattfinden und später, bei Ausbreitung der Viruspartikel auf die Nachbarzellen, durch Stimulation der MHC-Klasse-II-Antigenpräsentation. Beide Wege spielen bei der viralen Infektion eine Rolle, dennoch kann bei den meisten viralen Infektionen eine stärkere Vermehrung der CD8⁺ T-Zellen als der der CD4⁺ T-Lymphocyten beobachtet werden.

Bisher wird in erster Linie ein Mechanismus für die Ausheilung viraler Infektionen vorgeschlagen, der durch antigenspezifische T-Zellvermittlung zur Zerstörung der infizierten Zellen führt (Guidotti und Chisari, 1996). Hinweise, die diesen vorgeschlagenen Mechanismus unterstützen, wurden im Rahmen von Untersuchungen über die Influenza A Infektion und LCMV (Lymphocyten Choriomeningitis Virus) gefunden. So kann zum Beispiel die Replikation nur eines Influenza-Subtyps in mit zwei Subtypen simultan infizierten Mäusen durch den adoptiven

Transfer eines spezifischen CTL-Klons durch diesen kontrolliert werden (Lukacher *et al.*, 1984). Andere Daten zeigen, daß ein Perforin-Knock-Out dazu führt, daß LCMV in infizierten Mäusen trotz normaler Anzahl an CD8⁺ Lymphocyten nicht mehr eliminiert wird (Kägi *et al.*, 1994; Walsh *et al.*, 1994). Der antivirale, nicht-cytopathische Effekt von Cytokinen konnte dagegen in letzter Zeit öfter beobachtet werden. Die Arbeiten von Luca Guidotti und Francis V. Chisari haben gezeigt, welche Rolle die Cytokine, insbesondere Interferon- γ , bei der Inhibition der viralen Replikation spielen. Im Rahmen dieser Arbeit wird daher der Schwerpunkt auf die Untersuchung der bei der HBV-Infektion wichtigen Cytokine IFN- γ , TNF- α und IL-15 gelegt.

IFN- γ hat zahlreiche biologische Funktionen und löst in vielen Geweben Signaltransduktionskaskaden aus. Die Abbildung 6 zeigt die Wirkungen der Interferone im Überblick. Der Effekt von IFN- γ wird synergistisch durch TNF- α verstärkt. Insbesondere wird die Proliferation vieler Zelltypen inhibiert, andererseits wird jedoch die Aktivität von cytotoxischen Zellen stimuliert und verstärkt. Die Expression von Interferon γ führt u.a. zu einer erhöhten TNF- α Ausschüttung, zur Degradation viraler RNA und weiteren antiviralen und antiparasitären Effekten. Insbesondere die Aktivierung von CTL's und die Fähigkeit zur Induktion von RNA-Degradation bzw. zur Kontrolle der RNA-Synthese spielen eine wichtige Rolle bei (hepadna-) viralen Infektionen (H. Ibelgaufts, 1994, Dictionary of Cytokines).

Wie Interferon zeigt auch TNF- α ein breites Spektrum biologischer Aktivität. Der Tumor Nekrose Faktor verstärkt u.a. die Proliferation von T-Zellen. Er hat cytotoxische Effekte, induziert die Cytokinsekretion und ist mit chronischen Entzündungen, z.B. bei der chronischen Hepatitis, assoziiert. Darüber hinaus spielt TNF- α eine wichtige Rolle bei der Wundheilung (s. Abschnitt 4, Diskussion). TNF- α wirkt insbesondere auf Tumor- und inflammatorische Zellen. IL-15 könnte eine wichtige Rolle bei der akuten und/ oder chronischen HBV Infektion zukommen. IL-15 hat nahezu dieselben biologischen Funktionen wie IL-2 und kann in *in vitro* Experimenten CTL-Aktivität induzieren (Tagaya *et al.*, 1996; Kennedy & Park, 1996).

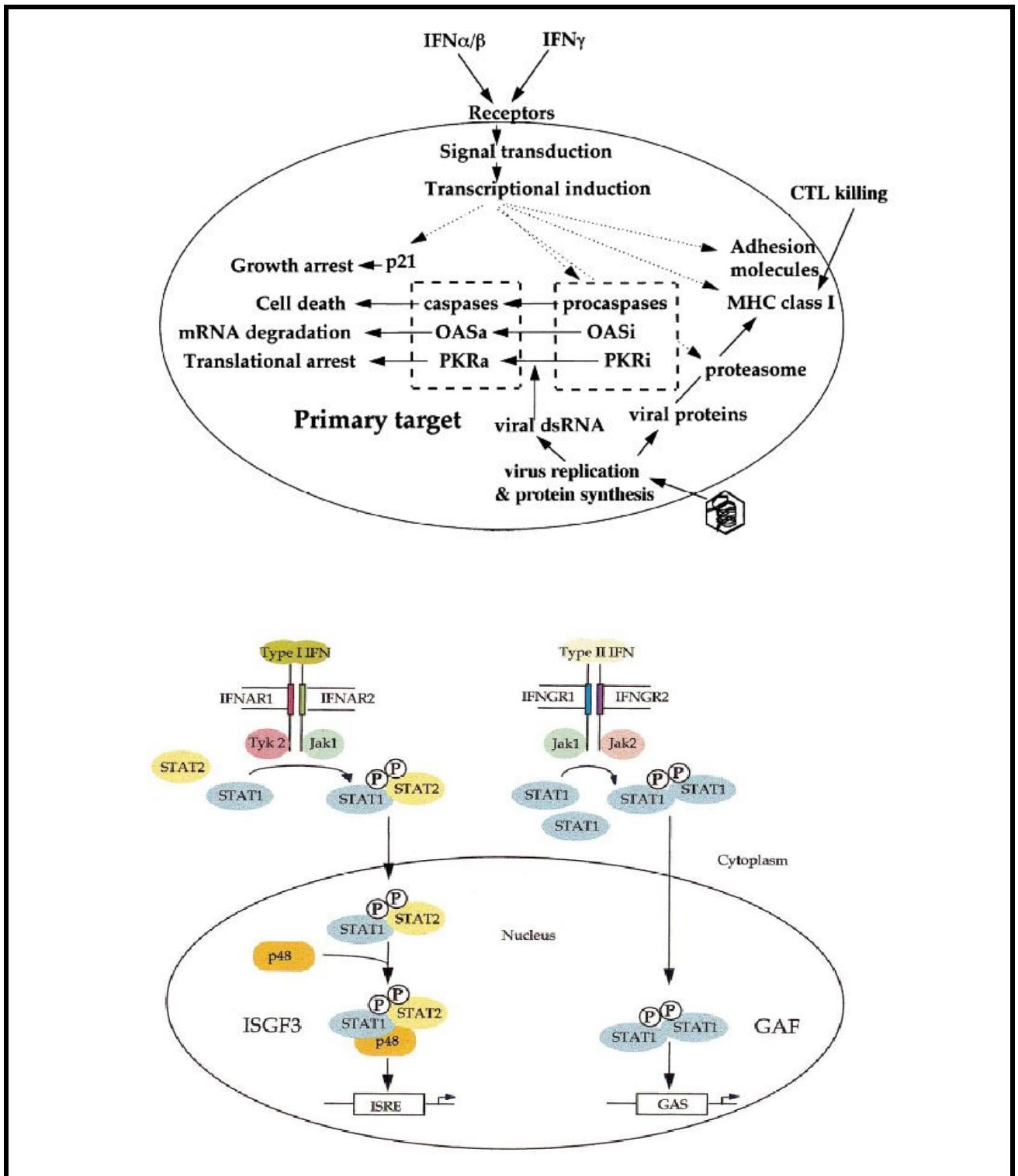


Abbildung 6: Signaltransduktion der Interferone (Goodbourn *et al.*, 2000). Oben: Die Interferone binden an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche und induzieren die Transkription zahlreicher Gene, deren Produkte eine antivirale Wirkung aufweisen. Diese Genprodukte sind oft von viraler dsRNA als einem Co-Faktor abhängig, um zu gewährleisten, daß sie nur in infizierten Zellen aktiv werden. Beispiele dafür sind die beiden Proteine PKR und OAS (2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase), die erst als inaktive Vorläufer translatiert werden (OASi und PKRi) und nur durch virale dsRNA in ihre aktiven Formen überführt werden (OASa und PKRa). Unten: Die Signaltransduktion der Interferone verläuft über die Januskinasen (JAK) und Proteine der STAT-Familie (signal transducer and activator of transcription).

Neben der Cytokinantwort wurde bereits mehrfach die CTL-Antwort als wichtiger Parameter der Viruseliminierung erwähnt. Besonders gut kann dieser Teilaspekt der hepadnaviralen Infektion im Modell der HBV-transgenen Maus (Chisari *et al.*, 1986; Chisari in: Hepatitis B Virus in transgenic mice; Cavanaugh *et al.*, 1998; Ando *et al.*, 1993) untersucht werden. Insbesondere eignet sich das Modell zum Studium der CTL-Antwort gegen das Hepatitis B Virus, was in anderen Modellen bisher noch nicht möglich ist. Das Virus wird in der Leber der transgenen Mäuse in etwa demselben Maße gebildet wie in der Leber eines chronisch HBV infizierten Patienten, allerdings sind keinerlei leberschädigende Effekte zu beobachten (Guidotti *et al.*, 1995). Werden jedoch in diese Tiere CD8⁺ T-Zellen gegen das HBsAg transferiert (adoptiver Immuntransfer), so kommt es zu einer, der akuten HBV entsprechenden, leberschädigenden Inflammation (Ando *et al.*, 1994; Moriyama *et al.*, 1990). Ein erneuter CTL-Transfer nach drei bis vier Wochen bleibt dagegen wirkungslos.

Neben der Lyse einiger infizierter Zellen reduzieren die CTLs die HBV-Replikation in allen Zellen (Guidotti und Chisari, 1996). Insbesondere die virale RNA und die Replikationsintermediate sind von diesem Effekt betroffen (Guidotti *et al.*, 1996). Durch die Gabe von Antikörpern, die Interferon- γ und TNF- α neutralisieren, kann dieser nicht-cytopathische Effekt der CTLs unterbunden werden, was die Rolle der Cytokine in der Abwehr der viralen Hepatitis unterstreicht (Guidotti und Chisari, 1996).

Da geeignete zellbiologische Tests (CTL-Assay) für das Woodchuck-Modell noch nicht etabliert sind, kann die Immunantwort im Woodchuck bisher nur mit Hilfe eines Proliferationstests oder mit Hilfe eines RNase Protection Assays untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit kommt, wie bereits erwähnt, der RNase Protection Assay zum Einsatz. Mit Hilfe dieses Tests soll die Expression der T-Zellmarker CD3, CD4 und CD8 bestimmt werden.

Die CD-Antigene (Cluster of Differentiation) spielen eine wichtige Rolle im Immunsystem und werden Zelltyp-spezifisch exprimiert. CD3 wird auf Thymocyten und T-Zellen exprimiert und ist mit dem Antigenrezeptor dieser Zellen assoziiert. CD3 ist notwendig für die Oberflächenexpression des T-Zellrezeptors und die Signaltransduktion über diesen Rezeptor. Das CD4-Antigen wird auf der Zelloberfläche einiger Thymocyten exprimiert, ist aber auch charakteristisch für T-Helferzellen, inflammatorische T-Zellen, Monocyten sowie Makrophagen. Es dient als Ko-Rezeptor für MHC-Moleküle der Klasse II. CD8 hingegen ist ein Marker für cytotoxische T-Zellen und ist Ko-Rezeptor für MHC-Klasse-I-Moleküle. Die beiden Marker CD4 (für T-Helfer-Zellen) und CD8 (für CTLs) erlauben also bedingt eine Unterscheidung zwischen der der MHC-Klasse-I und der MHC-Klasse-II Antigenpräsentation, bzw. lassen evtl. bei quantitativer Betrachtung einen Schluß auf die Art der Immunantwort auf eine virale Infektion zu.

Die folgende Abbildung faßt die Vorgänge bei der Pathogenese der hepadnaviralen Infektion zusammen:

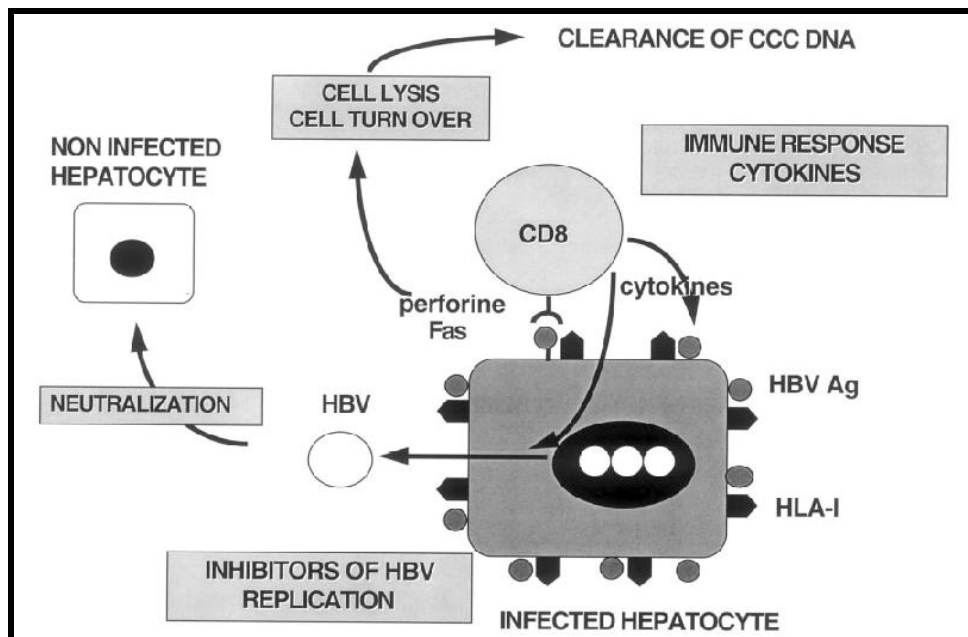


Abbildung 7: Modell der Pathogenese der HBV-Infektion (nach Chisari, 1995 und 2000); an der Viruseliminierung sind sowohl Cytokine als auch cytotoxische T-Zellen beteiligt, aber auch neutralisierende Antikörper leisten einen Beitrag bei der Reduktion der Virämie.

1.6. Das Woodchuck-Modell zur Untersuchung von Hepadnaviren

Hepadnaviren zeichnen sich durch ihr begrenztes Wirtsspektrum aus. Üblicherweise als Modellsysteme verwendete Spezies wie Maus, Ratte oder Meerschweinchen sind mit Hepadnaviren nicht infizierbar. Die Übertragung auf andere Primaten wie z.B. Schimpansen ist möglich (Barker *et al.*, 1973; Bancroft *et al.*, 1977), aber sowohl aus ethischen wie aus wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Gründen nur begrenzt durchführbar. Das Modell der HBV-transgenen Maus erlaubt zahlreiche Untersuchungen, kann aber nicht alle Teilaspekte des Infektionszyklus abdecken. Als Tiermodelle für die Untersuchung der natürlichen Infektion kommen daher nur das Woodchuck Hepatitis Virus, das Ground Squirrel Hepatitis Virus und das Duck Hepatitis B Virus in Frage.

Das Woodchuck Hepatitis Virus wurde 1978 entdeckt, da im Zoo von Philadelphia sehr oft hepatozelluläre Karzinome (Haupttodesursache bei diesen Tieren) im natürlichen Wirt, dem amerikanischen Murmeltier (*Marmota monax*), vorkamen. Es ist in den mittelatlantischen Staaten der USA endemisch (Tyler *et al.*, 1981; Wrigth *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1982) und nicht auf das Alpenmurmeltier (*Marmota marmota*) übertragbar. Da der Krankheitsverlauf dem der Hepatitis B Infektion beim Menschen gleicht, und die Homologie zwischen WHV und HBV bei etwa 60%

liegt (M. Roggendorf & T.K. Tolle, 1995; D. Ganem, 1996), ist dieses Tiermodell das am besten auf die HBV-Infektion übertragbare.

Etwa in Woche 6 nach der Infektion ist eine Virämie nachweisbar, die ca. vier bis sechs Wochen andauert. (Tyler *et al.*, 1986). Als erster virologisch nachweisbarer Parameter ist das WHsAg im Serum infizierter Tiere nachweisbar (Wong *et al.*, 1982). Spätere Marker einer Infektion sind Antikörper gegen das core Protein und das WHsAg. Eine chronische Infektion kann experimentell durch Infektion neugeborener Tiere induziert werden.

1.7. Ziele der Arbeit

a). Identifizierung und Charakterisierung der WHV-preS2-Glykosylierungsstelle

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Funktion der preS2-Domäne des Woodchuck Hepatitis Virus während des Infektionsverlaufs untersucht werden. Die Funktion der preS2-Domäne für das Virus ist bisher nicht aufgeklärt. Frühere Arbeiten haben gezeigt, daß die preS2-Domäne von WHV O-glykosyliert wird. Desweiteren wurde von T. Block *et al.* 1998 die Virämie chronisch WHV infizierter Tiere durch die Gabe eines Glykosylierungsinhibitors signifikant gesenkt. Andererseits wurde aber in *in vitro* Studien gezeigt, daß das M-Antigen der Hepadnaviren keine essentielle Rolle im Infektionszyklus zu spielen scheint. Ebenso werden in chronisch HBV infizierten HBV-Patienten preS2 defekte Virusstämme gefunden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Glykosylierungsstelle des preS2-Proteins identifiziert werden, und der Einfluß der Glykosylierung auf den intrazellulären Transport des M-Proteins untersucht werden. Im Tiermodell sollte darüber hinaus die Replikationskompetenz dieser Mutanten überprüft werden.

Dazu sollten eine Glykosylierungsmutante und eine preS2minus-Mutante konstruiert und durch *in vivo* und *in vitro* Versuche charakterisiert werden. Für die *in vitro* Studien sollten chimäre Proteine aus der WHVpreS2-Region und der a-Determinante des HBV kloniert werden. Diese Proteine sollten der zell- und molekularbiologischen Charakterisierung der preS2-Region dienen. Für die *in vivo* Versuche sollten in die WHV-DNA mittels molekulargenetischer Methoden gezielt Mutationen in der preS-Region eingeführt werden. Die derart veränderten Genome sollten dann *in vivo* in naive Murmeltiere transfiziert werden, um rekombinante Virusstämme zu generieren. Insbesondere sollte die Auswirkung der Glykosylierung auf den intrazellulären Transport des preS2-Proteins untersucht werden. Auf diese Weise sollte der mögliche Mechanismus der Glykosylierungsinhibition als Therapieform auf molekularer Ebene untersucht werden.

b). Etablierung eines RNase Protection Assays

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein RNase Protection Assay etabliert werden, der zur quantitativen Bestimmung der Cytokine IFN- γ , TNF- α und IL-15 sowie der T-Zellmarker CD3, CD4 und CD8 dienen kann. Der RNase Protection Assay ist eine Standardmethode zur qualitativen und quantitativen Untersuchung der Immunantwort in tierischen Geweben oder zur Bestimmung des Cytokin-Expressionsprofils von Lymphocyten. Die Technik ist für humane und murine sowie für einige Gene der Ratte etabliert und die entsprechenden Riboprobes sind kommerziell erhältlich. Riboprobes für Woodchuck-Gene sollten in einem „in-house“-Test neu etabliert werden. Die Etablierung sollte an vorhandenen Gewebeproben naiver und akut und chronisch WHV-infizierter Tiere durchgeführt werden. Daneben sollten stimulierte Lymphocyten im RPA untersucht werden, um später standardmäßig als Größenmarker eingesetzt zu werden. Im Rahmen der Etablierung sollte auch die Quantifizierbarkeit der Expression mit Hilfe eines Phosphorimagers untersucht werden.

c). Anwendungsmöglichkeiten des RPA

Nach der Etablierung des RNase Protection Assays sollte untersucht werden, wie die genannten immunologischen Marker in einem Zeitraum von vier Wochen in der Leber chronisch WHV-infizierter Tiere exprimiert werden. In diesem Projekt sollte zusätzlich das antivirale Potential von α -Galaktosyl-Ceramid, einem Immunmodulans das durch Aktivierung von NK-T Zellen die Interferon- γ Produktion stimuliert, im Woodchuck-Modell untersucht werden. Als Basis für weitere Untersuchungen sollte darüber hinaus der lösliche Teil des Interferon- γ -Rezeptors des Woodchucks in Insektenzellkulturen mit Hilfe rekombinanter Baculoviren überexprimiert werden. Dieser soll nach Möglichkeit als lösliches Protein in den Zellkulturüberstand sezerniert werden, und soll später in *in vivo* Experimenten Interferon- γ im Tier neutralisieren. Auf diese Weise kann die Rolle von Interferon- γ im natürlichen Infektionsmodell genauer charakterisiert werden.

In weiteren Projekten sollte der RNase Protection Assay zur Charakterisierung der Immunantwort des Woodchucks nach Transplantation bzw. nach Tumorbehandlung eingesetzt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

a) Zentrifugen:

Kryofuge 5000

Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B

Tischzentrifuge 5415C

Heraeus (Düsseldorf)

Kendro Sorvall (Bad Homburg)

Eppendorf (Hamburg)

b) Sonstige Geräte

Bakterienschüttler KS 501

CO₂-Inkubator B 5060 EK-CO₂

ELISA-Reader

Geltrockner

pH-Meter pH Digi 520

Photometer LKB Ultrospec III

Sterilbank Gelaire BSB 4

Thermocycler *Mastercycler® Gradient*

Thermocycler *TRIO-Thermoblock*

Vakuublottter

Waage R 160 P

Wasserbad Typ U3/A5 bzw. A6

Oehmen, Labor- und Klinikbedarf (Essen)

Heraeus (Düsseldorf)

Sorin (Düsseldorf)

BioRad (München)

WTW (Weilheim)

Pharmacia (Freiburg)

Bioflow (Meckenheim)

Eppendorf (Hamburg)

Biometra (Göttingen)

BioRad (München)

Sartorius (Göttingen)

Julabo (Seelbach)

c) Geldokumentationssystem:

Bildschirm CTM 9

UV-Tisch FLX-20M

Video Copy Processor P68E

Videosystem CS1

Hantarex (London, GB)

MWG-Biotech (Ebersberg)

Mitsubishi (Japan)

Cybotech (unbekannt)

d) Spannungsgeber für Elektrophorese und Elektrophoresesysteme:

Blue Power 3000

Power Pack P 25

Gelelektrophoresesystem MUPID-21

Gelelektrophoresesystem Mini-Protean II Cell

Serva (Heidelberg)

Biometra (Göttingen)

Eurogentech (Belgien)

BioRad (München)

e) Mikroskope:

Alle Mikroskope inklusive des Immunfluoreszenz Konfokal-Laser-Scanning Mikroskops stammen von der Firma Carl Zeiss (Jena) oder von der Fa. Leitz (Immunfluoreszenzmikroskop Leitz DM IL).

2.1.2. Chemikalien

Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München), Riedel-de-Haen (Seelze), und Roth (Karlsruhe) bezogen. Es wurde nur der Reinheitsgrad "reinst" bzw. "p.a."

eingesetzt. Die Glykosylierungsinhibitoren Tunicamycin (Lokeshwar *et al.*) und p-Nitrophenyl N-Acetyl α -D-Galatosaminid (Lokeshwar *et al.*) wurden von Sigma (München) bezogen.

2.1.3. Reagenziensysteme

Baculovirus Expression Vector System	Pharmlingen (USA)
B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent	Pierce (USA)
Effectene Transfection Reagent	Qiagen (Hilden)
Enzygnost®HBsAg 5.0	Dade Behring (Marburg)
HighSpeed Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
HighSpeed Midi Kit	Qiagen (Hilden)
<i>In vitro</i> -Transcription-Kit	Pharmlingen (USA)
LipofectAMINE™-Reagenz	Gibco BRL (Karlsruhe)
MicroSpin™Columns	Amersham Pharmacia (Braunschweig)
Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)
Plasmid Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QIAamp DNA Blood Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QiaQuick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
rediprime™II	Amersham Pharmacia (Braunschweig)
RiboQuant™-Kit	Pharmlingen (USA)
RNeasy Midi Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
TA Cloning® Kit	Invitrogen (Niederlande)
TNT®coupled Reticulocyte Lysate System	Promega (USA)
TOPO™ TA Cloning® Kit Version E	Invitrogen (Niederlande)
ER-Blue/White Tracker	Molecular Probes (USA)

2.1.4. Enzyme und Größenstandards

a) Restriktionsenzyme

Enzym	Konzentration [U/ μ l]	Hersteller
Aat II	10	Amersham Pharmacia (Braunschweig)
AlwNI	10	Amersham Pharmacia (Braunschweig)
Asp 700 (\cong XmnI)	10	Boehringer Roche (Mannheim)
Asp 718	10	Boehringer Roche (Mannheim)
Bal I	2-5	Amersham Pharmacia (Braunschweig)
Bsm I	10	Amersham Pharmacia (Braunschweig)
BspM I	10	New England Biolabs (Schwalbach/ Taunus)
Dra II (EcoO109 I)	15	Amersham Pharmacia (Braunschweig)
Dra III	3-5	Boehringer Roche (Mannheim)
EcoRI	10	Boehringer Roche (Mannheim)
Hinc II (\cong HindII)	10	Amersham Pharmacia (Braunschweig)
Hind III	15	Amersham Pharmacia (Braunschweig)
Kpn I	10	Amersham Pharmacia (Braunschweig)
Mun I	5	Gibco BRL (Karlsruhe)
Not I	15	Gibco BRL (Karlsruhe)
PmaCI	8-12	Amersham Pharmacia (Braunschweig)
Pst I	10	Amersham Pharmacia (Braunschweig)
Pvu I	5	Gibco BRL (Karlsruhe)
Pvu II	10	Amersham Pharmacia (Braunschweig)
Sac I	10	Amersham Pharmacia (Braunschweig)
Sal I	10	Amersham Pharmacia (Braunschweig)
Sca I	10	Gibco BRL (Karlsruhe)

Tabelle 5: Restriktionsenzyme

b) DNA-modifizierende und sonstige Enzyme

Enzym	Konzentration [U/ μ l]	Hersteller
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	200	Promega (USA)
T 4 DNA-Ligase	1	Boehringer Roche (Mannheim)
T 4 DNA-Ligase	4	Stratagene (Amsterdam)
Shrimp alkalische Phosphatase	1	Boehringer Roche (Mannheim)
Taq-Polymerase	5	Promega (USA)

Tabelle 6: DNA modifizierende Enzyme

c) Größenstandards

Bei der Gelelektrophorese von DNA der Größe 100 bp bis 10 kb wurde die 1 kb⁺ DNA-Leiter der Firma Gibco BRL (Karlsruhe) eingesetzt. Für die Größenbestimmung von Proteinen bei der Gelelektrophorese wurde der Kaleidoskop SDS-PAGE-Standard der Fa. BioRad (München) verwendet. Für die Gelelektrophorese radioaktiv markierter Proteine wurde der „Rainbow™ [¹⁴C]methylated protein molecular weight“- Marker eingesetzt.

2.1.5. Puffer und Lösungen

a) Puffer

6x DNA-Probenpuffer I	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 15 % Ficoll 400 in H ₂ O (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
6x DNA-Probenpuffer II	0,25% Orange G; 40% Saccharose in H ₂ O (B. Lohregel, persönliche Mitteilung)
1x Protein-Probenpuffer	50 mM Tris-HCl (pH6,8), 100mM DTT, 2% SDS, 0,1% Bromphenol-Blau, 10% Glycerin
10x BlueJuice Gel loading buffer	Gibco BRL (Karlsruhe)
6x Blue/Orange loading Dye	Promega (USA)
PBS	8g NaCl; 0,2g KCl; 1,44g Na ₂ HPO ₄ ; KH ₂ HPO ₄ in 1l H ₂ O; pH 7,4 (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)

b) Puffer für Southern-Blot-Analysen:

Puffer 1:	0,25 M HCl
Puffer 2:	zur Denaturierung der DNA 0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Puffer 3:	zur Neutralisierung

2 M NaCl
1 M Tris

Puffer 4: SSPE-Puffer
3,6 M NaCl
20 mM EDTA
0,2 M NaH₂PO₄

Puffer 5: 20 x SSC-Puffer zum Vakuumtransfer (Sambrook *et al.*, 1989)

c) Lösungen

Lösung I für Mini-Plasmid-Präparationen (Sambrook *et al.*, 1989):

50 mM Glukose
25 mM Tris-Cl (pH 8)
10 mM EDTA (pH 8)

Lösung II für Mini-Plasmid-Präparationen (Sambrook *et al.*, 1989):

0,2 N NaOH
1% SDS

Lösung III für Mini-Plasmid-Präparationen (Sambrook *et al.*, 1989):

5 M Natrium-Acetat 60 ml
100% Essigsäure, 11,5 ml
H₂O 28,5 ml

Carbonat-Puffer pH 9,6 für ELISA's:

3,18 g Na₂CO₃; 5,88 g NaHCO₃; 0,2 g NaN₃; mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

Phosphat-Puffer pH6 für ELISA's:

1 M KH₂PO₄ 88,9 ml; 1 M Na₂HPO₄ 11,1 ml; mit H₂O auf 1 l aufgefüllt

Lösungen für Coomassie-Färbungen:

I. Färbelösung

10 ml Eisessig
45 ml Methanol
45 ml H₂O
0,25 g Coomassie-Brilliant Blue

II. Entfärberlösung:

10 ml Eisessig
45 ml Methanol
45 ml H₂O

Puffer für die Elektrophorese:

TBE-Puffer:

0,045 M Tris-Borat
0,001 M EDTA

Tris-Glycin-Puffer:

25 mM Tris
250 mM Glycin
0,1% SDS

2.1.6. Plastikware

Plastikwaren wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner Labortechnik (Frickendorf), NUNC (Wiesbaden) und Falcon (Heidelberg) bezogen. Biospiekanülen für Leberbiopsien stammten von der Fa. Sherwood Medical (Nordirland).

2.1.7. Nährmedien

a) Bakterienkulturmedien

LB Flüssigmedium	5 g NaCl, 10g Bacto-Trypton, 5g Hefeextrakt auf 1l H ₂ O
LB Agar	5 g NaCl, 10g Bacto-Trypton, 5g Hefeextrakt, 12,5 g Agar-Agar auf 1l H ₂ O

LB-Agar und LB Flüssigmedium wurden nach *Sambrook et al.* (1989) hergestellt. Die zur Selektionierung von Bakterien eingesetzten Antibiotikakonzentrationen entsprechen ebenfalls den dort angegebenen Richtwerten.

b) Zellkulturmedien

AIM V-Medium	Cytogen (Lohmar)
Fetal Bovine Serum	Greiner (Frickenhausen)
HAM's F12 Nutrient Mixture	Cytogen (Lohmar)
MEM (Eagle) mit Earl's Salzen mit L-Glutamin + NaHCO ₃	Cytogen (Lohmar)
PBS pH 7,2, ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Apotheke des Universitätsklinikums (Essen)
RPMI-Medium	Cytogen (Lohmar)
TNM-FH Insect Medium	Pharming (USA)
Trypsin/ EDTA	Cytogen (Berlin)

2.1.8. Zelllinien

a) **Woodchuck-Hepatocyten WH12/6** (M. Lu *et al.*, 1999) wurden dem Institut freundlicherweise von Peter Banasch vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in HAM's F12 Medium.

b) **BHK- und HeLa-Zellen** wurden von Frau Krause aus dem Diagnostik-Labor des Instituts für Virologie der Universität GH Essen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in MEM mit 10 % FCS.

c) **HepG2-Zellen** wurden von Dr. M. Trippler, Institut für Virologie, Universitätsklinikum Essen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in RPMI-Medium mit 10% FCS.

d) **SF9-Zellen** wurden von der Fa. Pharmingen (USA) bezogen und in TNM-FH Insect Medium kultiviert.

2.1.9. Bakterien

a) Für die Herstellung kompetenter Zellen und die Retransformation von Plasmiden wurde der *E. coli* Stamm JM 109 verwendet, der den folgenden Genotyp aufweist:

recA1 sapE44 endA1 hsdR17 gurA96 relA1 thi(lac-proAB) F' [traD36proAB⁺lacI^qlacZΔM15]

b) Für die Transformation von Ligationen kamen *E. coli* Bakterien des Stammes TOP 10 One Shot™ der Firma Invitrogen (Niederlande) zum Einsatz. Der Stamm hat folgenden Genotyp:

F' mcrTA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG

2.1.10. Viren

Sämtliche Virusstocks wurden aus dem Serum *in vivo* transfizierter Tiere gewonnen und basieren auf dem von Yu (Minshu Yu *et al.*, 1998) beschriebenen Vektor.

2.1.11. Plasmide

a) **Das Plasmid pOG 45**, das eine Neomycin-Resistenz Kasette zur Selektionierung in eukaryotischen Zellen trägt, wurde von der Firma Stratagene (Amsterdam) bezogen.

b) **Das Plasmid pUC119/CMV/WHV** (Minshu Yu *et al.*, 1998; als Referenz dazu B.R.Cullen, 1986, zum CMV-Promotor Boshart *et al.* 1985) wurde dem Institut von Robert H. Purcell, Hepatitis Viruses Section, Laboratory of Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland (USA), freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Sequenz befindet sich im Anhang (M. Yu, persönliche Mitteilung).

c) **Der Vektor pcDNA3**, der eine Neomycin-Kasette unter der Kontrolle des SV40-Promotors enthält, stammt von der Firma Invitrogen (Niederlande). Ebenfalls in dieser Kasette enthalten ist ein SV40-ori-Element.

d) Für die Klonierung von PCR-Amplifikaten wurde der Vektor **pCR®2.1-TOPO**, enthalten in einem unter 2.1.3. aufgeführten Reagenziensystem der Fa. Invitrogen, eingesetzt.

e) Das Plasmid **HybIII** wurde von Frau Dr. Xin Zheng, Institut für Virologie, Universität GH Essen, zur Verfügung gestellt. Das Plasmid enthält ein preS2-HbsAg-Hybrid unter CMV-Promotorkontrolle und wurde für die Glykosilierungsstudien eingesetzt (X. Zheng, 2000).

f) Die folgenden Plasmide wurden von Frau Lohrengel, Institut für Virologie, Universität GH Essen, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Expressionsvektoren, die zur *in vitro* Transkription im Rahmen des RNase-Protection-Assay eingesetzt wurden, um die Immunantwort in Folge der α -Galaktosyl-Ceramid Therapie zu quantifizieren.

Name des Plasmids	Vektor	Expression von
β -Aktin	pGEM-4Z	Woodchuck β -Aktin
CD3	pGEM-4Z	Woodchuck-CD3
CD4	pGEM-4Z	Woodchuck CD4
CD8	pGEM-4Z	Woodchuck CD8
human L32	pGEM-4Z	Humanes L32
IFN γ	pGEM-4Z	Woodchuck IFN γ
IL 15	pGEM-4Z	Woodchuck IL 15
TNF- α	pGEM-4Z	Woodchuck TNF- α

Tabelle 7: Plasmide zur *in vitro* Transkription im Rahmen des RNase-Protection-Assays

2.1.12. Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz des Oligonukleotids, 5' ⇒ 3'	Verwendung
WSp2	CCACCATTTTGTTTTATTAA	PCR
preS1Sph	GGCATGCGCAACAACATAAAAAGTCA	PCR
preS2m1	GTCACCGGAGACGTCACCATCAAGT	rPCR, preS2 knock out
preS2m2	TTGATGGTGACGCTCTCCGGTGACAG	rPCR, preS2 knock out
pUC119/CMV/WHV-CMVseq	CATGGTTACAGAAGTCGCTG	Sequenzierung der CMV-Region
preS2gly1.1	CTATGAAAAGTCAGACTTTTCATCT	rPCR, Glykosilierungs-knock out 1
preS2gly1.2	AGATGAAAAGTCTGACTTTTCATCT	rPCR, Glykosilierungs-knock out 1
preS2gly2.1	CTATGAAAAGTCAGATTTTCATCT	rPCR, Glykosilierungs-knock out 2
preS2gly2.2	AGATGAAAATCTGACTTTTCATCT	rPCR, Glykosilierungs-knock out 2
HybIII mut re	GATGGCTGGCAACTAGAAGGC	Konstruktion der Hybrid-Klone
preSbgl 1	CCAGATCTGGCAACAACATAAAAAGTCA	PCR; <i>in vivo</i> Transfektion
preSbgl 2	CCAGATCTCTCCGGTGACAGTGCAGCAGGG	PCR; <i>in vivo</i> Transfektion
nested bgl 1	CATGGTCGCCTGCAGTGGCA	nested-PCR; <i>in vivo</i> Transfektion
nested bgl 1	GGAGACAATATGGTGGATACAGTA	nested-PCR; <i>in vivo</i> Transfektion
wc 1	TGGGGCATGGATATAGATCC	PCR; <i>in vivo</i> Transfektion
wc 2	CATTGAATTCAGCAGTTGGCAGATGG	PCR; <i>in vivo</i> Transfektion
wc 1 nested	GTTGAATTTTCTTCCTTTGGACT	nested-PCR; <i>in vivo</i> Transfektion
wc 2 nested	TTCTGGGGGACCTAGAAGCT	nested-PCR; <i>in vivo</i> Transfektion
rpaact-E	GTGAATTCGGAGCCTCGGTCAGCAGCAC	Umklonierung β-Actin aus Woodchuck
rpaact-H	GTAAGCTTGCTTACCAACTGGGACGACA	Umklonierung β-Actin aus Woodchuck
rpacd8-E	GTGAATTCTGGACTTCGCCTGTGATATC	Umklonierung CD8 aus Woodchuck
rpacd8-H	GTAAGCTTGGACATTTGCAAACACGTCT	Umklonierung CD8 aus Woodchuck

Tabelle 8: Oligonukleotide

2.1.13. Antikörper

Name und Herkunft des Antikörpers	besondere Eigenschaften und Verwendungszweck	Hersteller
∞ -WHVpreS, Kaninchenserum	Immunofluoreszenz	eigene Herstellung
∞ HBsAg	Immunfluoreszenz und Western-Blot	Biotrend (Köln)
∞ -rabbit, Peroxidase-gekoppelt	sekundärer Antikörper im ELISA, Western-Blot und Immunospot-Blot	Dianova
∞ -rabbit, FITC-gekoppelt	sekundärer Antikörper bei Immunfluoreszenzfärbungen	Sigma
rabbit- α -HBcAg	hohe Kreuzreaktivität gegen WHcAg, daher Einsatz im Immunospotblot möglich	Dako
mouse α -Golgi Zone	Immunfluoreszenz, Konfokal Mikroskopie	Biotrend (Köln)
mouse α -Epithelial cells-surface antigen	Immunfluoreszenz, Konfokal Mikroskopie	Biotrend (Köln)
rabbit α -human Endoplasmatic reticulum associated A β binding protein (ERAB)	Immunfluoreszenz, Konfokal Mikroskopie	Biotrend (Köln)
α -goat, Texas Red™ gekoppelt	Immunfluoreszenz, Konfokal Mikroskopie	Biotrend (Köln)
α -mouse, Texas Red™ gekoppelt	Immunfluoreszenz, Konfokal Mikroskopie	Biotrend (Köln)
α -goat, FITC gekoppelt	Immunfluoreszenz, Konfokal Mikroskopie	Biotrend (Köln)
α -goat, Cy3 gekoppelt	Immunfluoreszenz, Konfokal Mikroskopie	Dianova
α -rabbit, Cy2 gekoppelt	Immunfluoreszenz, Konfokal Mikroskopie	Dianova
α -mouse, Cy2 gekoppelt	Immunfluoreszenz, Konfokal Mikroskopie	Dianova
α -rabbit, FITC gekoppelt	Immunfluoreszenz, Konfokal Mikroskopie	Biotrend (Köln)
rabbit α 20s Proteasome subunit	Immunfluoreszenz, Konfokal Mikroskopie	Biotrend (Köln)

Tabelle 9: Antikörper für die Immunhistochemie

2.1.14. Tiere

Murmeltiere

Tierversuche wurden mit wildgefangenen amerikanischen Murmeltieren (Marmota monax, Woodchuck) von der Fa. North Eastern Wildlife (Ithaca, N.Y.) durchgeführt.

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

a) Bakterien des *E. coli* Stammes **JM 109** wuchsen über Nacht bei 37°C in 50 ml LB-Medium. Die Kultur wurde dabei geschüttelt, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 10 ml LB-Medium mit 100 µl der Übernachtskultur angeimpft und 90 min. bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

Die Bakterien wurden 10 min. bei 5000 rpm in der Cryofuge (Heraeus) pelletiert und anschließend in 10 ml kaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation, diesmal bei 500 rpm und 4°C in derselben Zentrifuge. Das Bakterienpellet wurde in 1 ml 0,1 M CaCl₂ aufgenommen und 30 min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 15% Glycerin wurden Aliquots a 100 µl abgefüllt und schnell bei -80°C eingefroren. Es konnte eine Kompetenz von ca. 1×10^6 cfu/µg DNA erreicht werden.

Zu 50 µl kompetenten Zellen wurde 1 µl DNA-Lösung (100 ng bis 1µg) gegeben und 20 min. auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 sec. bei 42°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Bakterien kurz auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 300 µl LB-Medium wurden die Zellen für 60 min. bei 37°C geschüttelt und anschließend auf LB-Agar (mit Antibiotikum) ausgestrichen. Die weitere Inkubation erfolgte über Nacht im Brutraum bei 37°C.

b) Die Transformation der **TOP 10 One Shot™** Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers.

In beiden Fällen erfolgte die Überprüfung des Transformationserfolgs durch Mini-Plasmid-Präparationen mit anschließender Restriktionsanalyse oder Bakterien-Kolonie PCR (s.u.).

2.2.1.2. Plasmidpräparationen

Mini-Plasmid-Präparationen wurden nach der Methode von Sambrook *et al.*(1989) durchgeführt. Dazu wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur *E. coli* 2 min. bei 14000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge pelletiert und in 200 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II wurde 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zugabe von 200 µl Lösung III folgte eine weitere fünfminütige Inkubation, diesmal allerdings auf Eis. Anschließend wurde 15 min. bei 14000 rpm zentrifugiert und 0,6 ml des Überstands in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Der Überstand wurde mit je 300 µl Phenol und Chloroform versetzt und 30 sec. gevortext. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min. bei 14000 rpm) wurden 0,55 ml der Oberphase entnommen

und mit 0,6 ml Isopropanol 30 min. bei 4°C und 14000 rpm gefällt. Das Pellet wurde einmal mit 70% EtOH gewaschen und nach vollständiger Trocknung in 50 µl H₂O resuspendiert. Die derart gewonnenen Plasmide standen dann für weitere Versuche zur Verfügung.

Um den Anforderungen der mit der Sequenzierung von Plasmiden beauftragten Firmen bzw. Laboratorien zu genügen wurden Mini-Plasmid-Präparationen alternativ mit dem Plasmid-Mini-Kit der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt.

Plasmid-Midi- und Maxi-Präparationen wurden mit dem entsprechenden Reaktionssystem der Fa. Qiagen (Hilden) durchgeführt.

2.2.1.3. Restriktionsspaltungen von DNA

Die bei den Restriktionen eingesetzten Enzyme sind Tabelle 3 zu entnehmen. Sie wurden i.d.R. in einem Reaktionsvolumen von 100 µl ausgeführt, die Reaktionsbedingungen wurden nach Angaben des jeweiligen Herstellers eingestellt. Die Überprüfung der Restriktionen erfolgte auf Agarosegelen.

2.2.1.4. Klonierungen

Klonierungen von DNA erfolgten ausschließlich mit den unter 2.1.11 angegebenen Vektoren und Plasmiden. Die zu klonierenden Fragmente wurden nach der Restriktion ihrer Größe nach über ein Agarosegel getrennt und aus diesem mit dem QiaQuick Gel Extraction-Kit extrahiert.

Bei der Ligation wurde das Insert in sehr hohem Überschuß (Vektor:Insert ≈ 1:20) eingesetzt, um die Wahrscheinlichkeit, des gewünschten Ligationsergebnisses zu erhöhen. Nach erfolgreicher Transformation wurden mindestens 18 Kolonien gepickt und der Ligationserfolg nach einer Mini-Plasmidpräparation mit einer Restriktionsanalyse überprüft. Bei schwierigen Klonierungen wurde der Vektor mit alkalischer Phosphatase behandelt, um die Religationswahrscheinlichkeit des Vektors herabzusetzen. Alle Klonierungen erfolgten gerichtet, d.h. mit zwei unterschiedlichen Restriktionsschnittstellen.

Die Selektion in Bakterien erfolgte in der Regel über eine Ampicillinresistenz, die eukaryotische Selektion über Neomycin. Die Klonierungsschemata sind dem Teil *Ergebnisse* dieser Arbeit zu entnehmen.

2.2.1.5. Sequenzierungen

Sequenzierungen von DNA wurden von dem DNA-Sequenzierungslabor des Universitätsklinikums Essen, FB14, IG1, oder der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Die DNA wurde nach den von diesen Labors gewünschten und dort einzusehenden

Standards aufgearbeitet. Die Sequenzierung erfolgte nach dem BigDye-Primer Cycle-Sequencing Protokoll (Abi-Prism), die anschließende Auftrennung auf einem Abi377-Sequenzierer (DSS-Info Nr.1, 10.3.99).

2.2.1.6. *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkriptionen erfolgten im Rahmen des RNase-Protection-Assays mit Hilfe des „*In vitro-Transcription-Kits*“ der Firma Pharmingen streng nach Angaben des Herstellers. (Kurzbeschreibung s. 2.2.1.22, RNase-Protection Assay).

2.2.1.7. Polymerase Kettenreaktion (PCR) und nested PCR

Die PCR wurde mit *Taq*-Polymerase der Firma Promega durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden nach Angaben des Herstellers eingestellt.

Reaktionsbedingungen für PCR Ansätze				
Reagenzien	PCR	nested PCR	SOE PCR	Kolonie PCR
10 x Puffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
dNTPs (2,5 mM)	4 µl	4 µl	2 µl	2 µl
Primer (10 µM)	je 5 µl	je 5 µl	je 5 µl	je 5 µl
Polymerase	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl
Template	1 µl	5 µl	je 2,5 µl	5 µl
H ₂ O	auf 50µl	auf 50µl	auf 50µl	auf 50µl

Tabelle 10: Reaktionsbedingungen für PCR Ansätze

Für die nested PCR wurden 5 µl eines gereinigten PCR-Amplifikats (PCR-Purification Kit, Qiagen) als template für eine PCR mit weiter innen liegenden (nested) Primern eingesetzt. Die Temperaturprofile wurden abhängig von den jeweils eingesetzten Primern, wie folgt eingestellt:

Reaktionsbedingungen für PCR, SOE-PCR, Kolonie-PCR und nested PCR	
Zyklusschritt	Temperatur und Dauer
initiale Denaturierung	2 min 94° C
Denaturierung	1 min 92° C
Annealing	1 min 45-50° C
Elongation	1 min 72° C
Delay	5 min 72° C
Zyklenzahl	30

Tabelle 11: Temperaturprofil der PCR

2.2.1.8. SOE-PCR

Ziel dieser PCR ist es, aus zwei überlappenden PCR-Amplifikaten ein einziges, durchgängiges Amplifikat zu synthetisieren. Aus dem Englischen abgeleitet spricht man von einer SOE-PCR, für **Sequence Overlapping Extension Polymerase Chain Reaction**. Die Reaktionsbedingungen wurden wie unter Punkt 2.2.1.7. beschrieben mit Taq-Polymerase der Fa. Promega nach Herstellerangaben gewählt.

Eingesetzt wurde diese Technik bei der Mutagenisierung durch modifizierte PCR-Primer. Die beiden Primer, welche Basenfehlpaarungen bei der Hybridisierung mit dem Template ausbilden, haben partiell zueinander komplementäre Sequenzen, sind also überlappend. Bei einer PCR dienen die Überlappungen im ersten Schritt als Primer, erst danach wird ein einziges, langes Amplifikat gebildet, da als Primer nur die bereits bei der ersten PCR eingesetzten Primer, die das neue Amplifikat flankieren, zum Einsatz kommen.

2.2.1.9. Bakterien-Kolonie-PCR

Die Bakterien-Kolonie-PCR wurde eingesetzt, um bei transformierten Ligationen positive Klone detektieren zu können. Da ein Primer innerhalb des Inserts liegt, können mit dieser Technik positive Klone identifiziert werden. Dazu wurde eine Bakterienkolonie gepickt, auf eine frische LB-Platte überführt und der Rest der Bakterien in 30 µl aqua dest. resuspendiert. Dieser Ansatz wurde für 10 min auf 94°C erhitzt und 5 µl dieses Ansatzes nach Zentrifugation (14000rpm für 2 min bei RT) in einer PCR (s.o.) eingesetzt.

2.2.1.10. Klonierung von PCR-Amplifikaten

Die Klonierung von mittels PCR amplifizierter DNA wurde mit dem TA Cloning® Kit oder dem TOPO™ TA Cloning® Kit Version E (Invitrogen, Niederlande) streng nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Selektion erfolgte über eine blau-weiß Färbung und Ampicillin. Positive Klone wurden in LB Medium mit Ampicillin überführt und nach 16 stündiger Inkubation über Nacht bei 37°C zur Plasmidisolierung nach 2.2.1.2. eingesetzt.

2.2.1.11. DNA-Extraktion

Zur Isolierung von DNA aus biologischen Materialien (Blut, Leberbiopsien) wurde das QiaAmp-Kit der Firma Qiagen nach Anweisung des mitgelieferten Protokolls eingesetzt.

2.2.1.12. RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion aus Zellkultur oder Lebergewebe erfolgte mit dem RNeasy Mini-oder Midi Kit der Firma Qiagen streng nach Angaben des Herstellers. Das biologische Material wurde zuvor

in flüssigem Stickstoff schockgefroren, gemörsert und anschließend mit der QiaShredder-Methode homogenisiert.

2.2.1.13. Radioaktive Markierung von DNA

Die Markierung der DNA als Sonde für die Hybridisierungsmethoden erfolgte mit Hilfe des rediprime™II Kits der Firma Amersham Pharmacia (Braunschweig). Es wurde radioaktiv markiertes Cytosin eingebaut. Zur Abtrennung der überschüssigen Nukleotide wurde die gesamte Probe auf MicroSpin™-Säulen der Firma Amersham Pharmacia (Braunschweig) überführt und nach Angaben des Herstellers zentrifugiert. Die so aufbereitete Sonde wurde für die Hybridisierungsexperimente eingesetzt.

2.2.1.14. Elektrophorese von Nukleinsäuren

Die Elektrophorese von DNA erfolgte standardmäßig mit Agarosegelen bei einer Spannung von 100 Volt. Als Laufpuffer und für die Zubereitung der Gellösungen diente TBE-Puffer. Zu je 100 ml Gellösung wurden 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugesetzt, um die Nukleinsäuren nach der elektrophoretischen Auftrennung unter UV-Licht nachweisen zu können.

2.2.1.15. Southern Blot

Nach Isolierung der Gesamt-DNA mit dem QiaAmp-Kit der Firma Qiagen aus den Zellen wurde die DNA elektrophoretisch auf einem 0,9%igen Agarosegel (mit Ethidiumbromid) der Größe nach aufgetrennt. Das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert und anschließend jeweils 30 min. in den Puffern 1 bis 4 inkubiert. Die DNA wurde mit Hilfe der Vakuum-Blot-Kammer innerhalb von 2 Stunden auf einen Filter (Hybond™-N+, Version 2.0, Amersham Pharmacia, Braunschweig) transferiert. Nach dem Transfer wurde der Filter unter UV-Licht gelegt und auf diese Weise die DNA an den Filter gebunden.

Die Membran wurde für 30 min bei 68°C mit Quick Hyb-Lösung der Firma Stratagene und Heringssperma-DNA (Roche, Mannheim) vorhybridisiert. Nach 30 min wurde die radioaktiv markierte Sonde zugegeben und über Nacht hybridisiert.

Die Membran wurde 2x je 15 min bei RT mit 0,1% SSC und 0,2% SDS, sowie 1x für 30 min bei 60 °C mit 0,1% SSC und 0,1% SDS gewaschen. Anschließend wurde die Membran getrocknet und auf einen Röntgenfilm gelegt.

2.2.1.16. Elektrophorese von Proteinen

Die Elektrophorese von Proteinen erfolgte nach der bei Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989) beschriebenen Methode der SDS-PAGE. In der Regel erfolgte die Auftrennung auf einem 12-

15%igen Trenngel, dem ein 5%iges Sammelgel vorgeschaltet war. Die Proteinelektrophorese wurde zur Proteindetektion durch Western-Blots eingesetzt.

2.2.1.17. Coomassie-Färbung von Proteingelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel (vergl. 2.2.1.14.) wurde das Gel vorsichtig aus der Elektrophoresekammer entnommen und mindestens 30 min bei Raumtemperatur mit Coomassie Brilliant Blue-Lösung gefärbt. Es folgte eine Entfärbung des Gels, bei der distinkte Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend wurde das Gel getrocknet oder fotografiert.

2.2.1.18. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen wurden mit Hilfe des BioRad Protein Assays (BioRad, München) durchgeführt. Die Proteinbestimmungs-Lösung wurde 1:5 mit Wasser verdünnt. Zu der verdünnten Lösung wurden 10 µl der zu testenden Proteinlösung gegeben, umgeschüttelt und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm photometrisch bestimmt.

Die Proteinbestimmungen erfolgten mit den Fraktionen aus der Fraktionierung transfizierter Zellen. Durch die Proteinbestimmungen konnte die Reproduzierbarkeit der Western-Spot-Blot Analysen gewährleistet werden.

2.2.1.19. Western-Blot

Der Western-Blot diente zur Detektion elektrophoretisch aufgetrennter Proteine und zur Überprüfung ihrer Größe. Dem eigentlichen Blot war eine SDS-PAGE (s. 2.2.1.14.) vorgeschaltet. Das Gel wurde dann auf eine Nitrocellulosemembran gelegt und zwischen mehreren Lagen mit Puffer angefeuchteten Whatman-Papiers in die Blottingvorrichtung eingelegt. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte im elektrischen Feld bei 100 Volt für 1 Stunde. Die Membran wurde anschließend analog zu 2.2.1.20. entwickelt.

2.2.1.20. Western-Spot-Blot

Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden nach einer Proteinbestimmung auf eine Nylonmembran aufgetropft (10 µl) und bei Raumtemperatur leicht angetrocknet. Es erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur in PBS mit 10% Magermilchpulver zur Absättigung freier Bindungskapazitäten auf der Membran. Nach zweimaligem, jeweils fünfminütigem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (z.B. Woodchuck anti-WHcAg-Serum, rabbit-anti-HBcAg) in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS.

Es folgten zwei weitere Waschschrte (s.o.) und die Inkubation (s.o.) mit einem zweiten, Peroxidase-gekoppelten Antikörper. Nach dieser Inkubation wurde erneut gewaschen und der Western-Spot-Blot mit 10 ml Peroxidasesubstrat-Lösung (10 ml H₂O, 1 mg DAP, 10 µl H₂O₂) colorimetrisch für 10 min. bei Dunkelheit und Raumtemperatur entwickelt. Dunkle Punkte zeigten die Anwesenheit des gesuchten Proteins an.

2.2.1.21. *In vitro* Translation

Die *in vitro* Translation erfolgte mit dem TNT®coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, USA) streng nach Angaben des Herstellers. Die Translation wurde mit und ohne mikrosomale Fraktion durchgeführt. Als Kontrollen wurden die Glykosylierungsinhibitoren Tunicamycin und p-Nitrophenyl N-Acetyl α-D-Galatosaminid verwendet. Durch Zugabe von ³⁵S-markiertem Methionin konnte die *in vitro* Translation nach der Gelelektrophorese mit Hilfe des Phosphorimagers ausgewertet werden.

2.2.1.22. RNase-Protection-Assay

Die RNase-Protection Assays wurden zur Quantifizierung der Immunantwort bei der Therapie chronisch WHV-infizierter Tiere mit α-Galaktosyl-Ceramid eingesetzt. Die Testdurchführung erfolgte in Anlehnung an M.V. Hobbs *et al.* (1993) mit dem RiboQuant™-Kit der Firma Pharmingen (USA) nach Angaben des Herstellers.

Die Woodchuck-spezifischen antisense RNA-Proben für IFN-γ, TNF-α, IL-15, CD3, CD4, CD8 und β-Aktin wurden von linearisierten (EcoRI) templates mittels *in vitro* Transkription durch T7-RNA-Polymerase synthetisiert (*In vitro* Transcription Kit, Pharmingen). Pro Reaktion (20µl) wurden 60 µCi [α-³²P] UTP, 12 µM UTP, jeweils 500 µM GTP, CTP, und ATP, 100 mM DTT, 1x Transkriptionspuffer, 40 U RNasin™, 20 U T7-RNA-Polymerase und 1µg linearisierte DNA eingesetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 U RNase-freier DNase I für 30 min bei 37°C gestoppt.

Die RNA wurde mit Phenol:Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt, getrocknet und vorsichtig in 50 µl Hybridisierungspuffer resuspendiert. Die Aktivität der RNA wurde durch Doppelbestimmung mit Szintillationsmessung quantifiziert. Für die Hybridisierung wurden Aliquods mit jeweils 3 x 10⁵ cpm mit 10 µg Gesamt-Leber-RNA gemischt, 5 min auf 95°C erhitzt und für 16 h bei 56°C hybridisiert. Nach dem Verdau der überhängenden RNA-Einzelstränge mit RNaseA und T1 sowie Proteinase Verdau, wurden die doppelsträngigen RNA-Proben wie o.a. extrahiert und präzipitiert. Die RNA-Pellets wurden in 1 x Probenpuffer resuspendiert und auf

einem 5%igen Polyacrylamid-Gel (PAGE) nach Herstellerangaben ihrer Größe nach getrennt. Die geschützten RNA-Banden wurden mit einem Phosphorimager (Packard) quantifiziert.

2.2.1.23. ELISA

Woodchuck-spezifische ELISAs zur Diagnostik von WHsAg, WHcAg oder antiviraler Antikörper wurden zentral von Frau Bleekmann oder Frau Kemper durchgeführt.

Zur Bestimmung der Sekretion subviraler Partikel in die Zellkulturüberstände transfizierter Zellen wurde das Enzygnost®HBsAg 5.0 System (Dade Behring, Marburg), das ebenfalls in der Routine-Diagnostik der HBV Infektion eingesetzt wird, verwendet.

2.2.2. Zellkulturtechniken und spezielle virologische Methoden

2.2.2.1. Kultivierung von Woodchuck-Hepatocyten WH12/6

Die Woodchuck-Hepatocyten-Zelllinie WH12/6 wurde bei 37°C unter 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Als Nährmedium diente HAM's F12 Medium (Cytogen) mit 10% FBS. Zur Passage der Zellen wurden diese, nachdem sie einen zu 80-90% konfluenten Zellrasen gebildet hatten, zweimal mit PBS-d gewaschen und nach Zugabe von 5 ml Trypsin/ EDTA (Cytogen) vom Flaschenboden abgelöst.

Je ein Viertel bis ein Drittel der abgelösten Zellen wurden mit einer Pipette aufgenommen und in frisches Medium überführt. Die Passage konnte etwa alle 8-10 Tage durchgeführt werden, ein Medienwechsel erfolgte nach etwa 4-5 Tagen.

2.2.2.2. Kultivierung von BHK-Zellen

BHK-Zellen wuchsen in MEM mit 10 % FCS bei 37°C in 5% CO₂ zu konfluenten Monolayern. Die Passage in neue Gewebekulturflaschen erfolgte durch Trypsinierung für 5 min. bei Raumtemperatur. Die Passage erfolgte alle 3-4 Tage.

2.2.2.3. Kultivierung von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden analog zu BHK-Zellen kultiviert, die Passage erfolgte jedoch anders als bei BHK-Zellen alle 5-6 Tage, das Medium wurde zwischen den Passagen jeweils einmal gewechselt.

2.2.2.4. Kultivierung von SF9-Zellen

SF9-Zellen dienten der Kultivierung rekombinanter Baculoviren zur Überexpression des Woodchuck Interferon- γ Rezeptors im eukaryotischen System. Die Zellen wurden in TNM-FH

Medium kultiviert und alle 4-5 Tage passagiert. Die Passage erfolgte ohne Zugabe von Trypsin oder anderen Reagenzien nach Anleitung (Baculo-Expression Vector System, Pharmingen, USA).

2.2.2.5. Transfektion eukaryotischer Zellen

Transfektionen wurden ausschließlich mit Effectene Transfection Reagent (Qiagen) durchgeführt. Transfizierte Zellen bzw. deren Überstände wurden 24-72 Stunden nach Transfektion geerntet bzw. mit Antikörpern immunhistochemisch gefärbt.

2.2.2.6. Isolierung von Lymphocyten

In ein 50 ml Separationsröhrchen der Firma Falcon wurden 16 ml Ficoll-Separationslösung gegeben und bei 3000 rpm für 1-2 min zentrifugiert. Anschließend wurde EDTA-behandeltes Blut mit PBS verdünnt und in das vorbereitete Separationsröhrchen überführt. Nach 20-25 minütiger Zentrifugation (3000 rpm, RT) wurde die obere Phase in ein normales 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 20 ml PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (15 min bei 3000 rpm, RT) wurde das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert, in ein frisches Röhrchen überführt und bei 2000 rpm für 10 min pelletiert. Nach Wiederholung des letzten Schrittes wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen in AIM V-Medium kultiviert.

2.2.2.7. Stimulation von Lymphocyten

Die Stimulation von Lymphocyten erfolgte mit 10 µg/ml PHA und 50 U/ml IL2 für 5 Tage bei 37°C, wobei die Zellen wie unter 2.2.2.6. beschrieben kultiviert wurden (M. Isogawa, Institut für Virologie, Universität GH Essen, persönliche Mitteilung).

2.2.2.8. Immunfluoreszenz-Färbungen

Für die Immunfluoreszenz wurden die zu färbenden Zellen (i.d.R. WH12/6) drei bis 10 Tage (abhängig von der Zelldichte und der Wachstumsgeschwindigkeit) vor der Färbung auf 8-Kammer-Objektträgern (Chamber-Slides) kultiviert.

Vor der Färbung wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 50%igem Methanol fixiert. Nach der Fixierung erfolgte die Inkubation mit dem/ den primären Antikörper(n) für eine Stunde bei 37°C. Anschließend wurde zweimal mit PBS-def. gewaschen und erneut für eine Stunde mit dem/ den sekundären, FITC/Texas Red-gekoppelten Antikörper(n) (1:20 mit Evan's Blue) bei 37°C inkubiert. Dieser Inkubation folgte ein weiterer Waschschrift für 15 min. mit PBS-def., anschließend wurden die Objektträger mit zwei bis drei Tropfen Vectashield® Mounting Medium (Vector Laboratories, USA) versehen und mit Deckgläschen abgedeckt. Als Negativkontrollen

dienten nicht transfizierte Zellen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops oder eines Konfokal Laser Scanning Mikroskops (nur Doppelfärbungen).

2.2.2.9. Überexpression des Woodchuck Interferon- γ Rezeptors

Ein rekombinanter AcNPV Stamm, dessen Polyhedrin-Gen durch das Gen für den Interferon γ Rezeptor des Woodchucks ersetzt wurde, wurde nach Herstellerangaben mit dem „*Baculo-Expression Vector System*“ (Pharmingen, USA) generiert. Die Expression des Interferon γ Rezeptors erreichte etwa 4 Tage nach Infektion der Zellen ein Maximum; die Reinigung erfolgte über ein His-Tag und die mitgelieferte Ni-NTA Agarose (Zubehör im *Baculo-Expression Vector System* mitgeliefert).

2.2.2.10. Fraktionierung von kultivierten Zellen

Transfizierte HeLa-Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion mit einem Zellschaber geerntet. Die Zellen wurden durch Zugabe von destilliertem Wasser (5-10 min bei RT) unter milden Bedingungen lysiert und das Lysat auf einem Stufen-Sucrose-Gradienten aufgetragen. Nach isopyknischer Zentrifugation (20 h bei 100000 g) wurde das Lysat fraktioniert. An den Phasengrenzen des Dichtegradienten kam es aufgrund unterschiedlicher Dichten zur Anreicherungen der unterschiedlichen zellulären Kompartimente (Plasmamembran, Golgi-Membran, ER). Die Dichte der Fraktionen wurde refraktometrisch bestimmt. Im Western-Spot-Blot wurden die Fraktionen auf ihren Gehalt an zellulären und transient exprimierten Proteinen untersucht. Die Fraktionierung und die isopyknische Zentrifugation erfolgten in Anlehnung an Rickwood *et al.* und Lottspeich und Zorbas, 1998.

2.2.3. Tierversuche

2.2.3.1. *In vivo* Transfektion

Nachdem die Tiere mit Ketamin/ Xylazin (5ml/1,5ml) narkotisiert wurden, wurde eine Laparatomie durchgeführt und DNA (in PBS) intrahepatisch injiziert. Die Operationswunde wurde antibiotisch versorgt, mit U-Nähten verschlossen und anschließend mit Alumiumspray desinfiziert. Nach 14 Tagen wurden die Fäden gezogen und über einen Zeitraum von 14 Wochen wöchentlich Blutproben entnommen.

2.2.3.2. Behandlung mit α -Galaktosyl-Ceramid

Chronisch WHV-infizierten Woodchucks wurde i.v. eine Dosis von 100 mg/ kg Körpergewicht α -Galaktosyl-Ceramid in 0,5 % Tween 20/ PBS verabreicht. Die Tiere wurden an den Tagen 0, 1, 50

3/7 leberbiopsiert, am Tag der vorgeschriebenen Tötung wurde die Leber entnommen. Die Tiere wurden in der Zwischenzeit mit NaCl, Sucrose-Lösung und Aminosäuren substituiert und antibiotisch behandelt.

2.2.3.3. Blutentnahmen

Die Blutentnahmen (Serum/ EDTA-Blut) erfolgten nach Ketamin/ Xylazin-Narkose der Murmeltiere aus der Vena saphena. Es konnten jeweils 2-3 ml Serum und 5-8 ml EDTA-Blut gewonnen werden.

2.2.3.4. Leberbiopsien

Die Leberbiopsien erfolgten entweder als offene Biopsien nach einer Laparatomie (s.o.) oder als Leberblindbiopsien mit Biopsiekantülen der Fa. Sherwood Medical (Nordirland). Die Biopsien wurden freundlicherweise von Frau Dr. Dahmen und Herrn Y. Li (Abteilung für experimentelle und Transplantationschirurgie, Uniklinikum Essen) durchgeführt.

2.2.3.5. Infektionsversuche

14 Wochen nach *in vivo* Transfektion erfolgte die Infektion der Woodchucks mit 1×10^8 WHV Partikeln. In den folgenden 4 Wochen wurden virale und immunologische Infektionsmarker beobachtet, um den Immunstatus der Tiere zu bestimmen.

3. Ergebnisse

3.1. Konstruktion und Charakterisierung von preS2-Mutanten

3.1.1. Konstruktion von chimären und rekombinanten preS2-Proteinen aus WHV und HBV

Da für das Woodchuck Modell nur eine begrenzte Auswahl spezifischer (polyklonaler) Antikörper zur Verfügung steht, sollten chimäre Fusionsproteine zwischen dem small-S-Antigen des humanen Hepatitis B Virus und dem Woodchuck preS/S-Antigen konstruiert werden. Mit Hilfe dieser Chimären sollten *in vitro* Studien zur Glykosylierung und intrazellulären Distribution des WHV-preS2-Proteins durchgeführt werden. Die Konstrukte basieren auf dem Protein HybIII (X. Zheng, Dissertationsschrift, 2000), welches die WHV-preS2-Domäne und ein Fusionsprotein aus WHVsAg und HBsAg unter der Kontrolle eines CMV-Promotors im pcDNA3-Vektor exprimiert (Abbildung 8, oberstes Konstrukt).

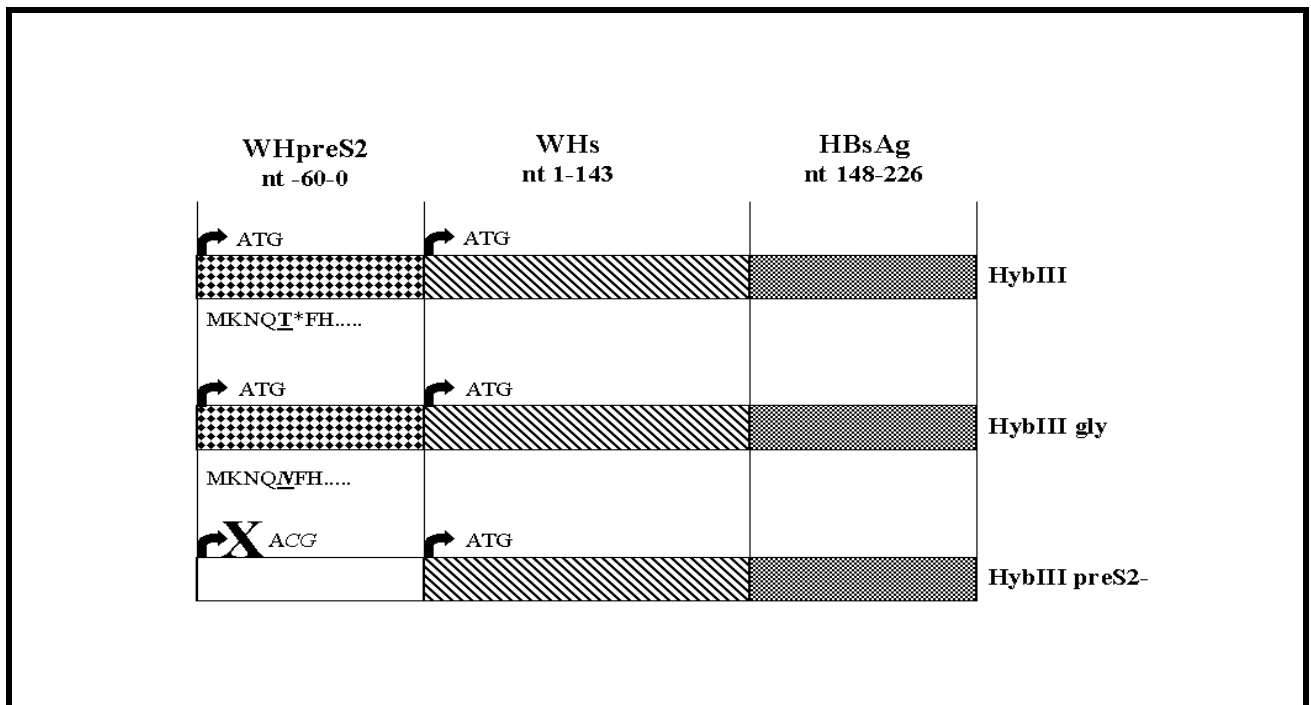


Abbildung 8: Chimäre WHpreS2/HBsAg-Konstrukte für *in vitro* Studien. Die Plasmide kodieren für chimäre Oberflächenproteine aus der preS2/S-Region des WHV und der 'a'-Determinante des HBV. Die preS2-Domäne wird von einem polyklonalen, die HBV 'a'-Determinante von einem monoklonalen Antikörper erkannt. Das obere Konstrukt HybIII enthält die Wildtyp preS2-Region des WHV, die Aminosäure 5 ist ein Threonin, das möglicherweise O-glykosyliert wird. Das zweite Konstrukt HybIIIgly hat eine Punktmutation und dadurch bedingt einen Aminosäureaustausch Thr→Asn an Position 5, der möglichen O-Glykosylierungsstelle. Das Plasmid HybIII preS2 minus (unten, auch als HybIIIpreS2- bezeichnet) kodiert nur für ein chimäres S-Protein, da das Startcodon für das preS2-Protein (auch middle surface antigen) mutiert wurde. Die beiden Konstrukte HybIII und HybIIIgly kodieren für ein chimäres S und ein chimäres preS2-Protein.

Die HBsAg-Domäne trägt die 'a'-Determinante des Virus, welche von kommerziellen Antikörpern, die seit langem erfolgreich in der klinischen Diagnostik eingesetzt werden, erkannt wird. Die preS2-Region des WHV wird darüber hinaus von einem polyklonalen Serum gegen WHVpreS2/S erkannt, so daß eine Unterscheidung zwischen den beiden exprimierten Proteinen WHpreS2 (mit preS2-Domäne und HBsAg) und WHsAg/HBsAg (ohne preS2-Domäne) möglich ist. Die folgende Abbildung zeigt die Konstrukte HybIII (Abb. 8 oben), HybIII preS2minus (Abb. 8 unten) und HybIII preS2gly (Abb. 8 Mitte). Analog zu den in der *in vivo* Transfektion eingesetzten Proteinen ist bei dem Konstrukt preS2 minus das Startcodon der preS2 Dömäne durch gezielte Mutagenese ausgeschaltet worden. Die Mutagenese erfolgte durch rekombinante PCR mit den Primerkombinationen *HybIIImutre/preS2gly1.1* (Glykosylierungsstelle mutiert) bzw. *HybIIImutre/preS2m1* (preS2-Startcodon mutiert). Als template für die rekombinante PCR wurde das Konstrukt HybIII eingesetzt, das freundlicher Weise von Frau Dr. X. Zheng zur Verfügung gestellt wurde (vergl. X. Zheng, Dissertationsschrift, 2000). Der Mutagenisierungserfolg wurde durch Sequenzierung überprüft (s. Abbildung 9). Die so gewonnenen Konstrukte wurden in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt.

```

HYBIII      ( 1) ATGAAAAATCAGACTTTTCATCTCCAGGGGTTTCGTAGACGGATTACGAGACTTGACAACA
HYBIII preS2- ( 1) .C.....
HYBIII GLY   ( 1) .....A.....

HYBIII      ( 61) ACGGAACGCCAACACAATGCCTATGGAGATCCTTTTACAACACTAAGCCCTGCGGTTCTCT
HYBIII preS2- ( 61) .....
HYBIII GLY   ( 61) .....

HYBIII      ( 121) ACTGTATCCACCATATTGTCTCCTCCCTCGACGACTGGGGACCTGCACTGTACCCGGAG
HYBIII preS2- ( 121) .....
HYBIII GLY   ( 121) .....

HYBIII      ( 181) ATGTCACCATCAAGTCTCCTAGGACTCCTCGCAGGATTACAGGTGGTGTATTTCTTGTGG
HYBIII preS2- ( 181) .....
HYBIII GLY   ( 181) .....

HYBIII      ( 241) ACAAAAATCCTAACAAATAGCTCAGAATCTAGATTGGTGGTGGACTTCTCTCAGTTTTCCA
HYBIII preS2- ( 241) .....
HYBIII GLY   ( 241) .....

HYBIII      ( 301) GGGGGCATACCAGAGTGCACCTGGCCAAAATTTCGAGTTCCAAACCTTGCAAACACTTGCCA
HYBIII preS2- ( 301) .....
HYBIII GLY   ( 301) .....

HYBIII      ( 361) ACCTCCTGTCCACCAACTTGCAATGGCTTTCGTTGGATGTATCTGCGGCGTTTTATCATA
HYBIII preS2- ( 361) .....
HYBIII GLY   ( 361) .....

HYBIII      ( 421) TACCTATTAGTCTCTGCTGTTGTGCCTCATCTTCTTGTGGTCTCCTGGACTGAAAAGGT
HYBIII preS2- ( 421) .....
HYBIII GLY   ( 421) .....

HYBIII      ( 481) TTAATACCTGTCTGTCTCTTCAACCCACAACAGAAACAACAGTCAATTGCAGAACCTGC
HYBIII preS2- ( 481) .....
HYBIII GLY   ( 481) .....

HYBIII      ( 541) ATGACTACTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACCAAACCTTCGGAC
HYBIII preS2- ( 541) .....
HYBIII GLY   ( 541) .....

HYBIII      ( 601) GGAAATTGCACTTGTATTCCCATCCCATCATCTGGGCTTTCGGAAAATTCCTATGGGAG
HYBIII preS2- ( 601) .....
HYBIII GLY   ( 601) .....

HYBIII      ( 661) TGGGCCTCAGCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGTA
HYBIII preS2- ( 661) .....
HYBIII GLY   ( 661) .....

HYBIII      ( 721) GGGCTTTCCTCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGCCAAGT
HYBIII preS2- ( 721) .....
HYBIII GLY   ( 721) .....

HYBIII      ( 781) CTGTACAGCATCTTGAGTCCCTTTTACCCTGTTACCAATTTCTTTTGTCTTTGGGTA
HYBIII preS2- ( 781) .....
HYBIII GLY   ( 781) .....

HYBIII      ( 841) TACATTTAAACCTAACAACAAAAGATGGAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACT
HYBIII preS2- ( 841) .....
HYBIII GLY   ( 841) .....

HYBIII      ( 901) GCGCGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTACCTAAATGCTAGA
HYBIII preS2- ( 901) .....
HYBIII GLY   ( 901) .....

HYBIII      ( 961) GCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCC
HYBIII preS2- ( 961) .....
HYBIII GLY   ( 961) .....

HYBIII      (1021) CCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAA
HYBIII preS2- (1021) .....
HYBIII GLY   (1021) .....

```

Abbildung 9: Sequenzvergleich der chimären Fusionsproteine; die Übereinstimmungen der Sequenzen sind durch Punkte dargestellt, die Punktmutationen in den Konstrukten HybIII gly und HybIII preS2- durch die entsprechenden Nukleotide.

3.1.2. Sekretion der chimären Proteine

Die Rolle des preS2-Proteins und die Auswirkungen der Glykosylierung auf die Prozessierung und den intrazellulären Transport des preS2 Proteins sind bisher noch unklar. Da die Glykosylierung oft Voraussetzung für die Sekretion eines Proteins ist, wird vermutet, daß das preS2 Protein eine Rolle im Zusammenhang mit der Sekretion viraler und subviraler Partikel spielt. Ebenso wurde aber in mehreren Arbeiten gezeigt, daß es einen preS2 unabhängigen Sekretionsweg zu geben scheint. Um zu prüfen, welche Hypothese zutrifft, wurden BHK-Zellen mit den Konstrukten HybIII, HybIII preS2 minus und HybIII preS2gly transient transfiziert.

Nach 72 Stunden wurden die Überstände abgenommen und mit einem diagnostischen ELISA (Enzygnost, Dade Behring) auf den Gehalt an S- und preS2-Protein, d.h. auf den Gehalt subviraler Partikel und freien Proteins, analysiert. Als Postivkontrolle diente Zellkulturüberstand mit HbsAg-DNA transfizierter Zellen. Als Kontrolle für die Glykosylierungsmutante wurde HybIII transfizierten Zellen der Glykosylierungsinhibitor p-Nitrophenyl N-Acetyl α -D-Galatosaminid zugesetzt und der Überstand im ELISA gemessen. Dieser Inhibitor unterbindet die O-Glykosylierung im Golgi-Apparat.

Als Negativkontrolle diente der Überstand nicht infizierter Zellen. Der cut off Wert für den ELISA berechnet sich aus der Extinktion der Negativkontrolle, zu der der Wert 0,05 addiert wird. Er liegt daher bei einer Extinktion von 0.107. Werte unterhalb des cut off dürfen nicht für weitere Analysen herangezogen werden (Angabe des Herstellers). Die Abbildung 10 zeigt die Extinktion der Überstände der transfizierten Zellkulturen. Das Konstrukt Hyb III liegt mit einer Extinktion von 0,25 über der Extinktion der Glykosylierungsmutante und der preS2 minus Mutante. Auch die Kontrolle mit p-Nitrophenyl N-Acetyl α -D-Galatosaminid weist eine niedrigere Extinktion auf. Die Unterschiede in der Sekretion sind minimal und bedeuten, daß keine, oder nur eine minimale Änderung der Sekretion durch die unterbundene Glykosylierung vorliegt. Alle Werte liegen über dem cut off und können daher zur Auswertung herangezogen werden. Die Daten deuten darauf hin, daß preS2 nicht alleine für die Sekretion verantwortlich ist.

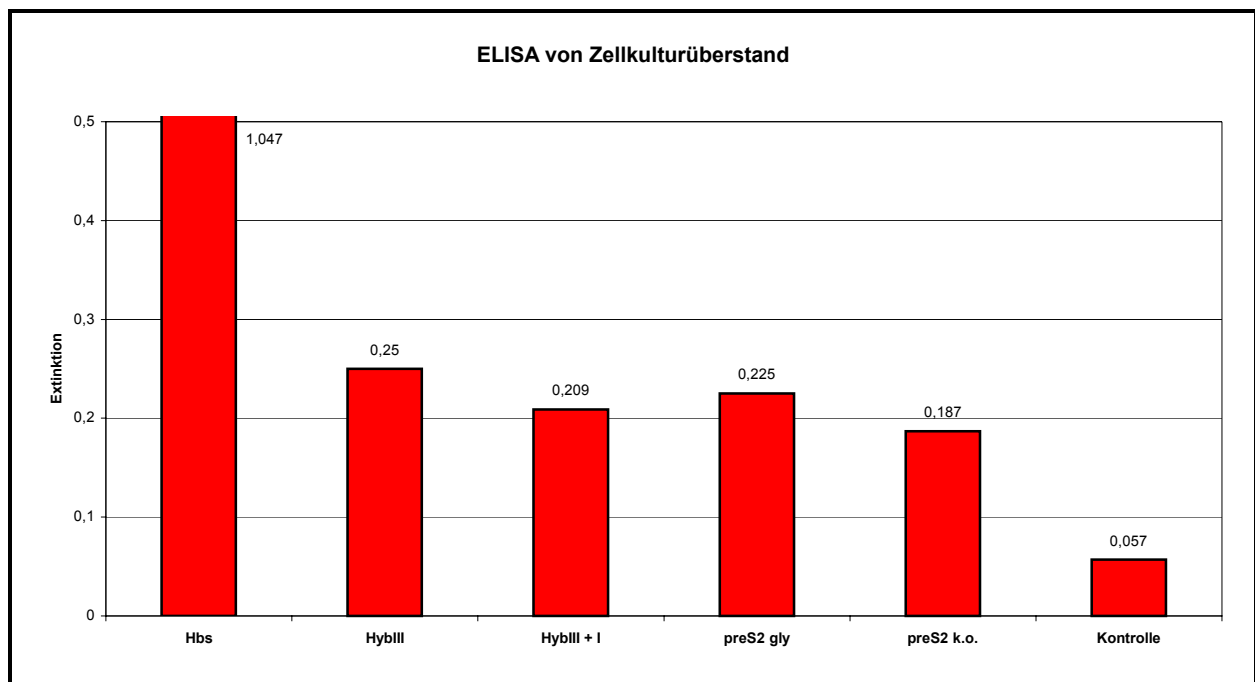


Abbildung 10: *In vitro* Sekretion der chimären Fusionsproteine in transfizierten BHK-Zellen. Die Sekretion der Proteine HybIII, HybIII+Inhibitor, HybIIIpreS2 gly und HybIIIpreS2- (=preS2k.o.) unterscheidet sich in ihrer Extinktion nur minimal. Der Zahlenwert über den Balken gibt die OD der jeweiligen Zellkulturüberstände an. Als positive Kontrolle dienten die Überstände von Zellen, die mit einem Plasmid transfiziert wurden, das für das HBsAg kodiert (erster Balken, nicht vollständig dargestellt). Als negative Kontrolle diente der Überstand von Zellen, die mit dem Plasmid pcDNA3 (Vektor ohne Insert) transfiziert waren.

3.1.3. *In vitro* Translation der chimären Proteine

Mit Hilfe einer *in vitro* Translation sollten die chimären Proteine biochemisch näher charakterisiert werden. Insbesondere kann mit dieser Technik überprüft werden, ob ein Protein posttranslational modifiziert wird. Diese Modifikationen werden in diesem experimentellen Ansatz dadurch erreicht, daß man zu dem Translationsansatz die sog. mikrosomale Fraktion zugibt. Dies ist eine Membranfraktion (aus Hundezellen), die in der Lage ist, z.B. Glykosylierung etc. an Proteinen durchzuführen. Durch Zugabe geeigneter Inhibitoren kann die Art der Glykosylierung bestimmt werden. Wird das untersuchte Protein glykosyliert, so kann man auf einer SDS-PAGE eine -im Vergleich zum nicht glykosylierten Protein- größere Bande (in kDa) sehen, d.h. es kommt zu einem *band-shift*.

Die *in vitro* Translation wurde mit und ohne mikrosomale Fraktion durchgeführt, d.h. mit und ohne posttranslationale Modifikationen. Auf diese Weise kann die Glykosylierung als solche aber auch die Art der Glykosylierung näher bestimmt werden (s.u.). Die Translation erfolgte durch ein Ein-Schritt-Verfahren, d.h. Transkription und Translation wurden in einem Reaktionsansatz gekoppelt durchgeführt. Transkribiert und translatiert wurden die Konstrukte HybIII, HybIII preS2 minus und HybIII preS2 gly. Als Kontrollen für die Glykosylierung dienten Transkriptionen/Translationen des Plasmids HybIII mit p-Nitrophenyl N-Acetyl α -D-Galatosaminid und HybIII mit Tunicamycin. Bei p-Nitrophenyl N-Acetyl α -D-Galatosaminid

handelt es sich um einen Inhibitor der O-Glykosylierung, Tunicamycin inhibiert die N-Glykosylierung. Die Abbildung 11 zeigt das Ergebnis dieser *in vitro* Translationen. Spur 1 zeigt die Translation des Konstrukts HybIII ohne mikrosomale Fraktion. Die Spur 2 zeigt die Translation des Konstrukts HybIII mit mikrosomaler Fraktion und p-Nitrophenyl N-Acetyl α -D-Galatosaminid, auf Spur 3 ist der Translationsansatz des Konstrukts HybIII mit mikrosomaler Fraktion aufgetragen. Es ist deutlich zu sehen, daß das Protein HybIII nur glykosyliert wird, wenn die mikrosomale Fraktion zugegeben wird (Spur 3). Die Glykosylierung wird durch p-Nitrophenyl N-Acetyl α -D-Galatosaminid, einen Inhibitor der O-Glykosylierung, unterbunden (Spur 2), nicht jedoch durch Tunicamycin, welches die N-Glykosylierung inhibiert (Daten für Tunicamycin nicht gezeigt, vergl. Tolle et al., 1998). Diese Daten bestätigen die Resultate von Tolle *et al.*, daß es sich bei der Glykosylierung des WHVpreS2 um ein O-glykosyliertes Protein handelt. Im Gel deutlich zu erkennen ist, daß die glykosylierte Form des preS2-Proteins ein wie zu erwarten höheres Molekulargewicht hat. Die glykosylierte Form des preS2 Proteins kann im Falle der Glykosylierungsmutante auch nach Zugabe der mikrosomalen Fraktion nicht nachgewiesen werden (Spuren 4+5), d.h. bei der mutierten Stelle des Proteins handelt es um eine Glykosylierungsstelle. Das Fehlen der preS2-Bande im Falle der *in vitro* Translation des Konstrukts HybIII preS2 minus sowohl mit als auch ohne mikrosomale Fraktion zeigt deutlich (Spuren 6+7), daß nur die chimäre WHsAg/HBsAg-Domäne exprimiert wird. Das defekte Startcodon verhindert also, wie erwartet, die Expression des preS2-Proteins.

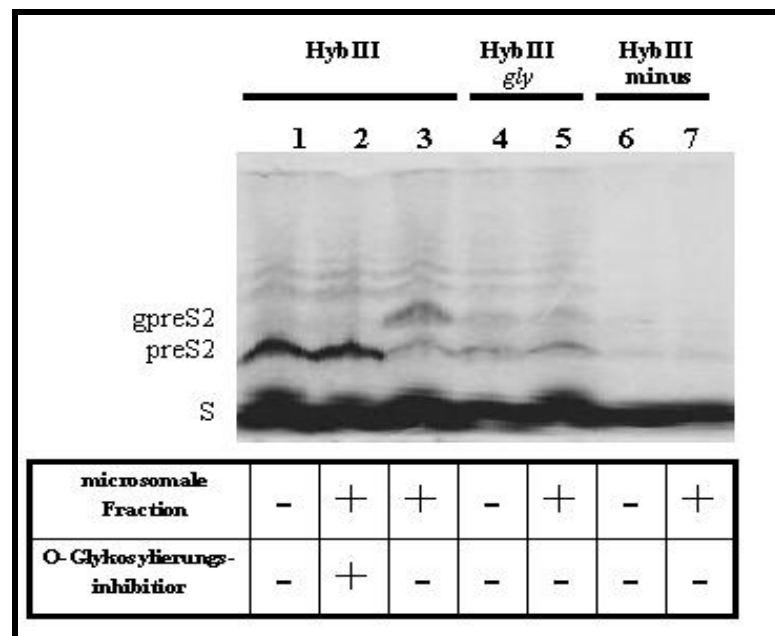


Abbildung 11: *In vitro* Translation der rekombinanten, chimären Konstrukte; die Translationen erfolgten mit und ohne mikrosomale Fraktion, als Kontrollen wurde der Glykosylierungsinhibitor p-Nitrophenyl-N-Acetyl- α -D-Galatosaminid eingesetzt. In Spur 3 sieht man deutlich die im Vergleich zu den Spuren 1 und 2 höhere Bande der glykosylierten Form des preS2 Proteins (g-preS2). Diese Bande findet man nicht in den Spuren 4 und 5, in denen die *in vitro* Translation der Glykosylierungsmutante HybIIIpreS2gly aufgetragen ist. Die *in vitro* Translationen des Proteins HybIIIpreS2- zeigen, wie erwartet, aufgrund des mutierten Startcodons, keine preS2-Bande.

3.1.4. Intrazelluläre Lokalisation und Morphologie der Fusionsproteine

In den folgenden Experimenten sollte die Auswirkung der Glykosylierung auf die intrazelluläre Verteilung und den Transport des preS2-Proteins in transfizierten Zellen untersucht werden. Dazu wurden Immunfluoreszenzstudien durchgeführt. Im ersten Teil dieser Studien sollte überprüft werden, ob die in der *in vitro* Translation bereits erfolgreich exprimierten Proteine auch in eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Dazu wurden BHK-Zellen mit den chimären Konstrukten HybIII, HybIII preS2 minus (=k.o.=) und HybIII preS2gly transfiziert (Abbildung 12). In weiteren Versuchen wurde dann überprüft, mit welchen zellulären Kompartimenten die Proteine kolokalisieren.

Zuerst wurden BHK-Zellen mit den Konstrukten HybIII, HybIII preS2 minus und HybIII preS2gly transient transfiziert. Als Kontrolle für die Glykosylierung wurde dem Medium mit HybIII transfizierter Zellen der Glykosylierungsinhibitor p-Nitrophenyl N-Acetyl α -D-Galatosaminid zugesetzt. Die Zellen wurden nach 24 Stunden mit Methanol (50% v/v) fixiert, mit PBS gewaschen und mit Antikörpern gegen die preS2-Domäne bzw. die chimäre WHsAg/HBsAg-Domäne gefärbt. Das Antiserum, das die preS2-Domäne erkennt ist polyklonal und erkennt auch Teilsequenzen des WHV-S-Proteins, ist aber in diesem Versuch nur minimal kreuzreaktiv.

Die primären Antikörper wurden mit einem FITC-gekoppelten sekundären Antikörper detektiert und die so gefärbten Präparate mit einem Immunfluoreszenz-Mikroskop untersucht und fotografiert (Belichtungszeit 10 sec, schwarz-weiß-Film, 800 ASA).

Wie in der Abbildung 12 zu sehen (A1 und A2), wird das dem Wildtyp des preS2-Proteins entsprechende chimäre Protein HybIII von beiden Antikörpern detektiert und zeigt eine gleichmäßige Verteilung im Cytoplasma der Zellen. Die chimäre WHsAg/HBsAg-Domäne der preS2minus Mutante wird von dem Antikörper gegen die HBsAg-Domäne erkannt (B1), nicht jedoch von dem Antikörper gegen das WHV-preS2-Protein (B2). Dieses Resultat bestätigt das o.a. Ergebnis der *in vitro* Translation, und zeigt, daß die Mutation im Startcodon der preS2-Domäne dessen Expression verhindert.

Betrachtet man die Immunfluoreszenzfärbung des glykosylierungsinhibierten HybIII-Proteins fallen die granulären Strukturen in den gefärbten Zellen auf (C1 und C2, siehe Pfeil). Die 'Clusterung' ist ein deutliches Indiz für einen veränderten Proteintransport. Die bei Zugabe des Glykosylierungsinhibitors beobachteten Granula treten auch bei der Transfektion von BHK-Zellen mit der Glykosylierungsmutante auf (D1 und D2, siehe Pfeile). Allem Anschein nach kommt es zu einer Anreicherung des nicht glykosylierten Proteins in einem zellulären Kompartiment. Diese Anreicherung sollte in den folgenden Experimenten näher untersucht werden. Zu diesem Zweck sollte durch Western-Spot-Blot-Analysen und Konfokalmikroskopie

eine eventuelle Kolo­kalisierung mit den wichtigsten an der Proteinsynthese beteiligten Zellorganellen bestimmt werden.

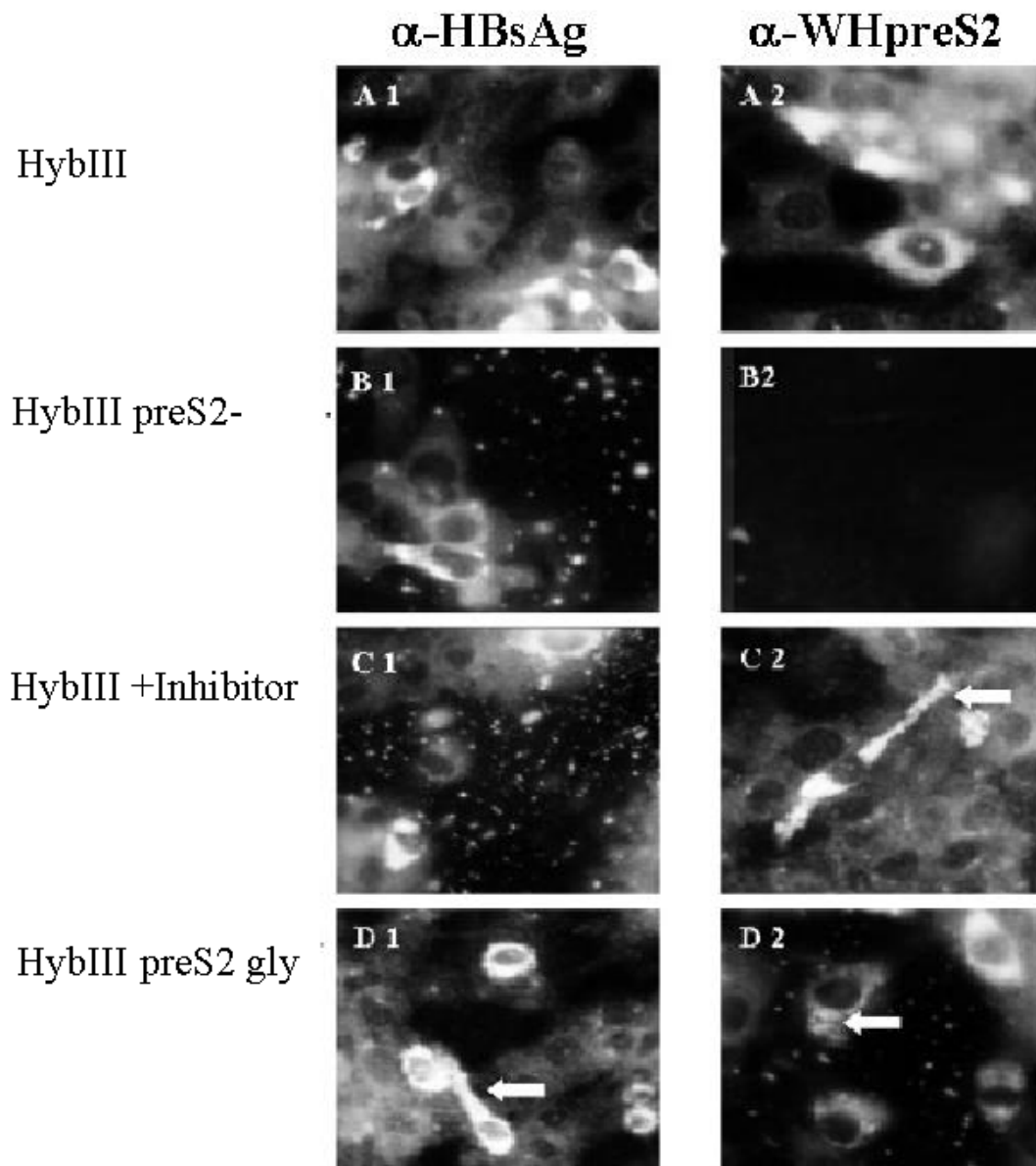


Abbildung 12: *In vitro* Transfektion der rekombinanten, chimären Proteine und Immunfluoreszenzfärbungen; deutlich zu sehen sind die, durch Glykosylierungsinhibition entstehenden, granulären Strukturen (in der Abbildung durch Pfeile hervorgehoben). A: Transfektion von BHK-Zellen mit dem Plasmid HybIII. Das chimäre preS2/S-Protein verteilt sich gleichmäßig im Cytoplasma, die preS2-Domäne wird exprimiert (A2). B: Transfektion von BHK-Zellen mit dem Konstrukt HybIIIpreS2-, das Protein (nur S-Protein) verteilt sich gleichmäßig im Cytoplasma (B1), die preS2-Domäne wird aufgrund des mutierten Startcodons nicht exprimiert (B2). C und D: Transfektion von BHK Zellen mit dem Konstrukt HybIIIpreS2gly (D) und dem Konstrukt HybIII (C; mit Glykosylierungsinhibitorzugabe zum Zellkulturmedium). In beiden Fällen kommt es zu einer Granulabildung, wahrscheinlich in Folge der nicht mehr erfolgenden Glykosylierung (s. Pfeile). (pMCSIII=HybIII; der Plasmidname pMCSIII soll in der geplanten Veröffentlichung verwendet werden)

3.1.5. Kolokalisation der Fusionsproteine mit Zellkompartimenten

Zur Untersuchung einer eventuellen Kolokalisation der chimären Proteine mit zellulären Kompartimenten wurden HepG2- und HeLa-Zellen mit den oben beschriebenen Konstrukten HybIII, HybIIIpreS2gly und HybIIIpreS2minus transient transfiziert. Diese Zelllinien wurde ausgewählt, weil die Detektion der zellulären Kompartimente Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum, Proteasom und Plasmamembran in diesen Zelllinien mit standardisierten Antikörpern möglich ist. Darüber hinaus handelt es sich bei der Zelllinie HepG2 um eine Zelllinie der humanen Leber.

Die Zellen wurden mit Effectene (Qiagen) transfiziert und nach 24, 48 und 72 Stunden geerntet. Die Zellen wurden pelletiert und mit destilliertem Wasser unter nativen Bedingungen lysiert. Die Zellysate wurden auf einem geschichteten Sucrosegradienten (60, 50, 40 und 30 % w/v) aufgetragen und mit 100.000 g für 20 Stunden isopyknisch zentrifugiert. Aufgrund der unterschiedlichen Dichten der verschiedenen Membranfraktionen reicherten sich die Membranen des Golgi-Apparates, des endoplasmatischen Retikulums und der Plasmamembran an den Phasengrenzen des Gradienten an. Diese Art der Zentrifugation wird als isopyknische Zentrifugation bezeichnet und ist eine Standardmethode zur Zellfraktionierung.

Die Gradienten wurden nach Zentrifugation in 8 Fraktionen aufgeteilt und diese Fraktionen nach einer Proteinbestimmung in mehreren Western-Spot-Blots untersucht (Originaldaten s. Anhang). Parallel wurde mit Hilfe eines Refraktometers der Brechungsindex der Fraktionen bestimmt. Für humane Zellen ist bekannt, in welcher Dichte sich zelluläre Kompartimente bei isopyknischer Zentrifugation anreichern (Lottspeich und Zorbas, 1998). Aufgrund der refraktometrischen Bestimmung und der Western Spot Blots konnte somit bestimmt werden, in welchen Fraktionen die Kompartimente Golgi, endoplasmatisches Retikulum und Plasmamembran überwiegend angereichert sind.

Die Western-Spot-Blots wurden parallel mit Antikörpern gegen die zellulären Kompartimente und gegen die 'a'-Determinante des HBsAg angefärbt. Wie im Anhang zu sehen, scheint es zu einer Anreicherung des nicht-glykosylierten preS2-Proteins im Golgi-Apparat oder endoplasmatischen Retikulum zu kommen. Die Anreicherung kann ebenfalls im Bereich des cis-Golgi vorliegen, also auf der Schwelle vom ER zum Golgi-Apparat (vergl. Diskussion).

Durch Auswertung der verschiedenen Blots konnten die Fraktionen mit den verschiedenen zellulären Kompartimenten identifiziert werden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, in welchen Fraktionen sich das S- und das preS2-Protein der transfizierten Konstrukte befanden. Durch einen Abgleich aller Daten konnte die Tabelle 12 erstellt werden, welche die Kolokalisation der Zellorganellen mit den chimären Proteinen zeigt. Als Kontrollen dienten mit HBsAg-transfizierte

Zellen und HybIII transfizierte Zellen, deren Medium der Inhibitor p-Nitrophenyl N-Acetyl α -D-Galatosaminid zugesetzt war.

Alle Proteine sind nach 24 Stunden überwiegend im endoplasmatischen Retikulum zu finden, in geringerer Menge auch im Golgiapparat. Nach 48 und 72 Stunden sind die Proteine in allen Kompartimenten gleichmäßig vertreten, lediglich die Glykosylierungs-Chimäre und das glykosylierungsinhibierte HybIII-Protein reichern sich nach 72 Stunden im Golgi-Apparat an. Die chimären Proteine findet man darüber hinaus öfter in derselben Fraktion wie die Proteasomen, wobei auffällt, daß besonders die chimären Proteine mit preS2-Domäne mit dem Proteasom kolokalisieren. Darüber hinaus findet sich das Proteasom nach 24 Stunden nur in den mit HybIII (+Inhibitor) und den mit HybIIIpreS2gly transfizierten Zellen in der ersten Fraktion, was möglicherweise Rückschlüsse auf einen früheren Abbau dieser Proteine über das Proteasom zuläßt (s. Abschnitt 4, Diskussion). In der negativen Kontrolle (Transfektion mit pcDNA3) ist keine Kolokalisation mit dem Proteasom zu beobachten. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß es selber unter der Nachweisgrenze exprimiert wird. Insgesamt waren die Experimente bezüglich einer Kolokalisation von Proteasomen und den chimären Proteinen eher unklar und sollen daher auch nicht weiter diskutiert werden.

Die in der Western-Blot-Analyse gewonnen Daten konnten durch die Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen bestätigt werden (Abbildungen 13 und 14). Es wurden jeweils ein zelluläres Protein (Golgi-Zone oder ERAB) und die HBsAg-Domäne der transfizierten Proteine angefärbt. Die sekundären Antikörper waren mit Texas Red und FITC gekoppelt. Texas Red emittiert im roten Bereich des sichtbaren Lichts, wohingegen FITC im grünen Bereich emittiert. In einem weiteren Versuch wurden die sekundären Antikörper durch Cy2 und Cy3 gekoppelte Antikörper ersetzt. Durch die Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie können beide Bereiche getrennt voneinander detektiert werden (grüne bzw. rote Fluoreszenz).

Wenn die jeweils angefärbten Proteine in demselben Zellkompartiment vorhanden sind bzw. kolokalisieren, ergibt sich an dieser Stelle bei Überlagerung der einzeln aufgenommenen Bilder eine orange bis gelbe Färbung. Dies zeigen die Abbildungen 13 und 14. Die Abbildung 13 zeigt die Immunfluoreszenzfärbung von HepG2 Zellen, die die Proteine HybIII, HybIIIpreS2gly und HybIIIpreS2minus transient exprimieren. Als negative Kontrolle dienen nicht transfizierte Zellen, als Kontrolle für die Glykosylierungsmutante dienten Zellen, deren Medium der O-Glykosylierungsinhibitor zugesetzt war. Tunicamycin hatte auch hier keinen Einfluß.

Nach 72 Stunden wurde die Zellen mit Methanol fixiert und wie unter Punkt 2 (Material und Methoden) beschrieben, gefärbt. Die Abbildung 13 zeigt die Doppelfärbung der HepG2 Zellen mit einem Antikörper gegen das *endoplasmatic reticulum antibody binding protein* (ERAB, grün) und HBsAg (rot). Bei der Transfektion mit HybIII und HybIIIpreS2minus (1. und 4. Reihe) sind

die chimären Proteine diffus über die gesamte Zelle, mit Ausnahme des Zellkerns, verteilt. Ein Teil des angefärbten S/preS2 Proteins kolokalisiert mit dem endoplasmatischen Retikulum. Betrachtet man die Doppelfärbungen der Glykosylierungsmutante (3. Reihe) und der Kontrolle mit Glykosylierungsinhibitor (2. Reihe), fällt eine Art Ringbildung und erneut eine Clusterung auf. Diese Ringe sind zweifarbig. Der innere Ring ist gelb und zeigt damit eine Kolokalisation von ER und HBs an, der äußere Ring hingegen ist rot und zeigt damit HBsAg an, das außerhalb des ER angereichert ist. Diese Ringbildung ist bei der Transfektion mit HybIII, das wie erwähnt dem Wildtyp entspricht, nicht vorhanden.

Die Abbildung 14 zeigt die Doppelfärbung von HepG2 Zellen mit dem Protein *Golgi-Zone* (grün). Das HBsAg ist wiederum rot (=Cy3) gefärbt. Auch in dieser Abbildung ist die Ringbildung bei der Färbung der Glykosylierungskontrolle und der Glykosylierungsmutante (2. und 3. Reihe) zu sehen. Diesmal ist der Ring jedoch nicht zweifarbig und auch nicht von einem roten Ring umgeben.

Zur genaueren Bestimmung der intrazellulären Region, in der das rekombinante, nicht glykosylierte preS2 Protein angereichert wird, wurde eine dreifach-Färbung *in vitro* transfizierter HepG2-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit den bekannten Konstrukten HybIII, HybIIIpreS2gly und HybIIIpreS2minus transfiziert und nach 48 Stunden mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 30 min. mit ER-blue/white-Tracker-haltigem Medium bei 37°C inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend wie oben beschrieben fixiert und mit Antikörpern gegen HBs und Golgi gefärbt.

Die Abbildung 15 zeigt das Ergebnis dieser Färbung. Die erste Reihe (1A-D) zeigt wie bereits mehrfach beschrieben die Transfektion mit dem Konstrukt HybIII. Es sind keinerlei Clusterungen zu erkennen, das Protein ist diffus in allen Kompartimenten vorhanden. Ebenso verhält sich das Protein HybIIIpreS2minus das in der Zeile 4 zu sehen ist. Sowohl in der Kontrolle mit Glykosylierungsinhibitor (2) als auch im Falle der Glykosylierungsmutante (3) sind granuläre Strukturen zu beobachten. Zu erkennen ist auch hier die Ringbildung durch HBs und dessen Kolokalisation mit dem Golgi-Apparat. Die weisse Färbung im Bild (3D), in dem die Überlagerung der drei Farbstoffe gezeigt wird, spricht für eine Kolokalisation aller angefärbten Strukturen. Das heißt, daß die Anreicherung des glykosylierungsdefekten preS2-Chimärs wahrscheinlich in dem Übergangsbereich von ER zu Golgi stattfindet. Eben dieser Bereich ist für die O-Glykosylierung mit verantwortlich.

Die Daten der Konfokalmikroskopie bestätigen die Daten der Western-Blot-Analyse. Es konnte gezeigt werden, daß die Glykosylierung für den korrekten Transport des preS2-Proteins vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgiapparat bzw. für den Transport durch den Golgiapparat

verantwortlich ist. Ein nicht-glykosyliertes preS2-Protein wird daher in diesem Kompartiment angereichert.

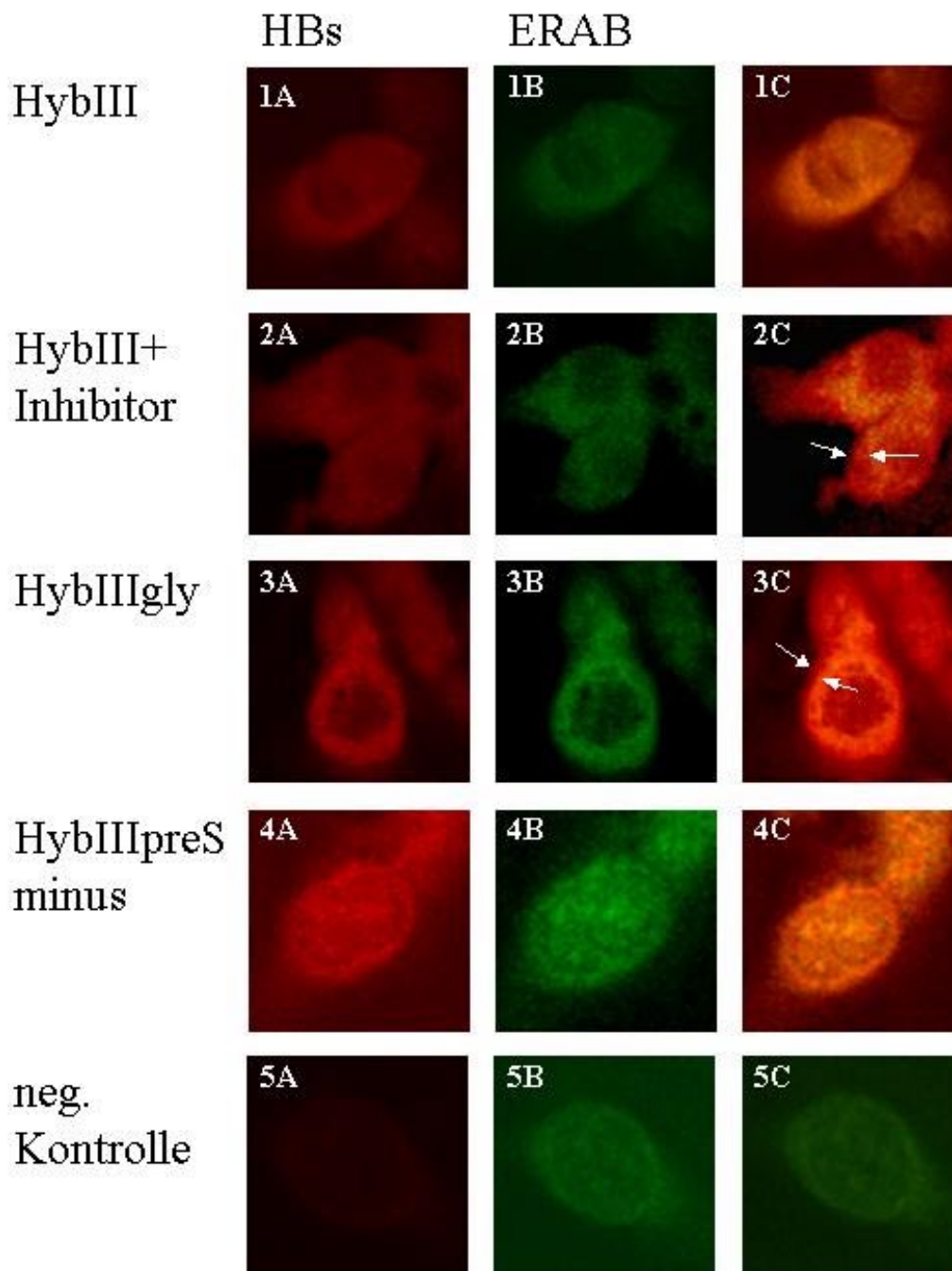


Abbildung 13: Kolokalisation der chimären Proteine mit ER-Strukturen in HepG2-Zellen; Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskopie. Die HepG2-Zellen wurden transfiziert (1:HybIII; 2: HybIII+Inhibitor; 3: HybIIIgly; 4: HybIIIpreS⁻; 5: negative Kontrolle) und nach 48 h indirekt mit monoklonalen Antikörpern gegen das HBsAg (rot) bzw. gegen das *Endoplasmatic Reticulum Binding Protein* (ERAB, grün) gefärbt (A: HBsAg; B: ERAB; C: Überlagerung von A und B). Die dritte Spalte (C) zeigt die Überlagerung beider Färbungen, orange bis gelbe Färbung zeigt die Kolokalisation von endoplasmatischem Retikulum mit den chimären Proteinen. Auffällig ist die rote Zone um einen hell-orangen Bereich im Falle der Transfektion mit der Glykosylierungsmutante HybIII gly (3c) bzw. bei der Transfektion des Wildtyp-Konstrukts (HybIII) und der Zugabe des Inhibitors (2c). Diese Zonenbildung, in der Abbildung durch Pfeile hervorgehoben, läßt sich wahrscheinlich auf eine Anreicherung des Proteins infolge eines veränderten Proteintransports zurückführen.

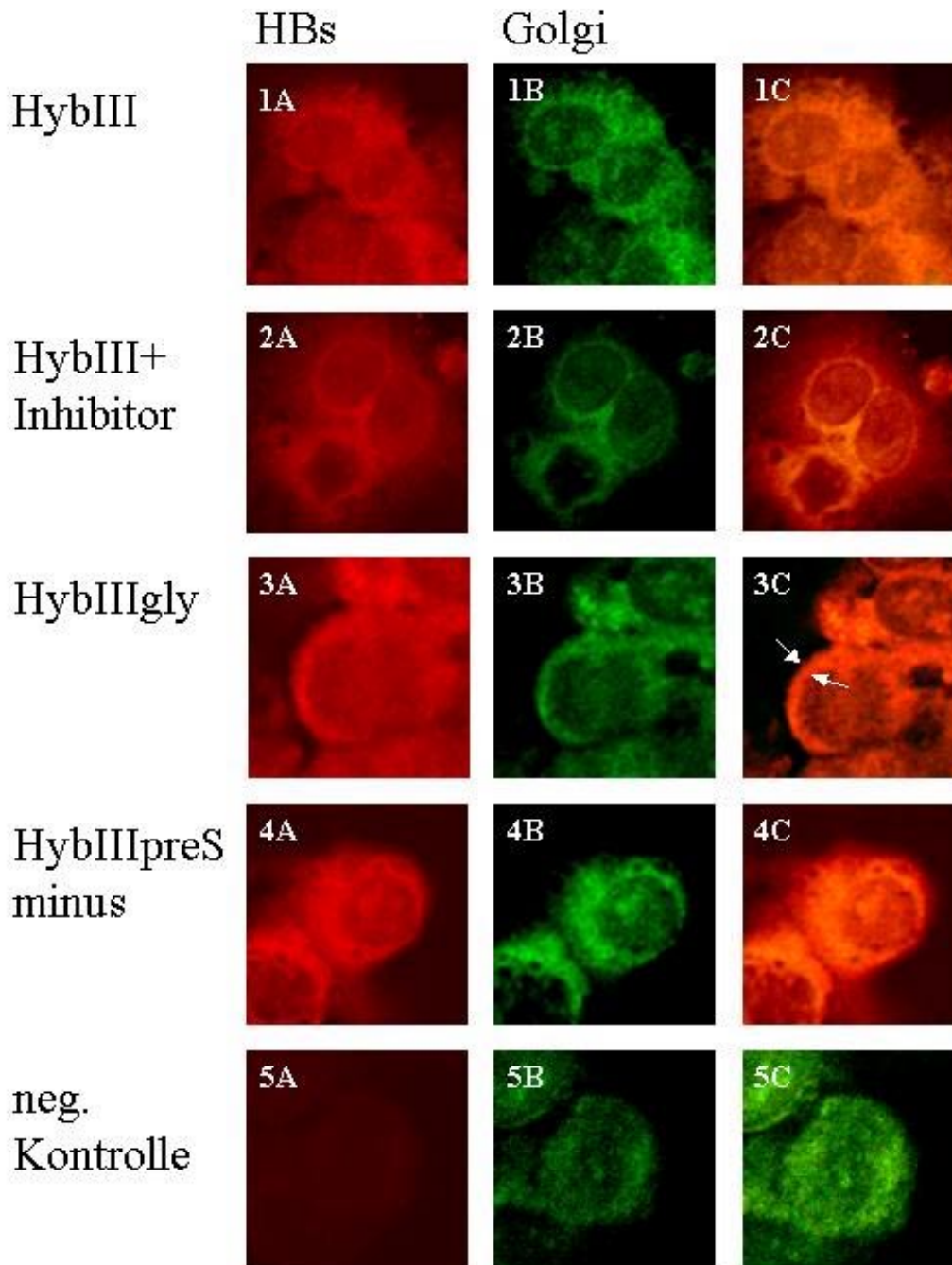


Abbildung 14: Kolokalisation der chimären Proteine mit Golgi-Strukturen in HepG2-Zellen; Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskopie. Die HepG2-Zellen wurden transfiziert (1:HybIII; 2: HybIII+Inhibitor; 3: HybIIIgly; 4: HybIIIpreS2-; 5: negative Kontrolle) und nach 48 h indirekt mit monoklonalen Antikörpern gegen HBsAg (rot) bzw. gegen das Protein *Golgi-Zone* (Golgi, grün) gefärbt (A: HBsAg; B: Golgi; C: Überlagerung von A und B). Die dritte Spalte (C) zeigt die Überlagerung beider Färbungen, orange bis gelbe Färbung zeigt die Kolokalisation des Golgi-Apparates mit den chimären Proteinen an. Die Bildung einer roten Zone um eine orange Region herum (s. vorherige Abbildung, Doppelfärbung von ER und chimären Proteinen) kann nicht beobachtet werden. D.h., daß die Anreicherung der nicht-glykosylierten Proteine (2+3) in einem postER-Bereich, evtl. sogar im Golgi-Apparat, stattfinden muß.

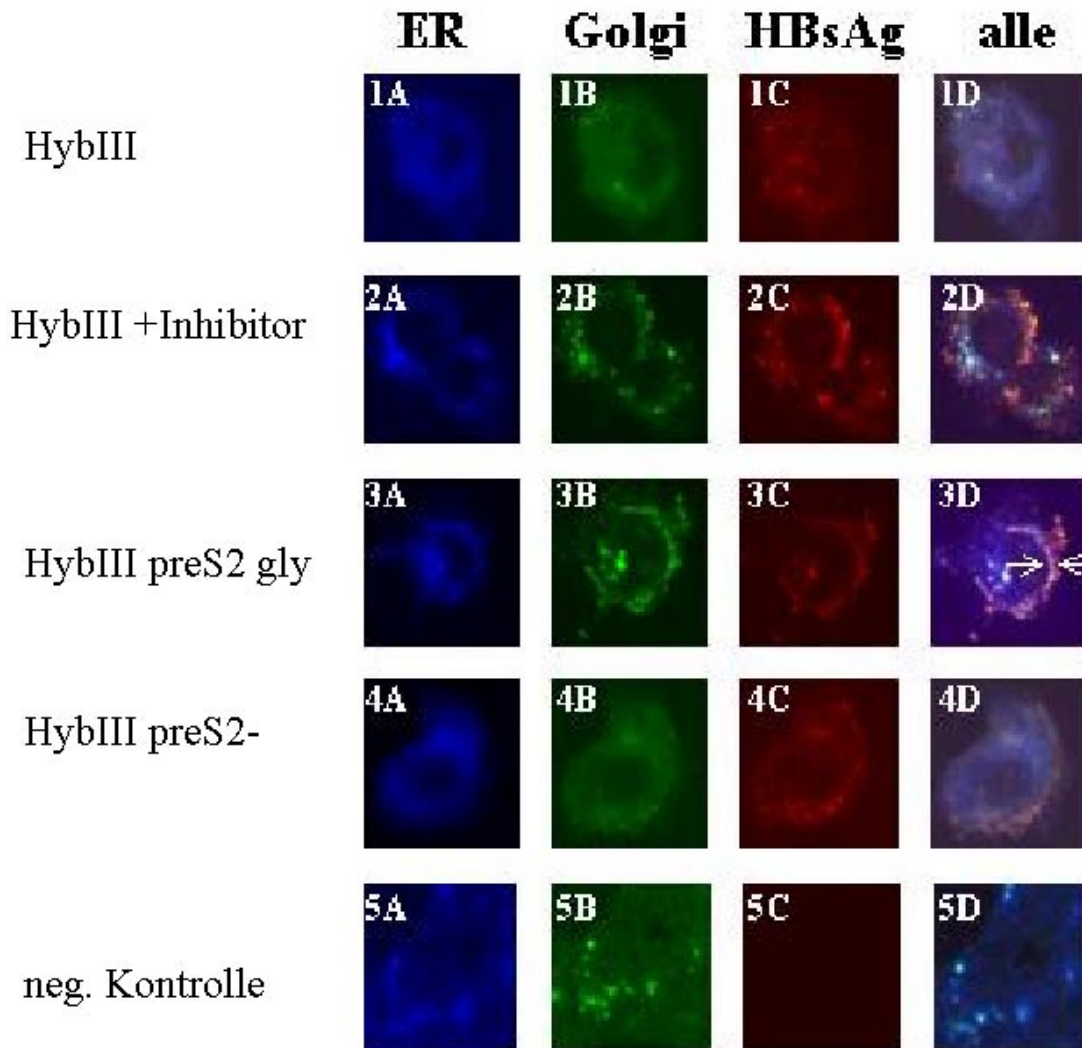


Abbildung 15: Dreifachfärbung von transfizierten HepG2-Zellen (1:HybIII; 2: HybIII+Inhibitor; 3: HybIIIgly; 4: HybIIIpreS2-; 5: negative Kontrolle); das ER (A) wurde mit *ER-Tracker-Blue-White* angefärbt, HBs (B) und Golgi (C) wie oben angeführt mit der Antikörperdoppelfärbung (HBsAg + Golgi-Zone). Die Spalte D zeigt die Überlagerung der drei Färbungen. Rosa gefärbte Bereiche bedeuten eine Überlagerung von HBs und ER, gelbe und hellgrüne Bereiche zeigen eine Kolo-kalisation von HBs und Golgi, die weiße Bereiche entstehen durch eine Überlappung aller drei Komponenten. Die weißen Bereiche treten insbesondere dann auf, wenn die Glykosylierung der chimären Proteine entweder durch einen Inhibitor (2d) oder durch Mutation der Glykosylierungsstelle (HybIIIgly; 3d) unterbunden wird. Die weiße Färbung zeigt an (Pfeile), daß sich das nicht-glykosylierte preS2-Protein im Übergangsbereich vom ER zum Golgi-Apparat anreichert. Dieser zelluläre Bereich ist nach bisherigen Erkenntnissen der Ort, an dem eine O-Glykosylierung stattfindet. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse anderer Untersuchungen (s. Abschnitt 4, Diskussion). (pMCSIII=HybIII, s.o.)

	Kokalisation mit Endplasmatischem Retikulum			Kokalisation mit Golgi-Apparat			Kokalisation mit Plasma-Membran			Kokalisation mit Proteasom			Kokalisation mit preS2			
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	
Western-Blot																
HBs	++	++	+	++	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Hyb III	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hyb III+ I	++	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
preS2 gly	++	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
preS2 k.o.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KIF																
HBs	++	++	+	+	+	+	-	+	+	(+)	+	+	(+)	+	+	+
Hyb III	(+)	+	+	-	+	+	+	+	+	(+)	+	+	(+)	+	+	+
Hyb III+ I	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
preS2 gly	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
preS2 k.o.	+	+	+	-	(+)	+	+	+	++	-	+	+	+	+	+	+
Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 12: Kokalisation der HBsAg-Domäne der rekombinanten Proteine mit zellulären Kompartimenten; der obere Teil der Tabelle zeigt die Daten der Western Spot Blot Analyse, der untere Teil die Daten der Konfokal-Immunfluoreszenz (KIF)

3.1.6. Restriktionskarte des Vektors pUC119/CMV/WHV

Das Plasmid pUC119/CMV/WHV (M. Yu *et al.*, 1998) wurde, wie unter 2.1.11 erwähnt, von R.H. Purcell zur Verfügung gestellt. Da das Plasmid für weitere Klonierungen eingesetzt werden sollte, war eine Restriktionsanalyse der wichtigsten Schnittstellen, insbesondere im Bereich der MCS, nötig. Es wurden dabei die Restriktionsschnittstellen überprüft, die bei der Klonierung des Plasmids eine Rolle spielten, bzw. eine klare Aussage über die Orientierung des WHV-Genoms im pUC119-Plasmid zulassen.

Im einzelnen wurden die Restriktionsenzyme Aat II, BspM I, Dra III, Hinc II (Isoschizomer von HindII), Hind III, Kpn I, Pst I, Sac I und Sal I zur Restriktionsanalyse eingesetzt. Die Restriktionsanalyse ergab folgende Restriktionskarte des Vektors pUC119/CMV/WHV:

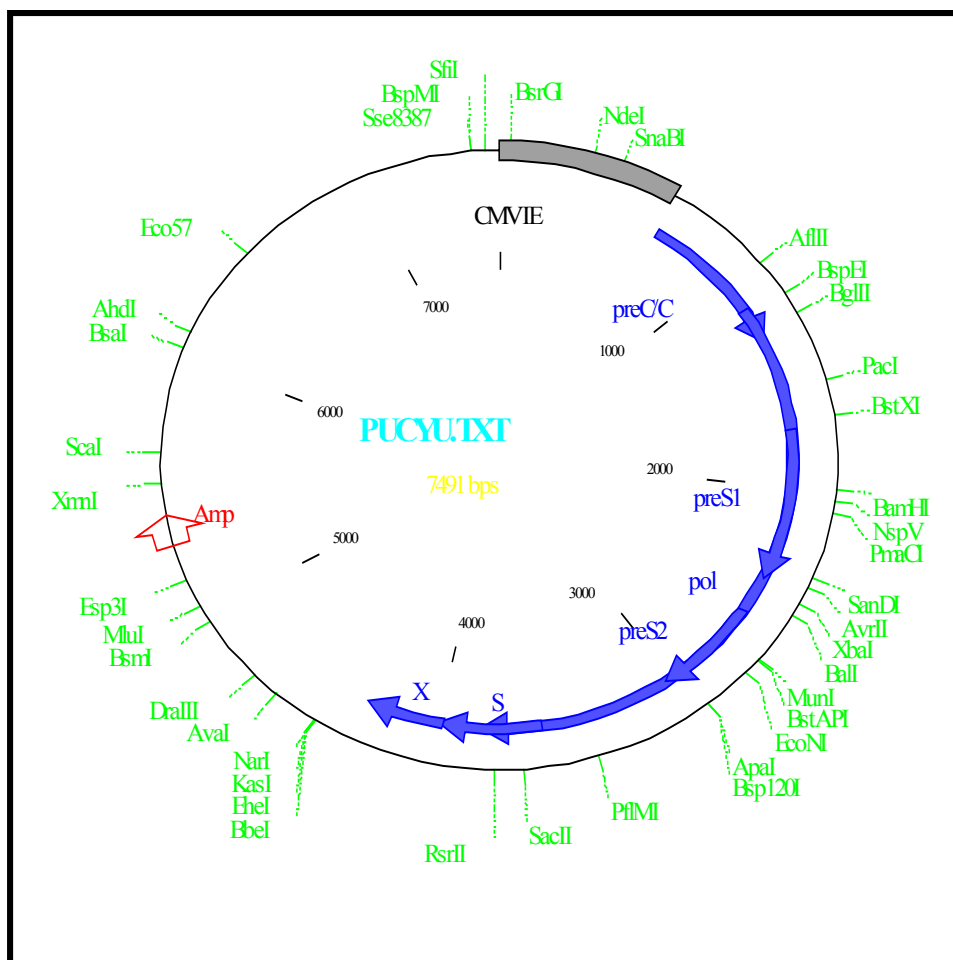


Abbildung 16: Restriktionskarte des Vektors pUC119/WHV/CMV

Wider Erwarten fehlten einige Restriktionsschnittstellen, nämlich die der Enzyme BspMI, die am Übergang WHV/pUC119 liegende HindIII Schnittstelle und die KpnI Schnittstelle. Desweiteren schneidet das Enzym DraIII nicht.

Zu der o.a. HindIII-Schnittstelle ist anzumerken, daß diese wahrscheinlich während der Klonierung des Ausgangsplasmids pUC119/CMV/WHV mutiert ist (Dr. Mengji Lu, persönliche Mitteilung). Die Sequenzierung des CMV-Promotors erfolgte durch die Fa. Biotech (Ebersberg), die Sequenz ist dem Anhang beigelegt

3.1.7. Klonierung des Vektors pUC119/CMV/WHV/neo⁺

Das Plasmid pUC119/CMV/WHV (M. Yu *et al.*, 1998) wurde mit dem Single-Cutter Asp 718 (\equiv XmnI) linearisiert. Der Vektor pcDNA3 wurde mit demselben Enzym geschnitten, elektrophoretisch auf einem präparativen Agarosegel getrennt und die Neomycinresistenzkassette aus dem Gel extrahiert. Nach Ligation der neo⁺-Resistenzkassette mit dem Plasmid pUC119/CMV/WHV wurde der Ligationsansatz in Bakterien transformiert, 18 Kolonien über Nacht in LB Medium (mit Ampicillin) inkubiert und die Plasmide präpariert. Der Klonierungserfolg wurde durch eine Restriktionsanalyse überprüft und durch Sequenzierung verifiziert. Die Neomycinresistenz wurde in das Plasmid kloniert, um in späteren, von dieser Arbeit unabhängigen Projekten, die hier konstruierten Plasmide in eukaryotischen Zellen zu selektionieren und evtl. stabil transfizierte Zelllinien zu generieren.

3.1.8. Klonierung einer WHV-S-Knock-Out-Mutante

Der Vektor pUC119/WHV/CMV/neo⁺ diente als template für rekombinante PCRs mit den Primern WSp2/preS2m1 und preS1Sph/preS2m2. Die Amplifikate wurden auf einem präparativen Agarosegel elektrophoretisch getrennt und geextrahiert. In einer SOE PCR mit den Primern WSp2/ preS1Sph wurde ein Amplifikat generiert, daß durch gerichtete Klonierung über die Schnittstellen BallI und PmaCI in den Ausgangsvektor pUC119/CMV/WHV/neo⁺ kloniert wurde. Nach der Plasmidisolierung wurde eine Restriktion mit dem Enzym EcoRI durchgeführt und 4 Klone mit einer Insertion des PCR-Amplifikats zur Überprüfung des Mutagenisierungserfolgs sequenziert. Ein mutierter Vektor wurde anhand einer Sequenzanalyse identifiziert (Abbildung 17). Der eingeführte Austausch betrifft nur das Leseraster der Oberflächenproteine preS2 und preS1 (Methionin gegen Threonin), im Leseraster der viralen Polymerase dagegen ist die Mutation stumm. Es handelt sich um eine Mutation im Startcodon des S-Proteins.

3.1.9. Klonierung einer WHV-preS2-Knock-Out-Mutante

Der Klonierung einer preS2-Knock-Out-Mutante sind mehrere Polymerasekettenreaktionen vorausgegangen. Zuerst erfolgte mit den Primerkombinationen preS2minus1.1/2.1 und preS2m1/2 eine rekombinante PCR, um das preS2-Startcodon zu mutieren.

Die Amplifikate wurden für eine SOE-PCR mit der Primerkombination preS2 minus 1.2/2.2 eingesetzt. Das Produkt aus dieser PCR wurde in den TA-Vektor kloniert und transformiert. Die Klonierung erfolgte analog zu 3.1.8.. In Abbildung 5 ist der Sequenzvergleich der konstruierten Mutanten mit der Wildtyp-Sequenz aufgeführt. Auf der Ebene der Aminosäuresequenz handelt es sich ebenfalls um einen Austausch von Methionin gegen Threonin, der aber lediglich das preS1 Protein betrifft. Das preS2-Protein kann aufgrund dieser Mutation nicht mehr exprimiert werden, da das Startcodon mutiert wurde.

3.1.10. Klonierung einer preS2-Glykosylierungsmutante

Die gezielte Mutagenese der putativen Glykosylierungsstelle des preS2 Proteins erfolgte analog zu der oben beschriebenen Klonierung der preS2 k.o. Mutante (vergl. 3.1.8. und 3.1.9). Für die PCR wurden die Primer preS2gly1.1/2.1 und preS2gly1.2./2.2. eingesetzt. Der Nukleotidaustausch bewirkt auf der Ebene der Aminosäuren einen Wechsel des Thr 5 zu Asn, das nach bisherigem Kenntnisstand nicht O-glykosyliert wird. Wie die beiden schon beschriebenen Mutanten ist auch diese Mutante im Sequenzvergleich aufgeführt.

PUC YU (WT)	(1)	GATACTCACCCCCACTTAACTATGAAAAATCAGACTTTTCATCTCCAGGGGTTTCGTAGAC
WHV S K.O..	(1)
WHV PRES2 GLY.	(1)A.....
WHV PRES2 KO.	(1)C.....
PUC YU (WT)	(61)	GGATTACGAGACTTGACAACAACGGAAACGCCAACACAATGCCTATGGAGATCCTTTTACA
WHV S K.O..	(61)
WHV PRES2 GLY.	(61)
WHV PRES2 KO.	(61)
PUC YU (WT)	(121)	ACACTAAGCCCTGCGGTTCTACTGTATCCACCATATTGTCTCCTCCCTCAGCGACTGGG
WHV S K.O..	(121)
WHV PRES2 GLY.	(121)
WHV PRES2 KO.	(121)
PUC YU (WT)	(181)	GACCCTGCACTGTCCACCGGAGATGTCACCATCAAGTCTCCT
WHV S K.O..	(181)C.....
WHV PRES2 GLY.	(181)
WHV PRES2 KO.	(181)

Abbildung 17: Sequenzvergleich der rekombinanten Konstrukte für die *in vivo* Transfektionen; Übereinstimmungen der Sequenzen sind durch Punkte angezeigt, Unterschiede durch das entsprechende Nukleotid. Die Sequenz PUC Yu entspricht dem Wildtyp und wurde von Yu *et al.* beschrieben. Bei dem Plasmid WHVpreS2gly wurde die Glykosylierungsstelle (Thr 5) mutiert, WHVSk.o. hat kein Startkodon für das S-Antigen und WHVpreS2k.o. zeichnet sich durch ein mutiertes und daher defektes preS2-Startcodon aus.

3.1.11. *In vivo* Transfektion der S-knock-out Mutante

Das unter 3.1.8. beschriebene Plasmid pUC119/WHV/CMV/neo⁺/S-minus wurde in *E. coli* amplifiziert und mit einer Qiagen Mega-Prep isoliert. Aus einem mg des Plasmids wurde mit SacI das mutierte WHV-Genom ausgeschnitten. Nach einer präparativen Gelelektrophorese wurde das WHV-Genom mit T4-Ligase über Nacht rezirkuliert, mit einem mg des Plasmids

pUC119/WHV/CMV/neo⁺/S-minus gemischt und in 0,5 ml PBS steril aufgenommen. Die DNA-Lösung wurde in Portionen von etwa 0,1 ml in die Leber eines Woodchucks injiziert. Diese Prozedur wurde bei einem zweiten Tier wiederholt.

Eines der beiden Tiere entwickelte eine sehr schwache Virämie, die nur mit Hilfe einer PCR in Woche 6 nachzuweisen war. Eine Sequenzanalyse des klonierten PCR-Produkts ergab, daß es sich um eine reverse Mutation gehandelt hat. Diese Infektion entsprach also einer Wildtyp-Infektion. Das zweite Tier entwickelte wie erwartet keine Virämie (vergl. Kapitel 4, Diskussion).

3.1.12. *In vivo* Transfektion der preS2-knock-out-Mutante

Die *in vivo* Transfektion erfolgte wie unter Punkt 3.1.11. beschrieben, jedoch mit dem Plasmid pUC119/WHV/CMV/neo⁺/preS2-minus, kurz als preS2k.o. bezeichnet. Den Tieren wurde ab Woche 2 nach Transfektion in wöchentlichem Abstand Blut entnommen und das Serum in einem Southern-Spot-Blot auf eine Virämie getestet. Parallel wurde DNA aus dem Serum extrahiert und mit PCR und nested PCR ebenfalls auf Virämie untersucht. Die PCR und der Southern-Spot-Blot blieben bei dem Tier 13194 über den gesamten Beobachtungszeitraum negativ, die PCR von Tier 13196 war in Woche 8 positiv. Die nested PCR war bei beiden Tieren bis Woche 3 bzw. Woche 4 nach Transfektion positiv, wurde dann negativ und in Woche 6 bzw. 9 wieder positiv. Das PCR-Amplifikat wurde kloniert und sequenziert und entsprach der Sequenz der transfizierten DNA, es lag also keine reverse Mutation vor. Das Phänomen der erst positiven, dann negativen und später wieder positiven PCR, das auch in der o.a. Kontrolle beobachtet werden konnte, kann leicht erklärt werden. Wahrscheinlich wird in den ersten Wochen nach der Transfektion die applizierte DNA nachgewiesen, die dann jedoch verschwindet und der eine, wenn auch sehr schwache, Virämie folgt.

Die untersuchten immunologischen Parameter sprachen jedoch gegen eine Infektion der Woodchucks mit WHV. Aus diesem Grund wurden die Tiere in Woche 16 nach der Transfektion mit 1×10^8 WHV-Partikeln infiziert und die Immunantwort (anti-WHs-Antikörper) gemessen. Bei beiden Tieren scheint eine beschleunigte anti-S Antikörperantwort vorhanden zu sein, was auf eine abgelaufene WHV-Infektion oder einen Vakzinierungseffekt schließen läßt. Die bereits früh auftretende anti C-Immunantwort des Tieres 13194 ist ungewöhnlich und könnte eine Resultat der starken core-Protein Expression unter der CMV-Promotor Kontrolle sein. Die Ergebnisse sind für beide Tiere in den nachfolgenden Tabellen zusammengefaßt.

Tier 13194 (preS2 minus)

Woche	vor i.v.T.	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	W13	W14	W15 nach BE I.	W1	W2	W3	W4	
Blot	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
anti S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
anti C	-	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
PCR preS2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nested PCR preS2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
PCR core	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nested PCR core	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Tabelle 13: Ergebnisübersicht der in vivo Transfektion des Tiers 13194 mit dem Konstrukt preS2 minus; Originaldaten; BE=Blutentnahme; I=Infektion

Tier 13196 (preS2 minus)

Woche	vor i.v.T.	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	W13	W14	W15 nach BE I.	W1	W2	W3	W4	
Blot	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
anti S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
anti C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	weak	weak	-	weak
PCR preS2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nested PCR preS2	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
PCR core	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nested PCR core	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+

Tabelle 14: Ergebnisübersicht der in vivo Transfektion des Tiers 13196 mit dem Konstrukt preS2 minus; die PCR in Woche 8 wurde kloniert und sequenziert, es wurden keine Revertanten gefunden ! Originaldaten; BE=Blutentnahme; I=Infektion

3.1.13. *In vivo* Transfektion der preS2-Glykosylierungs-Mutante

Die *in vivo* Transfektion zweier Murmeltiere mit dem Konstrukt pUC119/WHV/CMV/neo⁺/gly (kurz: preS2gly) erfolgte ebenfalls wie unter 3.1.11. und 3.1.12 beschrieben. Die Tiere zeigen lediglich in der nested PCR in den Woche 7 und 8/10 eine schwache Virämie, nachdem die applizierte DNA 3-4 Wochen zuvor nicht mehr nachweisbar war. Da wie bereits bei der o.a. *in vivo* Transfektion der preS2 k.o. Mutante die immunologischen Parameter einer WHV-Infektion nicht nachweisbar waren, wurden auch diese Tiere in Woche 16 nach *in vivo* Transfektion mit einer Dosis von 1×10^8 WHV-Partikeln intravenös infiziert. Ein Tier zeigte nach dieser Infektion gegenüber der normalen akuten Infektion eine beschleunigte Immunantwort gegen das S-Protein, das andere nicht. Diese Daten lassen auf eine abgelaufene Infektion oder einen Immunisierungseffekt des Tieres 13198 schließen, wohingegen bei dem Tier 13209 keinerlei Parameter einer abgelaufenen Infektion oder einer Immunisierung nachzuweisen waren. Die bei den Tieren eigentlich erwartete Virämie blieb aus (s. Abschnitt 4, Diskussion). Die Daten für die beiden mit der Glykosylierungsmutante transfizierten Tiere sind in den beiden nachfolgenden Tabellen zusammengefaßt.

Tier 13198 Glykosylierungsmutante

Woche	vor i.v.T.	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	W13	W14	W15 nach BE I.	W1	W2	W3	W4	
Blot	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
anti S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
anti C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
preS2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
nested PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
preS2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
core	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nested PCR	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
core	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 15: Ergebnisübersicht der in vivo Transfektion des Tiers 13198 mit dem Konstrukt preS2 gly; Originaldaten; BE=Blutentnahme; I=Infektion

Tier 13209 Glykosylierungsmutante

Woche	vor i.v.T.	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	W13	W14	W15 nach BE I.	W1	W2	W3	W4	
Blot	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
anti S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
anti C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
preS2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nested PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
preS2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
core	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nested PCR	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
core	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 16: Ergebnisübersicht der in vivo Transfektion des Tiers 13209 mit dem Konstrukt preS2 gly; Originaldaten; BE=Blutentnahme; I=Infektion

3.2. Etablierung eines RNase Protection Assays

3.2.1. Cytokinprofil der Leber infizierter und immuner Tiere

Nachdem in den bisherigen Versuchen ein neues therapeutisches Ziel zur Behandlung der chronischen Hepatitis-Infektion untersucht wurde (vergl. Diskussion und Block *et al.*, 1998), sollte in den folgenden Versuchen ein RNase Protection Assay etabliert werden. Ziel war es, eine Technik zu etablieren, die als Grundlage für spätere Untersuchungen der Immunologie der WHV-Infektion dienen kann. Im Zuge der Etablierung des RNase Protection Assays wurde die Expression verschiedener Cytokine und T-Zellmarker untersucht. Zusätzlich wurde eine neue Substanz im Modell der chronischen WHV-Infektion auf ihr antivirales Potential getestet. Das als α -Galaktosyl-Ceramid bezeichnete Immunstimulans bewirkt im Modell der transgenen Maus eine Stimulation der Interferon- γ Produktion, die mit einer Inhibition der viralen Replikation und einer Senkung der Viruslast einhergeht.

Da kommerzielle Testsysteme für IFN- γ nicht mit dem vom Woodchuck exprimierten IFN- γ kreuzreagieren, mußte ein spezielles Testsystem für das Murmeltier Modell etabliert werden. Basierend auf den Arbeiten von Frau Dr. Lohrengel, Institut für Virologie der Universitätskliniken Essen (Lohrengel *et al.*, 1998 und 2000; Lohrengel 1999, Dissertationsschrift), konnte ein RNase-Protection-Assay zur qualitativen und quantitativen Messung der Expression Woodchuck-spezifischer Cytokine und T-Zellmarker entwickelt werden. Die Cytokine IFN- γ , IL-15 und TNF- α sowie die beiden T-Zellmarker CD3 und CD4 lagen bereits in Plasmidform vor. Die Plasmide enthielten Teilsequenzen der eben genannten Gene, die in antisense-Orientierung hinter einen T7-Promotor kloniert wurden. Von diesem T7-Promotor aus kann durch eine *in vitro* Transkription eine antisense RNA (Riboprobe, radioaktiv markiert) synthetisiert werden, die mit der entsprechenden, aus Zellen oder Gewebe isolierten, mRNA hybridisiert. Dabei entstehen ein RNA-Doppelstrang und überhängende RNA-Einzelstränge. Die Einzelstränge werden von einer RNase abgebaut, wohingegen der Doppelstrang vor der RNase geschützt ist (RNase Protection). Die geschützten Doppelstränge können nach Gelelektrophorese mit Hilfe eines Phosphorimagers sichtbar gemacht werden.

Neben den o.a. Cytokinen und T-Zellmarkern sollten auch CD8 und β -Aktin mit dem RNase Protection Assay nachgewiesen werden. Dazu mußten die beiden Teilsequenzen in den RPA-Expressionsvektor, pGEM4-Z, umkloniert werden. Nach der Umklonierung der beiden Marker CD8 und β -Aktin in den Expressionsvektor pGEM-Z4 konnten die mRNAs der Cytokine und T-Zellmarker erstmals in Lebergewebe verschiedener Tiere nachgewiesen werden.

Die Teilsequenz von CD8 hat eine Länge von 120 Basen und wurde mittels einer PCR mit den Primern rpad8-E und rpad8-H generiert (Abb. 18, Spur 3). Dabei wurden Schnittstellen für die

Restriktionsendonukleasen HindIII (H) und EcoRI (E) eingeführt, die eine gerichtete Klonierung des Gens in den Expressionsvektors erlauben. Analog wurde eine PCR für eine Teilsequenz des β -Aktin-Gens durchgeführt. Es wurde die Primerkombination rpaact-E und rpaact-H gewählt, die ebenfalls die erwähnten Schnittstellen einführt und eine gerichtete Klonierung des Amplifikats erlaubt. Die Länge des β -Aktin-Fragments beträgt 105 Basenpaare (Abb.18, Spur 2). Der Klonierungserfolg wurde für beide Konstrukte durch Sequenzierung überprüft (Daten nicht gezeigt).

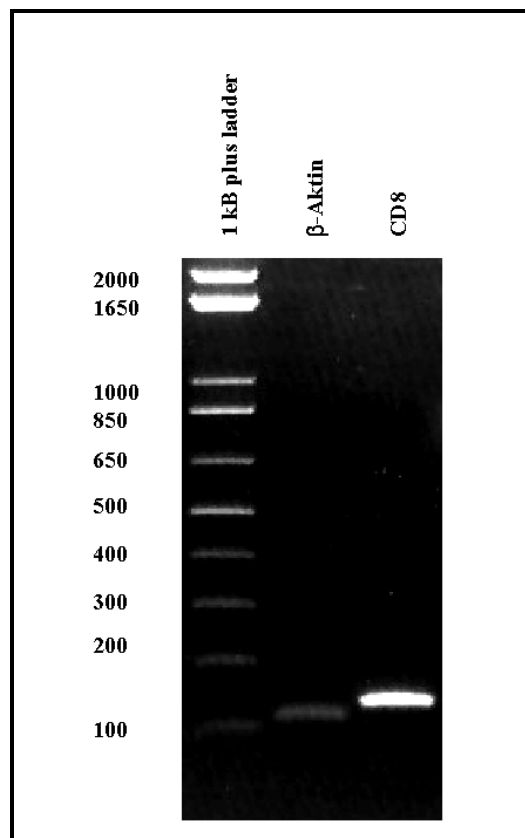


Abbildung 18: Agarose-Gelelektrophorese der beiden Fragmente CD8 und β -Aktin; die Banden wurden ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel extrahiert. Anschließend wurden beide Fragmente in den Expressionsvektor für den RNase-Protection-Assay kloniert und sequenziert. In dem Expression Vektor stehen die beiden Gen-Abschnitte unter der Kontrolle des T7-Promotors.

Um die Expression der untersuchten Marker innerhalb einer Leber zu bestimmen, wurden zunächst zwei Kontrollexperimente durchgeführt. Zum einen wurde eine Verdünnungsreihe untersucht. Dazu wurde aus einer einzigen Leberprobe RNA isoliert und unverdünnt, sowie in den Verdünnungen 1 zu 2 und 1 zu 4 für den RPA eingesetzt. Dabei stellte sich heraus, daß es unter den gewählten experimentellen Bedingungen einen linearen Zusammenhang zwischen dem eingesetzten Lebergewebe und der Menge der untersuchten mRNAs gibt. D.h., daß die doppelte Menge an Lebergewebe in der Quantifizierung der mRNA mit dem Phosphorimager ein doppelt so starkes Signal liefert als die einfache Menge (Abbildungen 19 und 20). Dieses Experiment

wurde mit Leberproben von insgesamt 6 verschiedenen Tieren durchgeführt und lieferte vergleichbare Ergebnisse sowohl bei chronisch infizierten Tieren als auch bei gesunden und akut WHV-infizierten Woodchucks. Exemplarisch ist das Tier 7021 gezeigt. Die in allen Verdünnungen scheinbar gleichstarke Interferon- γ -Bande beruht auf einem Bildverarbeitungsproblem. Optisch ist zwar eine Farbsättigung in allen Verdünnungen vorhanden, bei Quantifizierung mit dem Phosphorimager wird jedoch deutlich, daß es sich tatsächlich auch um eine Verdünnung des Interferon γ handelt. Aus diesem Grund sind die mit dem Phosphorimager in einer elektronischen Densitometrie ermittelten Werte in Digital Light Units (DLU) in den Diagrammen der Abbildung 20 dargestellt.

Die zweite Kontrolle des RPA ist im zweiten Teil der Abbildung 19 am Beispiel des Tiers 7015 dargestellt. Werden zufällig zu einem einzigen Zeitpunkt Leberbiopsien aus verschiedenen Regionen einer Leber entnommen, so ist bei diesen Biopsien eine Schwankung der Expression der Cytokine und T-Zellmarker um $\pm 5\%$ zu beobachten. Ein antiviraler Effekt der untersuchten Substanz α -Glaktosyl-Ceramid muß also, nimmt man die Grenzen dieser Schwankung als Basis, mindestens zu einer Steigerung der Interferon γ -Expression um 10% führen. Die Fluktuation der Cytokinexpression innerhalb einer Leber sind zum besseren Verständnis ebenfalls in dem Diagramm in Abbildung 20 dargestellt.

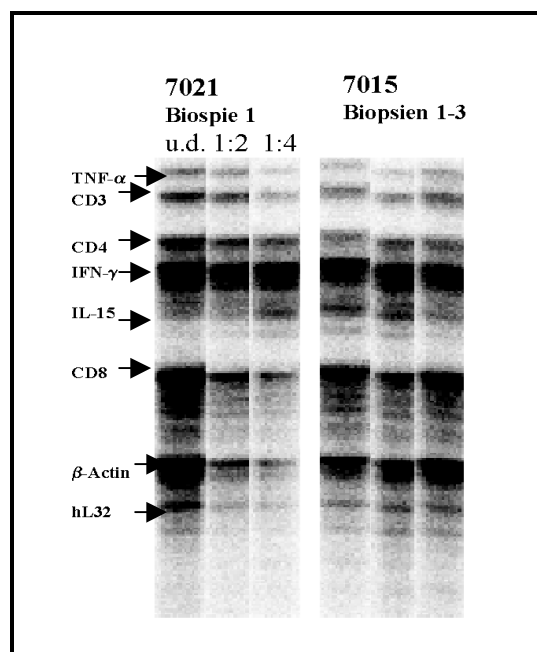


Abbildung 19: Kontrollen des RNase-Protection Assays; die Kontrollen dienen der Überprüfung der Methode des RPA. Der linke Teil der Autoradiographie zeigt eine Verdünnungsreihe aus lysiertem Lebergewebe des chronisch WHV-infizierten Tieres 7021. Deutlich zu erkennen ist, daß die doppelte Menge Ausgangsmaterial eine entsprechend stärkere Signal in der Autoradiographie liefert (mit Phosphorimager). Der rechte Teil zeigt drei Biopsien des Tiers 7015 (chronischer WHV-Carrier), die aus unterschiedlichen Regionen der Leber des Tiers, aber zum gleichen Zeitpunkt entnommen wurden. Die Schwankungen der Cytokinexpression betragen etwa $\pm 5\%$, wie aus der quantitativen Analyse (s. Abb.18) hervorgeht. Auf eine Kontrolle mit RNA, die nicht mit RNase behandelt wurde, kann verzichtet werden, da die Größenbestimmung der zu erwartenden Fragmente bereits von Lohregel 1999 (Dissertationschrift) bestimmt wurde. Als Größenmarker werden bei den folgenden RPAs die geschützten RNA-Fragmente dienen, die aus der RNA PHA-stimulierter Lymphocyten isoliert wurden.

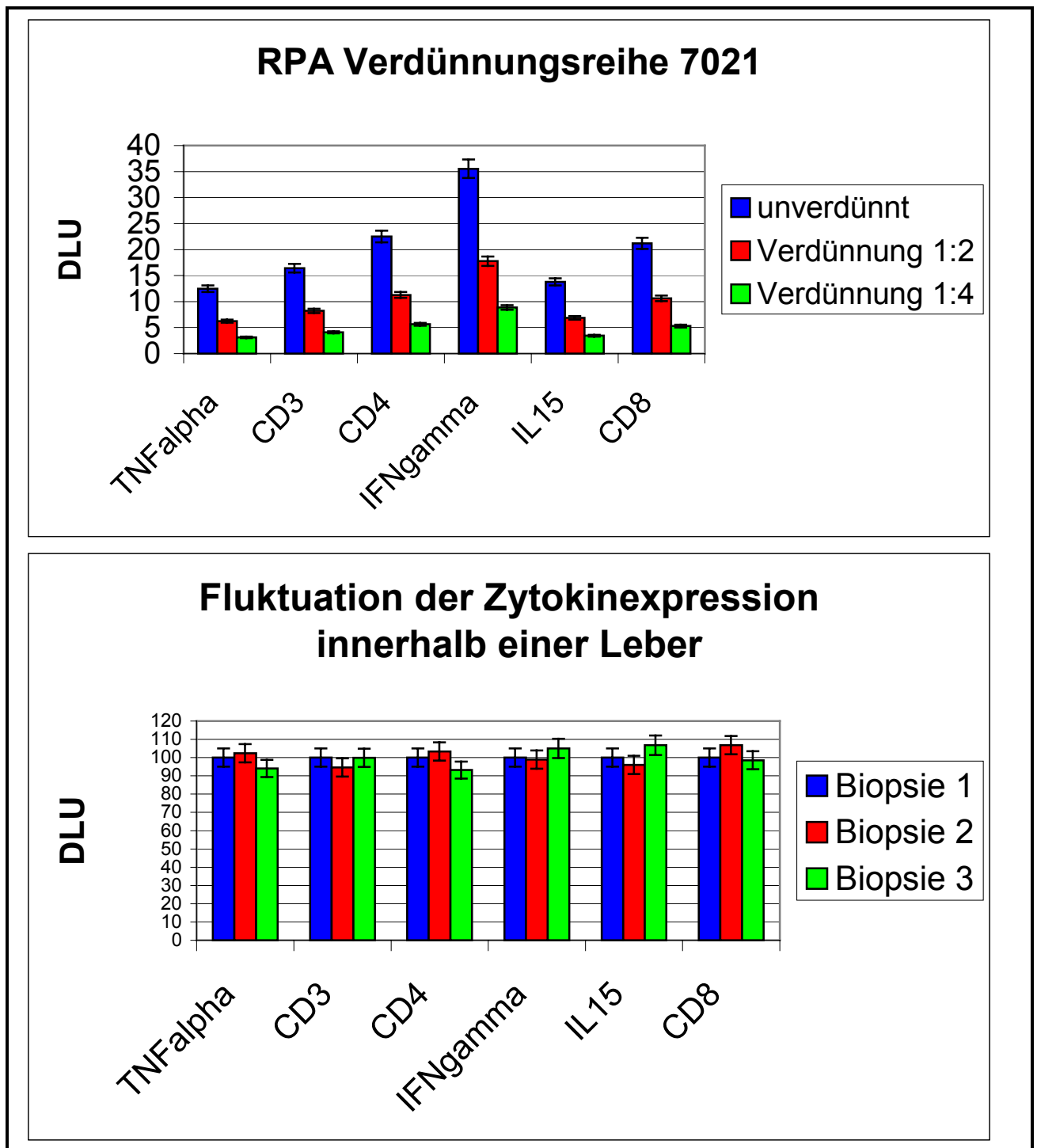


Abbildung 20: Kontrollen des RNase-Protection Assays, quantitative Auswertung; die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Phosphorimagers und der Optiquant-Software der Firma Canberra Packard (Dreieich). Der obere Teil der Abbildung zeigt, daß es einen linearen Zusammenhang zwischen der Verdünnung der isolierten Gesamt-RNA und der Menge an geschützten RNA-Fragmenten gibt. Die Menge an RNA-Fragmenten wird in *digital light units* (DLU) angegeben. Bei einer Verdünnung von 1:2 der Gesamt-RNA ist das Signal, das mit dem Phosphorimager gemessen wird, nur halb so stark wie bei der unverdünnt für den RPA eingesetzten RNA. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Fluktuationen der Cytokine und T-Zellmarker innerhalb einer Leber. Es wurde die Gesamt-RNA dreier Biopsien aus unterschiedlichen Regionen einer Leber isoliert und für den RPA eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte wie oben über den Phosphorimager (in DLU); die Balken der einzelnen Cytokine und T-Zellmarker stehen für die verschiedenen Biopsien.

Desweiteren stellte sich beim direkten Vergleich akut-infizierter Tiere, chronisch infizierter Tiere und immuner Tiere heraus, daß bei akut infizierten Tieren in der zweiten und vierten Woche die Expression der Marker für CD3 und CD4 nur grenzwertig nachweisbar ist (Abbildung 21, Spur 4+5). Ebenso konnte gezeigt werden, daß β -Aktin als interner Standard eingesetzt werden kann (Abbildung 21). In allen Spuren ist, nach vorheriger photometrischer Messung der eingesetzten Gesamt-RNA-Menge, die Menge von β -Aktin in DLU nahezu gleich und schwankt minimal. Lediglich das immune Tier in Spur 11 bildet eine Ausnahme. In den Spuren 1-3 (stimulierte Zellen) war die eingesetzte RNA-Menge entsprechend größer. Die Expression der Cytokine und T-Zellmarker bei den immunen Tieren (Spuren 10-12) unterscheidet sich nicht von der der chronisch WHV-infizierten Tiere (Spuren 6-9).

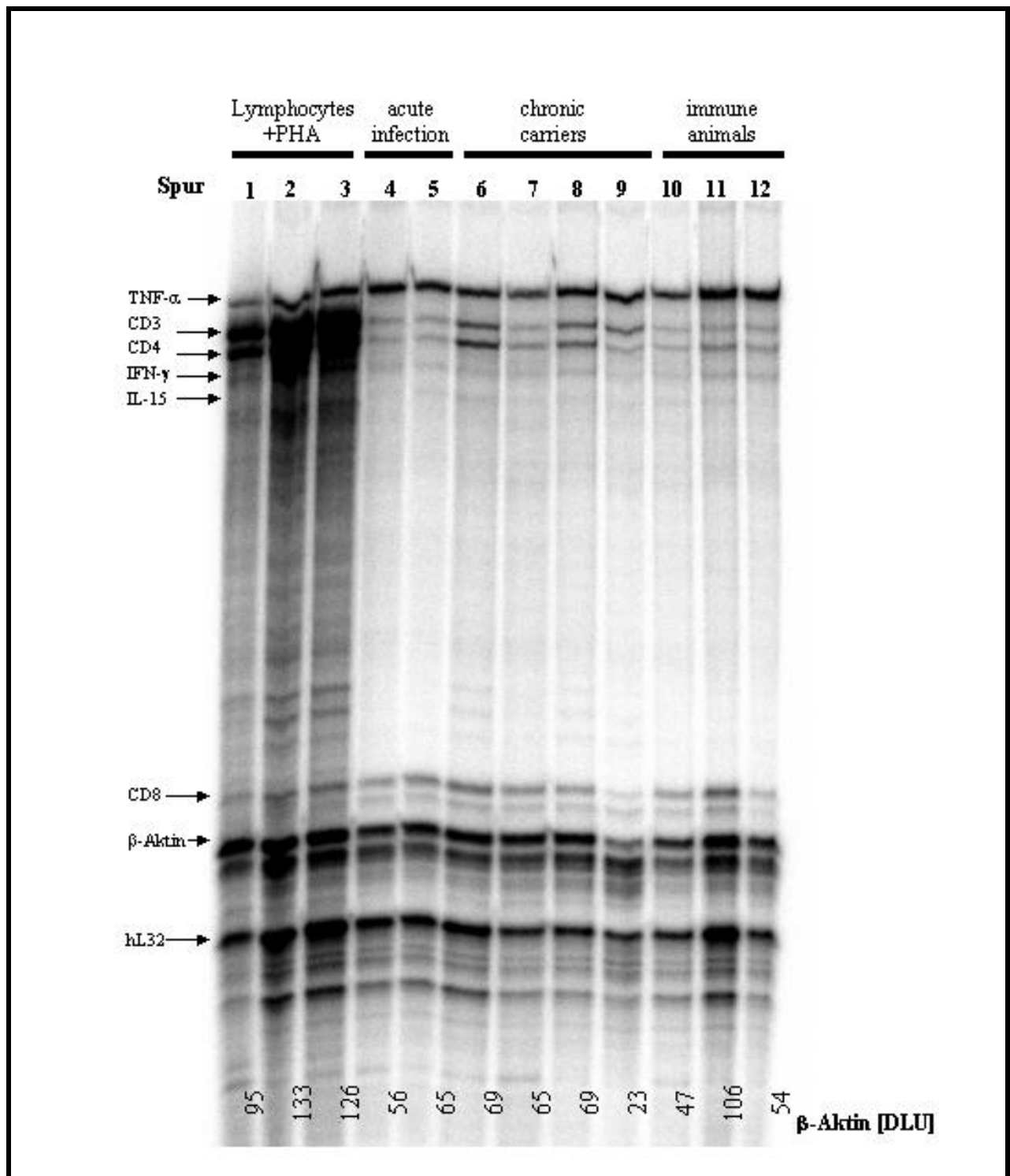


Abbildung 21: Vergleichender RPA von Leberproben akut, chronisch und nicht WHV-Infizierter Woodchucks; als Größenstandard wurden mit PHA stimulierte Lymphocyten verwendet (Spuren 1-3). Die Cytokine, T-Zellmarker und Haushaltsgene, deren Expression gemessen wurde, sind links aufgeführt. Die Zahlenwerte im unteren Teil der Abbildung geben die *digital light units* für β -Aktin an. Für die Leberbiopsien liegt der Wert in der Größenordnung von 47-69 DLU (mit Ausnahme von Spur 9 und 11) und ist damit nur geringen Schwankungen unterworfen. β -Aktin wird in erster Linie als *loading*-Standard eingesetzt, d.h. geringe Abweichungen in der β -Aktin-Menge bedeuten, daß es bei der eingesetzten Menge an isolierter RNA vor Beginn des RPA nur geringe Abweichungen gab.

3.3. Anwendungsmöglichkeiten des RPA

3.3.1. Behandlung chronisch WHV-infizierter Murmeltiere mit α -Galaktosyl-Ceramid

Vier chronisch WHV-infizierten Murmeltieren wurde Lebergewebe in einer offenen Biopsie entnommen. Nachdem die Operationswunde verschlossen war, wurde den Tieren eine Dosis von 100 mg α -Galaktosyl-Ceramid pro kg Körpergewicht i.v. verabreicht. Als Kontrolle wurden zwei Tiere biopsiert, denen nur das Lösungsmittel der Substanz α -Galaktosyl-Ceramid, nämlich 0,5 % Tween 20 in PBS, injiziert wurde. Weitere Biopsien wurden an den Tagen 1, 3 (3 Tiere) und 7 (3 Tiere) sowie am Tag der vorgeschriebenen Tötung entnommen. Parallel zu den Biopsien wurde Blut entnommen. Ab Tag 2 wurden die Tiere mit Aminosäure Lösung und Sucrose/Kochsalz-Lösung substituiert sowie antibiotisch mit Penicillin/Streptomycin behandelt. Ein Tier entwickelte eine schwere bakterielle Infektion und mußte am Tag 5 getötet werden.

Die Leberbiopsien wurden für DNA- und RNA- Isolierungen eingesetzt und auf ihren Gehalt an viralen Nukleinsäuren und mRNAs für Cytokine und T-Zellmarker untersucht. Die Viruslast im Serum der Tiere wurde mit Southern-Spot-Blot-Analysen bestimmt.

3.3.2. Fluktuation der Viruslast im Serum

Die Virämie der chronisch WHV-infizierten Murmeltiere war vor und nach α -Galaktosyl-Ceramid bzw. Placebo-Gabe Schwankungen unterworfen. Ein Zusammenhang dieser Schwankungen mit der Behandlung der Tiere konnte nicht festgestellt werden, abgesehen von der Tendenz eines Anstiegs der Virämie in der Woche der ersten drei Biopsien. Betrachtet man jedoch die folgenden Wochen, so fällt diese Tendenz nicht mehr ins Gewicht und kann als Ursache der der Virämiefluktuationen vernachlässigt werden. Das folgende Diagramm zeigt im Überblick die Fluktuationen der Virämie während des Studienzeitraumes.

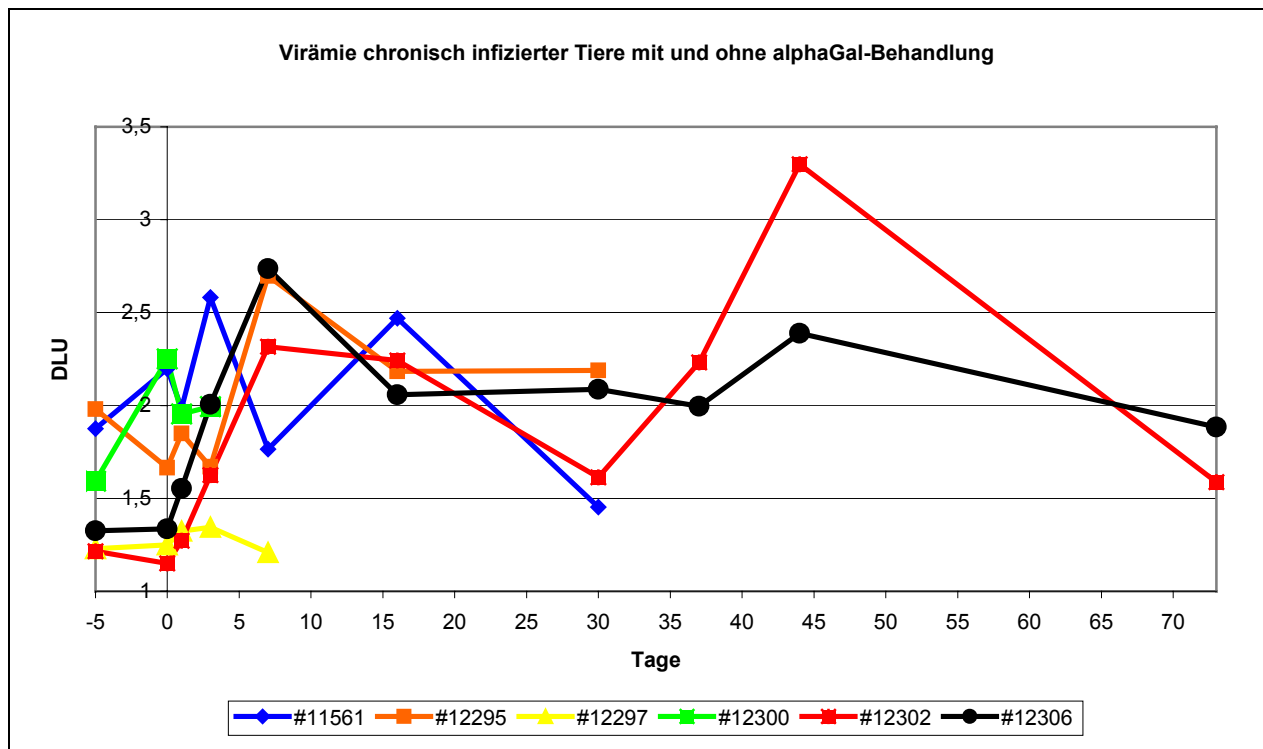


Abbildung 22: Fluktuation der Virämie in chronischen WHV-Carriern, vor und nach α -Galaktosyl-Ceramid-Gabe; die beiden Kontrolltiere (11561 und 12295) unterscheiden sich nicht von den behandelten Tieren. Tag 0= Tag der α -Galaktosyl-Ceramid-Gabe; DLU= digital light units

3.3.3. Cytokinprofil der Leber chronisch WHV infizierter Tiere mit und ohne α -Galaktosyl-Ceramid Gabe

In den behandelten Tieren konnte ebenso wie in den Kontrolltieren kein spezifischer Effekt von α -Galaktosyl-Ceramid und somit kein Anstieg in der Interferon- γ -Expression festgestellt werden. Es war lediglich zu beobachten, daß die Expression der Cytokine und T-Zellmarker ähnlich der Virämie, aber nicht in Korrelation mit dieser, natürlichen Schwankungen unterworfen ist. Diese Schwankungen liegen bei etwa $\pm 50\%$ (gemessen in DLU). Ebenfalls konnte keine Korrelation zwischen der Expression von Interferon- γ mit den viralen Nukleinsäuren in der Leber gefunden werden. Die Daten des transgenen Maus-Modell konnten also nicht im natürlichen Wirt bestätigt werden. Um den Einfluß der Biopsieprozedur als solcher auf die Expression der Cytokine zu untersuchen, wurde eine weitere Kontrolle durchgeführt. Da offene Biopsien zu einer verstärkten TNF- α -Expression und damit zu einer Veränderung der Interferon- γ -Expression führen können, wurden über einen Zeitraum von vier Wochen zwei chronische WHV-Carrier in wöchentlichem Abstand mit einer Biopsiekantüle Nadelstichbiopsien entnommen. Diese Biopsien wurden ebenfalls auf Cytokin- und T-Zellmarker Expression untersucht. Bei diesen Proben konnte die gleiche Fluktuation der immunologischen Parameter beobachtet werden, wie bei der laparotomisch biopsierten Tiergruppe. Die Korrelation der immunologischen Marker untereinander konnte wie erwartet bestätigt werden, d.h. die Expression von CD3 korreliert mit

der von CD4 und CD8, die von CD 8 korreliert mit IL-15 und Interferon etc.; ein Zusammenhang zu virologischen Parametern kann aber nicht festgestellt werden. Die folgenden Diagramme verdeutlichen die Fluktuation der Cytokine und T-Zellmarker am Beispiel der Nadelstich-biospierten Tiere.

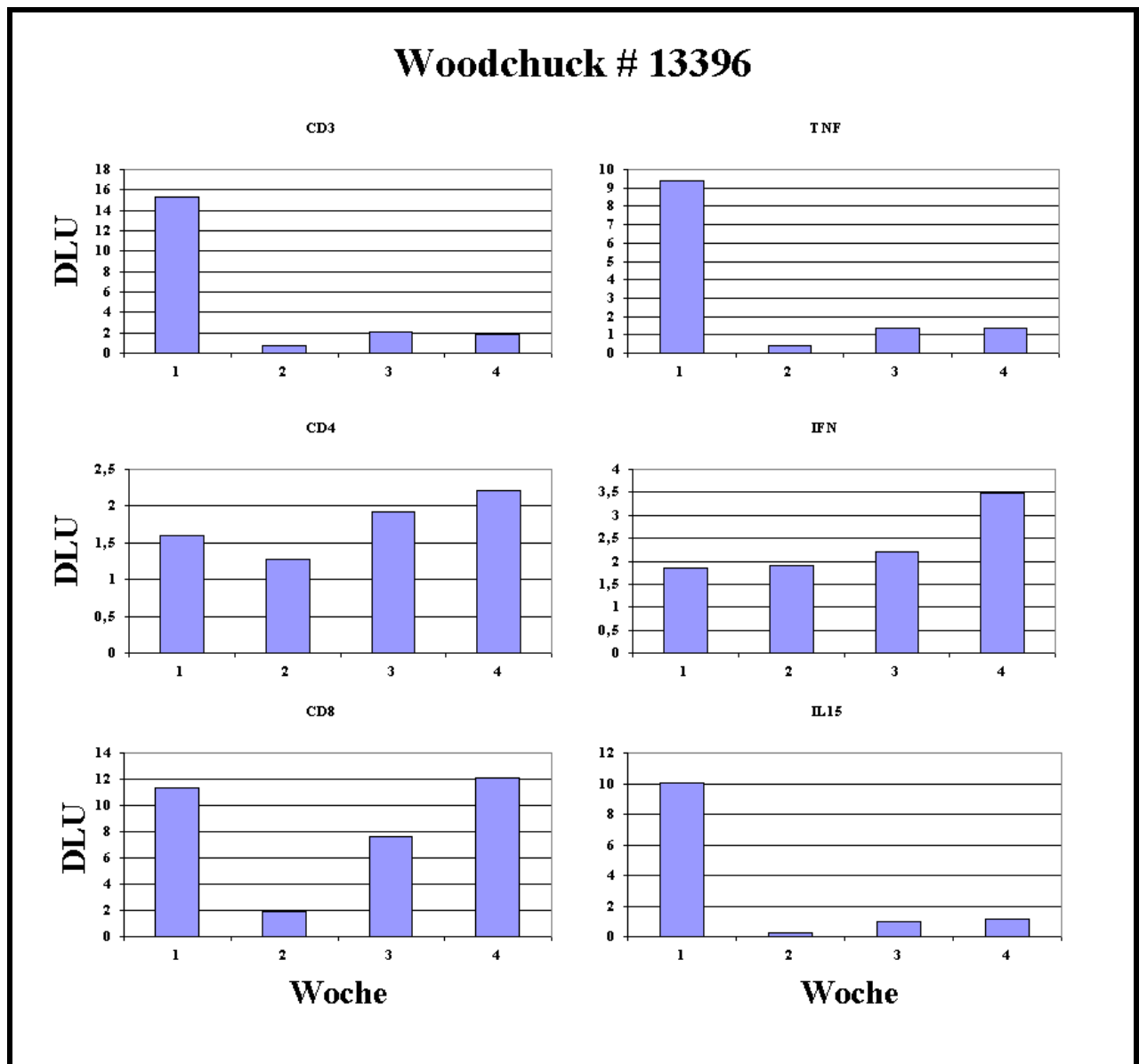


Abbildung 23: Fluktuation der Cytokinexpression in chronischen WHV-Carriern am Beispiel des Tiers 13396. Über einen Zeitraum von vier Wochen wurde Lebergewebe mit Nadelstichbiopsien entnommen und aus diesen Biopsien Gesamt-RNA isoliert. Diese RNA wurde für eine RNase-Protection-Assay eingesetzt und die Expression der Cytokine und T-Zellmarker mit Hilfe eines Phosphorimagers quantifiziert Für jedes Cytokin bzw. für jeden T-Zellmarker wurde, der besseren Übersichtlichkeit halber, ein Diagramm angefertigt.

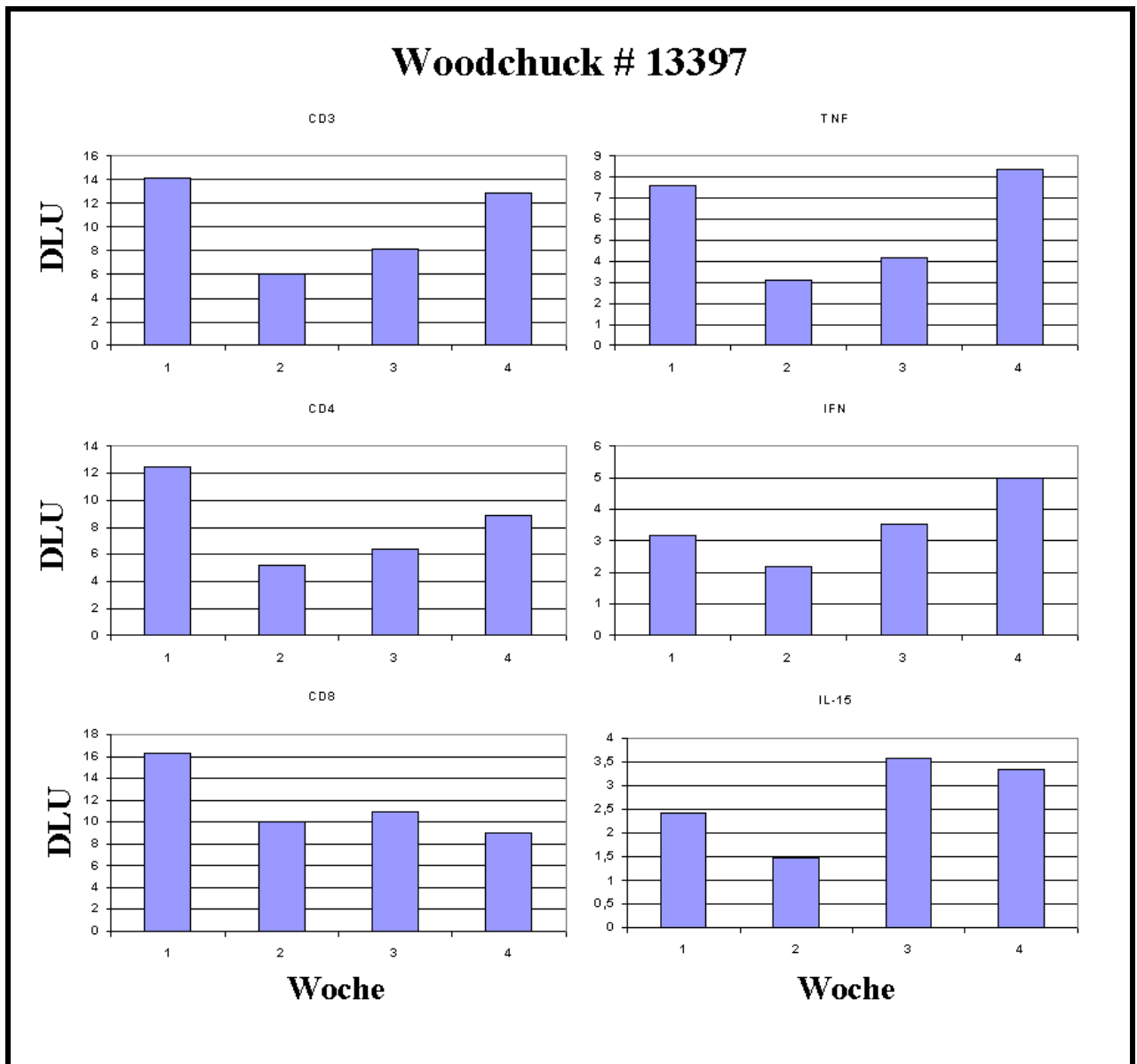


Abbildung 24: Fluktuation der Cytokinexpression in chronischen WHV-Carriern am Beispiel des Tiers 13397. Über einen Zeitraum von vier Wochen wurde Lebergewebe mit Nadelstichbiopsien entnommen und aus diesen Biopsien Gesamt-RNA isoliert. Diese RNA wurde für eine RNase-Protection-Assay eingesetzt und die Expression der Cytokine und T-Zellmarker mit Hilfe eines Phosphorimagers quantifiziert. Für jedes Cytokin bzw. für jeden T-Zellmarker wurde, der besseren Übersichtlichkeit halber, ein Diagramm angefertigt.

3.3.4. Stimmulierung von Lymphocyten mit α -Galaktosyl-Ceramid

Nach Auskunft von K. Kakimi, Scripps Research Institute, La Jolla, Kalifornien (persönliche Mitteilung), ist es u.U. möglich, daß α -Galaktosyl-Ceramid bei chronisch WHV infizierten Tieren aufgrund der latenten Interferon- γ -Expression unwirksam ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. Masanori Isogawa, Institut für Virologie, Universitätsklinikum Essen, Lymphocyten chronisch infizierter und naiver Murmeltiere aus deren Blut isoliert und mit α -Galaktosyl-Ceramid oder PHA stimuliert. Als Kontrolle dienten nicht stimulierte Lymphocyten eben dieser Tiere (Spuren 3, 6 und 9). Weder bei chronisch infizierten noch bei nicht infizierten Tieren war eine Erhöhung der Interferon- γ Expression zu beobachten, wohingegen PHA zu einer Erhöhung der Expression der untersuchten Marker führte (Abbildungen 25 und 26). Die Stimulation durch PHA führt zu stärkeren Banden der Cytokine und T-Zellmarker (Spuren 2, 5 und 8). α -Galaktosyl-Ceramid zeigt hingegen keine Wirkung (Spuren 1, 4 und 7).

Auch im Proliferationstest war keine Wirkung des α -Galaktosyl-Ceramid auf Woodchuck Lymphocyten zu beobachten, während sowohl bei der Kontrolle mit PHA als auch bei der Stimulation muriner Zellen mit α -Galaktosyl-Ceramid ein proliferativer Effekt beobachtet werden konnte (Dr. M. Isogawa, persönliche Mitteilung). Diese Daten lassen nur den Schluß zu, daß α -Galaktosyl-Ceramid Spezies-spezifisch in der Maus und im Menschen, nicht jedoch im Woodchuck wirkt, und somit das Woodchuck-Modell zum Studium des antiviralen Potentials von α -Galaktosyl-Ceramid nicht in Frage kommt (vergl. Abschnitt 4, Diskussion). Die Abbildungen 25 und 26 verdeutlichen die in stimulierten Zellen gewonnenen Ergebnisse.

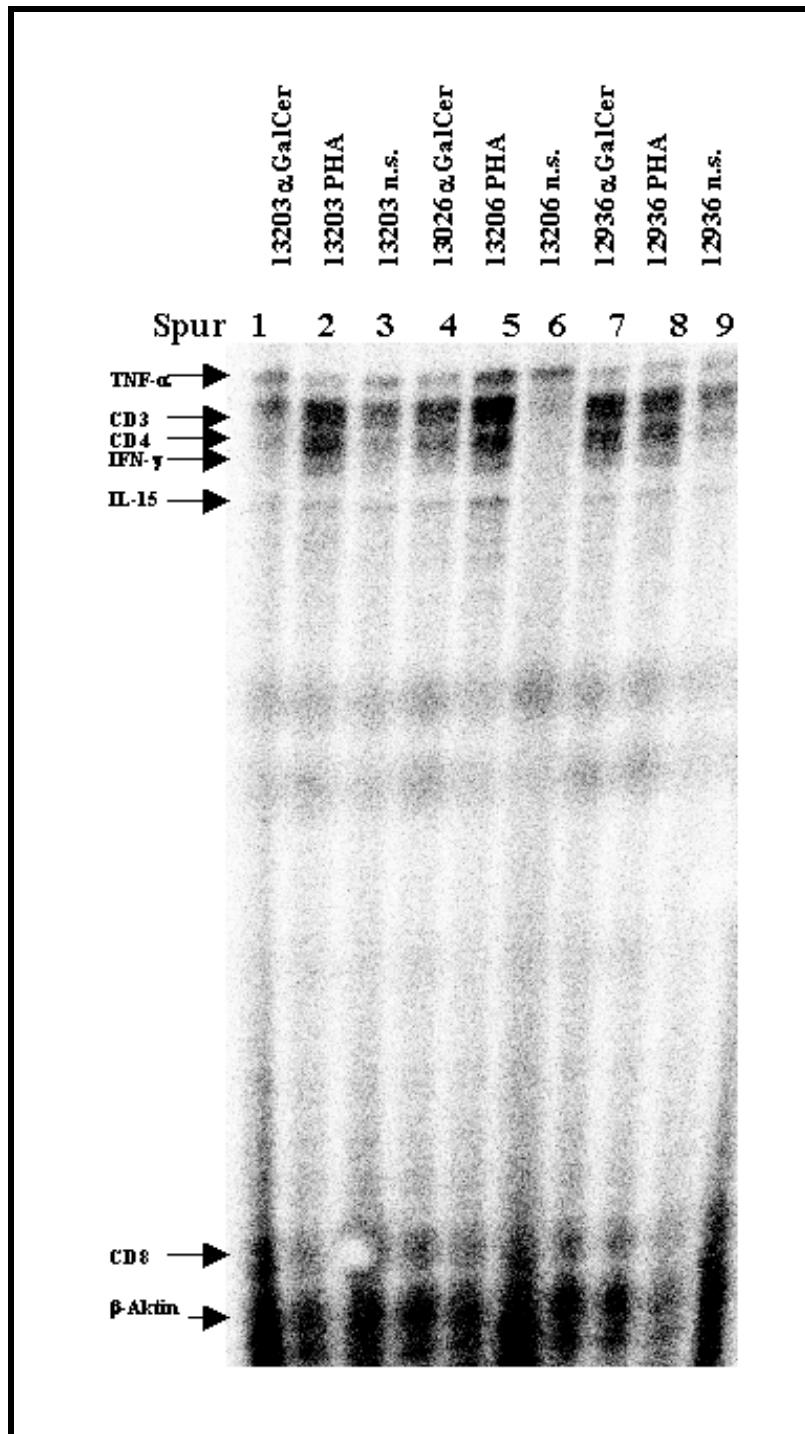


Abbildung 25: *In vitro* Stimulation von Lymphocyten mit α -Galaktosyl-Ceramid; durch die Stimulation konnte kein Effekt induziert werden. Weder bei chronisch infizierten Tieren (12303 und 12306) noch bei nicht infizierten Tieren (hier am Beispiel des Tiers 12936) konnte ein stimulierender oder proliferativer Effekt von α -Galaktosyl-Ceramid festgestellt werden. In diesem Fall kann eine Aussage über die Proliferation getroffen werden, da die gleiche Anzahl Zellen stimuliert bzw. als Kontrolle kultiviert wurde, und nach Ablauf der Stimulationsperiode das gesamte Zellmaterial, ungeachtet der Zellzahl, für die RNA-Isolierung und den RPA eingesetzt wurden. Eine erhöhte mRNA-Menge kann also auf eine erhöhte Expression oder eine größere Menge an Ausgangsmaterial zurückgeführt werden.

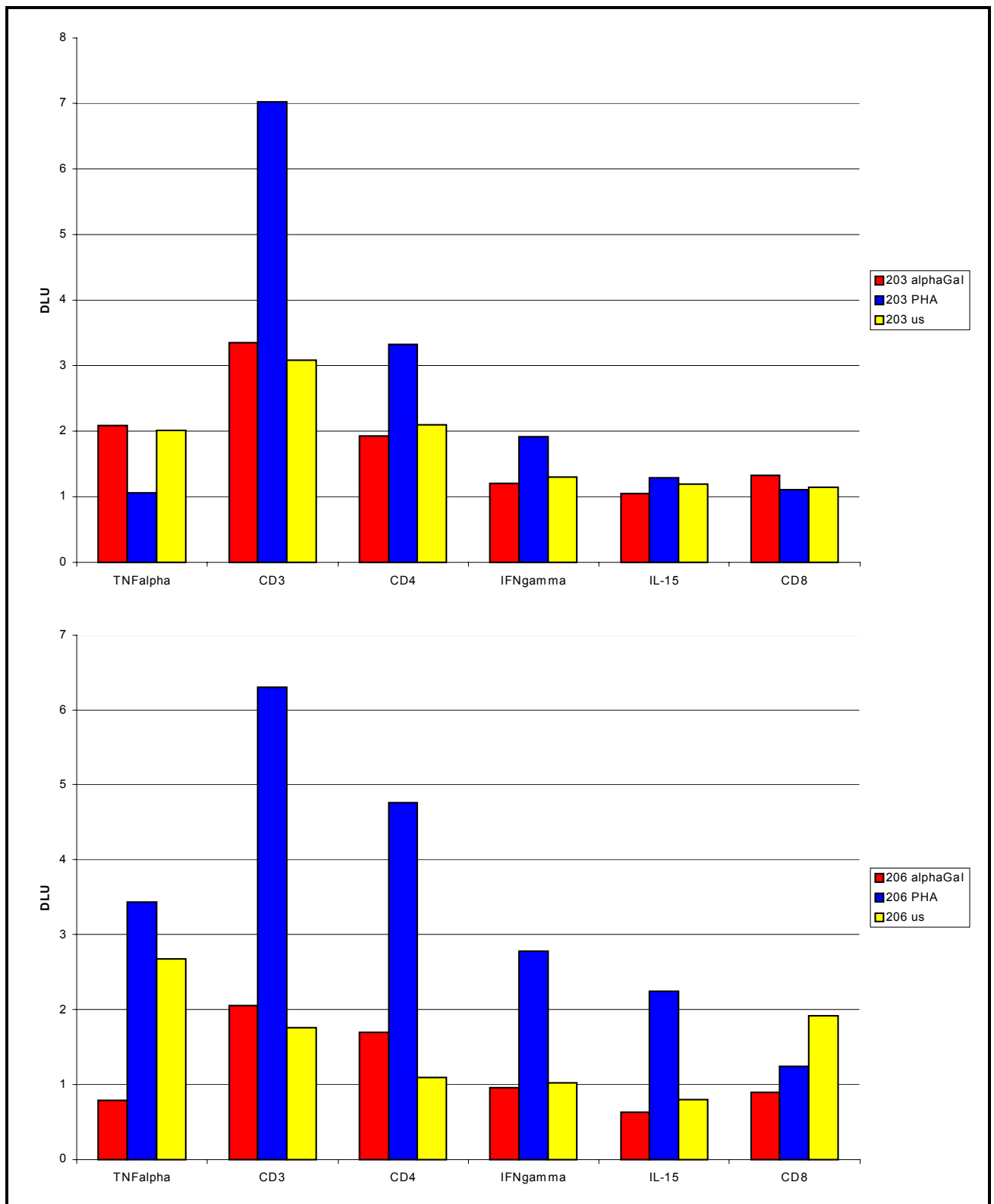


Abbildung 26: *In vitro* Stimulation von Lymphocyten mit α -Galaktosyl-Ceramid, quantitative Auswertung; ausführliche Legende s. nächste Seite

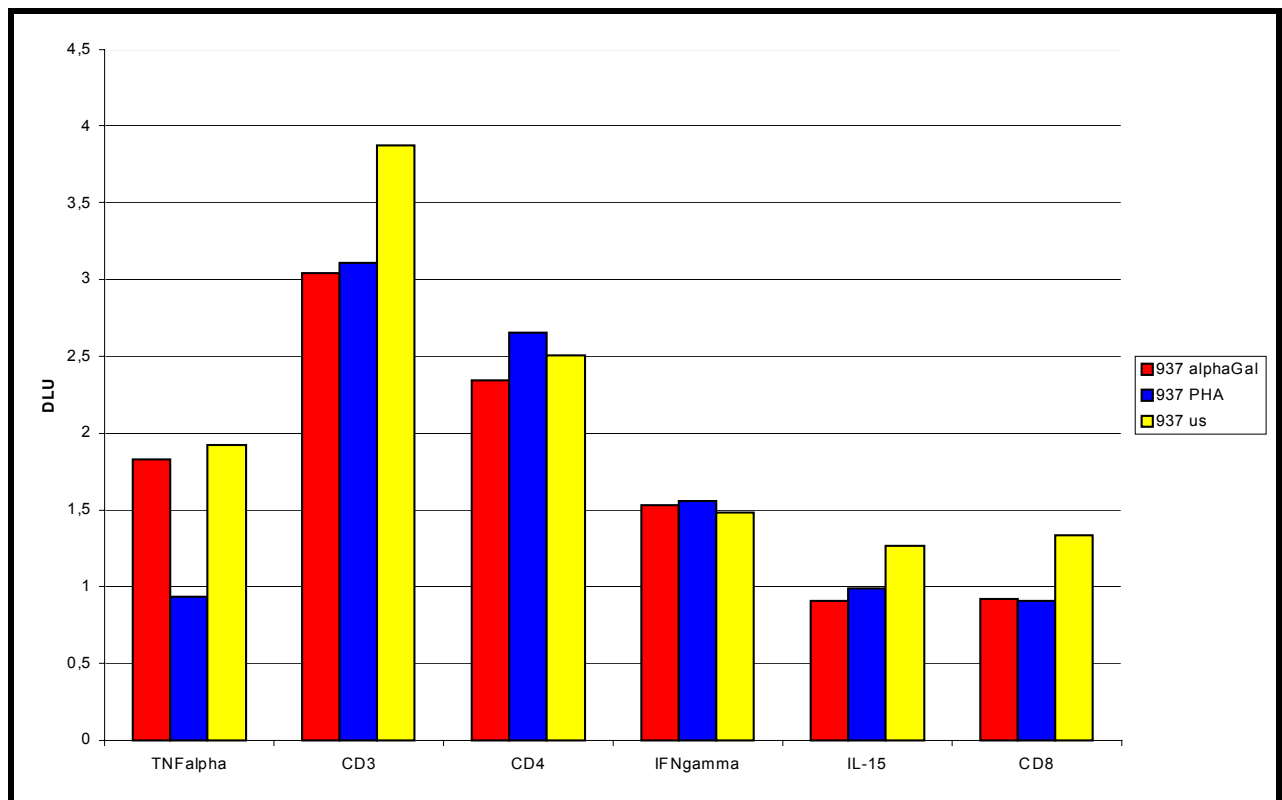


Abbildung 26: *In vitro* Stimulation von Lymphocyten mit α -Galaktosyl-Ceramid, quantitative Auswertung. Die hier durchgeführte Quantifizierung basiert auf dem RPA aus Abbildung 25. Die Lymphocyten wurden aus zwei chronisch WHV-infizierten Woodchucks (13203 und 12206) und einem nicht infizierten Tier (12937) isoliert und mit PHA oder α -Galaktosyl-Ceramid stimuliert. Als Kontrolle dienten nicht-stimulierte Zellen (us, unstimulated). Insbesondere bei Interferon γ , dessen Expression von α -Galaktosyl-Ceramid stimuliert werden soll, ist keine Expressionsteigerung durch α -Galaktosyl-Ceramid zu beobachten. Das Immunmodulans α -Galaktosyl-Ceramid wirkt also nicht im Woodchuck.

3.3.5. Weitere Anwendungsmöglichkeiten des RPA

Der oben beschriebene RNase-Protection Assay konnte über die o.a. beschriebenen Experimente hinaus bereits erfolgreich in anderen Zusammenhängen eingesetzt werden. So konnte zum Beispiel die Expression der Cytokine und T-Zellmarker in mit rekombinanten Adenovirusvektoren behandelten Tumoren quantifiziert werden (Pützer *et al.*, 2001). In der bereits publizierten Abbildung ist deutlich der Unterschied zwischen behandeltem und unbehandeltem Tumorgewebe zu erkennen. Insbesondere die von dem Vektor *AdIL-12.B7.1* durch IL-12 induzierte CD4 und IFN- γ -Expression im Vergleich zum Kontroll-Vektor mit GFP ist erkennbar.

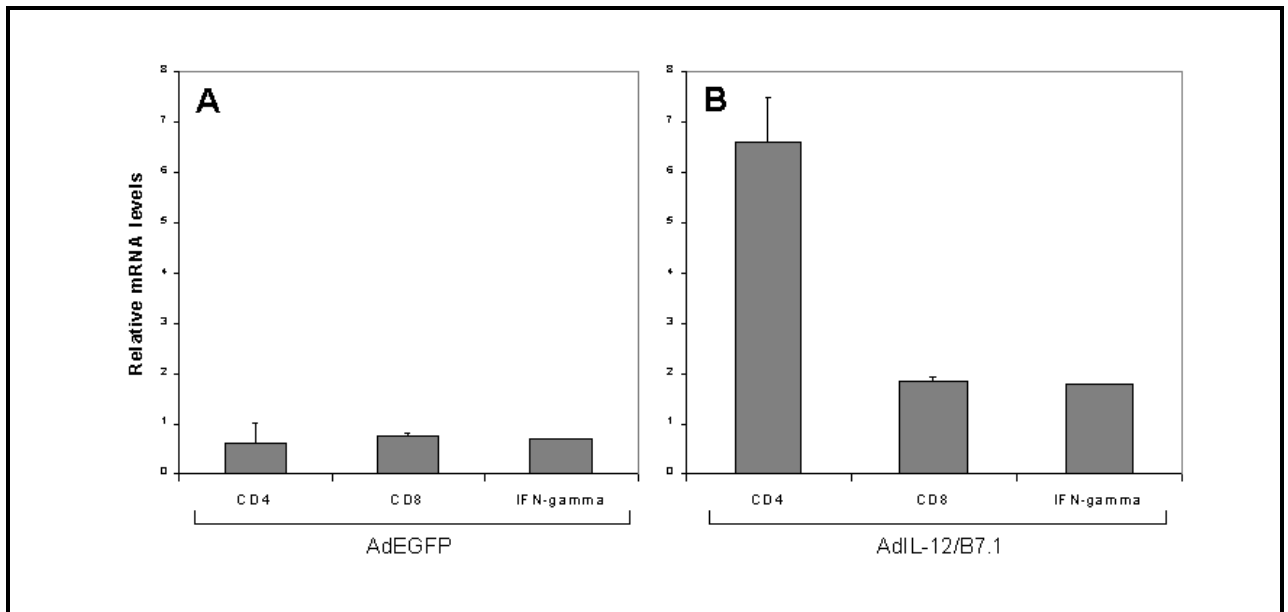


Abbildung 27: Behandlung von Tumoren mit adenoviralen Vektoren (aus Pützer *et al.*, 2001); deutlich zu erkennen ist ein Anstieg der Cytokin- und T-Zell-Marker-Expression im behandelten Tumor. Vor und 10 Tage nach intratumoraler Injektion der Vektoren wurden Biopsien des Tumorgewebes entnommen, Gesamt-RNA isoliert und für den RPA eingesetzt. Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Phosphorimagers.

In einem weiteren Projekt konnte gezeigt werden, daß die Leber nicht infizierter Woodchucks nach der Transplantation in chronische WHV Carrier immunologischen Prozessen im Empfängertier unterzogen ist. Ob eine Reinfektion oder eine Abstoßung vorliegt, soll durch weitere Untersuchungen gezeigt werden (U. Dahmen *et al.*, Publikation in Vorbereitung).

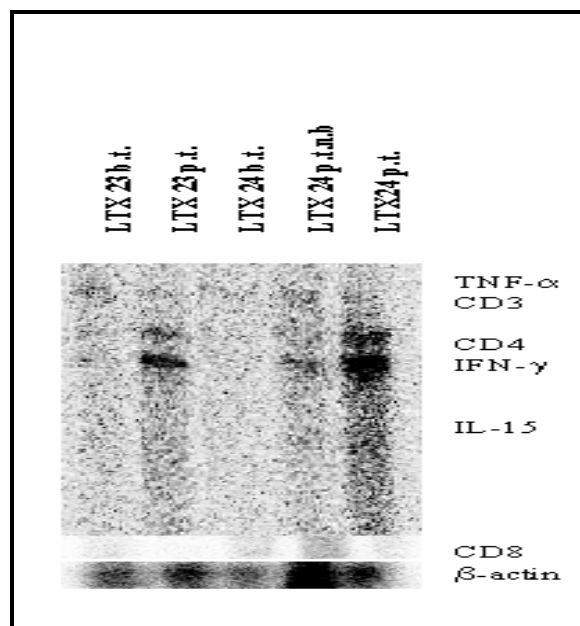


Abbildung 28: Cytokinexpression in der Leber chronisch WHV-infizierter Tiere vor und nach Lebertransplantation; den beiden Tieren wurde eine neue, nicht WHV infizierte Leber eingepflanzt und diese vor und nach der Transplantation auf Cytokin- und T-Zellmarkerexpression untersucht (b.t.=before transplantation; p.t. post transplantation; p.t.n.b.= post transplantation, needle biopsy).

3.3.6. Umklonierung des Interferon- γ -Rezeptors in den Baculotransfervektor

Wie oben gezeigt, konnte der in der Literatur beschriebene Zusammenhang zwischen der Virämie während der chronischen hepadnaviralen Infektion und der Interferon γ Expression nicht bestätigt werden. Aus diesem Grund sollen in Zukunft Versuche unternommen werden, Interferon γ im Tier zu neutralisieren. Diese Neutralisierung soll möglichst spezifisch und mit wenigen Nebenwirkungen für die Versuchstiere bewerkstelligt werden, so daß Immunsuppressiva für diesen Zweck ausscheiden. Für den humanen und den murinen Interferon- γ -Rezeptor wurde bereits gezeigt, daß diese im Baculovirusexpressionssystem in löslicher und biologisch aktiver Form überexprimiert werden können. In früheren am Institut für Virologie der Universitätsklinik Essen durchgeführten Experimenten wurde bereits die lösliche Domäne des Woodchuck-Interferon- γ -Rezeptors in den Vektor pcDNA3 kloniert.

Diese Domäne wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des *BaculoVektorExpressionSystem* in einen sog. Transfervektor umkloniert. Dieser Transfervektor ermöglicht eine Rekombination mit dem baculoviralen Genom und eine Expression des eingefügten Proteins, also des Woodchuck Interferon- γ -Rezeptors, an Stelle des viralen Polyhedrins. Durch Fusion des Rezeptors mit einem 6xHIS-Tag (Aminosäuresequenz aus 6 Histidinresten) kann das Protein über Nickelagarose, deren Ni^{2+} -Ionen mit dem HIS-Tag einen Chelat Komplex bilden, aus dem Überstand mit rekombinantem Baculovirus infizierter Insekten Zellen isoliert werden.

Der in den Transfervektor umklonierte Interferon- γ -Rezeptor wurde durch mehrere Restriktionsanalysen und eine Sequenzierung überprüft (Daten nicht gezeigt). Mit der nach Angaben des Herstellers generierten Baculovirusrekombinante AcNPVwIFNr wurde das unter 3.3.7. beschriebene Experiment durchgeführt.

3.3.7. Überexpression und Reinigung des Interferon- γ -Rezeptors im Baculovirusssystem

Die Abbildung 29 zeigt eine mit Coomassie Brilliant Blue gefärbte SDS-PAGE. Auf der ersten Spur ist der Kaleidoskopstandard der Fa. Biorad aufgetragen; Spur 2 zeigt das Lysat der mit dem Stamm AcNPVwIFNr infizierten Sf9 Zellen. Spur 3 zeigt dasselbe Zellysat, jedoch nach einer Proteinreinigung mit Ni-NTA-Agarose. Bei einer Größe von etwa 35 kDa ist eine schwache Bande zu erkennen, die in Spur 4 deutlicher zu sehen ist. Auf Spur 4 wurde der Überstand der mit der Rekombinante infizierten Zellkultur aufgetragen. Spur 5 zeigt das Lysat der Kontrollinfektion mit AcNPV Wildtyp, Spur 6 das zugehörige Lysat nach Proteinreinigung und Spur 7 den entsprechenden Überstand nach Proteinreinigung mit Ni-NTA-Agarose. Aus der SDS-PAGE wird deutlich, daß es gelungen ist, den löslichen Teil des Woodchuck Interferon- γ -Rezeptors zu

klonieren und zu überexprimieren. Wie erwartet wird der Rezeptor in das Zellkultur-Medium sezerniert. Weitere Versuche sollen Aufschluß über die biologische Aktivität des Rezeptors und dessen weitere Verwendungsmöglichkeiten in der Untersuchung der Interferon- γ Wirkung während der chronischen WHV-Infektion geben.

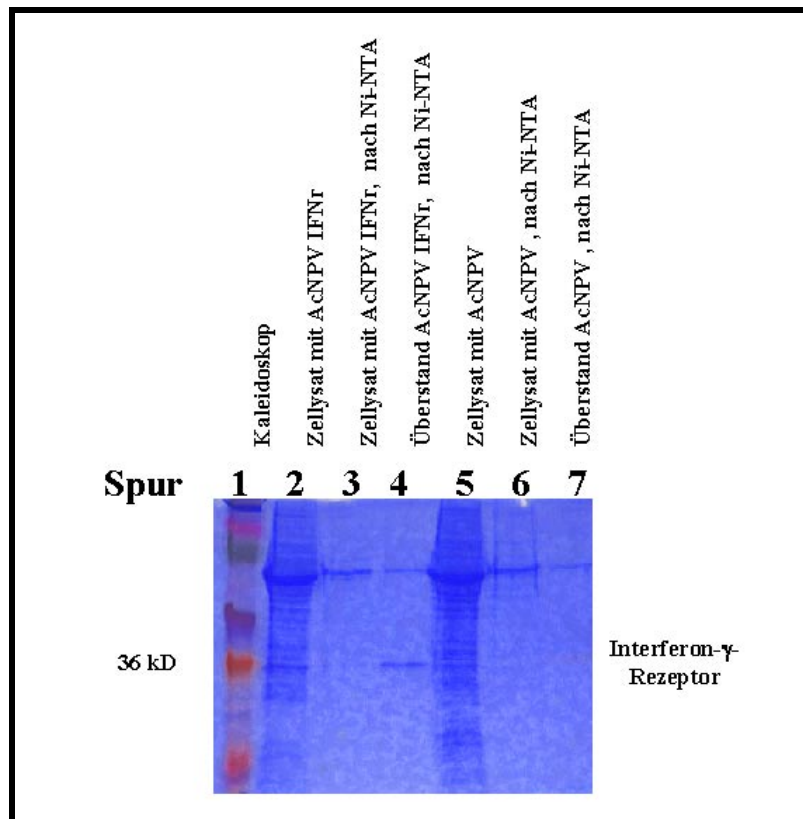


Abbildung 29: Expression des Interferon- γ Rezeptors des Woodchucks; SF9-Zellen wurden mit der Rekombinante AcNPVwIFN γ infiziert; als Kontrolle diente eine Infektion mit AcNPV-Wildtyp. Zellysate und -überstände wurden mit Ni-NTA-Agarose behandelt und das Protein extrahiert. Der Interferon- γ Rezeptor des Woodchucks konnte überexprimiert werden und liegt löslich im Überstand vor (Spur 4). Ein Westernblot konnte nicht durchgeführt werden, da keine Antikörper zur Detektion des Woodchuck Interferon- γ Rezeptors zur Verfügung stehen

4. Diskussion

4.1. Identifizierung und Charakterisierung einer WHV-preS2-Glykosylierungsstelle

4.1.1. Identifizierung einer Glykosylierungsstelle des preS2 Proteins

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Glykosylierung des WHV *middle surface antigen* und deren Einfluß auf den intrazellulären Transport des Proteins untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Replikationskompetenz von WHV-Mutanten mit Defekten in der preS2-Region getestet werden. Die *in vitro* Untersuchungen erfolgten, da geeignete Antikörper für das WHV-preS2-Protein nicht zur Verfügung standen, mit chimären Proteinen aus der WHV-preS2/S-Region und der HBsAg-‘a’-Determinante. Diese chimären Proteine werden von kommerziellen Antikörpern erkannt.

Wie im Abschnitt 3 (Ergebnisse) mittels *in vitro* Translation gezeigt, konnte eine Glykosylierungsstelle des preS2-Proteins des Woodchuck Hepatitis Virus identifiziert werden. Aufgrund der hier gezeigten Zellkulturexperimente (konfokale Laser Scanning Mikroskopie + Fraktionierungsstudien) scheint die Glykosylierung für den korrekten Transport des Proteins verantwortlich zu sein und Signalfunktion zu haben. Es konnten die von Tolle *et al.* 1998 gemachten Beobachtungen bestätigt werden, daß es sich um eine O-Glykosylierung handelt, da nur mit dem Inhibitor der O-Glykosylierung selbige unterbunden werden kann. Tunicamycin als Inhibitor der N-Glykosylierung hat in der *in vitro* Translation keine Auswirkungen auf die Modifikation und somit die Größe des Proteins.

Für die hier durchgeführten *in vitro* Studien war es notwendig Fusionsproteine aus der WHVpreS2 Domäne, einem Teil des WHsAg und HBsAg zu konstruieren, da geeignete WHV-spezifische Antikörper für die hier durchgeführten Untersuchungen nicht zur Verfügung standen. Aufgrund der hohen Homologien zwischen WHV und HBV (Galibert *et al.*,1982) scheint es jedoch zulässig ein artifizielles System wie das Verwendete für die hier durchgeführten Studien einzusetzen. Darüber hinaus war es mit Hilfe der HBsAg-Domäne der Fusionsproteine möglich, diese mit kommerziellen, bereits erfolgreich eingesetzten Antikörpern zu detektieren. Auch die Wahl der Zelllinie beruht auf diesen Überlegungen. Da die HBsAg-Domäne in humanen Zellen während der Infektion exprimiert und sezerniert wird, und desweiteren für humane Zellorganellen adäquate Antikörper zur Verfügung stehen, erscheint die Auswahl der Zelllinien HeLa und HepG2 als sinnvoll, zumal diese Zelllinien gut charakterisiert sind.

Mit den hier durchgeführten Experimenten konnte nicht gezeigt werden, ob die Glykosylierung Auswirkungen auf die Sekretion des Virus hat. Die durchgeführten Studien zur Sekretion können bestenfalls Hinweise darauf geben, daß eine defekte Glykosylierung zu Änderungen in der

Sekretion viraler und subviraler Partikel führt. Obwohl Block *et al.* 1998 den antiviralen Effekt von Glykosylierungsinhibitoren der α -Glukosidasen des ER gezeigt haben, bedeutet das nicht unbedingt, daß die Sekretion des Virus davon direkt beeinflusst wird. Zwar ist eine O-Glykosylierung oft gleichbedeutend mit dem Transport des Proteins zum Golgi-Apparat und damit seiner Sekretion (Stryer, 1987 und 1999; Lehninger *et al.*, 1994), aber auch andere Auswirkungen der Glykosylierung sind denkbar. Insbesondere die Interaktion mit Chaperonen könnte von der Glykosylierung beeinflusst werden (Werr und Prange, 1998).

Da in mit preS2-defekten Virusstämmen infizierten Patienten (Fernholz *et al.*, 1991 und 1993; Pollicino *et al.*) trotz des nicht mehr exprimierten Proteins Viruspartikel im Blut vorliegen, muß es einen preS2-unabhängigen Sekretionsmechanismus für das Virus geben (Yi Sheu *et al.*, 1994). Nach den in der Literatur gezeigten Daten scheint es wahrscheinlicher, daß das core-Protein für die Sekretion des Virus verantwortlich ist, oder wenigstens eine entscheidende Rolle bei dieser spielt (Poisson *et al.*, 1997; Scaglioni *et al.*, 1994; Ta-Tung Yuan *et al.*, 2000; Ta-Tung Yuan *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1996). Denkbar wäre in diesem Zusammenhang eine Interaktion zwischen dem core-Protein und den viralen, membranständigen Oberflächenproteinen, zu denen auch das preS2-Protein gehört. Sollte dieses nicht oder falsch glykosyliert werden, könnte das zu einer falschen Interaktion mit dem core-Protein oder zu einer, wie auch immer gearteten, Inhibition der Interaktion zwischen dem core Protein und dem preS1- bzw. s-Protein führen (zur Rolle des preS1 bei der Morphogenese: Guo *et al.*, 1997). Für diese potentielle Interaktion spricht, daß es core-Protein-Mutanten gibt, die ebenso wie die preS2-Varianten zu einer fulminanten Hepatitis führen (Friedt *et al.*, 1999).

Nach den in der Literatur vorliegenden Daten ist der Zusammenhang zwischen der fulminanten Hepatitis und dem Auftreten der preS2 defekten Mutanten offensichtlich. Es wurde in mehreren Arbeiten gezeigt, daß das Gleichgewicht zwischen preS2 und den beiden anderen Oberflächenproteinen wichtig für die Sekretion des Virus ist (s.o.). Eine Verschiebung dieses Gleichgewichts zugunsten des preS1-Proteins hat für die Zellen in der Regel durch eine Anreicherung des core-Proteins cytopathische Auswirkungen, was die fulminante Hepatitis erklären kann (Bock *et al.*, 1999).

Die Bedeutung von Glykoproteinen für die Virulenz bzw. die Pathogenese von Viren konnte bereits bei anderen Virussystemen gezeigt werden (Gaudin *et al.*, 1999; Bernard *et al.*, 2000).

4.1.2. Einfluß der Glykosylierung auf die intrazelluläre Verteilung des preS2-Proteins

Obwohl in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen der Sekretion viraler und subviraler Partikel mit dem preS2-Protein nicht nachgewiesen werden konnte, so wurde doch aufgrund der Kollokalisationsstudien und der Immunfluoreszenzfärbungen deutlich, daß die Glykosylierung den

Transport des viralen Proteins steuert und Nichtglykosylierung zu, im Vergleich zum Wildtyp, abnormalen Verteilungen des Proteins in transfizierten Zellen führt. Diese Ergebnisse und die Daten von Block *et al.* (1998) und Bock *et al.* (1999), machen deutlich, daß das preS2-Protein eine wichtige Rolle im viralen Replikationszyklus einnimmt. Allem Anschein nach scheint es für Interaktionen bei der Sekretion des Virus verantwortlich zu sein, wenn es auch nicht der alleinige Vermittler derselben ist (siehe vorherigen Abschnitt).

Die in *in vitro* Experimenten durch die genetisch oder biochemisch inhibierte Glykosylierung veränderte Verteilung des preS2-Proteins deutet auf eine Anreicherung des Proteins in zellulären Kompartimenten hin. Durch Fraktionierung transfizierter Zellen (HeLa und HepG2) und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie konnte gezeigt werden, daß insbesondere der Golgi Apparat der Ort dieser Anreicherung ist. Dies stimmt mit dem bisherigen Kenntnisstand über O-Glykosylierung überein, die im Golgi-Apparat stattfindet (Alberts *et al.*, 1994). Wie bei Bock *et al.* 1999 gezeigt wurde, führt eine Anreicherung der preS Proteine im endoplasmatischen Retikulum zu einer Verlangsamung des Proteintransports und zu einer Reduktion der Sekretion. Ebenso weisen die subviralen Partikel eine stark veränderte Morphologie im Vergleich zu denen einer Wildtyp Infektion auf. Diese Daten lassen den Schluß zu, daß es sich bei den hier gewonnenen Daten um ein vergleichbares Phänomen handelt, und eventuell auch die Sekretion der Partikel beeinflußt wird.

4.1.3. Bedeutung der Kolokalisation des preS2-Proteins mit zellulären Kompartimenten

Kolokalisationsstudien wurden in der jüngeren Vergangenheit u.a. für das core- und das E2-Protein des Hepatitis C Virus (Martire *et al.*, 2001) aber auch für das L-Protein des Hepatitis B Virus (Lambert und Prange, 2001) durchgeführt. Diese Studien gaben Aufschluß über die posttranslationalen Translokationen dieser Proteine und leisten damit einen entscheidenden Beitrag zum besseren Verständnis des Virus-Assembly. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der Glykosylierung auf die posttranslationale Translokation des WHmAg untersucht und Kolokalisationsstudien mit verschiedenen rekombinanten M-Proteinen durchgeführt.

Die Kolokalisationsstudien (Western-Spot-Blot und kLSM) zeigen, daß die untersuchten Proteine zu unterschiedlichen Zeiten in unterschiedlichen Zellkompartimenten in verschiedenen Konzentrationen vorliegen. Auf diese Weise kann der klassische Weg der Membranprotein-Synthese (endoplasmatisches Retikulum, Golgi, Plasmamembran) nachvollzogen werden. Auffällig ist hierbei die Tatsache, daß sich das Protein HybIIIpreS2gly bzw. das glykosylierungsinhibierte HybIII-Protein in einem gegenüber dem Wildtyp veränderten Muster im Golgi-Apparat nachweisen lassen. Im Gegensatz zum Wildtypprotein, welches gleichmäßig über

die zellulären Kompartimente verteilt ist, kommt es zu einer Aggregation der nicht glykosylierten Proteine im Golgi-Apparat. Für diese Phänomene sind drei Erklärungen denkbar: Entweder kommt es zu einem schnelleren Transport der Proteine aus dem ER und damit zu einer früheren Akkumulation im Golgiapparat, oder es kommt zu einer Aggregatbildung im Golgiapparat, da das Protein zwar eine Signalsequenz für Glykosylierung, aber nicht die passende Glykosylierungsstelle hat. Die dritte Erklärung kombiniert die beiden ersten Möglichkeiten und würde bedeuten, daß die beiden denkbaren Effekte parallel auftreten und evtl. synergistisch wirken, was das frühere Auftauchen des Proteins im Golgi und dessen Anreicherung erklären würde.

Die Kollokationen der chimären Proteine mit dem Proteasom scheinen in der Western Spot Blot Analyse durch die mutierte Glykosylierungsstelle im Gegensatz zu Wildtypprotein (HybIII) verändert. Möglicherweise wird das falsch glykosylierte Protein wie bereits für andere Proteine beschrieben (Wiertz *et al.*, 1996) schneller bzw. früher abgebaut als das Wildtypprotein. Die scheinbare Kollokation des preS/S Proteins mit dem Proteasom, welche in der Konfokalmikroskopie beobachtet werden konnte, würde die hohe Immunogenität des S-Proteins erklären (Meisel *et al.*, 1994), da dieses nach Abbau durch das Proteasom möglicherweise über MHC-I-Moleküle präsentiert wird. Diese Beobachtung der möglichen Kollokation muß aber in weiteren Studien näher untersucht werden und kann an dieser Stelle nur als Hinweis auf den vermuteten Abbauweg des Proteins und dessen Präsentation als Antigen dienen.

Zu den Konfokal- und Western-Blotdaten ist anzumerken, daß diese in Kombination betrachtet werden müssen, da sie für sich alleine betrachtet lediglich ein unvollständiges Bild der Gesamtsituation darstellen. Für die Auswertung der Daten wurden die einzelnen Fraktionen auf ihren Gehalt an zellulären Proteinen für ER, Golgi, Plasmamembran, Proteasom und Gesamtproteingehalt untersucht. Anschließend wurde untersucht, in welchen Fraktionen sich die preS2- und die S- Domäne der Fusionsproteine befanden. Anhand dieser Daten konnte die im Ergebnisteil gezeigte Tabelle erstellt werden, die auf den im Anhang gezeigten Rohdaten basiert. Die Immunfluoreszenzdoppelfärbung wurde herangezogen, um die Daten aus der Western-Spot-Blot-Analyse zu untermauern. Die in der IF beobachteten Kollokationen stimmen weitgehend mit denen im Spot-Blot beobachteten überein. Die deutlichsten Kollokationen konnten in der IF bei der Färbung gegen Golgi Apparat und endoplasmatisches Retikulum beobachtet werden (s.o.).

4.1.4. *In vivo* Transfektionen der preS2-Mutanten

In weiteren Versuchen sollte geklärt werden, ob die untersuchten Mutationen der preS2-Region Einfluß auf die Replikationskompetenz haben. Es ist zwar bekannt, daß preS2-minus-Mutanten

während der chronischen Hepatitis dominant im Serum infizierter Patienten zu finden sind, die Replikationskompetenz ist aber bisher nicht nachgewiesen worden. Ebenso könnte eine Komplementation der Replikation durch Wildtyp-preS2 erfolgen, das evtl. noch latent vorhanden sein könnte.

Die Untersuchung der Replikationskompetenz sollte durch *in vivo* Transfektionen der Marmosetter mit rekombinanten Plasmiden, welche das Genom des Virusstammes WHV 8 mit Mutationen der preS2 Region in sich trugen, erfolgen. Eine akute Infektion dieser Tiere konnte jedoch nicht beobachtet werden. Obwohl in der Literatur bereits Fälle beschrieben sind, bei denen in chronisch HBV infizierten Patienten preS2-defekte Virusmutanten dominant und damit replikationsfähig waren (Fernholz *et al.* 1993; Fernholz *et al.*, 1991; Gerner *et al.*, 1998; Pollicino *et al.*, 1997; Santantonio *et al.*, 1992), konnte in den *in vivo* Transfektionen keine deutliche, bestenfalls eine sehr schwache Virämie beobachtet werden. Für diese Beobachtungen gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen besteht die Möglichkeit, daß die *in vivo* Transfektion als solche nicht erfolgreich war. Dagegen spricht neben den über das verwendete Plasmid bekannten Daten (Yu *et al.*, 1998) die interne Kontrolle. Während nach Yu. *et al.* 1998 das verwendete Plasmid in 80-90 % der Fälle zu einer deutlichen Virämie führt, ist nur die Infektion mit der Revertante in der Kontrolle positiv. Aufgrund der Mutationsrate des hepadnaviralen Genoms während der Replikation (Girones *et al.*, 1989; I. Pult, persönliche Mitteilung, HBV-Kongress 2000 Paris) und aufgrund der transfizierten Menge an Plasmid-DNA ist eine reverse Mutation nicht auszuschließen. Im Falle der Kontrolle ist die reverse Mutation nach bisherigem Kenntnisstand über die Rolle des S-Proteins sogar die einzige, replikationskompetente Mutante (Chisari *et al.*, 1986; Standring *et al.*, 1986; Bruss und Ganem, 1991), da Hepadnaviren ohne S-Protein nicht replikationsfähig sind.

Die Immunantwort der mit den preS2-Mutanten transfizierten Tiere liefert kein verwertbares Ergebnis, da eine Replikation nicht mit Sicherheit nachweisbar ist. Die gegenüber einer akuten Infektion stark veränderte Immunantwort ist darüber hinaus schwer zu interpretieren und läßt lediglich einige Spekulationen zu.

Desweiteren besteht die Möglichkeit, daß die Mutationen der preS2-Region zu einer Reduktion der Virulenz oder der Replikationsfähigkeit führen. Neben den Daten von Block *et al.* (1998), in denen die Virämie chronisch infizierter Tiere durch die Inhibition der Glykosylierung dramatisch gesenkt werden konnte, gibt es zahlreiche Beispiele anderer Modellsysteme und Virusfamilien, in denen einzelne Austausch auf Nukleinsäure- oder Proteinebene zu einer Attenuierung führen. So können wenige Mutationen in der 5'-nichttranslatierten Region des Sindbis Virus (Kuhn *et al.*, 1992) oder in der 3'-nichtkodierenden Region des Tick-Borne Enzephalitis Virus (Mandl *et al.*, 1998) zu einer Attenuation führen, aber auch einzelne Aminosäureaustausche wie z.B. die von

Tyrosin zu Histidin an Position 384 des Tick-Borne Enzephalitis Virus Proteins E (Holzmann *et al.*, 1990) können die Virulenz eines Erregers herabsetzen. Für weitere Flaviviren wie das West-Nil-Virus sind ähnliche attenuierende Sequenzveränderungen beschrieben worden (Chambers *et al.*, 1998). Die Bedeutung von Mutationen in glykosylierten viralen Transmembranproteinen wird auch durch die Arbeit von Gaudin *et al.* (1999) deutlich. Einzelne Mutationen an wichtigen Positionen des Transmembranproteins G des Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) führen zu verändertem Virusattachement und somit zur Reduktion der Virulenz. Ebenfalls wurde für das Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) beschrieben, daß einzelne Mutationen der Oberflächenproteine zu einer reduzierten Virulenz führen können (Yamaguchi *et al.*, 1996). Die attenuierten Impfstämme für die Poliovirusstypen basieren ebenfalls auf Austausch in Regionen, die für das Virus entscheidend sind, weitere Literaturstellen für Picornaviren sollen hier jedoch nicht angeführt werden (vergl.: O. Schildgen, Diplomarbeit, 1998, einzusehen beim Diplomprüfungsausschuss für Biologie der Universität zu Köln). Als letztes Beispiel für eine Attenuierung nach Mutationen soll die Arbeit von Aalende *et al.* (2000) angeführt werden, die zeigt, daß wenige Austausche in diversen Regionen des Genoms des Porcine Reproductive and Respiratory Syndrom Virus dessen Pathogenität verändern.

Desweiteren zeigen frühere Arbeiten, daß das Gleichgewicht der drei Oberflächenproteine zueinander in Hinblick auf den Schweregrad der Hepatitis eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Chisari *et al.*, 1986; Stranding *et al.*, 1986; Bruss und Ganem, 1991). Die bereits erwähnten Fälle einer chronischen Infektion mit preS2 defekten Virusstämmen gehen häufig mit einer fulminanten Hepatitis einher. Wie die *in vitro* Experimente zeigen, könnte es zu einem veränderten Abbau der Proteine über das Proteasom und damit zu einer veränderten Antigenpräsentation kommen, was eine Änderung der Infektionssymptome (z.B. eine fulminante Hepatitis ?) nach sich ziehen könnte. Diese Hypothese ist allerdings spekulativ und bedarf weiterer Untersuchungen.

In den bisherigen Untersuchungen über preS2-defekte Mutanten (Fernholz *et al.*, 1991 und 1993) wurde nie mit hundertprozentiger Sicherheit ausgeschlossen, daß die Mutanten möglicherweise erst durch eine Komplementation durch den Wildtyp replikationsfähig sind. Der Wildtyp ist jedoch, wenn überhaupt noch vorhanden, nur noch latent und in nicht mehr nachweisbarer Kopienzahl als Unterpopulation vertreten. Allerdings konnte die Frage der Notwendigkeit einer Komplementation der Mutanten durch den Wildtyp Stamm in den dieser Arbeit zu Grunde liegenden Experimenten nicht beantwortet werden. Die *in vivo* Daten der hier durchgeführten Experimente geben letztlich keinen Aufschluß über die Rolle, die das preS2-Protein *in vivo* während der akuten oder chronischen WHV-Infektion spielt.

Aufgrund der gewonnenen Daten wurde auf weitere Transfektionen verzichtet. Ein Transfektionserfolg mit den hier beschriebenen Mutanten in adulten Tieren ist nicht zu erwarten.

Die geringe Aussicht auf einen Transfektionserfolg rechtfertigt weder die hohen Versuchskosten, die im Falle einer Wiederholung des Versuchs entstünden, noch ist eine Wiederholung vom ethischen Standpunkt aus vertretbar.

4.2. Etablierung eines RNase Protection Assays

4.2.1. Fluktuationen des Cytokinprofils während der chronischen Infektion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Testsystem etabliert werden, mit dem es möglich ist, immunologische Parameter wie Cytokine und T-Zellmarker während der akuten und chronischen Infektion des Woodchucks mit WHV qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Die dafür in Frage kommende Technik des RNase Protection Assays schien dafür auf Grund ihrer hohen Spezifität und Sensitivität am besten geeignet.

Bei der Untersuchung einer Serie von offenen Biopsien wurde bei den unter Abschnitt 3 (Ergebnisse) vorgestellten Versuchen festgestellt, daß die Cytokinexpression in der Leber starken Schwankungen unterworfen ist. Die Expression schwankt $\pm 50\%$ um den jeweiligen Mittelwert, d.h. zehnmal so viel wie zu einem einzigen Zeitpunkt in verschiedenen Regionen einer Leber ($\pm 5\%$). Diese Beobachtungen wurden im Rahmen einer anderen Studie unabhängig von Zhou *et al.* (2000) bestätigt.

Da die Expression insbesondere von TNF- α von der Biopsie als solcher induziert werden kann (Sato *et al.*, 1991), wurden neben den o.a. Versuchen in wöchentlichen Abständen Biopsien mit Kanülen als minimal-invasive Eingriffe durchgeführt. In den Biopsien konnten die Beobachtungen der Expressionsschwankungen bestätigt werden. Diese Art der Biopsierung minimiert die Einflüsse der Wundheilung auf die Cytokinexpression der Leber und erlaubt bessere Vergleiche der Markerexpression zueinander. Nach bisherigen Erkenntnissen kann ausgeschlossen werden, daß die von der Biopsie-Nadel verursachten Wunden die Cytokinexpression nach einer Woche noch beeinflussen, da eine erhöhte Expression des TNF nur bis zu Tag 2 nach Biopsie festgestellt werden kann (Sato *et al.*, 1991; Sandblom *et al.*, 1976).

Außerdem konnte festgestellt werden, daß die Cytokine und T-Zellmarker im Woodchuck, wie bereits für das humane und das murine Immunsystem beschrieben, untereinander korrelieren. Im einzelnen bedeutet das, daß eine erhöhte Expression von CD3 mit einer erhöhten Expression von CD4 und/oder CD8 einhergeht. Ebenso korrelieren Interferon- γ und Interleukin 15 mit der CD8 Expression und die TNF- α Expression scheint mit der von CD3 gekoppelt zu sein.

Eine Korrelation der immunologischen Marker mit viralen Parametern wie Replikation und Virämie konnte aber nicht beobachtet werden. Der im Maus-Modell von Interferon- γ beobachtete Abfall der viralen Replikation (McClary *et al.*, 2000; Guidotti *et al.*, 1999; Guidotti *et al.*, 1994)

konnte in den hier gezeigten Versuchen nicht nachvollzogen werden. Eine hohe Interferon- γ Expression ging nicht automatisch mit einem Abfall der Replikationsintermediate einher, allerdings bedarf es weiterer Untersuchungen zur Klärung der *in vivo* Effekte von Interferon- γ im Woodchuck.

Interferon- γ wird während der chronischen Hepatitis kontinuierlich, aber mit den bereits o.a. Fluktuationen exprimiert. Möglicherweise kommt es zu einer Gewöhnung an Interferon- γ und damit zu einer verminderten Antwort auf dieses Cytokin. Zwar sind Lymphocyten von HBV Patienten in der Lage, Interferon- γ zu sezernieren (Jung *et al.*, 1991; Hsu *et al.*, 1999), aber insbesondere die chronische HBV-Infektion scheint nur schlecht auf Interferon- γ anzusprechen (M. Lu, persönliche Mitteilung, *in vitro* Daten; Lau *et al.*, 1992; Tangkijvanich *et al.*, 2000). Im Gegenteil gibt es in diesen Patienten sogar Hinweise auf eine herabregulierte Interferon Expression (Tangkijvanich *et al.*, 2000), und selbst bei normaler Interferon- γ Expression und im Vergleich zu Gesunden gleicher Rezeptor-Expression verliert sich die Wirkung von Interferon- γ (Lau *et al.*, 1992).

Eine mögliche Erklärung für die Schwankungen der Expression der Cytokine und T-Zellmarker ist die, daß es aufgrund von Regenerationsprozessen der Leber immer wieder zu unterschiedlichen mRNA-Leveln der untersuchten Parameter, insbesondere TNF und Interferon, kommt (Fukuda *et al.*, 1995; Andus *et al.*, 1995; Fausto, 2000). Bis heute ist nicht klar, wie der Mechanismus der Viruseliminierung im einzelnen funktioniert, aber es hat den Anschein, als würde die Immunantwort cytotoxischer T-Lymphocyten eine wichtige Rolle spielen (Guidotti und Chisari, 1996; Koziel, 1999; vergl. Abschnitte 1.7 und 1.8, Einleitung). Die Viruseliminierung scheint jedoch während der chronischen Hepatitis-Infektion abgeschwächt zu werden. Zum einen erfolgt die Abschwächung durch eine wahrscheinlich unzureichende CTL- und Cytokin-Antwort, zum anderen aber auch durch immuninhibitorische Effekte der HBV-Infektion. So ist HBV in der Lage, Cytokine oder die von ihnen ausgelösten Effekte direkt oder indirekt zu neutralisieren bzw. abzumildern. So wird in HBV-infizierten Zellen Interleukin 8 stärker als in nicht infizierten Zellen exprimiert, was zu einer Absenkung der Interferon- α Expression führt (Koziel, 1999). Desweiteren werden Lymphocyten in denen das X-Protein von HBV exprimiert wird, durch die anhaltende Stimulation von N-myc, sensitiver für TNF- α und werden daher verstärkt durch Apoptose eliminiert (Koziel, 1999; Zhang *et al.*, 1995). Die erhöhte TNF- α Produktion mag den letztgenannten Mechanismus noch zusätzlich zu verstärken und somit die chronische Hepatitis aufrechtzuerhalten (Sheron *et al.*, 1991). Die CTL-Antwort führt außerdem zu einer, wenn auch nur partiellen, Zellerstörung im Lebergewebe und leitet somit Regenerationsprozesse ein, die mit verstärkter Cytokinexpression einhergehen (Sato *et al.*, 1991; Andus *et al.*, Fausto, 2000).

Aufgrund der verstärkten Zellregeneration könnte auch der Level der β -Aktin Expression verändert werden (T. Michalak, persönliche Mitteilung), was eine Quantifizierung anhand der hier verwendeten Methode erschweren würde. Da sich das Cytokinprofil der chronischen Hepatitis deutlich von dem der akuten Infektion unterscheidet (Guo *et al.*, 2000) und wie gezeigt keine Korrelation zwischen virologischen Markern und immunologischen Parametern bei der chronischen Hepatitis zu beobachten ist, könnten die bei der chronischen Hepatitis beobachteten Schwankungen der Cytokinexpression auf Regenerationsprozesse zurückgeführt werden.

4.3 Weitere Anwendungsmöglichkeiten des RPA

4.3.1. Behandlung chronisch WHV-infizierter Tiere mit α -Galaktosyl-Ceramid

Nach Etablierung des RNase Protection Assays sollte dieser zur Untersuchung der Interferon- γ Expression in mit α -Galaktosyl-Ceramid behandelten chronischen WHV-Trägern dienen. Das Immunmodulans α -Galaktosyl-Ceramid führt bei chronisch HBV-infizierten, transgenen Mäusen durch direkte Aktivierung von NK-T-Zellen und indirekte Aktivierung von NK-Zellen (Kakimi *et al.*, 2000) zu einer Erhöhung der Interferon- γ Expression, insbesondere in der Leber (Kakimi *et al.*, 2000). In diesem Modell der transgenen, HBV-infizierten Maus wurde auch gezeigt, daß Interferon- γ in der Lage ist, die Virusreplikation zu inhibieren und so die Virämie in der Leber und im Serum zu senken (McClary *et al.*, 2000; Guidotti *et al.*, 1999; Guidotti *et al.*, 1994).

In der hier vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob α -Galaktosyl-Ceramid auch im natürlichen Infektionsmodell der chronischen Hepatitis B-Infektion, dem nordamerikanischen Waldmurmeltier (*Marmota monax*) mit dem Woodchuck-Hepatitis Virus (Roggendorf und Tolle, 1995), in der Lage ist, sein antivirales Potential zu entfalten und die Interferon- γ Produktion zu stimulieren. Mit dem RPA war es möglich, Leberbiopsien behandelter und unbehandelter Tiere auf ihren Gehalt an Cytokin- und T-Zell-Marker-RNA zu untersuchen. Der im Maus-Modell beschriebene Anstieg der Interferon- γ Produktion blieb jedoch entgegen der Erwartungen aus, ebenso konnte keine Senkung der Virämie oder der Replikation beobachtet werden. Da aufgrund der Chronizität der Infektion möglicherweise die Wirkung von α -Galaktosyl-Ceramid ausbleibt (K. Kakimi, Scripps Research Institute, La Jolla, Kalifornien, persönliche Mitteilung), wurde der Effekt von α -Galaktosyl-Ceramid auf Lymphocyten chronisch WHV-infizierter und naiver Woodchucks überprüft. Bei den Lymphocyten beider Tiergruppen konnte weder ein proliferativer Effekt (M. Isogawa, persönliche Mitteilung) noch ein Anstieg der Interferon- γ Expression beobachtet werden, so daß mit Sicherheit davon auszugehen ist, daß α -Galaktosyl-Ceramid im Murmeltier keine Wirkung zeigt. Die von Dr. Isogawa durchgeführte Kontrolle mit murinen

Lymphocyten, die nach α -Galaktosyl-Ceramid-Stimulation proliferieren, zeigt, daß es sich nicht um Fehler in der experimentellen Ausführung handelt, sondern um ein Spezies spezifisches Phänomen.

4.3.2. Weitere Anwendungsmöglichkeiten des RPA

Die weiteren Anwendungsmöglichkeiten des RNase-Protection Assays zeigen deutlich, daß die Technik für immunologische Untersuchungen im Woodchuck-Modell geeignet ist. So ist insbesondere bei der Behandlung des hepatozellulären Karzinoms mit rekombinanten, IL-12/B7.1 exprimierenden Adenovirusvektoren ein deutlicher Anstieg der Interferon- γ Expression im Tumor und ein Rückgang des Tumors zu erkennen (Pützer *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang spielt möglicherweise die Expression von Interleukin 15 eine entscheidende Rolle. Interleukin 15 stimuliert durch Aktivierung von NK Zellen zusammen mit IL-12 synergistisch die Expression von Interferon- γ , TNF- α und GM-CSF und ist bereits als Tumorthapeutikum in der Diskussion (Waldmann und Tagaya, 1999). Darüber hinaus zeigt IL-15 auch antivirale Aktivitäten, indem es z.B. bei der Herpes-Simplex Infektion die Cytotoxizität aktiviert und somit eine Lyse der infizierten Zellen bewirkt (Fehniger und Caligiuri, 2001). Die Rolle von IL-15 bei der HBV-Infektion ist noch unklar, aber es hat sich bei der HIV-Infektion gezeigt, daß IL-15 einen positiven, antiviralen Effekt ausübt (Waldmann und Tagaya, 1999; Fehniger und Caligiuri, 2001). Aufgrund der engen Verwandtschaft zwischen HIV und HBV (vergl. Abschnitt 1, Einleitung) könnte sich dieser Effekt auch in der HBV-Infektion zeigen.

4.3.3. Expression des Interferon γ Rezeptors des Murmeltiers

Die Wirkung von Interferon- γ ist im Woodchuck noch nicht aufgeklärt. Aus diesem Grund ist es naheliegend, die Wirkungsweise von Interferon- γ in weiteren Experimenten in Zukunft näher zu untersuchen, zumal Interferon- γ während der chronischen Infektion des Woodchucks mit WHV latent in unterschiedlich hohen Dosen exprimiert wird (s. vorhergehende Abschnitte). Will man die Wirkung von Interferon- γ im natürlichen Wirt studieren, so ist es naheliegend, dieses *in vivo* zu neutralisieren.

Biologisch wird Interferon durch Bindung an seinen Rezeptor oder ein virales Rezeptor Analogon neutralisiert (Alcami und Smith, 1995; Hsu *et al.*, 1986; Evans, 1996; Koziel, 1999), wobei es eine Signaltransduktionskaskade in Gang setzt

Es wurde gezeigt, daß sowohl Maus- als auch humanes Interferon durch Bindung an den löslichen Teil seines Rezeptors inaktiviert werden kann. Die Bindung an lösliche virale Interferon- γ Rezeptoren wie z.B. die des Vaccinia Virus, des Kuh-Pocken oder des Kamel-Pocken-Virus (Alcami und Smith, 1995) wird durch Immunreaktionen gegen das virale Protein erschwert und

kommt somit nicht für die *in vivo* Studien in Frage. Ähnliche Mechanismen zur Neutralisation von Cytokinen sind auch für das Epstein-Barr-Virus (EBV) und HBV beschrieben worden (Koziel, 1999). Da es bereits gelungen ist, biologisch aktive, lösliche Domänen des humanen und murinen Interferon- γ -Rezeptors überzuexprimieren (Aguet *et al.*, 1988; Cofano *et al.*, 1990; Gentz *et al.*, 1992; Fountoulakis *et al.*, 1991; Fountoulakis *et al.*, 1993), sollte dies im Woodchuck-Modell nachvollzogen werden.

Aus diesem Grund wurde der bereits klonierte Woodchuck Interferon- γ -Rezeptor in einen Baculovirus-Transfer-Vektor umklont und ein rekombinanter AcNPV-Stamm (*Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus) generiert. Dieser Baculovirus-Vektor wurde zur Infektion von Sf9 Zellen eingesetzt und war in der Lage, den löslichen Teil des Interferon- γ -Rezeptors in den Überstand dieser Zellen zu sezernieren. Mittels eines His-Tags war die Reinigung des Proteins aus dem Überstand möglich. In weiteren Versuchen soll geklärt werden, ob der Interferon- γ -Rezeptor in der Lage ist, rekombinantes Interferon- γ zu binden, und ob eine *in vivo* Neutralisation von Interferon- γ möglich ist. Auf diese Weise könnte die Wirkungsweise von Interferon- γ unter Umständen näher beleuchtet werden.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Glykosylierung des *middle surface antigen* des Woodchuck Hepatitis Virus untersucht werden. Dazu wurden chimäre Proteine aus der WHVpreS2/S-Region und dem S-Antigen von HBV mit der HBV 'a'-Determinante konstruiert. In der preS2-Region konnte durch zielgerichtete Mutagenese und *in vitro* Translations-Assays eine O-Glykosylierungsstelle an Position 5 (Thr) der Aminosäuresequenz identifiziert werden. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen und Konfokalmikroskopie wurde gezeigt, daß die Glykosylierung des preS2-Proteins eine wichtige Rolle für den intrazellulären Transport dieses Proteins spielt. Dabei wurde deutlich, daß falsche oder fehlende Glykosylierung zu einer ringförmigen Anreicherung des preS2-Proteins führt. Diese Ringbildung erfolgt nach den vorliegenden Daten zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat, also in dem zellulären Kompartiment, das für die O-Glykosylierung verantwortlich ist. Dies ist eine mögliche Erklärung für den Erfolg einer Therapie mit Glykosylierungsinhibitoren. Vergleichende Studien mit einer preS2-minus Chimäre zeigten, daß die Ringbildung nur bei fehlender Glykosylierung des preS2-Proteins auftritt, nicht aber bei nicht-Translation der preS2-Domäne. Der Therapieerfolg mit Glykosylierungsinhibitoren im Falle einer Infektion mit HBV-Varianten, denen das preS2-Protein fehlt, ist also fraglich.

Desweiteren sollte die Replikationskompetenz von WHV-Stämmen mit Glykosylierungsdefekt sollte mit Hilfe *in vivo* Transfektionen untersucht werden. Im Rahmen dieser Versuche konnte jedoch allenfalls die kurzfristige Expression viraler Proteine nachgewiesen werden, nicht aber die Replikation der glykosylierungsdefekten oder preS2minus Mutante. Ein Virustiter und damit Replikation konnte nicht nachgewiesen werden, und zwar weder für die preS2minus-Mutante, noch für die Variante mit dem Glykosylierungsdefekt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine RNase Protection Assay etabliert. Mit Woodchuck-spezifischen Sonden, sogenannten Riboprobes, kann die Expression der Cytokine IFN- γ , TNF- α und IL-15 sowie der T-Zellmarker CD3, CD4 und CD8 qualitativ und quantitativ untersucht werden. Es wurde gezeigt, daß die Marker CD3, CD4 und CD8 während der chronischen Infektion stärker exprimiert werden als in der Akutphase der Infektion. Alle untersuchten Cytokine und T-Zellmarker sind während der chronischen Infektion natürlichen Schwankungen unterworfen. Ausgehend von einem Mittelwert betragen diese Schwankungen $\pm 50\%$, gemessen in DLU. Diese Fluktuationen sind zehnmal so hoch wie die Schwankungen, die man beobachtet, wenn man zu einem einzigen Zeitpunkt multiple Biopsien aus verschiedenen Regionen einer einzigen Leber untersucht. Ebenfalls konnten unterschiedliche Expressionsmuster bei verschiedenen Tiere beobachtet werden.

Der RNase Protection Assay konnte bereits in mehreren Projekten erfolgreich zur Untersuchung der Cytokin- und T-Zellmarker-Expression eingesetzt werden. So konnte gezeigt werden, daß das Immunmodulans α -Galaktosyl-Ceramid Spezies-spezifisch wirkt, und im Woodchuck nicht zu einer Erhöhung der Interferon- γ Expression führt.

Mit Hilfe des RPA konnte darüber hinaus die Erhöhung der CD4, CD8 und Interferon- γ Expression nach einer Tumorthherapie mit einem rekombinanten Adenovirusvektor nachgewiesen werden. Die Erhöhung der Expression dieser Marker erfolgte durch einen Gentransfer der Gene für IL-12 und B7.1. Darüber hinaus sind seit kurzem Interferon- α und GAPDH aus dem Woodchuck als Konstrukte für den RNase Protection Assay verfügbar (Daten nicht gezeigt, Klonierung erfolgte analog zu 3.14), wodurch weitere Untersuchungen der Woodchuck-Immunantwort ermöglicht werden.

Durch die Expression des Interferon- γ -Rezeptors des Murmeltiers wurde der Grundstein für weitere Untersuchungen der Interferon- γ Wirkung gelegt. Aufgrund der bisherigen Daten müßte es daher in absehbarer Zukunft möglich sein, weitere immunologisch-virologische Studien der hepadnaviralen Infektion im natürlichen Infektionsmodell durchzuführen.

Anhang

Die Arbeit ist in Auszügen wie folgt veröffentlicht:

1. Pützer, B.M., T. Stiewe, F. Rödicker, O. Schildgen, S. Rühm, O. Diersch, M. Fiedler, U. Dahmen, B. Tennant, C. Scherer, F.L. Graham, M. Roggendorf: Large nontransplanted hepatocellular carcinoma in woodchucks: Treatment with Adenovirus-mediated delivery of interleukin 12/B7.1 genes; JNCI 93 (6), 2001
2. Schildgen, O., M. Fiedler, U. Dahmen, J. Li, L. Guidotti, M. Roggendorf: Expression of Cytokines in the liver of woodchucks during chronic woodchuck hepatitis virus (WHV) infection; Posterbeitrag im Rahmen des Kongresses "The molecular biology of hepatitis B viruses" im September 2000, Paris
3. Schildgen, O., M. Lu, X. Zheng, M. Roggendorf: Identifizierung einer Glykosylierungsstelle des präS2-Proteins des Woodchuck Hepatitis Virus (WHV); Posterbeitrag im Rahmen der Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie, März 2001, Dresden
4. Schildgen, O., B. Lohrengel, M. Fiedler, M. Lu, U. Dahmen, J. Li, M. Roggendorf: Cytokinexpression während der chronischen Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) Infektion; Posterbeitrag im Rahmen der Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie, März 2001, Dresden

Folgende Veröffentlichung ist in Vorbereitung:

O. Schildgen, M. Lu, X. Zheng, M. Roggendorf: Identification of a glycosylation site of the Woodchuck Hepatitis Virus preS2 protein and the role of this glycosylation site for protein trafficking

Fraktion	1	2	3	4	5	6	7	8	Bestätigung durch LSM
Zeit/ Konstrukt									
HBs 24					+++	+	++	+++	
HBs 48					++	+	+++	+	
HBs 72					+	+++	+++	+	
HybIII 24					+++	+	++	+	
HybIII 48					+	++	+++	+	
HybIII 72					+	+	+	+	
HybIII + I 24					+	+	+	+	
HybIII + I 48					+++	+	+++	+	
HybIII + I 72					++	++	+++	+	
Gly 24				+	+++	+	++	+	
Gly 48						+	+++	+	
Gly 72						++	+++	+	
preS2- 24				+	++		+		
preS2- 48					+	+	+++		
preS2- 72							+++		
Kontrolle 24									
Kontrolle 48									
Kontrolle 72									

Färbung des Blots mit α HBs

Fraktion	1	2	3	4	5	6	7	8	Bestätigung durch LSM
Zeit/ Konstrukt									
HBs 24					+++				
HBs 48					++				
HBs 72					+				
HybIII 24					+++				
HybIII 48					+				
HybIII 72					+				
HybIII + I 24									
HybIII + I 48									
HybIII + I 72									
Gly 24				+	+++				
Gly 48									
Gly 72									
preS2- 24				+	++				
preS2- 48					+				
preS2- 72									
Kontrolle 24									
Kontrolle 48									
Kontrolle 72									

Färbung des Blots mit α preS2

Zeit/ Fraktion Konstrukt	1	2	3	4	5	6	7	8	Bestätigung durch LSM
HBs 24					+				
HBs 48					+				
HBs 72					+	+			
HybIII 24					+				
HybIII 48					+				
HybIII 72					+				
HybIII + I 24					+				
HybIII + I 48					+				
HybIII + I 72					+				
Gly 24					+				
Gly 48					+				
Gly 72					+				
preS2- 24					+				
preS2- 48					+				
preS2- 72					+				
Kontrolle 24					+				
Kontrolle 48					+				
Kontrolle 72					+				

Färbung des Blots mit α cell-surface

Zeit/ Fraktion Konstrukt	1	2	3	4	5	6	7	8	Bestätigung durch LSM
HBs 24					+				
HBs 48					+		++		
HBs 72					+		+		
HybIII 24					+		+		
HybIII 48					+		+		
HybIII 72					+		+		
HybIII + I 24					+		+		
HybIII + I 48					+		+		
HybIII + I 72					+		+		
Gly 24					+		+		
Gly 48					+		+		
Gly 72					+		+		
preS2- 24					+		+		
preS2- 48	+				+		+		
preS2- 72	+				+		+		
Kontrolle 24					+		+		
Kontrolle 48					+		+		
Kontrolle 72	+				+		+		

Färbung des Blots mit α ERAB

Zeit/ Konstrukt	1	2	3	4	5	6	7	8	Bestätigung durch LSM
HBs 24					+		++	+	
HBs 48					+		+		
HBs 72					+		+		
HybIII 24					+		+	+	
HybIII 48					+		+	+	
HybIII 72					+		+	+	
HybIII + I 24					+		+		
HybIII + I 48					+		+		
HybIII + I 72					+		+	+	
Gly 24					+		+		
Gly 48					+		+		
Gly 72					+		+	+	
preS2- 24					+		+		
preS2- 48	+				+		+		
preS2- 72	+				+		+	+	
Kontrolle 24					+		+		
Kontrolle 48					+		+	+	
Kontrolle 72	+				+		+		

Färbung des Blots mit α Golgi-Zone

Zeit/ Konstrukt	1	2	3	4	5	6	7	8	Bestätigung durch LSM
HBs 24									
HBs 48				+			+	+	
HBs 72					+		+	+	
HybIII 24				+			+	+	
HybIII 48				+			+	+	
HybIII 72				+			+	+	
HybIII + I 24			+				+	+	
HybIII + I 48				+			+	+	
HybIII + I 72				+			+	+	
Gly 24			+				+		
Gly 48				+			+	+	
Gly 72				+			+	+	
preS2- 24				+			+		
preS2- 48				+			+	+	
preS2- 72				+			+	+	
Kontrolle 24							+		
Kontrolle 48							+		
Kontrolle 72							+		

Färbung des Blots mit α Proteasome

I. Sequenzen

1. Sequenz des Vektors pUC/CMV/WHV (M. Yu, persönliche Mitteilung)

AGCTTCCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAAC
ATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAG
TTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCG
CCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGAC
TTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGT
ATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCC
CAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAC
CATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTT
CAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCA
AAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA
TATAAGCAGCGACTTCTGTAACCATGTATCTTTTTCACCTGTGCTTTGTTTTGCCTGTGTTCCA
TGTCTTACTTTTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGATGGCTTTGGGGCATGGACATAGATCCCTA
TAAAGAATTTGGTTCATCTTATCAGTTGTTGAATTTTTCTTCTTTGGACTTCTTTCTTGACCTTA
ATGCTTTGGTGGACACTGCTACTGCCTTGTATGAAGAAGAGCTAACAGGTAGGGAACATTGCTCT
CCGCACCATACAGCTATTAGACAAGCTTTAGTATGCTGGGATGAATTAATAAATGATAGCTTG
GATGAGCTCTAACATAACTTCTGAACAAGTAAGAACAATCATAGTAAATCATGTCAATGATACCT
GGGACTTAAGGTGAGACAAAGTTTTATGGTTTTCATTTGTCTCATGTCTCACTTTCGGACAACATA
GTTCAAGAATTTTTAGTAAGTTTTGGAGTATGGATCAGAACTCGACGTCCATATAGACCTCCTAA
TGCACCCATTCTCTCGACTCTTCCGGAACATACAGTCATTAGGAGAAGAGGAGGTGCAAGAGCTT
CTAGGTCCCCCAGAAGACGCACTCCCTCTCCTCGCAGGAGAAGATCTCAATCACCGCGTCGCAGA
CGCTCTCAATCTCCATCTGCCAAGTCTGATCTTCAATGGGTACATAAACTAATGCAATTACAG
GTCTTTACTCTAACCAAGCTGCTCAGTTCATCCGAATTGGATTCAACCTGAGTTTCTGAACTT
CATTTACATAATGATTTAATTCAAAAATTGCAACAGTATTTTGGTCTTTGACTATAAATGAAA
GAGAAAATTGCAATTAATTTTTCTTGCCAGATTTTTCCCCAAAGCTACTAAATATTTCCCTTTAA
TTAAAGGCATAAAAAACAATTATCCTAATTTTTGCTTTAGAACATTTCTTTGCTACCGCAAATTAT
TTGTGGACTTTATGGGAAGCTGGAATTTTTGTATTTAAGGAAGAATCAAACAACCTTTGACTTTTAA
AGGTAAACCATATTCTTGGGAACACAGACAGCTAGTGCAACATAATGGGCAACAACATAAAAAGTC
ACCTTCAATCCAGACAAAATAGCAGCATGGTGGCCTGCAGTGGGCACTTATTACACAACCACTTA
TCCTCAGAATCAGTCAGTGTTCACCAGGAATTTATCAAACAACATCTCTGATAAATCCCAAAA
ATCAACAAGAACTGGACTCTGTTCTTATAAACAGATACAAACAGATAGACTGGAACATCTGGCAA
GGATTTCTGTGGATCAAAAATTTTCATTGGTTCAGCAGGGATCCTCCCCCAAACCTTATATAAA
TCAATCAGCTCAAACCTTTCGAAATCAAACCTGGGCCTATAATAGTTCCTCGGAATTCGGGACATAC
CACGTGGTTTTAGTTCGCTCAAACCTCAAACAATCGAGATCAAGGGAGAAAGCCTACTCCTCCA
ACTCCACCTCTAAGAGATACTCACCCCACTTAACTATGAAAAATCAGACTTTTTCATCTCCAGGG
GTTTCGTAGACGGATTACGAGACTTGACAACAACGGAACGCCAACACAATGCCTATGGAGATCCTT
TTACAACACTAAGCCCTGCGGTTCTACTGTATCCACCATATTGTCTCCTCCTCAGCGACTGGG
GACCCTGCACTGTCACCGGAGATGTCACCATCAAGTCTCCTAGGACTCCTCGCAGGATTACAGGT
GGTGTAGTTCTTGTGGACAAAAATCCTAACAAATAGCTCAGAATCTAGATTGGTGGTGGACTTCTC
TCAGTTTTCCAGGGGGCATAACCAGAGTGCCTGGCCAAAATTCGCAGTTCCAAACTTGCAAACAC
TTGCCAACCTCCTGTCCACCAACTTGCAATGGCTTTCGTTGGATGTATCTGCGGCGTTTTTATCAT
ATACCTATTAGTCTCGCTGCTGTGCCTCATCTTCTTGTGGTGTCTCCTGGACTGGAAAGGTTTTAA
TACCTGTCTGTCTTCAACCCACAACAGAAACAACAGTCAATTGCAGACAATGCACAATCTCT
GCACAAGACATGTATACTCCTCCTTACTGTTGTTGTTTAAACCTACGGCAGGAAATTGCACTTG
TTGGCCCATCCCTTTCATCATGGGCTTTAGGAAATTACCTATGGGAGTGGGCCTTAGCCCGTTTTCT
CTTGGCTCAATTTACTAGTGCCCTTGCTTCAATGGTTAGGAGGAATTTCCCTCATTGCGTGGTTTT
TTGCTTATATGGATGATTTGGTTTTGGGGGCCCACTTCTGAGCATCTTACCGCCATTTATTC
CATATTTGTTCTGTTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTGAATGTCAATAAAACAAAATGGTGGGG
CAATCATCTACATTTTCATGGGATATGTGATTACTAGTTTCAGGTGTATTGCCACAAGACAAACATG

TTAAGAAAATTTCCCGTTATTTGCACTCTGTTCTTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGT
GAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAAT
GCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGT
TGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTT
GCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTTCGC
TTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACCTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGG
CTCGGCTGTTGGGCACTGACAAATCCGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTG
CTCGCCTGTGTTGCCCACTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAA
TCCAGCGGACCTTCCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTC
GCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGTTTCGCCTCGGCGTCCGGTC
CGTGTGCTTGGTCTTACCTGTGCAGACTTGCGAACCATGGATTCCACCGTGAACCTTTGTCTCC
TGGCATGCAAATCGTCAACTTGGCATGCCAAGTAAGGACCTTTGGACTCCTTATATAAAAAGATCA
ATTATTAATAAATGGGAGGAGGGCAGCATTGATCCTAGATTATCAATATTTGTATTAGGAGGCG
GTAGGCATAAATGTATGCGACTTCTGTAACCATGTATCTTTTTACCTGTGCCTTGTTTTTGCCT
GTGTTCTATGTCCACTTTTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGATGGTTTTGGGGCATGGATATA
GATCCTTATAAGAATTTGGTTCATCTTATCAGTTGTTGAATTTTTCTTCTTTGGACTTCTTTCC
TGACCTTAATGCTTTGGTGGACACTGCTACTGCCTTGTATGAAGAAGAGCTAACAGGTAGGGAAC
ATTGCTCTCCGCACCATAACAGCTATTAGACAAGCTAATTCGAGCTCGAATTCACTGGCCGTGCTT
TTATAATGTGCTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCC
TTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCC
TGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCTTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGC
AAAATTGTAAACGTTAATATTTGTTAAAATTCGTGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTT
TAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGCCCGAGATAGGGTTGA
GTGTTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGA
AAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCTATCACCAAATCAAGTTTTTTGGGGTC
GAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAA
AGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCA
AGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGC
GTACTATGGTTGCTTTGACGTGGTGCATTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGC
CAGCCCCGACACCCGCCAATACCCGCTGACGCGTTTTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGC
TTACAGACAAGCTGTGACTGTCACCCGGAGCTGCATGTGTCAGAGTTTTTACCGTCATCACCGA
AACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATG
GTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTT
CTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATT
GAAAAGGAAGAGTATGAGTATTC AACATTTCCGTGTGCGCCTTATTCCCTTTTTTTCGCGCATTT
TGCCTTCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGTTGAAGATCAGTTGGG
TGCACGAGTGGGTTACATCGAATTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTGCCTCG
AAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATT
GACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATAACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTC
ACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGAGGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAA
CCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACC
GCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGA
AGCCATAACAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCTTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC
TATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGAT
AAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGG
AGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTA
TCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG
ATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGAT
TGATTTAAAACCTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGA
CCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCTACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGA
TCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACC
AGCGGTGGTTTTGTTTGC CGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCA

```
GAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACTACTTCAAGAACTCT
GTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCTAGTGGCGATAA
GTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGTAGCGGTCGGGCTGAA
CGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCTAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAG
CGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG
CAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTC
CTGTCGGGTTTTTCGTACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGC
CTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTTCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTTGCTCA
CATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTG
ATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGC
CCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGGTT
TCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCAC
CCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGTGGATAACAATTT
CACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCCCTCCAAAAAA
GCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAA
AAATTAGTCAGCCATG
```

2. Sequenz der CMV-Promotorregion des Vektors pUC/CMV/WHV

```
GTACACGCCTACCGCCCATTTGCGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACGACATTTTGGAAAGTCCCCT
TGATTTTGGTGCCAAAACAACTCCCATTTGACGTCAATGGGGTGGAGACTTGGAAATCCCCTGA
GTNAAACCGCTATCCACGCCCATTTGATGTACTGCCAAAACCGCATCACCATGGTAATAGCGATGA
CTAATACGTAGATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCATAAAGTCATGTACTGGGCATAATGCCAG
GCGGGCCATTTACCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCGTACTTGGCATATGATACACTTGATGTAC
TGCCAAGTGGGCAGTTTACCGTAAATACTCCACCCATTGACGTCAATGGAAAGTCCCTATTGGCG
TTACTATGGGAACATACGTCAATTATTGACGTCAATGGGCGGGGGTCTTGGGCGGTCAGCCAGGC
GGGCCATTTACCGTAAGTTATGTAACGCGGAACTCCATATATGGGCTATGAACTAATGACCCCCT
AATTGATTACTATTAATAACTAGTCAATAATCAATGTCAACATGGCGGTAATGTTGGACATGAGC
CAATATAAATGTACATATTATGATATGGATACAACGTATGCAATGGGCCAAGCTCATGGCTGACT
AATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAG
GAGGCTTTTTTGGAGGGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTT
GTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGC
CTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGT
CGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGGGAGAGGCGGTTTTGCG
TATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGTTCGTTCCGCTGCGGCGAG
CGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATAC
```

II. Literaturverzeichnis

Aguet, M., Z. Dembic, G. Merlin: Molecular cloning and expression of the human interferon- γ receptor; Cell 55 , 273-280, 1988

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson: Molecular biology of the cell, 3rd Ed. 1994, Garland Publishing, Inc., New York, 1994

- Alcami, A., G.L. Smith: Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble γ interferon receptors with novel broad species specificity; *J. Virol.* 69 (8), 4633-4639, 1995
- Allende, R., G.F. Kutish, W. Laegreid, Z. Lu, T.L. Lewis, D.L. Rock, J. Friesen, J.A. Galeota, A.R. Doster, F.A. Osorio: Mutations in the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus responsible for the attenuation phenotype; *Arch. Virol.* 145, 1149-1161, 2000
- Ando, K., L.G. Guidotti, S. Wirth, T. Ishikawa, G. Missale, T. Moriyama, R.D. Schreiber, H.J. Schlicht, S. Huang, F.V. Chisari: Class I restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells *in vivo*; *J. Immunol.* 152, 3245-3253, 1994
- Ando, K., T. Moriyama, L.G. Guidotti, S. Wirth, R.D. Schreiber, H.J. Schlicht, S. Huang, F.V. Chisari: Mechanism of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis; *J. Exp. Med.* 178, 1541-1554, 1993
- Andus, T., J. Bauer, W. Gerok: Effects of cytokines on the liver; *Hepatology* 13(2), 364-375, 1991
- Bancroft WH, Snitbhan R, Scott RM, *et al.* Transmission of hepatitis B virus to gibbons by exposure to human saliva containing hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* 1977 135:79-85.
- Barker LF, Chisari FV, McGrath PP, *et al.* Transmission of type B viral hepatitis to chimpanzees. *J Infect Dis* 1973 127:648-62.
- Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, *et al.* Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 1981 2:1129-33.
- Beasley RP, Hwang LY. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 1984 4:113-21.
- Block, T.M., X. Lu, A.S. Mehta, B.S. Blumberg, B. Tennant, B. Korba, D.M. Lansky, G.S. Jakob, R.A. Dwek: Treatment of chronic hepadnavirus infection in a woodchuck animal model with an inhibitor of protein folding and trafficking; *Nat. Med.* 4 (5), 610-614, 1998
- Blum HE, Haase AT, Harris JD, *et al.* Asymmetric replication of hepatitis B virus DNA in human liver: demonstration of cytoplasmic minus-strand DNA by blot analyses and in situ hybridization. *Virology* 1984 139:87-96.
- Bock, C.T., H.L. Tillmann, M.P. Manns, C. Trautwein: The preS region determines the intracellular localisation and appearance of Hepatitis B Virus; *Hepatology* 30 (2), 517-525, 1999
- Boshart, M., F. Weber, G. Jahn, K. Dorsch-Häsler, B. Fleckenstein, W. Schaffner: A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus; *Cell* 41, 521-530, 1985
- Breiner, K. M., S. Urban, B. Glass, H. Schaller: Envelope protein mediated down regulation of Hepatitis B Virus receptor in infected hepatocytes; *J. Virol.* 75 (1), 143-150, 2001
- Breiner, K.M., H. Schaller: Cellular receptor traffic is essential for productive duck hepatitis B virus infection; *J. Virol.* 74 (5), 2203-2209, 2000

- Bruns, M., S. Miska, S. Chassot, H. Will: Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles; *J.Virol.* 72 (2), 1462-1468, 1998
- Bruss, V., D. Ganem: The role of envelope proteins in Hepatitis B Virus assembly; *PNAS* 88 , 1059-1063, 1991
- Buendia, M.A., O. Paterlini: Liver Cancer, in: A.J. Zuckermann and H.C. Thomas (Hrsg.): *Viral hepatitis - scientific basis and management*; Churchill Livingstone, Edinburgh, 137-164
- Callard R, Gearing A. *The Cytokine FactsBook*. London Academic Press 1994.
- Cattaneo R, Will H, Hernandez N, *et al.* Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. *Nature* 1983 305:336-8.
- Carmann, W.F., L.T. Nimms: Pre-S/S gene variants of hepatitis B virus; *Tagungsband*, 108-115, 1997
- Cavanaugh, V.J., L.G. Guidotti, F.V. Chisari: Inhibition of hepatitis B Virus replication during Adenovirus and Cytomegalovirus infection in transgenic mice; *J.Virol.* 72 (4), 2630-2637, 1998
- Chambers, T.J., M. Halevy, A. Nestorowicz, C.M. Rice, S. Lustig: West Nile virus envelope proteins: nucleotide sequence analysis of strains differing in mouse neuroinvasiveness; *J.Gen.Virol.* 79, 2375-2380, 1998
- Chang, S.F., H.J. Netter, M. Bruns, R. Schneider, K. Frölich, H. Will: A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single stranded DNA; *Virology* 262, 39-54, 1999
- Chisari, F.V., P. Filippi, A. Mc Lachlan, D.R. Milich, M. Riggs, S. Lee, R.D. Palmiter, C.A. Pinkert, R.L. Brinster: Expression of hepatitis B virus large envelope polypeptide inhibits hepatitis B surface antigen secretion in transgenic mice; *J.Virol.* 60 (3), 880-887, 1986
- Chisari, F.V.: Hepatitis B virus transgenic mice: Models of viral immunobiology and pathogenesis; *Annu.Rev.Immunol* 150-173
- Chisari, F.V.: Rous-Whipple Award lecture. Viruses, immunity, and cancer: lessons from hepatitis B; *Am.J.Pathol.* 156 (4), 1117-1132, 2000
- Chisari, F.V.: Hepatitis B Virus immunopathogenesis; *Annu.Rev.Immunol.* 13, 29-60, 1995
- Chisari, Francis V. & Carlo Ferrari: Hepatitis B Virus Immunopathogenesis; *Annu.Rev.Immunol.* 13, S. 29-60, 1995
- Cofano, F., S.K. Moore, S. Tanaka, N. Yuhki, S. Landolfo, E. Appella: Affinity purification, peptide analysis, and cDNA sequence of the mouse interferon γ receptor; *J.Biol.Chem.* 265 (7), 4064-4071, 1990
- Cote, P., I. Toshkov, C. Bellezza, M. Ascenzi, C. Roneker, L.A. Graham, B.H. Baldwin, K. Gaye, I. Nakamura, B.E. Korba, B.C. Tennant, J.L. Gerin: Temporal pathogenesis of experimental neonatal Woodchuck Hepatitis Virus infection: Increased initial viral load and decreased severity of acute hepatitis during the development of chronic viral infection; *Hepatology* 32 (4), 807-817, 2000

- Cullen, B.R.: Trans activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism; *Cell* 46, 973-982, 1986
- Dane, D.S., C.H. Cameron, M. Briggs: Virus-like particles in serum of patients with Australia-Antigen-associated hepatitis; *Lancet* 1, 695-698, 1970
- Di, Q., J. Summers, J.B. Burch, W.S. Mason: Major differences between WHV and HBV in the regulation of transcription; *Virology* 229, 25-35, 1997
- Evans, C.H.: Cytokines and viral anti immune genes; *Stem Cells* 14, 177-184, 1996
- Fehniger, T.A., M.A. Caligiuri: Interleukin 15: biology and relevance to human disease; *Blood* 97 (1), 14-32, 2001
- Feitelson, M.A., I. Millmann, T. Halbherr, H. Simmons, B.S. Blumberg: A newly identified hepatitis B virus in tree squirrels; *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 83, 2233-2237, 1986
- Fernholz D., P.R. Galle, M. Stemler, M. Brunetto, F. Bonino, H. Will: Infectious hepatitis B virus variant in preS2 protein expression in a chronic carrier; *Virology* 194, 137-148, 1993
- Fernholz, D., G. Wildner, H. Will: Minor envelope proteins of duck hepatitis B virus are initiated at internal preS AUG codons but are not essential for infectivity; *Virology* 197, 64-73, 1993
- Fernholz, D., M. Stemler, M. Brunetto, F. Bonino, H. Will: Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce preS2 protein; *J.Hepatol.* 13 (4), 102-104, 1991
- Fountoulakis, M., E. Takacs-di Lorenzo, J.-F. Juranville, M. Manneberg: Purification of interferon γ -Interferin γ receptor complexes by preparative electrophoresis on native gels; *Analytical Biochem.* 208, 270-276, 1993
- Fountoulakis, M., E.-J. Schlaeger, R. Gentz, J.-F. Juranville, M. Manneberg, L. Ozmen, G. Garotta: Purification and biochemical characterization of a soluble mouse interferon γ receptor produced in insect cells; *Eur.J.Biochem.* 198, 441-450, 1991
- Fountoulakis, M., H.W. Lahm, A. Maris, M. Manneberg, D. Stueber, G. Garotta: A 25-kD stretch of the extracellular domain of the human interferon γ receptor is required for full ligand binding capacity; *J.Biol.Chem.* 266 (23), 14970-14977, 1991
- Fountoulakis, M., M. Zulauf, A. Lustig, G. Garotta: Stoichiometry of interaction between interferon γ and its receptor; *Eur.J.Biochem.* 208, 781-787, 1992
- Fourel, G., C. Trepo, L. Bougueleret, B. Henglein, A. Ponzetto, P. Tiollais, M.A. Buendia: Frequent activation of N-myc genes by hepadnavirus insertion in woodchuck liver tumors; *Nature* 347, 294-298, 1990
- Friedt, M., P. Gerner, E. Lausch, H. Trübel, S. Wirth: Mutations in the basic core promoter and the precore region of hepatitis B virus and their selection in children with fulminant and chronic hepatitis B; *Hepatology* 29, 1252-1258, 1999
- Fukuda, R., N. Ishimura, T. Nguyen, A. Chowdhury, S. Ishihara, N. Kohge, S. Akagi, M. Watanabe, S. Fukumoto: The expression of IL-2, IL-4 and interferon-- γ (IFN γ) mRNA using liver

- biopsies at different phases of acute exacerbation of chronic hepatitis B; *Clin.Exp.Immunol.* 100, 446-451, 1995
- Galibert, F., T.N. Chen, E. Mandart: Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: comparison with the hepatitis B virus sequence; *J.Virol.* 41 (1), 51-65, 1982
- Ganem, D., H.E. Varmus: The molecular basis of the hepatitis B viruses; *Annu.Rev.Biochem.* 56, 651-693, 1987
- Ganem, Don: Hepadnaviridae and their replication, in *Fields Virology*, 3rd. Edition, edited by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, *et al.*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia ©, S.2703-2737, 1996
- Gaudin, Y., P. de Kinkelin, A. Benmansour: Mutations in the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus that affect virulence for fish and the pH threshold for membrane fusion; *J.Gen.Virol.* 80, 1221-1229, 1999
- Gentz, R., A. Hayes, N. Grau, M. Fountoulakis, H.-W. Lahm, L. Ozmen, G. Garotta: Analysis of soluble human and mouse interferon γ receptors expressed in eukaryotic cells; *Eur.J.Biochem.* 210, 545-554, 1992
- Gerlich WH, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 1980 21:801-9.
- Girones, R., R.H. Miller: Mutation rate of the hepadnavirus genome; *Virology* 170, 595-597, 1989
- Goodbourn, S., L. Didcock, R.E. Randall: Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures; *J.Gen.Virol.* 81, 2341-2364, 2000
- Guidotti LG, Chisari FV. To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Curr Op Immunol* 1996 8:478-83.
- Guidotti LG, Guilhot S, Chisari FV. Interleukin-2 and interferon α/β downregulate hepatitis B gene expression *in vivo* by tumor necrosis factor dependent and independent pathways. *J Virol* 1994 8:1265-70.
- Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, *et al.* Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996 4:25-36.
- Guidotti, L.G., B. Matzke, H. Schaller, F.V. Chisari: High level hepatitis B virus replication in transgenic mice; *J.Virol.* 69 (10), 6158-6169, 1995
- Guidotti, L.G., F.V. Chisari: To kill or to cure: options in host defense against viral infection; *Curr.Opin.Immun.* 8, 478-483, 1996
- Guidotti, L.G., P. Borrow, A. Brown, H. McClary, R. Koch, F.V. Chisari: Noncytopathic clearance of lymphocyte choriomeningitis virus from the hepatocytes; *J.Exp.* 189 (10), 1555-1564, 1999
- Guidotti, L.G., R. Rochford, J. Chung, M. Shapiro, R. Purcell, F.V. Chisari: Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection; *Science* 284, 825-829, 1999

- Guidotti, L.G., T. Ishikawa, M.V. Hobbs, B. Matzke, R. Schreiber, F.V. Chisari: Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes; *Immunity* 4, 25-36, 1996
- Guo, J.-T., H. Zhou, C. Liu, C. Aldrich, J. Saputelli, T. Whitaker, M.I. Barrasa, W.S. Mason, C. Seeger: Apoptosis and regeneration of hepatocytes during recovery from transient hepadnavirus infections; *J.Virol.* 74 (3), 1495-1505, 2000
- Guo, J.-T., J.C. Pugh: Topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus suggests a mechanism for membrane translocation during particle morphogenesis; *J.Virol.* 71 (2), 1107-1114, 1997
- Heathcote J, Cameron CH, Dane DS. Hepatitis-B antigen in saliva and semen. *Lancet* 1974 1:71-3.
- Heermann, K.H., U. Goldmann, W. Schwartz, T. Seyffarth, H. Baumgarten, W.H. Gerlich: Large surface proteins of hepatitis B virus containing the preS sequence; *J.Virol.* 52 (2), 396-402, 1984
- Hobbs, M.V., W.O. Weigle, D.J. Noonan, B.E. Torbett, R.J. McEvilly, G.J. Caedenas, D.N. Ernst: Patterns of cytokine gene expression by CD4⁺ T cells from young and old mice; *J.Immun.* 150, 3602-3614, 1993
- Hollinger, F.Blaine: Hepatitis B Virus; in *Fields Virology*, 3rd. Edition, edited by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, *et al.*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia ©, S. 2739-2793, 1996
- Holzmann, H., F.X. Heinz, C.W. Mandl, F. Guirakhoo, C. Kunz: A single amino acid substitution in envelope protein E of Tick Borne Encephalitis virus leads to attenuation in the mouse model; *J.Virol.* 64, 5156-5159, 1990
- Howard, C.R.: The biology of hepadnaviruses; *J.gen.Virol.* 67, 1215-1235, 1986
- Hsu, H.-Y., M.-H. Chang, Y.-H. Ni, P.-I. Lee: Cytokine release of peripheral blood mononuclear cells in children with chronic hepatitis B virus infection; *JPNG* 29, 540-545, 1999
- Ishikawa T, Kuroki K, Lenhoff R, *et al.* Analysis of the binding of a host cell surface glycoprotein to the preS protein of duck hepatitis B virus. *Virology* 1994 202:1061-4.
- Junker-Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller H. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J* 1990 9:3389-96.
- Kägi D, Ledermann B, Burki K, *et al.* Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994 369:31-37.
- Kakimi, K., L.G. Guidotti, Y. Koezuka, F.V. Chisari: Natural killer T cell activation inhibits Hepatitis B Virus replication *in vivo*; *J.Exp.Med.* 192 (7), 921-930, 2000
- Kennedy, M.K., L.S. Spark: Characterization of interleukin 15 (IL15) and the IL-15 receptor complex; *J.Clin.Immunol.* 16(3), 1996
- Klingmuller U, Schaller H. Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor. *J Virol* 1993 67:7414-22.

Korba BE, Wells F, Tennant BC, *et al.* Hepadnavirus infection of peripheral blood lymphocytes *in vivo*: woodchuck and chimpanzee models of viral hepatitis. *J Virol* 1986 58:1-8.5.

Korba BE, Wells F, Tennant BC, *et al.* Lymphoid cells in the spleens of woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks are a site of active viral replication. *J Virol* 1987 61:1318-24.

Korba, B.A., H. Xie, K.N. Wright, W.E. Hornbuckle, J.L. Gerin, B.C. Tennant, K.Y. Hostetler: Liver targeted antiviral nucleosides: enhanced antiviral activity of phosphatidyl-dideoxyguanosine versus dideoxyguanosine in woodchuck hepatitis virus infection *in vivo*; *Hepatology* 23, 958-963, 1996

Koziel, M.J.: Cytokines in viral hepatitis; *Sem.Liv.Dis.* 19 (2), 157-169, 1999

Krone, B., A. Lenz, K.H. Heermann, M. Seifer, X.Y. Lu, W.H. Gerlich: Interaction between hepatitis B surface proteins and monomeric human serum albumin; *Hepatology* 11, 1050-1056, 1990

Kuby, J., R.A. Goldsby, T.J. Kindt, B.A Osborne: *Immunology*; 4thEd. W.H. Freeman and Company, New York 2000

Kuhn. R.J., D.E. Griffin, H. Zhang, H.G.M. Niesters, J.H. Strauss: Attenuation of Sinbis virus neurovirulence by using defined mutations in nonttranslated regions of the genome RNA; *J.Virol.* 66 (12), 7121-7127, 1992

Lambert, C., R. Prange: Dual topology of the Hepatitis B Virus large envelope protein: determinants influencing posttranslational preS translocation; *J.Biol.Chem.*, elektronische Vorab-Publikation, Artikel im Druck, April/ Mai 2001

Lanford, R.E., D. Chavez, R. Rico-Hesse, A. Mootnick: Hepadnavirus infection in captive gibbons; *J.Virol.* 74 (6), 2955-2959, 2000

Lanford, Robert E., Deborah Chavez, Kathleen M. Brasky, Roy B. Burns III, Rebeca Rico-Hesse: Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a new world primate; *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 95, 5757-5761, 1998

Lau, J.Y.N., A.G. Morris, G.J.M. Alexander, R. Williams: Interferon- γ receptor expression in chronic hepatitis B virus infection; *J.Hepatol.* 14, 294-299, 1992

Laub O, Rall LB, Truett M, *et al.* Synthesis of hepatitis B surface antigen in mammalian cells: expression of the entire gene and the coding region. *J Virol* 1983 48:271-80.

Lehninger, A.L., D.L. Nelson, M.M. Cox: *Prinzipien der Biochemie*; 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag 1994

Lien JM, Aldrich CE, Mason WS. Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis. *J Virol* 1986 57:229-36.

Lin, S.-M., I.-S. Sheen, R.-N. Chien, C.-M. Chu, Y.-F. Liaw: Longterm beneficial effect of interferon therapy in patients with chronic hepatitis B virus infectio; *Hepatology* 29, 971-975, 1999

- Lohrengel, B., M. Lu, D. Bauer, M. Roggendorf: Expression and purification of woodchuck tumor necrosis factor α ; Cytokine 12 (6), 573-577, 2000
- Lohrengel, B., M. Lu, M. Roggendorf: Molecular cloning of the woodchuck cytokines: TNF- α , IFN- γ , and IL-6; Immunogenetics 47, 332-335, 1998
- Lohrengel, B.: Antivirale Cytokine in der frühen Phase der Woodchuck Hepatitis Virus Infektion; Inaugural Dissertation des Fachberichts Bio-und Geowissenschaften der Universität Essen, 1999-2000
- Lokeshwar, V.B., N. Iida, L.Y.W. Bourguignon: The cell adhesion molecule, gp116, is a new CD44 variant (ex14/v10) involved in hyaluronic acid binding and endothelial cell proliferation; J.Biol.Chem. 271 (39), 23853-23864
- Lottspeich, F., H. Zorbas (Hrsg.): Bioanalytik; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1. Auflage 1998
- Lu, M., G. Hilken, J. Kruppenbacher, T. Kemper, R. Schirmbeck, J. Reimann, M. Roggendorf: Immunization of woodchucks with plasmids expressing woodchuck hepatitis virus (WHV) core antigen and surface antigen suppresses WHV infection; J.Virol. 73 (1), 281-289, 1999
- Mandl, C.W., H. Holzmann, T. Meixner, R. Rauscher, P.F. Stadler, S.L. Allison, F.X. Heinz: Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus; J.Virol.72, 2132-2140, 1998
- Marion, P.L., L. Oshiro, D.C. Regnery, G.H. Scullard, W.S. Robinson: A virus in B eechy ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans; Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 2941-2945, 1980
- Martire, G., A. Viola, L. Iodice, R. Gradini, S. Bonatti: Hepatitis C Virus structural proteins reside the endoplasmatic reticulum as well as in the intermediate compartment/cis-Golgi complex region of stably transfected cells; Virology 280, 176-182, 2001
- Mason, W.S., G. Seal, J. Summers: An HBV like virus of domestic ducks; Proceedings of the 1980 Symposium on viral Hepatitis, Alter, H. (Ed.), The Franklin Institute Press, Philadelphia, 107-116
- McLary, H., R. Koch, F.V. Chisari, L.G. Guidotti: Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines; J.Virol. 74 (5), 2255-2264, 2000
- McLean AA. Hepatitis B vaccine: a review of the clinical data to date. J Am Dent Assoc 1985 110:624-8.
- Meisel, H., I. Sominskaya, P. Pumpens, P. Pushko, G. Borisova, R. Deepen, X. Lu, G.H. Spiller, D.H. Krüger, E. Grens, W.H. Gerlich: Fine mapping and functional characterization of two immuno dominant regions from the preS2 sequence of hepatitis B virus; Intervirology 37, 330-339, 1994
- Miller RH, Kaneko S, Chung CT, *et al.* Compact organization of the hepatitis B virus genome. Hepatology 1989 9:322-7
- Miller, R.H., S. Kaneko, C.T. Shung, R. Girones, R.H. Purcell: Compact organisation of the hepatitis B virus genome; Hepatol. 9, 322-327, 1989

- Modrow, S., D. Falke: *Molekulare Virologie*; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1. Auflage, 1997
- Moriyama, T., S. Guilhot, K. Klopchin, B. Moss, C.A. Pinkert, R.D. Palmiter, R.L. Brinster, O. Kanagawa, F.V. Chisari: Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice; *Science* 248, 361-364, 1990
- Mosley JW. The epidemiology of viral hepatitis: an overview. *Am J Med Sci* 1975 270:253-70.
- Nassal, M., H. Schaller: Hepatitis B virus replication- an update; *J.Vir.Hep.* 3, 217-226, 1996
- Neurath, A.R., Y. Thanavala: Hepadnaviruses; in *Immunochemistry of viruses II: The Basis for Serodiagnosis and vaccines*, van Regenmortel, M.H.V. (ed.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 403-458, 1990
- Pohl, C.J., P.J. Cote, R.H. Purcell, J.L. Gerin: Failure to detect polyalbumin binding sites on the woodchuck hepatitis virus surface antigen: implications for the pathogenesis of hepatitis B virus in humans; *J.Virol.* 60 (3), 943-949, 1986
- Poisson, F., A. Severac, C. Hourieux, A. Goudeau, P. Roingeard: Both preS1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle; *Virology* 228, 115-120, 1997
- Pollicino, T., A.R. Zanetti, I. Cacciola, M.A. Petit, A. Smedile, S. Campo, L. Sagliocca, M. Pasquali, E. Tanzi, G. Longo, G. Raimondo: PreS2 defective hepatitis B virus infection in patients with fulminant hepatitis; *Hepatology* 26, 495-499, 1997
- Pollicino, T., S. Campo, G. Raimondo: PreS and core gene heterogeneity in hepatitis B virus (HBV) genomes isolated from patients with long lasting HBV chronic infection; *Virology* 208, 672-677, 1995
- Pützer, B.M., T. Stiewe, F. Röddicker, O. Schildgen, S. Rühm, O. Diersch, M. Fiedler, U. Dahmen, B. Tennant, C. Scherer, F.L. Graham, M. Roggendorf: Large nontransplanted hepatocellular carcinoma in woodchucks: Treatment with Adenovirus-mediated delivery of interleukin 12/B7.1 genes; *JNCI* 93 (6), 2001
- Robinson, W.S., R.H. Miller, P.L. Marion: Hepadnaviruses and retroviruses share genome homology and features of replication; *Hepatology* 7 (1), 64-73, 1987
- Robinson, W.S., R.L. Greenman: DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate; *J.Virol.* 13, 1231-1236, 1974
- Roggendorf, M., T.K. Tolle: The woodchuck: an animal model for human hepatitis B virus infection in man; *Intervirology* 38, 100-112, 1995
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis: *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989
- Sandblom, P., V. Mirkovitch, D. Gardiol: The healing of liver wounds; *Ann.Surg.* 679-684, 1976
- Santantonio, T., M.-C. Jung, R. Schneider, D. Fernholz, M. Milella, L. Monno, G. Pastore, G.R. Pape, H. Will: Hepatitis B virus genomes that cannot synthesize preS2 proteins occur frequently and as dominant virus populations in chronic carriers in Italy; *Virology* 188, 948-952, 1992

Satoh, M., K. Adachi, T. Suda, M. Yamazaki, D. Misuno: TNF-driven inflammation during mouse liver regeneration after partial hepatectomy and its role in growth regulation of liver; *Mol.Biother.* 3, 136-147, 1991

Scaglioni, P.P., M. Melegari, J.R. Wands: Characterization of hepatitis B virus core mutants that inhibit viral replication; *Virology* 205, 112-120, 1994

Schödel, F., R. Sprengel, T. Weimer, D. Fernholz, R. Schneider, H. Will: Animal hepatitis B viruses; in: *Advances in viral oncology*, Vol. 8, G. Klein (ed.), Raven Press Ltd., New York, 72-103, 1989

Seeger C, Ganem D, Varmus HE. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* 1986 232:477-84.

Seeger, C., B. Baldwin, B.C. Tennant: Expression of infectious woodchuck hepatitis virus in murine and avian fibroblasts; *J.Virol.* 63 (11), 4665-4669, 1989

Seeger, C., W.S. Mason: Hepatitis B virus biology; *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 64 (1), 51-68, 2000

Shamoon, B.M., E. Mandart, A. Kay, F. Galibert: Woodchuck Hepatitis surface antigen produced *in vitro* fails to bind polymerized woodchuck serum albumin; *J. gen.Virol.* 75, 2081-2084, 1994

Sheron, N., J. Lau, H. DSaniels, J. Goka, A. Eddleston, G.J.M. Alexander, R. Williams: Increases production of tumor necrosis factor α in chronic hepatitis B virus infection; *J.Hepatol.* 12, 241-245, 1991

Smith, R.A., C. Baglioni: The activity of tumor necrosis factor is a trimer; *J.Biol.Chem.* 262 (15), 6951-6954, 1987

Sprengel, R., E.F. Kaleta, H. Will: Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons; *J. Virol.* 62, 3832-3839, 1988

Standring, D.N., J.-H. Ou, W.J. Rutter: Assembly of viral particles in *Xenopus* oocytes: pre surface antigens regulate secretion of the hepatitis viral surface envelope particle; *PNAS* 83, 9338-9342, 1986

Stryer, L.: *Biochemie*; 2. und 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag 1987 und 1999

Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 1982 29:403-15.

Summers, J., J.M. Smolec, R. Snyder: A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks; *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 75, 4533-4537, 1978

Takaya, Y., R.N. Bamford, A.P. DeFilippis, T.A. Waldmann: IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signalling pathways whose expression is controlled at multiple levels; *Immunity* 4, 329-336, 1996

Ta-Tung Yuan, T., C. Shih: A frequent, naturally occurring mutation (P130T) of human hepatitis B virus core antigen is compensatory for immature secretion phenotype of another frequent variant (I97L); *J. Virol.* 74 (10), 4929-4932, 2000

- Ta-Tung Yuan, T., P.-C. Tai, C. Shih: Subtype independent immature secretion and subtype dependent replication deficiency of a highly frequent, naturally occurring mutation of human Hepatitis B Virus core antigen; *J.Virol.* 73 (12), 10122-10128, 1999
- Testut, Patrice, Claire-Angelique Renard, Olivier Terradillos, Ludmilla Vitvitski-Trepeo, Fredj Tekaiia, Claude Degott, John Blake, Bert Boyer, Marie Annick Buendia: A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska; *J.Virol.* 70 (7), 4210-4219, 1996
- Tiollais, P., C. Pourcel, A. Dejean; The hepatitis B virus; *Nature* 317, 489-495, 1985
- Tiollais, P., M.A. Buendia, C. Brechot, A. Dejean, M.L. Michel, C. Pourcel: Structure, genetic organisation and transcription of hepadnaviruses; in: *Viral hepatitis and liver disease*, Zuckerman, A.J. (ed.), Alan R. Liss Inc., New York, 295-300, 1988
- Tolle, Tanja K., Dieter Glebe, Monica Linder, Dietmar Linder, Sigrid Schmitt, Rudolf Geyer, Wolfram H. Gerlich: Structure and glycosylation patterns of surface proteins from Woodchuck Hepatitis Virus; *J.Virol.* 72 (12), 9978-9985, 1998
- Tong, S., J. Li, J.R. Wands: Carboxypeptidase D is an avian hepatitis virus receptor; *J.Virol.* 73 (10), 8696-8702, 1999
- Tyler GV, Snyder RL, Summers J. Experimental infection of the woodchuck (*Marmota monax*) with woodchuck hepatitis virus. *Lab Invest* 1986 55:51-5.
- Tyler GV, Summers JW, Snyder RL. Woodchuck hepatitis virus in natural woodchuck populations. *J Wildl Dis* 1981 17:297-301.
- Ueda, K., T. Tsurimoto, K. Matsubara: Three envelope proteins of hepatitis B virus: large S, middle S, and major S proteins needed for the formation of Dane particles; *J.Virol.* 65 (7), 3521-3529, 1991
- Waldmann, T.A., Y. Tagaya: The multifaceted regulation of interleukin 15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens; *Ann.Rev.Immunol.* 17, 19-49, 1999
- Walsh CM, Matloubian M, Liu C, *et al.* Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 91:10954-8.
- Warren, K.S., J.L. Heeney, R.A. Swan, Heriyanto, E.J. Verschoor: A new group of hepadnaviruses naturally infecting Orangutans (*Pongo pygmaeus*); *J.Virol.* 73 (9), 7860-7865, 1999
- Wei, Y., G. Fourel, A. Ponzetto, M. Silvestro, P. Tiollais, M.A. Buendia: Hepadnavirus integration: mechanism of activation of the N-myc2 retrotransposon in woodchuck liver tumors; *J.Virol.* 66 (9), 5265-5276, 1992
- Werr, M., R. Prange: Role for calnexin and N-linked glycosylation in the assembly and secretion of Hepatitis B Virus middle envelope protein particles; *J.Virol.* 72 (1), 778-782, 1998
- Wiertz, E.J.H.J., D. Tortorella, M. Bogyo, J. Yu, W. Mothes, T.R. Jones, T.A. Rapoport, H.L. Ploegh: Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction; *Nature* 384, 432-438, 1996

- White, D.O., F.J. Fenner: *Medical Virology*, 4thEd.; Academic Press San Diego, 1994
- Will H, Reiser W, Weimer T, *et al.* Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol* 1987 61:904-11.
- Wong DC, Shih JW, Purcell RH, *et al.* Natural and experimental infection of woodchucks with woodchuck hepatitis virus, as measured by new, specific assays for woodchuck surface antigen and antibody. *J Clin Microbiol* 1982 15:484-90.
- Wright J, Tennant BC, May B. Genetic variation between woodchuck populations with high and low prevalence rates of woodchuck hepatitis virus infection. *J Wildl Dis* 1987 23:186-91.
- Yamaguchi, T., M. Ogawa, Y. Inoshima, M. Miyoshi, H. Fukushi, K. Hirai: Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus; *Virology* 223, 219-223, 1996
- Yi Sheu, S., S.J. Lo: Biogenesis of the hepatitis B viral middle (M) surface protein in a human hepatoma cell line: demonstration of an alternative secretion pathway; *J.Gen.Virol.* 75, 3031-3039, 1994
- Yu, M., R.H. Miller, S. Emerson, R.H. Purcell: A hydrophobic heptad repeat of the core protein of woodchuck hepatitis virus is required for capsid assembly; *J.Virol.* 70 (10), 7085-7091, 1996
- Yu, Minshu, Suzanne U. Emerson, Paul Cote, Max Shapiro, Robert H. Purcell: The GDPAL region of the pre-S1 envelope Protein is important for the morphogenesis of Woodchuck Hepatitis Virus; *Hepatology* 27 (5), 1408-1414, 1998
- Zheng, L., G. Fisher, R.E. Miller, J. Peschon, D.H. Lynch, M.J. Leonardo: Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor; *Nature* 377, 348-351, 1995
- Zheng, X.: The characterization of antibody responses to HBsAg and WHsAg induced by DNA immunization; *Inaugural-Dissertation der medizinischen Fakultät Essen*, 2000
- Zhou, T., J.T. Guo, F.A. Nunes, K.L. Molnar-Kimber, J.M. Wilson, C.E. Aldrich, J. Saputelli, S. Litwin, L.D. Condreay, C. Seeger, W.S. Mason: Combination therapy with lamivudine and Adenovirus causes transient suppression of chronic woodchuck hepatitis virus infection; *J.Virol.* 74 (24), 2000

Lebenslauf

- zeitliche Gliederung -

Persönliche Daten

Name: Oliver Ernst Schildgen
Geburtsdatum und Ort: 23.07.1974 in Nürnberg
Familienstand: ledig

Berufsausbildung und schulische Laufbahn

seit 01.03.1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter (Forschung und Lehre) im Institut für Virologie der Universitätskliniken Essen, seit 25.06.1999 Strahlenschutzbeauftragter des Instituts für Virologie

01.01.1999-28.02.1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter im Max-Planck-Institut für neurologische Forschung Köln in der Arbeitsgruppe "Gentherapie maligner Hirntumore und Virologie"; Titel des Projekts: Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts von Insektenzellen infolge der Infektion mit dem Baculovirus AcMNPV

01.07.1998-31.12.1998 wissenschaftlicher Mitarbeiter des Instituts für Genetik der Universität zu Köln, Abteilung für Virologie Titel des Projekts: "Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts von Insektenzellen infolge der Infektion mit dem Baculovirus AcMNPV"

23.06.1998 Erlangung des akademischen Grades Diplombiologe, Gesamtnote -sehr gut-

05.05.1997-23.06.98 Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln mit dem Titel "*Molekularbiologische Untersuchungen der Pathogenitätsdeterminanten verschiedener Echovirus 9 Stämme*", angefertigt im Institut für Virologie der Universität zu Köln

Lebenslauf

- Fortsetzung -

- 01.10.1997-31.01.1998** Leitung eines Tutoriums Biologie im Rahmen des Programms "Qualität der Lehre" für Studienanfänger des Faches Biologie (Diplom) als studentischer Mitarbeiter des Instituts für Botanik der Universität zu Köln
- April 1997** Diplomprüfungen im Fachbereich Biologie der Universität zu Köln; Hauptfach Genetik (sehr gut), Nebenfächer Zoologie (gut) und Pharmakologie (gut-)
- 01.04.1996-30.05.1997** studentischer Mitarbeiter des Instituts für Zoologie der Universität zu Köln, Lehrstuhl für Morphologie und Entwicklung; Mitarbeit in Forschung und Lehre (Anfängerpraktikum Zoologie)
- 06.10.1995** Diplomvorprüfung im Fach Biologie an der Universität zu Köln, bestanden mit der Gesamtnote -gut-
- 01.10.1993** Immatrikulation an der Universität zu Köln im Studiengang Biologie
- 1984-1993** Besuch des städtischen Apostelgymnasiums Köln, Abgang 1993 nach bestandener Abiturprüfung (Durchschnittsnote 2,0)
- 1980-1984** Besuch der Grundschule in Ahrensburg und Köln

Erklärungen gemäß § 6, Abs. 2, 6-8, Promotionsordnung der FachBereiche 6-9 der Universität Gesamthochschule Essen

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. Promotionsordnung § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Fachbereiche 6-9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Identifizierung einer O-Glykosylierungsstelle der Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) preS2-Domäne und deren Einfluß auf den intrazellulären Transport des *middle surface antigen* (WHmsAg)“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Schildgen befürworte.

Essen, den 3.7.2001

(Prof. Dr. M. Roggendorf)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. Promotionsordnung § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Fachbereiche 6-9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfaßt habe und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Köln/ Essen, den 3.7.2001

(Dipl.-Biol. Oliver Schildgen)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. Promotionsordnung § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Fachbereiche 6-9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Köln/ Essen, den 3.7.2001

(Dipl.-Biol. Oliver Schildgen)