



**KOMBINATIONSTHERAPIE VON ENTECAVIR UND  
DNA-PROTEIN-VAKZINEN BEI CHRONISCHEN  
HEPADNAVIRUS-INFEKTIONEN IM  
MURMELTIER-MODELL**

**CLAUDIA BUDDE**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Virologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. H.-J. Thiel

und

dem Institut für Virologie

der Universität Duisburg-Essen

Betreuer: Prof. Dr. M. Roggendorf

**Kombinationstherapie von Entecavir und DNA-Protein-  
Vakzinen bei chronischen Hepadnavirus-Infektionen im  
Murmeltier-Modell**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

CLAUDIA BUDDE

Tierärztin aus Düsseldorf

Gießen 2009

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. H.-J. Thiel  
Prof. Dr. M. Roggendorf

Tag der Disputation: 25.11.2009

Meinen Eltern,  
meiner Großmutter,  
meinem Bruder  
und Jens...

...in Liebe und Dankbarkeit.



---

1. Einleitung	1
2. Ziel der Arbeit	3
3. Literaturübersicht	4
3.1 Hepadnaviren	4
3.1.1 Morphologie	5
3.1.2 Das Genom der Hepadnaviren	6
3.1.3 Virale Replikation	8
3.1.4 Virale Transkription	9
3.1.5 Virale Proteine	10
3.2 Das Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)	12
3.2.1 Verbreitung des WHV	12
3.2.2 Natürliche und experimentelle Infektion mit dem WHV	13
3.2.3 Serologische Diagnostik der WHV-Infektion	14
3.2.4 Chronische WHV-Infektion und Leberzellkarzinome	15
3.3 Immunantwort nach einer HBV-Infektion beim Menschen	16
3.3.1 Humorale Immunantwort gegen HBV	17
3.3.2 Zelluläre Immunantwort gegen HBV	18
3.4 Die chronische HBV-Infektion	19
3.5 Woodchuck als Tiermodell für die Therapie der chronischen Hepadnavirus-Infektion	20
3.6 Therapie der chronischen HBV-Infektion	21
3.6.1 Interferone	21
3.6.2 Antivirale Therapie chronischer HBV-Carrier mit Nukleosidanaloga	22
3.6.3 Therapeutische Vakzinierung chronischer WHV-Carrier	24
4. Material und Methoden	27
4.1 Material	27
4.1.1 Versuchstiere	27
4.1.2 Plasmide	28
4.1.3 Peptide	29
4.1.4 Chemikalien	30
4.1.5 Plastikwaren	31
4.1.6 Geräte	32
4.1.7 Häufig verwendete Puffer	32



---

4.2 Methoden	33
4.2.1 Versuchsdurchführung	33
4.2.1.1 Blutentnahme	34
4.2.1.2 Biopsie	34
4.2.1.3 Immunisierung von chronischen WHV-Carriern	35
4.2.2 Serologische Nachweise	36
4.2.2.1 ELISA für anti-WHc	36
4.2.2.2 ELISA für anti-WHs	37
4.2.2.3 ELISA für WHsAg	38
4.2.2.4 Bestimmung der GOT und GPT	38
4.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	39
4.2.3.1 Qualitative PCR	39
4.2.3.2 Quantitative PCR	40
4.2.4 WHV-DNA-Nachweis im Serum (Spot Blot)	41
4.2.4.1 DNA-Immobilisierung auf Nitrozellulose	41
4.2.4.2 Radioaktive Markierung der Gensonde	42
4.2.4.3 DNA-Hybridisierung und Nachweis	42
4.2.5 Nachweis von DNA aus Lebergewebe (Southern Blot)	43
4.2.5.1 Aufbereitung des Gewebes	43
4.2.5.2 Herstellung eines Agarosegels	43
4.2.5.3 Aufbringen der Proben	44
4.2.5.4 Übertragung der DNA auf eine Membran	44
4.2.5.5 Radioaktive Markierung der Gensonde	45
4.2.5.6 DANN-Hybridisierung und Nachweis	45
4.2.6 Histologische Untersuchung der Leber	46
4.2.7 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)	47
4.2.8 Proliferationstest mit $2[{}^3\text{H}]$ -Adenin	48
4.2.8.1 Stimulation der PBMCs mit Mitogenen	48
4.2.8.2 Stimulation der PBMCs mit WHV-Antigenen	49
5. Ergebnisse	50
5.1 Allgemeines	50
5.1.1 Versuchstiere	50
5.1.2 Entecavir-Aufnahme	52
5.2 Kinetik der WHV-DNA und anderer Parameter während der Therapie mit ETV	52
5.2.1 Kontrollgruppe (Gruppe A)	52
5.2.2 Entecavirgruppe (Gruppe B)	61
5.2.3 Entecavir + DNA-Vakzine-Gruppe (Gruppe C)	69
5.2.4 Entecavir + DNA/Protein-Vakzine-Gruppe (Gruppe D)	79
5.2.5 Allgemeines zu den Proliferationstests	88

---

6. Diskussion	91
6.1 Ursachen der chronischen Infektion	91
6.2 Ziel der Kombinationstherapie	93
6.3 Covalent closed circular DNA (CCCDNA)	93
6.4. Nucleosidanaloga	95
6.4.1 Lamivudin (3TC)	95
6.4.2 Adefovir	96
6.4.3 Entecavir (ETV)	96
6.5 DNA-Vakzine	98
6.6 Probleme Woodchuck-Modell: Winterschlaf, Applikation von Medikamenten, etc.	100
6.7 WHV-DNA und Antikörperbestimmung	103
6.8 Messung der T-Zell-Antwort	105
6.9 Schlussfolgerung	111
7. Zusammenfassung	112
8. Summary	114
9. Danksagung	116
10. Anhang	117
10.1 Erklärung zur „Guten wissenschaftlichen Praxis“	117
10.2 Abkürzungsverzeichnis	118
10.3 Literaturverzeichnis	121



# 1. Einleitung

Laut Weltgesundheitsorganisation WHO ist die Hepatitis B Infektion die am häufigste auftretende Infektionskrankheit der Leber weltweit. Schätzungen der WHO zur Folge haben mehr als zwei Milliarden Menschen eine Infektion mit dem HB-Virus durchgemacht. In 90 % der Fälle verläuft die Infektion akut, d. h. die Patienten genesen wieder von der Infektion und bilden eine Immunität gegen das Virus aus. In 10 % der Fälle kommt es bei Erwachsenen zu einem chronischen Verlauf der Infektion. Dies bedeutet, dass ca. 300 - 420 Millionen Menschen (5 – 7 % der Gesamtbevölkerung) chronisch mit HBV infiziert sind. In Deutschland beläuft sich die Zahl der chronisch infizierten Patienten auf 250.000 - 650.000 (0,6 % der Bevölkerung). Gerade bei Neugeborenen ist die Chronifizierungsrate besonders hoch. Kinder im Alter von vier Jahren bilden zu mehr als 50 % eine chronische Hepatitis aus. Mit steigendem Alter der infizierten Patienten sinkt diese Chronifizierungsrate.

Von einer chronischen Infektion mit HBV spricht man dann, wenn sechs Monate nach der Infektion eine Persistenz des Virus nachgewiesen wird. Die Übertragung des Virus erfolgt v. a. parenteral durch ungeschützten Geschlechtsverkehr (50 % der Infektionen). Risikogruppen sind v. a. Drogenabhängige, Empfänger von Blutprodukten, ungeimpftes medizinisches Personal und Menschen mit einem engen Kontakt zu HBsAg-Trägern.

Das einzige Reservoir für dieses Virus ist der Mensch. HBV kommt weltweit vor, endemisch aber in China, Südostasien, Naher und Mittlerer Osten (v. a. die Türkei) und in Teilen Afrikas. In den sog. Industriestaaten liegt die Prävalenz für HBV unter 1 % (Deutschland 0,3 - 0,5 %), während sie in den oben genannten Gebieten teilweise bei über 10 % liegt.

Viele chronische HBV-Infektionen verlaufen asymptomatisch. Häufige Folgeerkrankungen sind eine Leberzirrhose und Hepatozelluläre Karzinome (Hepatocellular Carcinoma, HCC). 60 – 80 % aller auftretenden HCC sind Virus-induziert (HBV und HCV). Zwei Millionen Menschen sterben jährlich an den Folgen einer HBV-Infektion (sowohl akute als auch chronische Verläufe), allein eine Million davon an den unmittelbaren Folgen von HCC.

Die vorbeugende Impfung ist zurzeit die wichtigste Maßnahme im Kampf gegen die HBV-Infektion. Die HBV-Vakzine besteht aus Hüllproteinen des HBV (HBsAg). Die Impfstoffe enthalten an Aluminiumhydroxid absorbiertes HBsAg in unterschiedlicher Dosierung. Das übliche Impfprotokoll sieht eine Dreifachimpfung zum Zeitpunkt null, ein und sechs Monaten vor. Dies führt zur Bildung protektiver Antikörper (anti-HBs) bei über 95 % der Patienten. Nach fünf Jahren sollte eine Wiederholungsimpfung angeschlossen werden. Diese Impfung ist nur bei Personen sinnvoll, die noch keinerlei Kontakt mit dem HBV hatten. Bei chronisch HBV-infizierten Patienten ist die Impfung ohne Wirkung, daher müssen andere Therapie-Strategien verwendet werden.

Die z. Z. gängigste Therapie der chronischen HBV-Infektion ist eine Behandlung mit Interferon- $\alpha$  für mindestens sechs Monate. Allerdings führt diese Form der Behandlung nur bei 30 – 40 % der Patienten zum Erfolg. Erfolg bedeutet in diesem Fall, dass die chronisch infizierten Patienten nach der Therapie in der Lage sind, das Virus zu eliminieren und möglicherweise zusätzlich noch eine stabile Immunität aufzubauen, die vor Re-Infektionen schützt. Aufgrund des mäßigen Therapieerfolges mit IFN- $\alpha$  wird immer weiter nach neuen Behandlungskonzepten geforscht, um die übrigen 60 – 70 % der Patienten erfolgreich therapieren zu können, und um v. a. die Zahl der daraus resultierenden HCC zu reduzieren. Neuere Therapieansätze beziehen sich auf den Einsatz von verschiedenen Nukleosidanaloga, gegebenenfalls mit zusätzlicher Gabe von INF- $\alpha$ . Das Nukleosidanalogon Lamivudin (3TC, Epivir ®) ist leider durch rasch auftretende Resistenzen eingeschränkt. Innerhalb von zwei Jahren entwickelt sich bei ca. 30 % der Patienten eine Mutation innerhalb der HBV-Polymerase, die einen weiteren Einsatz von 3TC unmöglich macht. Die Mutation erfolgt am YMDD-(Tyrosin-Methionin-Aspartat-Aspartat)-Lokus der HBV-Polymerase und macht ein Ansetzen des 3TC nicht möglich. Diese spezielle Form der Mutation tritt vermehrt beim Einsatz von 3TC auf. Weitere Nukleosidanaloga sind Adefovir (Hepsera ®, Firma Gilead Sciences) und Tenofovir (Viread ®, Firma Gilead Sciences) und Entecavir (Baraclude ®, Firma Bristol-Myers Squibb Pharma Eeig.), die bei Lamivudin-Resistenz (Zeffix ®, Firma GlaxoSmith Kline) wirksam zu sein scheinen. Allerdings ist auch mit diesem Behandlungsschema noch kein endgültiger Durchbruch für die Therapie von chronischen HBV-Infektionen gelungen, da die Nukleosid-Behandlung lebenslang durchgeführt werden muss.

## Ziel der Arbeit

Es gibt mittlerweile gut wirksame Impfungen zum Schutz vor einer HBV-Infektion für nicht infizierte Personen. Die Impfung führt zur Ausbildung einer Immunität und soll so vor dem klinischen Ausbruch einer Infektion schützen. Was allerdings noch fehlt, ist eine wirksame Therapie bei chronisch erkrankten Patienten. Hier gibt es bisher mehrere Ansätze (INF-Therapie, Gabe von Nukleosidanaloga). Das Problem der alleinigen Therapie mit INF liegt in dem Auftreten von Nebenwirkungen, bei den Nukleosidanaloga ist eine Dauer-Therapie vonnöten. Deshalb wird nach neuen Behandlungsschemata geforscht, die nicht eine dauerhafte Therapie beinhalten und v. a. nebenwirkungsarm sind. Die therapeutische Vakzinierung scheint eine sehr Erfolg versprechende Methode zu sein.

Ziel dieser Arbeit ist es, neue Behandlungs-Strategien einer chronischen HBV-Infektion in einem präklinischen Modell zu entwickeln. Anhand des Murmeltier-Modells soll eine Kombinationstherapie, bestehend aus einer Nukleosidanaloga-Gabe und therapeutischen Vakzinierungen, auf ihre Fähigkeit zur Elimination der HBV-Infektionen getestet werden. Mit Hilfe der Behandlung soll die Virusreplikation unterdrückt werden und gleichzeitig die zelluläre und humorale Immunantwort induziert werden. Das Murmeltier-Modell ist das etablierte Tiermodell zur Untersuchung möglicher Behandlungsstrategien der HBV-Infektion (sowohl akute als auch chronische Formen). Die im Versuch eingesetzten Amerikanischen Waldmurmeltiere (*Marmota monax*) sind chronisch mit dem Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) infiziert. Das Virus gehört zur selben Familie wie HBV und zeigt große Ähnlichkeiten bezüglich des Verlaufes der akuten Infektion, als auch bezüglich der Ausbildung der chronischen Form mit HCC als Folgeerscheinung. Zum Einsatz kommt das Nukleosidanalogon Entecavir alleine oder in Kombination mit einer DNA- oder DNA-Protein-Kombinationsvakzine. Der Erfolg dieser Kombinationstherapie soll anhand der Elimination des WHV und dem gleichzeitigen Auftreten von Antikörpern gegen das WHsAg überprüft werden.

## Literaturübersicht

### 3.1 Die Hepadnaviren

Das Hepatitis B Virus (HBV) gehört zur Familie der Hepadnaviridae und wird den DNA-Viren zugeordnet. Hepadnaviren sind sphärische, seltener pleomorphe Viruspartikel mit deutlichen Oberflächenprojektionen. Die Viren weisen einen deutlichen Hepatotropismus auf (Gust et al. 1986). Neben HBV sind mehrere pathogene Viren isoliert und beschrieben worden (s. Tabelle 1):

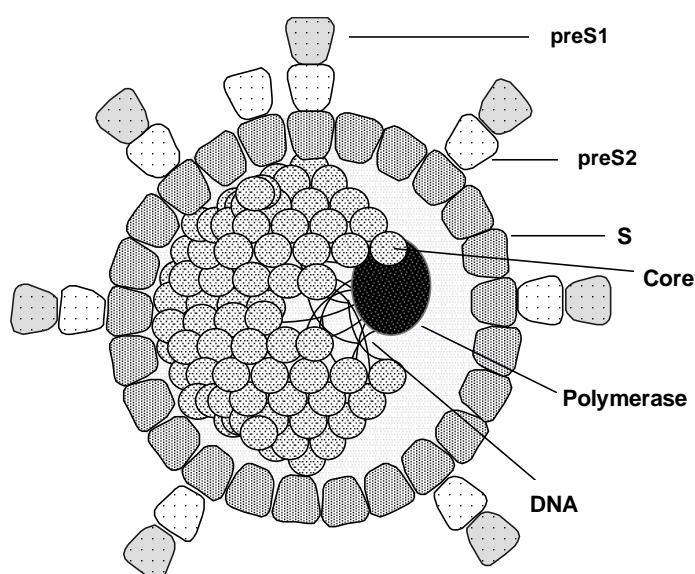
**Tabelle 1:** Bisher isolierte pathogene Viren der Familie Hepadnaviren

Genus	natürlicher Wirt	Literatur
Hepatitis B Virus (HBV)	Mensch ( <i>Homo sapiens</i> )	[Blumberg et al. 1965; Dane et al. 1970]
Arctic Squirrel Hepatitis Virus (ASHV)	Arktische Erdhörnchen ( <i>Spermophilus parryi kennicotti</i> )	[Testut et al. 1996]
Duck Hepatitis Virus (DHBV)	Pekingente ( <i>Anas domesticus</i> )	[Mason et al. 1980]
Ground Squirrel Hepatitis Virus (GSHV)	Erdhörnchen ( <i>Spermophilus beecheyi</i> )	[Marion et al. 1980]
Heron Hepatitis B Virus (HHBV)	Graureiher ( <i>Adrea cinera</i> )	[Sprenkel et al. 1988]
Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)	Amerikanisches Waldmurmeltier ( <i>Woodchuck, Marmota monax</i> )	[Summers et al. 1978]
Woolly Monkey Hepatitis B Virus (WMHBV)	Neuweltaffen (Woolly Monkey; <i>Lagothrix lagothricha</i> )	[Lanford et al. 1998]

Typisch ist neben dem Hepatotropismus der Viren die starke Spezies-Spezifität der Viren. Alle oben genannten Viren können in ihren Wirten persistierende Infektionen verursachen. V. a. WHV-infizierte Woodchucks zeigen große Übereinstimmungen zwischen dem chronischen Infektionsverlauf und der Entstehung eines primären HCC im Vergleich zur chronischen HBV-Infektionen beim Menschen (Summers et al., 1978, Buendia et al., 1994).

### 3.1.1 Morphologie

Die vollständigen Viruspartikel sind sphärisch und haben einen Durchmesser von 42 (HBV) bis 47 nm (GSHV; Schödel 1989 et al., Fields et al. 1990). Die Dichte der Partikel im CsCl-Gradienten beträgt zwischen 1,16 und 1,24 g/cm<sup>3</sup> (Summers et al. 1978). Die äußere Hülle ist eine Proteinhülle, die sich aus drei verschiedenen Proteinen zusammensetzt (S, pre-S1 und pre-S2). Die Proteine sind in unterschiedlicher Ausprägung glykosyliert und bilden zusammen mit Lipiden die Virushülle. Die Lipide stammen aus der Membran der Wirtszelle. Diese Hülle umschließt ein unglykosyliertes Protein, das sog. Core- oder Kernprotein. Dieser Kernpartikel hat einen Durchmesser von 27 (HBV) bis 30 nm (GSHV). Das Core umschließt seinerseits die genomische DNA sowie eine DNA-Polymerase/reverse Transkriptase (Robinson et al., 1974).



**Abb. 1: Schematische Darstellung des WHV-Partikels**

Das Viruspartikel besteht aus einer äußeren Hülle (Surface, S), die aus dem preS1-, preS2- und dem S-Protein und Lipiden aufgebaut ist. Die Hülle umschließt das Kapsid, das aus dem Nukleo-Protein (Core-/Kernpartikel) besteht. Im Innern des Kapsids befindet sich die partiell doppelsträngige DNA und die virale DNA-Polymerase/reverse Transkriptase.



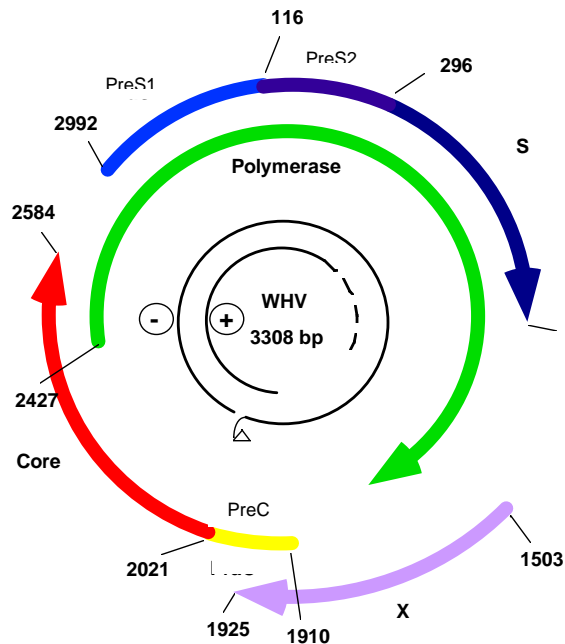
Die Hüllproteine werden bei der Virusreplikation in der Leberzelle in großem Überschuss produziert und bilden die Hülle des Virions oder werden als leere bzw. unvollständige Viruspartikel in das Serum sezerniert. Diese unvollständigen Partikel haben eine Größe von 16 bis 25 nm oder liegen als sphärische Partikel oder tubuläre Strukturen mit einer Länge von 100 nm im Serum vor (Dane et al. 1970, Tiollais et al. 1985, Schödel et al., 1989).

Neben den Hüll- und Kernproteinen lässt sich v. a. in der Frühphase der Infektion ein weiteres Protein im Serum nachweisen, das e-Antigen (Chang et al. 2007, Wang, C. et al. 2007, Millman et al. 1984, Gerlich et al. 1987). Die Bedeutung dieses Antigens für die Entstehung chronischer HBV-Infektionen ist noch nicht genau geklärt (Wang, C. et al. 2007).

### 3.1.2 Das Genom der Hepadnaviren

Das Viruspartikel besteht aus Virushülle, Nukleokapsid und dem viralen DNA-Genom (Schödel et al. 1989, Fields et al. 1990). Das Genom ist eine zirkuläre, nicht kovalent geschlossene, teilweise doppelsträngige DNA (Howard et al. 1986). Das gesamte Genom von HBV besteht aus 3.200 Basenpaaren. Die Ähnlichkeit der DNA-Sequenz der tierischen Hepadnaviren zum menschlichen HBV ist unterschiedlich groß. Die Homologie reicht von 40 % (DHBV; Mandart et al. 1984) bis zu 70 % (WHV, Galibert et al. 1982).

Die Länge beträgt je nach Virus zwischen 3,0 (DHBV) und 3,3 kb (WHV, Galibert et al. 1982). Damit gehören die Hepadnaviren zu den kleinsten bisher bekannten animalen DNA-Viren. Trotz seiner kleinen Größe wird das Genom durch seine äußerst kompakte Organisation der einzelnen Gene sehr effektiv genutzt. So kodieren durch Überlappen der offenen Leserahmen (ORF's, open reading frames) über 50 % der Nukleotide für mehr als ein Gen (Miller et al. 1989).



**Abb. 2: Struktur und Organisation des WHV-Genoms** (modifiziert nach Schödel et al., 1989). Die Pfeile symbolisieren die vier offenen Leserahmen des WHV. Im Innern liegt die partiell doppelsträngige DNA mit dem kovalent gebundenen Protein und Oligoribonukleotide des DNA Minus- bzw. Plusstrangs.

Der Minus-Strang der doppelsträngigen DNA ist in seiner ganzen Länge ausgebildet. Die Länge des Plus-Stranges dagegen ist stark variabel (50 – 100 %; Tiollais et al. 1985, Howard et al. 1986). Dabei ist das 5'-Ende des Plus-Stranges konstant, während das 3'-Ende die beschriebene Variabilität aufweist. Die zirkuläre Konformation der DNA kommt durch Überlappung der 5'-Enden beider Stränge über bis zu 200 Nukleotide zustande, ohne dass eine kovalente Bindung erfolgt (Tiollais et al. 1988). Es gibt vier offene Leserahmen, die alle auf dem Minus-Strang lokalisiert sind (Galibert et al. 1982, Tiollais et al. 1985, Chisari et al. 1989, Schödel et al. 1989, Fields et al. 1990, Chisari et al. 1994).

**Tabelle 2:** Gene der Hepadnaviren und ihre Funktion

Gen	kodiert für	Literatur
S-Gen	großes (pre-S1), mittleres (pre-S2) und Haupt-Oberflächen-Antigen (S)	[Heermann et al. 1984; Neurath et al. 1985; Gerlich et al. 1987]
C-Gen	Core-Protein, e-Antigen	[Uy et al. 1986; Ganem et al. 1987]
P-Gen	DNA-Polymerase/reverse Transkriptase, RNase H, DNA-bindendes Protein	[Bavand et al. 1989]
X-Gen	ca. 150 AS großes Protein, Funktion noch nicht vollständig geklärt, besitzt transkriptionsaktivierende Eigenschaften	[Twu et al. 1989; Balsano et al. 1994; Su et al. 1994]

Das Genom der aviären Hepadnaviren hat insgesamt nur 3 offene Leserahmen. Bei ihnen sind das C- und X-Gen miteinander verbunden. Deswegen besteht auch eine geringere Homologie zwischen Säugetier- und Vogel-Hepadnaviren bezüglich der Nukleotidsequenz des Genoms (Neurath et al. 1990).

### 3.1.3 Virale Replikation

Einzigartig unter allen bisher beschriebenen Virusarten ist der Replikationsmechanismus der Familie Hepadnaviridae (Summers et al. 1982; Blum et al. 1984; Fowler et al. 1984; Miller et al. 1989).

Nach Infektion des Hepatozyten durch das Virus verliert das Virion seine eigene Hülle. Das Core-Partikel mit der partiell zirkulären DNA wandert zur Membran des Zellkerns. Dort wird die virale DNA freigesetzt und dringt in den Kern ein. Im Zellkern wird durch die virale DNA-Polymerase der noch inkomplette Plus-Strang vervollständigt und durch wirtseigene zelluläre Ligasen von der „relaxed“ zirkulären in eine kovalent geschlossene, zirkuläre Form überführt (covalent closed circular DNA, cccDNA). Vom DNA-Minusstrang werden nun durch eine zelluläre RNA-Polymerase mehrere RNA-Transkripte (S-, Core- und X-Transkripte) erstellt und im Zytoplasma

translatiert. Die prägenomische RNA bindet spezifisch an den Nukleinsäurebindenden Bereich des Core. Sie wird dann im Zytoplasma der Wirtszelle zusammen mit der DNA-Polymerase/reverse Transkriptase, der RNase H und dem DNA-bindenden Protein in das Kernpartikel verpackt. Durch reverse Transkription des RNA-Prägenoms wird nun der Minus-Strang der genomischen Virus-DNA im Core-Partikel synthetisiert und gleichzeitig durch die RNase H das RNA-Prägenom abgebaut. Ein kleines RNA-Molekül wirkt als Primer für die Synthese des Plus-Stranges. Die vollständige Ausbildung des Plus-Stranges ist für die weitere Reifung und Infektiosität des Virions nicht notwendig. Nach Anlagerung von gleichzeitig produzierten Hüllproteinen am endoplasmatischen Retikulum wird das komplette Virus gebildet und aus der Zelle ausgeschleust.

Durch Verwendung der reversen Transkriptase ähnelt der Replikationszyklus der Hepadnaviren demjenigen der Retroviren. Letztere enthalten im Unterschied zu den Hepadnaviren jedoch RNA und verwenden eine in das Wirtsgenom integrierte DNA als Matrize (Hull et al. 1986; Mason et al. 1987; Nassal et al. 1996).

#### 3.1.4 Virale Transkription

In von Hepadnaviren infizierten Hepatozyten können zwei ungespleißte, polyadenylierte Haupttranskripte nachgewiesen werden. Diese sind zum Minus-Strang komplementär. Eine größere messengerRNA (mRNA) umfasst das gesamte Genom, von ihr werden das Kernprotein und die DNA-Polymerase/reverse Transkriptase translatiert (Cattaneo et al. 1987; Standring et al. 1984; Yaginuma et al. 1987; Will et al. 1987; Möroy et al. 1985; Etiemble et al. 1986; Enders et al. 1985). Zugleich stellt diese mRNA die prägenomische RNA dar, die als Matrize für die reverse Transkriptase dient (Tiollais et al. 1985). Von der kleineren mRNA werden die Hüllproteine (S, pre-S1, pre-S2) translatiert (Cattaneo et al. 1984 und 1987; Schödel et al. 1989). Beide Haupttranskripte haben unterschiedliche 5'-Enden, besitzen aber eine gemeinsame Polyadenylierungsstelle, welche am 5'-Ende des C-Gens lokalisiert ist. Alle Säugetier-Hepadnaviren besitzen außerdem ein weiteres Transkript, von dem das X-Protein translatiert wird (Nassal et al. 1996).

### 3.1.5 Virale Proteine

Die viralen Proteine umfassen das Core-Protein, das e-Antigen, die Oberflächen/Hüll-Proteine, die Polymerase sowie das X-Gen-Produkt.

Das Core-Protein und das e-Antigen sind auf dem C-Gen kodiert (Uy et al. 1986; Ganem et al. 1987). Bei HBV besteht das Core-Protein aus 185 AS (bei manchen Subtypen auch aus 183 AS), während es bei WHV 188 AS lang ist (Ganem et al. 1987). Die Core-Proteine von HBV und WHV weisen bezüglich der Aminosäuresequenz eine Homologie von 75 % auf, während die Homologie auf Nukleotid-Ebene nur 70 % beträgt (Galibert et al. 1982; Kodama et al. 1985). Charakteristisch für das Core-Protein ist der basische Carboxy-Terminus. Dieser ist besonders reichhaltig an den Aminosäuren Arginin, Serin und Prolin und weist eine hohe Bindungsaffinität zu Nukleinsäuren auf (Valenzuela et al. 1980; Gallina et al. 1989; Birnbaum et al. 1990; Hatton et al. 1992). Die translatierten Core-Proteine aggregieren spontan zu Core-Partikeln, die sich beim WHV und DHBV hauptsächlich im Zytoplasma und bei HBV v. a. im Kern infizierter Hepatozyten nachweisen lassen. Bei HBV besitzt das Core-Partikel eine ikosaedrische Form (Pasek et al. 1979; Cohen et al. 1982; Crowther et al. 1994).

Das e-Antigen besitzt eine Größe von 25 kd und aggregiert im Gegensatz zum Core-Protein nicht, sondern wird in löslicher Form in den Blutkreislauf sezerniert (Uy et al. 1986). Im Serum liegt es entweder in freier Form vor oder ist an Immunglobuline oder andere Proteine und Lipide gebunden (Takahashi et al. 1978; Budkowska et al. 1984). Die Funktion des e-Antigens ist bislang nicht vollständig geklärt. Das Antigen wird in größeren Mengen während der Akutphase einer Hepadnavirus-Infektion freigesetzt, kann aber auch bei chronischen Infektionen im Serum festgestellt werden.

Die Hülle der Hepadnaviren besteht aus drei viral codierten Proteinen und zusätzlich aus Lipiden der Wirtszellmembran. Den größten Anteil der Hülle bildet das Hauptprotein (S). Das mittlere (pre-S2) und große Protein (pre-S1) sind in geringeren Mengen vorhanden (Stibbe et al. 1983; Neurath et al. 1985). Alle drei Proteine sind Produkte des S-Gens, welche aber auf Grund von drei im gleichen ORF lokalisierten

Startkodons zwar einen gemeinsamen Carboxy-Terminus besitzen, aber in ihrem Amino-Terminus variieren (Laub et al. 1983; Heermann et al. 1984; Cattaneo et al. 1987). Das erste Startkodon kodiert für das große (pre-S1), das zweite Startkodon für das mittlere (pre-S2) und das dritte Startkodon des S-Gens kodiert für das Haupt-(S)-Protein. Die Hüllproteine finden sich auf der Oberfläche im glykosylierten Zustand, was aber nicht für die aviären Hepadnaviren gilt. Die Proteine des S-Gens bilden das Oberflächenantigen (HBsAg, WHsAg, ...). Bei HBV sind serologisch mehrere Antigendeterminanten des HBsAg differenzierbar. Alle Subtypen tragen die gemeinsame Determinante *a* und alternativ die Determinanten *d* oder *y* bzw. *w* oder *r*, so dass es insgesamt vier Subtypen (*adw*, *ayw*, *adr*, *ayr*) gibt. Die verschiedenen Subtypen zeigen keine biologischen Unterschiede, haben aber Bedeutung in epidemiologischen Studien (Couroucé et al. 1976; Bancroft et al. 1972). Die Oberflächenproteine von HBV (*adr1*-Subtyp) und WHV weisen in ihrer Aminosäuresequenz eine 60 %ige Übereinstimmung auf. Im Gegensatz dazu beträgt die Homologie auf Nukleotid-Ebene 73 % (Kodama et al. 1985). Sowohl Menschen als auch Woodchucks sind durch eine Immunisierung mit HBsAg bzw. WHsAg immun gegen eine Infektion mit HBV bzw. WHV. Mit HBsAg immunisierte Woodchucks sind aber nicht vor einer WHV-Infektion geschützt, während WHsAg-immunisierte Schimpansen gegenüber einer HBV-Infektion geschützt sind (Cote et al. 1986).

Die Polymerase als Produkt des P-Gens kann aufgrund des größten ORF im Genom bis zu 845 AS umfassen (Bavand und Laub et al. 1987; Bavand et al. 1989; Kawamoto et al. 1990). Außerdem enthält die Aminosäuresequenz des Genproduktes Bereiche großer Homologie zur retroviralen reversen Transkriptase und RNase H (Toh et al. 1985; Miller et al. 1987; Schödel et al. 1989).

Die Funktion des X-Gens, dessen offener Leserahmen eine Kodierungskapazität für ein etwa 17 kD großes Protein hat, ist bisher nicht vollständig geklärt. Es weist zwischen HBV (*adr1*-Subtyp) und WHV sowohl auf Ebene der AS als auch auf Ebene der Nukleotide nur geringe Homologien auf (48 % und 66 %; Galibert et al. 1982). Durch verschiedene Versuche konnte nachgewiesen werden, dass ein intaktes X-Gen für die HBV-Replikation nicht notwendig ist (Yaginuma et al. 1987; Blum et al. 1992). Auch besitzen aviäre Hepadnaviren kein X-Gen (Moriarty et al.

1985; Schödel et al. 1989). Das X-Genprodukt von WHV ist für die Infektion von Woodchucks mit WHV essentiell. Eine *in vivo*-Infektion mit einem WHV-Genom, dem das X-Gen fehlte, ist nicht möglich (Chen et al. 1993; Zoulim et al. 1994). *In vitro* konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Produkt des X-Gens transkriptionsaktivierend auf verschiedene virale und zelluläre Gene wirkt (Twu et al. 1989; Balsano et al. 1993 und 1994; Menzo et al. 1993). Aus diesem Grund wird vermutet, dass über die Aktivierung von zellulären Onkogenen sowie der Deregulation der zellulären Genexpression ein Zusammenhang zwischen X-Genprodukt und der Karzinogenese und damit der Ausbildung von HCC bestehen könnte (Höhne et al. 1990; Koike et al. 1994; Su et al. 1994).

## 3.2 Das Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)

Das WHV ruft bei Amerikanischen Walddarmeltieren (Woodchucks, *Marmota monax*) eine virale Hepatitis hervor, deren chronische Verlaufsform mit dem Auftreten eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) assoziiert ist. Das Virus wurde 1978 nach dem Hepatitis B Virus als zweites Mitglied der Familie Hepadnaviridae entdeckt. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der WHV-Infektion des Woodchucks mit der HBV-Infektion des Menschen dient sie als Tiermodell für die Untersuchung der Hepadnavirus-Infektionen.

Das Virus ist 40 – 45 nm groß, besitzt eine Dichte von 1,205 - 1,234 g/cm<sup>3</sup> (Ponzetto et al. 1982, Sprotte et al. 1987). Die DNA ist wie bei allen Hepadnaviren partiell doppelsträngig und besteht aus 3.308 Basenpaaren. Die WHV-DNA kann in das Genom der Wirtszelle integriert werden.

### 3.2.1 Verbreitung des WHV

Das Virus wurde 1978 bei Woodchucks im Zoo in Philadelphia, USA das erste Mal nachgewiesen. Während der Infektion dort starben 22 % der Tiere an den Folgen der WHV-Infektion (Summers et al. 1978). Die Prävalenz des WHV innerhalb von Woodchuck-Populationen Nordamerikas ist unterschiedlich. Während das WHV in den mittelatlantischen Bundesstaaten Amerikas (North/South Carolina, New Jersey,

Delaware, Virginia) endemisch ist, sind die Populationen von New York und in Neuengland (Maine, New Hampshire, Vermont, Massachusetts, Rhode Island, Connecticut) frei vom WHV (Tyler et al. 1981; Wong et al. 1982; Wright et al. 1987). Aus Europäischen Murmeltieren (Alpenmurmeltiere, *Marmota marmota*) konnte das WHV oder ein ähnliches Virus bisher nicht isoliert werden (Chomel, 1984). Bei einer weiteren Murmeltierart in China (Eastern Woodchuck, *Marmota bobak*) gibt es möglicherweise ebenfalls ein nachgewiesenes Vorkommen von WHV (Kai et al. 1988).

### 3.2.2 Natürliche und experimentelle Infektion mit dem WHV

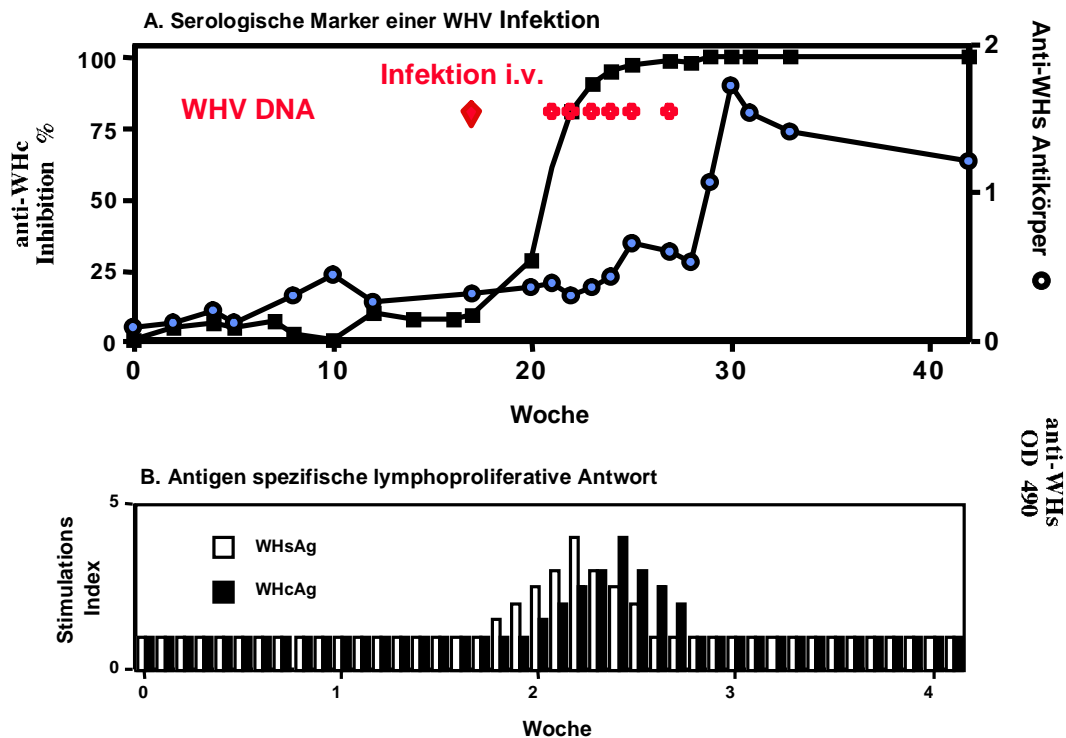
Bei einer natürlichen Infektion mit WHV wird, wie auch bei HBV, eine Übertragung durch Blut und andere Körperflüssigkeiten angenommen. Ob das WHV intrauterin übertragen werden kann, konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden (Robinson et al. 1983). Kinder von HBV-chronischen Müttern werden zu über 95 % erst während bzw. nach der Geburt mit dem Virus infiziert. Bei Zugrundelegung gleicher Verhältnisse beträgt beim neugeborenen Woodchuck die Inkubationszeit bis zu 16 Wochen. Bei natürlichen Infektionen von adulten Tieren beträgt die Inkubationszeit etwa acht Wochen (Tyler et al. 1984). Experimentell gesetzte Infektionen haben eine Inkubationszeit zwischen zwei und dreizehn Wochen (Millman et al. 1984; Tyler et al. 1984; Lindberg et al. 1985). Infektionen mit dem WHV verlaufen akut oder gehen in einen chronischen Verlauf über. Bei einer akuten Infektion dauert die Virämie zwischen vier und sechs Wochen an (Tyler et al. 1986). Die Wahrscheinlichkeit, dass eine chronische Infektion entsteht, ist wie bei einer HBV-Infektion umso größer, je jünger das Tier zum Zeitpunkt der Infektion ist. Die Chronifizierungsrate liegt bei adulten Tieren bei ca. 10 %. Die Leber ist das primäre Organ der Virusreplikation, obwohl eine Replikation des WHV auch in Lymphozyten des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) sowie in lymphoiden Zellen der Milz und in den Lymphknoten nachgewiesen wurde (Davison et al. 1987; Korba et al. 1986 und 1987). Ähnliche Befunde liegen auch für HBV vor (Davison et al. 1987). Während bei einer HBV-Infektion das HBcAg überwiegend im Zellkern lokalisiert ist, befindet sich das WHcAg vorwiegend im Zytoplasma. Die akute Infektion ist gekennzeichnet durch den Nachweis von WHV-DNA, WHcAg und



WHsAg im Lebergewebe. Im Serum sind freie Viruspartikel und WHsAg-Partikel zu finden.

### 3.2.3 Serologische Diagnostik der WHV-Infektion

WHsAg im Serum ist der früheste Marker einer akuten WHV-Infektion, tritt aber auch immer bei chronischen Infektionen auf und zeigt eine aktive Virusreplikation an (Ponzetto et al. 1984; Wong et al. 1982). Bei einer akuten WHV-Infektion erscheint nach dem Verschwinden von WHsAg anti-WHs im Serum. Antikörper gegen WHsAg (anti-WHs) sind Marker einer abgelaufenen WHV-Infektion und erscheinen erst zum Ende der virämischen Phase (s. Abb 3). Sie besitzen neutralisierende Eigenschaften und schützen so vor einer erneuten Infektion. In Einzelfällen ist es jedoch möglich, dass auch bei einer abgelaufenen Infektion kein anti-WHs nachgewiesen werden kann (Gerin et al. 1986). Das Nukleokapsid findet sich während der akuten oder chronischen Infektion nur intrazellulär und zwar im Zytoplasma infizierter Hepatozyten. Antikörper gegen das WHcAg (anti-WHc) werden meist schon während der virämischen Phase der Infektion gefunden (s. Abb. 3). Das anti-WHc zeigt in Kombination mit dem Auftreten von WHsAg sicher an, dass eine WHV-Replikation stattgefunden hat. Die anti-WHc bleiben nach jetzigem Kenntnisstand wahrscheinlich lebenslang bestehen und dienen als Durchseuchungsmarker. Bei chronischen Virusträgern sind meist höhere anti-WHc-Serumtiter festzustellen ( $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-6}$ ) als bei akuten Infektionen ( $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-4}$ ; Ponzetto et al. 1984). Die anti-WHc-Antikörper haben keine protektive Wirkung gegen Re-Infektionen. Gerade bei chronischen Trägern sind während der Zeit der aktiven Virusreplikation besonders hohe Titer zu finden. Als Spaltprodukt des Nukleokapsid-Antigens WHcAg kann das lösliche Antigen WHeAg im Serum von Woodchucks während der virämischen Phase nachgewiesen werden. WHeAg kann sowohl bei akuten als auch bei chronischen Infektionen auftreten (Klocke et al. 1991; Millman et al. 1982). Der Nachweis der DNA-Polymerase im Serum zeigt eine aktive Virusreplikation an (Feitelson et al. 1988; Ponzetto et al. 1984; Popper et al. 1981), während der Nachweis von WHV-DNA im Serum das Vorhandensein von Viruspartikeln anzeigt und somit ebenfalls ein Marker für eine aktive Virusreplikation ist.



**Abb. 3: Schema einer akuten experimentellen WHV-Infektion** (Roggendorf und Lu 2005, Karger Review). Dargestellt werden die einzelnen Verläufe bzw. das Auftreten der einzelnen Marker im Serum von erkrankten Tieren nach einer Infektion mit WHV (Abb. A) sowie deren lymphoproliferative Antwort gegenüber WHsAg und WHcAg im zeitlichen Verlauf (Abb. B).

- ◆: Tier wird mit WHV infiziert (i.v.)
- : Nachweis von WHV DNA im Serum der Tiere (PCR)
- : anti-WHc-Inhibition in %
- : Auftreten von anti-WHs-Antikörpern im Serum

### 3.2.4 Chronische WHV-Infektion und Leberzellkarzinome

Eine akute Hepatitis ist histologisch durch zelluläre Infiltrationen im periportalen Raum und vereinzelte Herde mit Leberzellnekrosen gekennzeichnet (Popper et al. 1987). Chronische Infektionen kommen in zwei verschiedenen Formen vor. Bei der chronisch persistierenden Hepatitis (CPH) ist der periportale Raum lymphozytär infiltriert. Im Gegensatz dazu ist die chronisch aktive Hepatitis (CAH) gekennzeichnet durch lymphozytäre Infiltrationen im gesamten Lebergewebe und weiter durch zahlreiche Leberzellnekrosen (Frommel et al. 1984; Toshkov et al. 1990). Im Unterschied zur chronischen Infektion mit HBV wird beim Woodchuck eine Leberzirrhose nicht beobachtet (Popper et al. 1981). Dies hängt möglicherweise mit der insgesamt kürzeren Lebensdauer der Woodchucks von ca. sechs Jahren zusammen (Grizell et al. 1955). Sowohl bei einer akuten als auch bei chronischen Infektionen mit WHV werden klinische Symptome einer Hepatitis nicht beobachtet. Die Transaminasen (GOT, GPT) als Marker für Leberzellschäden sind nur bei

Vorliegen eines HCC erhöht (Lindberg et al. 1985). Nahezu alle chronischen WHV-Träger erkranken über kurz oder lang an einem HCC. Bei natürlichen Infektionen beträgt die Rate der Tiere, die ein HCC entwickeln, etwa 80 %, bei experimentellen Infektionen nahezu 100 %. In den Karzinomen wird regelmäßig chromosomal integrierte WHV-DNA beobachtet (Fuchs et al. 1989; Popper et al. 1987). In den Tumoren liegt häufig eine verminderte oder fehlende Expression des Core-Proteins vor (Fuchs et al. 1990). Der Mechanismus der WHV-induzierten Tumorentstehung ist noch nicht geklärt (Fuchs et al. 1989; Ogston et al. 1982; Rogler et al. 1982). Möglicherweise ist auch die gesteigerte Regeneration ursächlich für die Entstehung eines Tumors (Ganem et al. 1990). Generell metastasiert das HCC nicht.

Serologisch ist ein chronisch infiziertes Tier charakterisiert durch das gleichzeitige Vorliegen von WHV-DNA und von Antikörpern gegen WHc (anti-WHc) im Serum der erkrankten Tiere.

### 3.3 Immunantwort nach einer HBV-Infektion beim Menschen

Die Immunantwort gegen Proteine des HBV ist für die Viruseliminierung und für den weiteren Verlauf (akut oder chronisch) beim Menschen verantwortlich (Cerny et al. 1994; Chisari et al. 1995; Franco et al. 1995). Das Immunsystem hat dabei mehrere Strategien entwickelt, um extrazelluläre Virionen zu eliminieren und virusinfizierte Zellen zu zerstören (Abbas et al. 1994). Es setzt dabei v. a. auf zwei Bestandteile des Immunsystems, zum einen auf die humorale, zum anderen auf die zelluläre Immunantwort. Die humorale Immunantwort wird von den B-Lymphozyten getragen. Über ihre Immunglobulin-Rezeptoren erkennen sie virale Antigene in nativer Form entweder als lösliche Proteine, oder als Moleküle, die auf der Oberfläche virusinfizierter Zellen exprimiert werden (Parker et al. 1993). Durch die Bildung von Antikörpern kommt es zur Komplexbildung mit den viralen Proteinen, indem die Antikörper an die Virionen binden. Unter Freisetzung von Zytokinen und über Antikörper-Rezeptoren werden nachfolgend z. B. Makrophagen aktiviert, die diese Komplexe erkennen und die Viruspartikel oder die virusinfizierten Zellen eliminieren.

Die zelluläre Immunantwort verhindert eine neue Infektion von Hepatocyten und wird bedingt durch spezifische T-Lymphozyten. Über ihre Rezeptoren erkennen sie bereits prozessierte virale Antigene in Form kurzer Peptide, welche mit Molekülen des Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes („major histocompatibility complex“, MHC) assoziiert werden (Germain et al. 1994). Peptide, die im Zytoplasma infizierter Zellen nach Prozessierung endogener viraler Proteine entstehen, binden an die MHC-Klasse-I-Moleküle. Diese Art der Antigen-Präsentation führt zur Erkennung durch CD8+-T-Lymphozyten, den sog. cytotoxischen T-Lymphozyten oder CTLs (Yewdell et al. 1992). Die prinzipielle Funktion der CTLs ist die Eliminierung von intrazellulären Virionen durch Induktion von Apoptose (= programmierter Zelltod durch die Zelle selbst) der Wirtszellen oder durch direkte Lyse der virusinfizierten Zellen.

Die MHC-Klasse-II-Moleküle hingegen binden Peptide, die aus extrazellulären viralen Proteinen und proteolytischer Prozessierung nach Endophagozytose durch Antigen-präsentierende Zellen („Antigen presenting cells“ = APCs) entstanden sind. Als APCs können B-Lymphozyten, Makrophagen oder dendritische Zellen fungieren. Diese Form der Präsentation führt zur Erkennung durch CD4+-T-Lymphozyten (Vitetta et al. 1989). Die so induzierten T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) besitzen prinzipiell eine regulative und unterstützende Funktion, die sie über die Sekretion bestimmter Zytokine ausüben. Aufgrund der sezernierten Zytokine können die Th-Zellen in zwei Subpopulationen unterteilt werden: Th<sub>1</sub>- und Th<sub>2</sub>-Zellen (Peters et al. 1996).

Die koordinierte und adäquate Aktivierung der humoralen und zellulären Immunantwort führt zur Bekämpfung der viralen Infektion, die durch eine Eliminierung extrazellulär und intrazellulär vorkommender Viruspartikel beendet wird.

### 3.3.1 Humorale Immunantwort gegen HBV

Die Bildung von virusneutralisierenden Antikörpern gegen die HBV-Hüllproteine (anti-HBs) ist ein von T-Lymphozyten abhängiger Prozess (Milich et al. 1987 und 1988). Th-Zellen, die gegen das Kernprotein des HBV (HBcAg) sensibilisiert wurden, treten mit B-Zellen in Wechselwirkung und unterstützen so direkt die Bildung von anti-HBs. Das so entstandene anti-HBs bildet Komplexe mit freien Virionen, die auf diese Weise für Makrophagen markiert werden, was zu einer Elimination der Viruspartikel

führt. Deshalb besitzt anti-HBs eine essentielle Bedeutung bei der Viruseliminierung, da mit dem HBV-Hüllprotein (HBsAg) immunisierte Menschen, aufgrund der hohen anti-HBs-Titer, vor einer HBV-Infektion geschützt sind (Szmuness et al. 1981). Darüber hinaus können diese Antikörper nur bei Menschen festgestellt werden, die das HBV eliminiert und die akute Infektion überwunden haben. Chronisch infizierte Patienten weisen normalerweise kein anti-HBs auf (Chisari et al. 1995; Hollinger et al. 1996).

Im Gegensatz dazu ist die Bildung von Antikörpern gegen das Kernprotein (anti-HBc) ein sowohl T-Zell-abhängiger als auch –unabhängiger Prozess (Milich et al. 1986). Die Bedeutung von anti-HBc während der HBV-Infektion ist noch ungeklärt, weil es einerseits keinen virusneutralisierenden Effekt vermitteln kann und andererseits in hoher Konzentration sowohl während der akuten als auch während der chronischen HBV-Infektion nachweisbar ist (Chisari et al. 1995; Hollinger et al. 1996).

Antikörper gegen die DNA-Polymerase und gegen das X-Genprodukt des HBV können bereits in der Frühphase der Infektion nachgewiesen werden, ihre Bedeutung und Funktion ist jedoch unklar (Moriarty et al. 1985; Jung et al. 1990; Stemler et al. 1990; Vitvitski-Trepp et al. 1990; Weimer et al. 1990).

### 3.3.2 Zelluläre Immunantwort gegen HBV

Die Immunantwort umfasst sowohl die Reaktion der T-Helfer-Lymphozyten (CD4+ T-Zellen) als auch der zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8+ T-Zellen) auf das HBV. Menschen mit einer akuten, selbstlimitierenden HBV-Infektion weisen immer eine starke Immunantwort der Th-Zellen gegen verschiedene Epitope der Hüll- und Kernproteine des HBV auf (Ferrari et al. 1986 und 1991; Jung et al. 1995; Chisari et al. 1995). Auffällig ist dabei, dass die gegen HBsAg gerichtete Th-Zellantwort deutlich schwächer ausfällt als die gegen HBcAg oder HBeAg (Ferrari et al. 1990; Jung et al. und 1995; Löhr et al. 1995). Ein möglicher Grund dafür kann sein, dass die gegen HBsAg gerichtete Th-Zellantwort schon sehr früh nach der Infektion auftritt und im weiteren Verlauf durch hohe Konzentrationen an repliziertem Virus bzw. HBsAg unterdrückt wird (Vento et al. 1987).

Im Gegensatz dazu wird der gegen HBcAg und HBeAg-gerichteten Th-Zellantwort eine Schlüsselstellung bei der Bekämpfung der HBV-Infektion zugesprochen. Diese beiden Populationen aktivieren HBcAg-spezifische CTLs und führen zu einer verstärkten Viruseliminierung (Penna et al. 1991; Missale et al. 1993; Nayersina et al. 1993). Des Weiteren unterstützen HBcAg-spezifische Th-Zellen die Bildung von virusneutralisierenden Antikörpern (anti-HBs; Milich et al. 1987).

Menschen mit einer chronischen HBV-Infektion weisen nur eine schwache bis gar keine Th-Zellantwort im peripheren Blut gegen HBV-Proteine auf (Ferrari et al. 1990; Jung et al. 1991 und 1995; Löhr et al. 1995). Die so während der chronischen HBV-Infektionen meist fehlenden virusneutralisierenden Antikörper (anti-HBs) und die fehlenden Antigen-spezifischen CTLs werden auf die äußerst schwache Th-Zellantwort zurückgeführt (Maruyama et al. 1993).

Patienten mit akuter selbstlimitierender HBV-Infektion weisen vorwiegend Th-Zellen vom Subtyp Th<sub>1</sub> auf, weshalb vermutet wird, dass die Dominanz von Th<sub>2</sub>-Zellen zur Entstehung von persistierenden HBV-Infektionen führt. Außerdem weisen chronisch HBV-infizierte Menschen gegen alle HBV-Proteine nur eine schwache oder keine nachweisbare CTL-Antwort im peripheren Blut auf.

### 3.4 Die chronische HBV-Infektion

Akut HBV infizierte Menschen können durch das koordinierte Zusammenwirken von humoraler und zellulärer Immunantwort das HBV eliminieren und so die Infektion überwinden. Patienten, die das Virus eliminieren, entwickeln eine starke, gleichzeitig gegen viele verschiedene Epitope gerichtete Immunantwort, die durch Th-Zellen und CTLs getragen wird. Außerdem bilden sie virusneutralisierende Antikörper, wie z. B. anti-HBs, aus.

Im Gegensatz dazu weisen chronisch HBV-infizierte Menschen gewöhnlich weder eine zelluläre Immunantwort noch virusneutralisierende Antikörper (anti-HBs) auf. Aufgrund dieser inadäquaten Immunantwort können sie das Virus nicht eliminieren. Deshalb kann sich im Patienten eine persistierende Infektion ausbilden. Neben den

vom Virus ausgehenden Faktoren sind auch die individuellen Faktoren und Eigenschaften der infizierten Menschen für den Verlauf einer HBV-Infektion von Bedeutung (Chisari et al. 1995; Franco et al. 1995).

Mögliche Folgen einer solchen lebenslang persistierenden HBV-Infektion sind Leberzirrhose und Ausbildung eines HCC. Die persistierende HBV-Infektion kann jahrelang asymptomatisch verlaufen. Es kann aber immer wieder durch äußere und innere Einflüsse (wie z. B. Stress) zum erneuten Auftreten der HBV-Infektion mit gesteigerter Virusreplikation kommen (CAH, Chronisch aktive Hepatitis).

### 3.5 Woodchuck als Tiermodell für die Therapie der chronischen Hepadnavirus-Infektion

Das Wirtsspektrum der einzelnen Hepadnaviren ist sehr eng (Schödel et al. 1989; Fields et al. 1990). Es gelang in einigen wenigen Experimenten das HBV auf Schimpansen und andere höhere Primaten zu übertragen. Allerdings ist die klinische Ausprägung und Manifestation bei diesen Spezies deutlich schwächer als beim Menschen (Barker et al. 1973; Bancroft et al. 1979). Es gelang bisher auch nicht, die sonst im Allgemeinen gebräuchlichen Labortiere (Mäuse, Ratten, ...) mit Hepadnaviren zu infizieren. Da ebenfalls permissive Zellsysteme zur Erforschung von HBV fehlen (Chisari et al. 1989; Fields et al. 1990), ist man zur Erforschung der Pathologie und Immunologie der HBV-Infektion auf Woodchucks, Ground Squirrels und Pekingenten mit ihren wirtseigenen Hepadnaviren angewiesen. In zahlreichen Untersuchungen hat sich das Tiermodell der Woodchucks als besonders geeignet für die Untersuchung der Pathogenese der HBV-Infektion erwiesen (Popper et al. 1981, Korba et al. 1986, Gerin et al. 1991; Buendia et al. 1994; Roggendorf et al. 1995). Zwischen HBV und WHV besteht eine große Übereinstimmung bezüglich Morphologie, dem genomischen Aufbau, den Genprodukten, den Replikationsmechanismen und den pathogenen Effekten. Analog zum HBV kann das WHV im Woodchuck eine akute oder chronisch persistierende Infektion verursachen. Gemeinsamkeiten bestehen ebenfalls im Hinblick auf die Entstehung primärer Leberzellkarzinome bei chronischer Infektion. Einzige Ausnahme ist die fehlende

Ausbildung einer Leberzirrhose bei chronisch infizierten Woodchucks (Popper et al. 1981).

## 3.6 Therapie der chronischen HBV-Infektion

### 3.6.1 Interferone

Interferone (INF) wurden 1957 das erste Mal von A. Isaacs und J. Lindenmann beschrieben. Es handelt sich um pleiotrope Zytokine, welche wichtige biologische Aktivitäten im Organismus erfüllen. Im Vordergrund stehen hier antivirale, antitumorale und immunmodulatorische Aufgaben und Effekte (Parmar et al. 2003).

INF können in drei Gruppen unterteilt werden: Interferon- $\alpha$ , Interferon- $\beta$  und Interferon- $\gamma$ . Die Unterteilung erfolgt abhängig von ihrem zellulären Ursprung, ihrer induzierten Funktion sowie anhand ihrer antigenetischen und funktionellen Eigenschaften. Sie können in den verschiedensten Immun-Interaktionen als Inducer, Regulatoren und Effektoren tätig sein. Ihre Funktion erstreckt sich sowohl auf das unspezifische als auch das spezifische Immunsystem (Malmgaard et al. 2004). Ihre biologische Funktion erfüllen die INF durch Bindung an spezifische Rezeptoren, welche ihrerseits zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden innerhalb der Zelle führen. Die am häufigsten genutzten Proteine der Signalkaskaden sind die Jak-Kinase, Map-Kinase, IRS- und CrK-Proteine. Es handelt sich hierbei um Proteine verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden, die für die Umsetzung der Rezeptorantwort verantwortlich sind. Durch diese Signalkaskaden werden bestimmte Gen-Gruppen aktiviert, welche denn den eigentlichen Effekt, z. B. antivirale Eigenschaften, hervorrufen (Landolfo et al. 1995, Parmar et al. 2003).

Vor allem in der Bekämpfung von viralen Infektionen spielen Interferone eine entscheidende Rolle. INF- $\alpha$ / $\beta$  werden schnell produziert, wenn virale Faktoren wie z. B. Glycoproteine oder doppelsträngige RNA (dsRNA) mit zellulären Gewebe-Erkennungs-Rezeptoren (Pattern-Recognition-Receptor, PRR; z. B. Toll-like-Rezeptor, TLR) interagieren. Im Gegensatz dazu wird INF- $\gamma$  aktiviert durch Rezeptor-medierte Stimulation oder durch das Auftreten früh produzierter Zytokine (z. B. IL-2,



IL-12, IL-18, INF- $\alpha$ /- $\beta$ ). Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung von INF- $\gamma$  erfolgt durch Aktivierung von virusspezifischen T-Zellen.

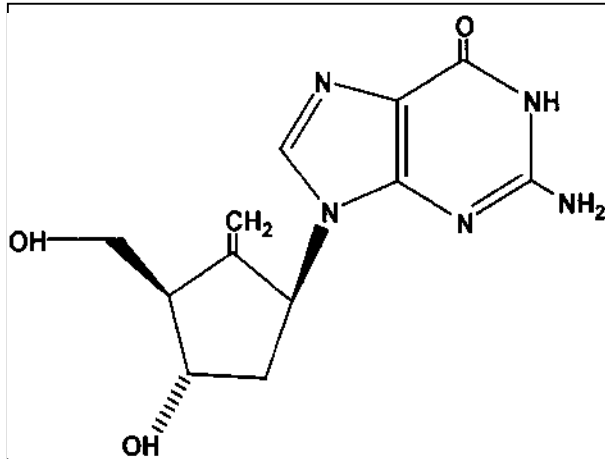
Im Zuge einer Immunantwort beeinflussen die INF die Aktivität von Makrophagen, NK-Zellen, DC sowie der Zelldifferenzierung. Kurz gesagt: INF sind für das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten des Immunsystems verantwortlich. Sie modulieren die verschiedenen Aspekte der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr (Malmgaard et al. 2004). Sie sind so in der Lage die Virusvermehrung auf den verschiedensten Stufen zu hemmen. Das betrifft die Viruspenetration, das Uncoating der Viruspartikel, die mRNA-Synthese, die Protein-Synthese und die Protein-Aggregation (Landolfo et al. 1995).

### 3.6.2 Antivirale Therapie chronischer HBV-Carrier mit Nukleosidanaloga

In der Therapie chronischer Infektion mit HBV wurden bisher viele Ansätze unternommen, um die Virusreplikation zu hemmen und so das Immunsystem zu stärken, so dass es in der Lage ist, das Virus zu eliminieren. Bisher wurden v. a. Therapien mit Interferon- $\alpha$  über sechs Monate durchgeführt. Sie führen aber nur in 30 - 40 % der Fälle zum Erfolg.

Andere Therapieansätze setzen auf die Anwendung sog. Nukleosidanaloga. Diese hemmen die reverse Transkriptase des Virus im infizierten Organismus. Ziel ist es die Virusreplikation möglichst vollständig zu unterbinden und so die Viruslast des infizierten Organismus zu reduzieren, um es dem Immunsystem möglich zu machen, das verbleibende Virus zu eliminieren. In der Therapie der HBV-Infektion steht hier das Lamivudin (3TC) an erster Stelle. Es wird nach Aufnahme in die Zellen zu seiner aktiven Form, dem 5'-Triphosphat umgewandelt. Wird es in dieser Form in die virale DNA eingebaut, führt es zum Abbruch des DNA-Stranges. Des Weiteren hemmt es die reverse Transkriptase. Problematik des Lamivudins ist die schon nach wenigen Monaten einsetzende Resistenz des HBV. Dabei kommt es zu Mutationen in der DNA-Polymerase/reversen Transkriptase des HBV, die eine Wirkung des 3TC an diesem Enzym nicht mehr möglich machen. Daher wird nach anderen Nukleosidanaloga geforscht, die nicht zur Bildung von Resistenzen führen.

Ein solches neues Nucleosidanalogen ist das Entecavir (ETV). Bei dieser Substanz handelt es sich um ein Nucleosidanalogen der Firma Bristol-Myers Squibb. Es hat eine spezielle antivirale Aktivität gegen Hepadnaviren. Die aktive Form von Entecavir ist das Entecavir-Triphosphat (s. Abb. 4).



**Abb. 4. Chemische Struktur von Entecavir in seiner inaktiven Form.** Die chemische Strukturformel lautet  $C_{12}H_{15}N_5O_3$ . Es handelt sich dabei um ein Cyclo-pentyl-2'-deoxyguanosin-Nucleosid-Analogen. Im Körper wird es zu einer aktiven Form, dem Entecavir-Triphosphat phosphoryliert und so aktiviert.

ETV hemmt die Viren in ihrer Reproduktion auf drei Ebenen. Zum Ersten verhindert ETV-Triphosphat das Priming der DNA-Polymerase, zweitens unterbindet es die reverse Transkription des negativen Stranges der prägenomischen mRNA in die DNA. Und drittens macht es die Synthese des positiven DNA-Stranges unmöglich.

Alle verwendeten Nucleosidanaloga bewirken nur einen transienten Abfall des Serumspiegels an WHV-DNA, der nach Absetzen der Therapie wieder auf das Ausgangsniveau zurückging. Das bedeutet, dass immer eine Dauertherapie vonnöten ist.

Da es dem chronisch infizierten Organismus aufgrund seiner inadäquaten und schwachen Immunantwort auch bei abgeschwächter Viruslast nicht möglich ist, das Virus vollständig zu eliminieren, müssen neue bzw. zusätzliche Behandlungsansätze überlegt und erforscht werden. Ziel ist immer, die Viruslast zu senken und gleichzeitig das Immunsystem in die Lage zu versetzen, das noch vorhandene Virus möglichst unter Aufbau einer stabilen Immunität zu eliminieren.

### 3.6.3 Therapeutische Vakzinierung chronischer WHV Carrier

Therapeutische Vakzinierung bedeutet Induktion der Immunantwort durch Zuführen von Virusantigenen. Damit ist der Grundgedanke, der hinter der therapeutischen Vakzinierung steckt, sowohl einfach als auch klar. Das Immunsystem soll in die Lage versetzt werden, die bisher nur inadäquate Immunantwort gegen das Virus zu überwinden, es zu eliminieren und gleichzeitig auch eine stabile Immunität aufzubauen, die vor Re-Infektion der Hepatozyten schützt.

Insbesondere die CD4+ und CD8+ T-Zellen sollen durch diese Form der Therapie angesprochen werden. Sie produzieren infolge dessen große Mengen an Interferon- $\gamma$  und  $\alpha$  (Couillin et al. 1999). Eine Induktion der CD4+ T-Zell-Antwort scheint wichtig zu sein, um die während der HBV-Infektion vorliegende Virämie kontrollieren zu können.

Das Woodchuck-Modell ist geeignet für Vakzinierungsstudien von naiven Tieren als auch zur Untersuchung der Vakzinierung als therapeutischen Behandlungen einer HBV-Infektion (Lu, M. et al. 2001). Es erlaubt z. B. die Untersuchung von Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten. V. a. die B-Zell-Antwort, weniger die T-Zell-Antwort, wird durch therapeutische Immunisierungen mit WHsAg in chronisch WHV-infizierten Woodchucks induziert (Lu, M. et al. 2001). In Folge dessen ist es möglich die unzureichende immunologische Antwort von chronisch infizierten Woodchucks gegenüber WHsAg teilweise zu überwinden (Roggendorf et al. 2007).

**Tabelle 3:** Bisher durchgeführte Studien in Woodchucks mit therapeutischen Vakzinierungen

Vakzine	Ergebnis	Literatur
WHsAg und Th-Peptide	Transiente anti-WHs, 2 Woodchuck starben	[Hervas-Stubbs et al., 1997]
WHsAg in Adjuvans	Antikörper gegen die pre-S-Region von WHs	[Lu et al., 2003]
WHsAg in Kombination mit L-FMAU	Stimulation der T-Zell-Antwort gegen WHV-Proteine, anti-WHs	[Menne et al., 2002]
WHsAg + anti-WHs-Immunkomplex in Kombination mit DNA-Vakzine und Lamivudin	Stimulation von anti-WHs und Suppression des WHV-Titers	[Lu et al., unveröffentlicht]
WHcAg	Viruselimination in einem von sechs Tieren	[Roggendorf und Tolle, 1995]

Bisher wurde für die therapeutischen Vakzinierungen derselbe Impfstoff verwendet, der auch zum Schutz vor Erstinfektionen mit HBV verwendet wird (Pol et al. 1993). Bei der Hälfte der Patienten kam es zu einem signifikanten Abfall der replizierten HBV-DNA im Serum. Dasselbe konnte auch für chronisch WHV-infizierte Woodchucks und einer therapeutischen Vakzinierung mit WHcAg gezeigt werden (Roggendorf et al. 1995, s. Tab. 3). Es gelang aber in keinem der Versuche, das Virus vollständig zu eliminieren, es blieben immer, wenn auch niedrige, Virus-Spiegel im Serum nachweisbar. 1997 führten Hervas-Stubbs et al. ebenfalls Immunisierungen von chronisch infizierten Woodchucks durch. Als Vakzine wurde eine Verbindung von WHsAg und Peptiden, welche speziell von T-Zellen erkannt werden, gewählt (s. Tab. 3). Es konnte gezeigt werden, dass die Kombinations-Vakzine zu einer guten Antikörper-Antwort führte. Allerdings wiesen die Tiere z. T. sehr starke Leberschäden auf, so dass eine Optimierung dieser Vakzine notwendig ist. Ebenfalls wurde 2001 gezeigt, dass die Höhe der Virämie von entscheidender Bedeutung für den Erfolg oder Misserfolg einer therapeutischen Immunisierung ist (Hervas-Stubbs et al. 2001). Bei chronisch infizierten Woodchucks mit einer niedrigen Virämie kam es infolge der Vakzinierung zu einer Verschiebung des produzierten Zytokin-Profiles hin zu Th0/Th1. Dies schien in dieser Studie eine effektive Induktion von anti-WHs-Antikörpern zu verhindern.

Neue Ansätze, sowohl was die Impfung gegen Erstinfektionen betrifft, als auch therapeutische Vakzinierungen, sind die Entwicklung von DNA-Vakzinen, die insbesondere die T-Zell-Immunantwort induzieren. Wie aus der Studie von Lu (nicht veröffentlicht) hervorgeht, scheint sich eine vorherige Virusreduktion, z. B. durch Nukleosidanaloga oder Interferon- $\alpha$ , positiv auf die Effekte der therapeutischen Vakzinierung auszuwirken.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Versuchstiere

Alle am Institut für Virologie (Universitätsklinikum Essen) der Universität Duisburg-Essen gehaltenen Woodchucks (*Marmota monax*, Amerikanisches Waldmurmeltier) stammen entweder aus eigenen Nachzuchten oder werden als adulte Tiere in den mittelatlantischen Staaten Nordamerikas gefangen und von der North Eastern Wildlife, N.Y., USA bezogen.

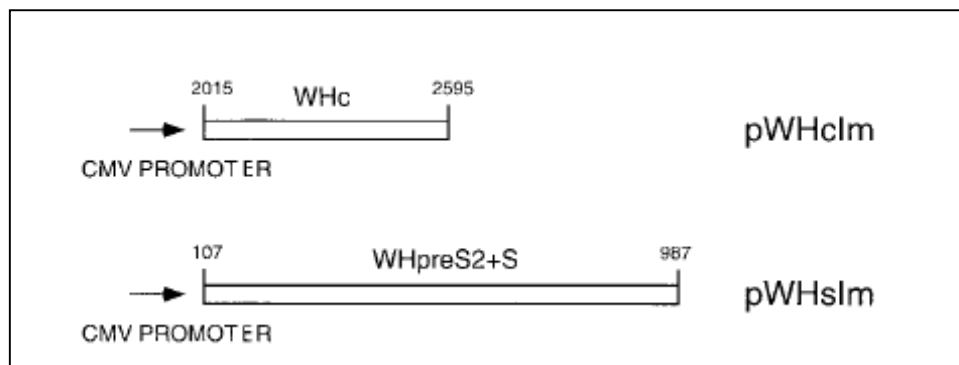
In den Versuch werden 2 negative und 20 chronisch infizierte Woodchucks aufgenommen. Als negativ wird ein Tier dann definiert, wenn im Serum keinerlei Marker einer bestehenden oder abgelaufenen WHV-Infektion nachgewiesen werden können. Bei diesen Tieren sind WHV-DNA, WHsAg, anti-WHs und anti-WHc nicht nachweisbar. Diesen Tieren wird regelmäßig Blut zur Serumgewinnung abgenommen, welches für weitere Tests (z. B. T-Zell-Proliferationstest, s. 4.2.7) verwendet und benötigt wird. Als chronisch infiziert werden Woodchucks definiert, wenn sie Marker einer bestehenden, nicht akuten WHV-Infektion zeigen. Bei ihnen werden WHV-DNA, WHsAg und anti-WHc, aber keine anti-WHs nachgewiesen.

Die Tiere werden einzeln gehalten. Als Käfige werden Edelstahlkäfige mit einer Größe von 95 x 60 x 80 cm verwendet, die als Doppelkäfige konstruiert sind. Die beiden Käfighälften sind durch ein Schlupfloch verbunden, welches bei Bedarf mit einem Schieber verschlossen werden kann. Eine Hälfte des Käfigs dient als Schlafplatz mit einem Heunest, die andere als Fress- und Kotplatz.

Die Fütterung setzt sich zusammen aus handelsüblichem, pelletiertem Meerschweinchen- oder Kaninchenfutter, welches mit Futterhaferflocken ergänzt wird. Außerdem werden den Tieren Äpfel, Bananen, Karotten oder Kopfsalat zur Ergänzung angeboten. Wasser steht ad libitum zur Verfügung.

#### 4.1.2 Plasmide

Zur Immunisierung werden Plasmide verwendet. Die Plasmide werden im Institut selbst hergestellt (s. u.). Als Grundlage werden Plasmide verwendet, welche sich bereits in früheren Versuchen (Lu et al, 1998) als wirksam erwiesen haben. So haben wir diese Plasmide erneut hergestellt und wie später beschrieben an den Tieren angewendet. Die Plasmide werden ohne Zugabe von Adjuvantien den Tieren i. m. verabreicht.



**Abb. 5. Konstrukte der für die Vakzinierung verwendeten Plasmide.** Beide Konstrukte (pWHslm und pWHclm) wurden auf der Basis von pcDNA3 (Invitrogen) kloniert. Die Nummerierung erfolgt nach Girones et al. (Girones et al. 1989).

Als Ausgangspunkt für die Fragmente dient der WHV8 Klon. Das Core-Gen wird hieraus mit Hilfe der PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer sind wc1 (Nukleotide [nt] 2015 bis 2038, 5'-TGGGGCCATGGACATAGATCCTTA-3') und wc2 (nt 2595 bis 2570, 5'-CATTGAATTCAGCAGTTGGCAGATGG-3'). Das PCR-Produkt wird in den pCRII-Vektor nach Herstellerangaben hineinkloniert. Ein einzelner Klon wird dann ausgesucht, nachdem die richtige Sequenz zuvor kontrolliert wurde. Das Fragment, welches das WHV-Core-Produkt enthält, wird mit Hilfe eines EcoRI-Verdau herausgeschnitten und gleichzeitig in die EcoRI-Schnittstelle des pcDNA3-Vektors eingebaut. Das so hergestellte pWHslm enthält das Core-Gen unter Kontrolle des CMV-Promotors.

Für das zweite Plasmid wird ebenfalls der WHV8-Stamm herangezogen. Daraus wird das WHsAg wie oben beschrieben mit der PCR amplifiziert. Die dafür verwendeten Primer sind whpres-2 ([nt] 107-12, 5'-CACTTAACTATGAAAAATCAGAC-3') und whs-2 ([nt] 987 bis 968, 5'-CCACCATTTTGTTTTATTAA-3'). Die weiteren Schritte werden, wie für das Core-Gen beschrieben, durchgeführt. Das Endprodukt ist das pWHsIm.

In beiden Vektoren stehen die Fragmente so unter direkter Kontrolle des CMV-Promotors. Die richtige Sequenz beider Klone wird mittels Sequenzierung kontrolliert und verifiziert.

#### 4.1.3 Peptide

Für die Proliferationstests werden industriell synthetisierte Peptide verwendet (Fa. emc microcollections, Tübingen, Deutschland). Sie sind nach früheren Studien von Menne et al. und Lu et al. (2002 und 1997, sowie 1999) ausgewählt worden. Es sind je sechs Peptide des Core-Proteins und sechs Peptide des S-Antigens nach ihrer Reaktivität ausgewählt worden.

**Tabelle 4:** Im Versuch eingesetzte Peptide auf Basis des S-Antigens

Name der S-Peptide	Aminosäure-Sequenz
S1 (AS 16 - 36)	AWWPAVGTYTTTYPQNSVF
S2 (AS 45 - 59)	SLINPKNQQELDSVL
S3 (AS 142 - 161)	LRDTHPHLTMKNQTFHLQGF
S4 (AS 235 - 243)	TIAQNLDWW
S5 (AS 302 - 321)	LLVLLDWKGLIPVCPLQPTT
S6 (AS 372 - 381)	ALARLSWLNL

Die Peptide sind zwischen 8 und 20 Aminosäuren lang (die meisten 19 AS), wobei sich v. a. die C-Peptide in einigen Aminosäuren überlappen können. Sie sind in PBS mit 10 % DMSO gelöst und in einer Konzentration 1 mg/ml eingestellt. Bis zu ihrer Verwendung werden sie tiefgefroren bei -20°C aufbewahrt.



**Tabelle 5:** Im Versuch eingesetzte Peptide auf Basis des Core-Antigens

Name der C-Peptide	Aminosäure-Sequenz
C1 (AS 1 - 20)	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLP
C2 (AS 50 - 69)	PHHTAIRQALVCWDELTKLI
C3 (AS 82 - 101)	RTIIVNHVNDTWGLKVRQSL
C4 (AS 97 - 110)	VRQSLWFHLSCLTF
C5 (AS 100 - 119)	SLWFHLSCLTFGQHTVQEFL
C6 (AS 112 - 131)	QHTVQEFLVSFGVWIRTPAP

#### 4.1.4 Chemikalien

[ $\alpha$ -P-32]-dCTP 9,25MBq, 250 $\mu$ Ci (Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland)  
 2[ $^3$ H]-Adenin 481GBq/mmol, 13,0Ci/mmol (Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland)

Acrylamid (BioRad, München, Deutschland)

Agarose (Eurogentec, Seraing, Belgien)

AIM-V Medium (Gibco, Paisley, UK)

Aluminium-Spray (Albrecht, Aulendorf, Deutschland)

$\beta$ -Mercaptoethanol (Gibco, Paisley, UK)

Biocoll Separating Solution (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Blocking Reagent (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland)

Concanavalin („ConA“; Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

3',3'-Diaminobenzifintetrahydrochlorid („DAB“, Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

D-PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung (Gibco, Paisley, UK)

Edithiumbromid (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Erythrozytenlyse-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland)

FCS = fötales Kälberserum/Fetal Bovine Serum (Gibco, Paisley, UK)

Fischsperma (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Glass Fiber Filters (Packard, Meriden, USA)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Hybond N<sup>+</sup>-Nylonmembran (Amersham Biosciences, Bucks, UK)

Hybridisierungslösung, Rapid-Hyb Buffer (Amersham Biosciences, Bucks, UK)

Isopropanol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)  
Ketamin 10 % (CEVA Tiergesundheit, Düsseldorf, Deutschland)  
Langzeitpenicillin/Dihydrostreptomycin (Chassot, Ravensburg, Deutschland)  
Microscint 20 (PerkinElmer, Monza, Italien)  
N, N, N', N' - Tetramethylethyldiamin („TEMED“; Sigma-Aldrich, München, Deutschland)  
Natriumdodecylsulfat („SDS“, Merck, Darmstadt, Deutschland)  
Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell GmbH, Einbeck, Deutschland)  
Orange G (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)  
o-Phenylendiamindihydrochlorid, („OPD“; Sigma-Aldrich, München, Deutschland)  
Penicillin-Streptomycin (Gibco, Paisley, UK)  
Protein A = HRP Conjugated EIA Grade ICN (Biomedicals Inc. Aurora, OH 44202, icnbiomed. com)  
Rainbow Marker 2,35 – 46,00 kd und 30,15 – 240,00 kd (Amersham Biosciences, Bucks, UK)  
Stopplösung = Stopping Solution POD (Dode Behring, Marburg, Deutschland)  
T61 (Intervet, Unterschleißheim, Deutschland)  
Temgesic (Buprenorphinhydrochlorid (Essex Pharma, München, Deutschland)  
Tris(-Base) (Calbiochem, Jolla, Kanada)  
Tween20 (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
Xylazin 2 % (CEVA Tiergesundheit, Düsseldorf, Deutschland)

Alle sonstigen Chemikalien werden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham, BioRad, Boehringer Ingelheim, Gibco, Merck und Sigma-Aldrich bezogen. Alle verwendeten Chemikalien besitzen den höchstmöglichen Reinheitsgrad.

#### 4.1.5 Plastikwaren

Bluecaps 15ml und 50ml (Falcon, Becton, Dickinson, USA)  
EDTA-Monovetten (Sarstedt, Nuembrecht, Deutschland)  
Eppendorfgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)  
Heparinisierte Serum-Monovetten (Sarstedt, Nuembrecht, Deutschland)  
MicroSpin S-200 HR Columns (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)

Microtest™ U-Bottom 96-well-plate (Falkon, Becton, Dickinson, USA)  
Mikrotiterplatten für ELISA = MaxiSorp Surface-Platte (NUNC, Roskilde, Dänemark)  
Kanülen Neolus Terumo®, 20 Gauge (bsn medical GmbH, Hamburg, Deutschland)  
Plastik-Petrischalen (Greiner GmbH, Esslingen a. Neckar, Deutschland)  
Plastiktüten (PerkinElmer, Monza, Italien)  
Rediprime II (Random Prime Labelling Systems)  
Selbstklebende Abdeckfolie Top Seal A: 96-well Microplates (PerkinElmer, Monza, Italien)

#### 4.1.6 Geräte

Elektrophorese-Geräte Power Supply EPS 500/400 (Pharmacia Biotech, Wien, Österreich)  
Eppendorf-Zentrifuge 5804 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)  
Eppendorf-Zentrifuge 5415 D (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)  
Handgeigerzähler LB 122 (Berthold GmbH, Bad Wildbad, Deutschland)  
Laminar HeraSafe (Heraeus, Hanau, Deutschland)  
Mikroskop Carl Zeiss 61394 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)  
Multifuge 3 L-R (Heraeus, Hanau Deutschland)  
Szintillationszähler Top Count-N XT Scintillation & Luminescence Counter (Packard, Meriden, USA)  
Neugebauer-Zählkammer (Heiland, Hamburg, Deutschland)  
Proteingelkammern "Mini Protean II Dual Slab Cell" (BioRad, München, Deutschland)  
UV-Lichtgerät (MWG-Biotech mbH, Frankreich)  
Wärmeofen Mino-Oven (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland)  
Zell-Harvester Filtermate Harvester (Packard, Meriden, USA)

#### 4.1.7 Häufig verwendete Puffer

Carbonatpuffer: 3,18 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,1 M) + 5,88 g NaHCO<sub>3</sub> + 0,2 g NaN<sub>3</sub>; pH 9,6  
Denaturierungspuffer: 20 g NaOH (0,5 M) + 37,66 g NaCl (1,5 M)  
Neutralisierungspuffer: 116 g NaCl (2 M) + 121 g Tris (1 M) + 70 ml HCl  
SSPE: NaCl (0,3 M) + EDTA (2 mM) + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (20 mM)

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Versuchsdurchführung

Die 20 Tiere werden in vier Gruppen aufgeteilt. Die Gruppen A und B bestehen aus vier, die Gruppen C und D aus sechs Tieren. Aufgrund von verschiedenen Verlusten (s. 5.1) gehen nur 17 Tiere in die Versuchsauswertung ein. Vier Tiere aus Gruppe A, drei aus Gruppe B und jeweils fünf aus den Gruppen C und D. Die Gruppenaufteilung sieht wie folgt aus:

**Tabelle 6:** Gruppeneinteilung der Tiere im Versuch.

<b>Gruppe</b>	<b>Behandlungen</b>	<b>Eingesetzte Tiere (n)</b>
A	Kontrollgruppe	4
B	Entecavirgruppe	3
C	ETV + DNA-Vakzine	5
D	ETV + DNA/Protein-Kombinationsvakzine	5

Zu Beginn des Versuches wird bei allen Tieren eine offene Leberbiopsie durchgeführt (s. 4.2.1.2). Dann wird den Gruppen B bis D elf Wochen lang täglich ETV (0,5 mg/kg) gefüttert, wobei ein durchschnittliches Körpergewicht von 4 kg angenommen wird. Das Medikament wird den Tieren zusammen mit handelsüblichem Babybrei (Fa. Nestlé-Alete, Frankfurt am Main, Deutschland) verabreicht. Nach den ersten elf Wochen werden die Tiere weitere elf Wochen einmal wöchentlich mit in Babybrei enthaltenem ETV gefüttert. Während der ersten elf Wochen wird den Tieren alle vier Wochen, später alle zwei Wochen Blut abgenommen. Die Gruppen C und D erhalten ab der 12. Woche zusätzlich auch noch Vakzinierungen. In Woche elf wird den betreffenden Tieren in den M. tibialis cranialis 500 mg Cardiotoxin injiziert. Die betreffende Injektionsstelle wird zum späteren Wieder-Auffinden markiert. Eine Woche später findet genau an der gleichen Stelle die erste Injektion mit der entsprechenden Vakzine statt. Die weiteren Injektionen mit den Vakzinen finden in den M. biceps femoris statt. Insgesamt werden die Tiere sechsmal vakziniert. Die ersten drei Vakzinierungen finden alle vier Wochen statt und liefen parallel mit der wöchentlichen Fütterung des ETV. Danach wird das Vakzinierungsschema auf eine Injektion alle zwei Wochen verkürzt.

Zusätzlich wird den Tieren regelmäßig Blut abgenommen, mindestens immer eine Woche nach der Vakzinierung.

**Tabelle 7:** Schematischer Versuchsaufbau. Tgl. und Wtl. zeigen die Zeiträume, in denen die Tiere täglich (Tgl.) bzw. wöchentlich (Wtl.) ETV bekommen haben. BE steht für Blutentnahmen.

Woche	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	
	0	1	2	4	6	8	10	12	13	16	17	20	21	24	25	27	
ETV-		T g l.															
Gabe								W t l.									
Impfung								↓		↓		↓	↓	↓	↓		
BE	x			x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X	
Biopsie	x																

#### 4.2.1.1 Blutentnahme

Blutentnahmen werden grundsätzlich am narkotisierten Tier vorgenommen. Dafür wird eine Kombinationsnarkose aus Ketamin und Xylazin verwendet. Die Dosierung beträgt 2,5 – 3 mg Xylazin/kg und 30 – 35 mg Ketamin/kg (entspricht 1 ml Xylazin und 4 ml Ketamin). Diese Mischung wird den Tieren intramuskulär (M. biceps femoris) injiziert. Die Blutentnahme erfolgt aus der V. saphena. Dafür wird das Bein großzügig geschoren, gereinigt und desinfiziert. Pro Blutentnahme werden ca. 4 – 5 ml EDTA- oder 2 – 3 ml Heparin-Blut gewonnen.

Während der Blutentnahmen werden den Tieren zu ihrem eigenen Schutz regelmäßig die Krallen geschnitten, sowie das Gewicht protokolliert.

#### 4.2.1.2 Biopsie

Die Leberbiopsie wird ebenfalls unter Narkose durchgeführt. Die Tiere erhalten die wie unter 4.2.1.1 beschriebene Kombinationsnarkose. Dann werden sie auf dem Rücken liegend ausgebunden. Der Bauch wird großzügig geschoren (vom Brustbein bis 6 cm unter dem Bauchnabel). Die Haut wird gereinigt und desinfiziert. Der Zugang erfolgt median über die Linea alba mit einem etwa 2 cm großen Schnitt. Dann wird der lateral liegende Leberlappen aufgesucht und ein etwa 1 x 1 cm großes Stück aus dem Leberlappenrand exzidiert. Der Schnitt in der Leber wird mit

resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen. Nach Kontrolle ob etwaiger Nachblutungen wird der Muskulatur- und Hautschnitt in zwei Schichten verschlossen. Die Wundabdeckung erfolgt zusätzlich mittels Aluspray. Die Tiere erhalten noch in der Narkose 0,8 ml Langzeitpenicillin/Dihydrostreptomycin® und 0,5 ml Temgesic® s. c. gespritzt. Das entnommene Stück Lebergewebe wird halbiert. Eine Hälfte wird sofort in Formaldehyd eingebracht, die andere Hälfte wurde unmittelbar danach in flüssigen Stickstoff verbracht. Die in Formaldehyd eingebrachte Probe wird später histologisch untersucht, während die andere Probe für etwaige weitere Tests bei - 80°C weggefroren wird. An den Tagen null, eins und zwei erhalten die Tiere zweimal täglich 0,5 ml Temgesic® und an den Tagen null, zwei und vier 0,8 ml Langzeitpenicillin® s. c. gespritzt. Während der nächsten 14 Tage werden die Tiere nicht auf Heu, sondern auf mehreren Lagen Zellstoff gehalten und täglich die Wunde kontrolliert. So wird ein etwaiges Einbringen von Fremdkörpern in die Wunde vermieden. Des Weiteren werden den Tieren regelmäßig die Krallen geschnitten, um das Risiko eines möglichen Aufkratzens der Wunde so gering wie möglich zu halten. Nach 14 Tagen werden in Narkose die Fäden gezogen und die Tiere können wieder ganz normal auf Stroh und Heu gehalten werden (s. 4.1.1).

#### 4.2.1.3 Immunisierung von chronischen WHV-Carriern

Die Vakzinierungen erfolgen entweder am wachen, oder wenn die Immunisierung mit einer Blutentnahme zusammenfällt im narkotisierten Zustand. Die Vakzinierung findet, bis auf das erste Mal, immer in den M. biceps femoris statt. Nur bei der ersten Vakzinierung erfolgt eine Woche vorher eine Behandlung mit Cardiotoxin. Dafür wird dann der M. tibialis cranialis ausgewählt, weil dieser kleiner ist und man so sicherstellen kann, dass die Vakzinierung an derselben Stelle erfolgt, wie die vorangehende Injektion mit Cardiotoxin. Den Tieren werden 500 µl einer 10 mMol Cardiotoxin-Lösung in beide M. tibialis cranialis verabreicht. Die Stelle wird mit einem hautverträglichen Stift markiert. Eine Woche später erfolgt an der gleichen Stelle die erste Immunisierung. Dieses Vorgehen wurde gewählt, weil Cardiotoxin ein hohes entzündungsauslösendes Potential besitzt. So kann sichergestellt werden, dass an der Infektionsstelle bereits viele Leukozyten vorhanden sind und so die Immunantwort verstärkt sein wird.

## 4.2.2 Serologische Nachweise

### 4.2.2.1 ELISA für anti-WHc

Der Nachweis der Antikörper gegen das Core-Protein erfolgt mittels eines ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Bei dem verwendeten ELISA handelt es sich um einen sog. Sandwich-ELISA. Dafür wird eine Mikrotiterplatte (NUNC) mit dem WHcAg ge-coated. Als Antigen wird ein selbst hergestelltes Plasmid verwendet (pQEWHc 149H), welches mittels Carbonatpuffer-Zugabe auf eine Konzentration von 10 µg/ml eingestellt wird. In jedes well werden 50 µl vorgelegt. Die Platte wird für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und danach viermal gewaschen (PBS mit 0,05 % Tween20). Um etwaige freie Bindungskapazitäten abzusättigen wird die Platte mit einer sog. Blocklösung (10 ml PBS + 500 µl FCS) belegt (100 µl/well) und erneut für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt eine weitere viermalige Waschung (PBS mit 0,05 % Tween20). Nun wird in jedes well 100 µl PBS vorgelegt und danach jeweils 1 µl der zu testenden Seren. Man erhält so eine Verdünnung der Seren von 1 : 100. Die Platte wird nun erneut für 1 Stunde bei gleicher Temperatur wie oben beschrieben inkubiert und erneut viermal gewaschen. Nun wird eine Lösung, welche Protein A zum Nachweis von Antikörper-Antigen-Bindungen enthält, hergestellt. Dafür werden z. B. 3 ml PBS mit 3 µl Protein A (Verdünnung von 1 : 1000) gemischt und von dieser Lösung jeweils 100 µl in die wells gegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 1 Stunde und wiederholtem Waschen mit PBS und 0,05 % Tween20 wird im nächsten Schritt eine mögliche Reaktion sichtbar gemacht. Dafür wird eine Tablette o-Phenylendiamindihydrochlorid (OPD) in 10 ml PBS und 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aufgelöst und wieder 100 µl in jedes well aufgetragen. Eine positive Reaktion erkennt man an dem mehr oder weniger sofort auftretenden Farbumschlag Richtung grünlich-schwärzlich. Nach etwa 2 - 5 Minuten gibt man zum Abstoppen der Reaktion 100 µl Stop-Lösung in jedes well und kann die einzelnen Farbintensitäten photometrisch auswerten. Die Farbintensität wird bei 492 nm bestimmt.

#### 4.2.2.2 ELISA für anti-WHs

Der Nachweis der Antikörper gegen das WHsAg erfolgt mittels eines ELISA. Bei dem verwendeten ELISA handelt es sich um einen sog. Sandwich-ELISA. Dafür wird eine Mikrotiterplatte (NUNC) mit dem WHs-Antigen ge-coated. Als Antigen wird ein industriell hergestelltes Antigen verwendet (Rheinbiotech, Düsseldorf, Deutschland), welches mittels Carbonatpuffer-Zugabe auf eine Konzentration von 2 µg/ml eingestellt wird. In jedes well werden 50 µl vorgelegt. Die Platte wird für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und danach viermal gewaschen (PBS mit 0,05 % Tween20). Um etwaige freie Bindungskapazitäten abzusättigen wird die Platte mit einer sog. Blocklösung (10 ml PBS + 500 µl FCS) belegt (100 µl/well) und erneut für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt eine weitere viermalige Waschung (PBS mit 0,05 % Tween20). Nun wird in jedes well 100 µl PBS vorgelegt und danach jeweils 10 µl der zu testenden Seren. Man erhält so eine Verdünnung der Seren von 1 : 10. Die Platte wird nun erneut für 1 Stunde bei gleicher Temperatur wie oben beschrieben inkubiert und erneut viermal gewaschen. Nun wird eine Lösung, welche Protein G zum Nachweis von Antikörper-Antigen-Bindungen enthält, hergestellt. Dafür werden z. B. 1,5 ml PBS mit 3 µl Protein G (Verdünnung von 1 : 500) gemischt und von dieser Lösung jeweils 100 µl in die wells gegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 1 Stunde und wiederholtem Waschen mit PBS und 0,05 % Tween20 wird im nächsten Schritt eine mögliche Reaktion sichtbar gemacht. Dafür wird eine Tablette OPD in 10 ml PBS und 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aufgelöst und wieder 100 µl in jedes well aufgetragen. Eine positive Reaktion erkennt man an dem mehr oder weniger sofort auftretenden Farbumschlag Richtung grünlich-schwärzlich. Nach etwa 2 - 5 Minuten gibt man zum Abstoppen der Reaktion 100 µl Stop-Lösung in jedes well und kann die einzelnen Farbintensitäten photometrisch auswerten. Die Farbintensität wird bei 492 nm bestimmt.



#### 4.2.2.3 ELISA für WHsAg

Der Nachweis des WHsAg erfolgt mittels eines ELISA. Dafür wurde eine Mikrotiterplatte (NUNC) mit dem WHs-IgG ge-coated. Dieses wird aus dem Serum positiver Tiere isoliert, welches dann mittels Carbonatpuffer-Zugabe auf eine Konzentration von 10 µg/ml eingestellt wird. In jedes well werden 50 µl vorgelegt. Die Platte wird für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und danach viermal gewaschen (PBS mit 0,05 % Tween20). Um etwaige freie Bindungskapazitäten abzusättigen wird die Platte mit einer sog. Blocklösung (10 ml PBS + 500 µl FCS) belegt (100 µl/well) und erneut für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt eine weitere viermalige Waschung (PBS mit 0,05 % Tween20). Nun wird in jedes well 100 µl PBS vorgelegt und danach jeweils 10 µl der zu testenden Seren. Man erhält so eine Verdünnung der Seren von 1 : 10. Die Platte wird nun erneut für 1 Stunde bei gleicher Temperatur wie oben beschrieben inkubiert und erneut viermal gewaschen. Nun wird eine Lösung, welche Biotin S zum Nachweis der Immunglobulin-Antigen-Bindungen enthält, hergestellt. Dafür werden z. B. 1,2 ml PBS mit 3 µl Protein A (Verdünnung von 1 : 400) gemischt und von dieser Lösung jeweils 100 µl in die wells gegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 1 Stunde und wiederholtem Waschen mit PBS und 0,05 % Tween20 wird im nächsten Schritt eine mögliche Reaktion sichtbar gemacht. Dafür wird eine Lösung, die Avidin enthält hergestellt (z. B. 5 ml PBS und 5 µl Avidin; Verdünnung von 1 : 1000) und in jedes well 100 µl vorgelegt. Avidin setzt das zuvor gebundene Biotin S farb-enzymatisch um. Die einzelnen Farbintensitäten werden photometrisch bei 492 nm bestimmt.

#### 4.2.2.4 Bestimmung der GOT und GPT

Die Bestimmung der GOT (Glutamatoxalacetattransaminase) und der GPT (Glutamatpyruvattransaminase) erfolgt im Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen. Dafür werden 200 µl des frisch abzentrifugierten Serums oder 200 µl Plasma, welches bei der Isolierung der Blutlymphozyten gewonnen wurde direkt ins Labor gebracht und dort bestimmt. Die Ergebnisse werden dann per email übersendet.

### 4.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) handelt es sich um ein hoch sensitives Verfahren zum direkten Nachweis von DNA. Hierbei können auch kleinste Mengen von DNA nachgewiesen werden. Hierzu wird ein Vermehrungsschritt vorgeschaltet. Die zunächst doppelsträngige DNA im Probenmaterial wird beim ersten Schritt mittels eines speziell angesetzten Mix in Einzelstränge aufgetrennt. Im zweiten Schritt lagern sich dann die sog. Primer an einzelsträngige DNA an. Bei den Primern handelt sich um kleine Oligonukleotide, welche eine komplementäre Sequenz zur nachzuweisenden DNA besitzen. Diese Primer dienen als Startpunkt für die Polymerase und so einer Transkription der Ursprungs-DNA. Im dritten Schritt werden die nun erneut doppelsträngigen DNA-Stücke wieder zu Einzelsträngen getrennt, damit sich die Primer an die nun vorhandenen Einzelstränge wieder anlagern können und so eine weitere Duplizierung möglich ist. Theoretisch reicht bei diesem Verfahren ein einziger Doppelstrang als Matrize aus. In der Praxis sind aber Mindest-DNA-Mengen von ca.  $1 \times 10^0$  nötig. Der Amplifizierungsschritt wird im Durchschnitt zwischen 25 und 40 Mal durchgeführt. So wird die Ursprungsmatrize amplifiziert, so dass die DNA später leichter nachgewiesen werden kann. Voraussetzung ist immer, dass zur DNA passende Primer ausgewählt werden.

#### 4.2.3.1 Qualitative PCR

Als Ausgangspunkt werden 200 µl Serum verwendet. Aus dieser Probe wird mittels eines Kits (QiAamp DNA Blood Kit; Qiagen, Hilden, Deutschland) die DNA laut Herstellerangaben gewonnen. Das entstehende Pellet wurde in 200 µl EB-Puffer (im Kit vorhanden) resuspendiert.

Es wird für die PCR der Mix wie folgt zusammengesetzt: Wasser + 5 µl DNA + DNTP's + 5fach Puffer + Taq-Polymerase + 2 Primer (wc1 und wc2). Die Menge für den Gesamtansatz des Mixes beträgt 25 µl. Die verwendeten Primer sind wc1 (Nukleotide [nt] 2015 bis 2038, 5'-TGGGGCCATGGACATAGATCCTTA-3') und wc2 ([nt] 2595 bis 2570, 5'-CATTGAATCAGCAGTTGGCAGATGG-3').

Die PCR läuft im Eppendorf-Cycler wie folgt: 4 Minuten bei 94°C als Startsequenz, dann 30 Zyklen (94°C 1 Minute, 50°C 1 Minute, 72°C 1 Minute). Der Endpunkt liegt bei 72°C für zwei Minuten, zum Ende wird die Probe konstant bei 4°C kühl gehalten. Zur Auswertung der PCR wird ein Agarosegel gegossen (s. 4.2.5.2). Es werden jeweils 5 µl der Probe zusammen mit Orangegel aufgetragen. Das Gel wird bei 120 mV für etwa eine Stunde eingeschaltet. Als Marker läuft eine sog. Protein Ladder mit.

#### 4.2.3.2 Quantitative PCR

Wenn im Rahmen der qualitativen PCR bei einer Probe eines Tieres ein positives Ergebnis festgestellt wird, wird zusätzlich eine quantitative PCR durchgeführt. Ausnahme bildet hier die Kontrollgruppe, wo davon ausgegangen wird, dass alle Tiere den gesamten Beobachtungszeitraum über virus-positiv bleiben. Daher werden dort alle Proben sofort quantitativ getestet.

Die WHV-DNA im Serum wird mittels einer real time PCR im Light-Cycler durchgeführt. Es wird das DNA-Master SYBR green Hot Start-Kit (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) verwendet. Die für die PCR verwendeten Primer werden in Anlehnung an Girones et al. (1989) konstruiert: wc1 5'-TGGGGCCATGGACATAGATCCTTA-3' [nt] 2015 bis 2038) und wc-149s 5'-AAGATCTCTAAATGACTGTATGTTCCG-3' ([nt] 2467 bis 2451). Die Reaktion wird im Light-Cycler (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) mit folgenden Parametern durchgeführt: 95°C für 0 Sekunden, 53°C für 10 Sekunden und 72°C für 12 Sekunden. Es werden insgesamt 45 Zyklen durchgeführt. Zum Schluss liegt die Schmelzkurve bei folgenden Parametern: 95°C für 0 Sekunden, 63°C für 15 Sekunden und erneut 95°C für 0 Sekunden. Das Abkühlen erfolgt bei 40°C für 0 Sekunden. Ein Plasmid, welches die gesamte Länge des gesamten WHV-Genoms enthält, wird verdünnt und als Standard mitgeführt. Das Detektionslimit des Assays liegt bei 103 WHV-Genom-Äquivalenten pro Reaktion.

#### 4.2.4 WHV-DNA-Nachweis im Serum (Spot Blot)

Zum Nachweis von WHV-DNA im Serum oder Plasma wurde ein sog. Spot Blot-Test durchgeführt.

##### 4.2.4.1 DNA-Immobilisierung auf Nitrozellulose

Auf einer Nitrozellulose-Membran (Hybond N<sup>+</sup>-Nylonmembran, Amersham Biosciences, Bucks, UK) wird ein Quadratgitter eingezeichnet. Die einzelnen Kästchen haben eine Kantenlänge von 1,5 cm. In jedes dieser vorgezeichneten Kästchen werden dann 5 µl des zu untersuchenden Serums oder Plasmas aufgetropft und ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Als Positivkontrolle wird ein WHV-Plasmid in einer Verdünnungsreihe ( $1 \times 10^{-3}$  bis  $1 \times 10^{-6}$ ) verwendet.

Danach erfolgt die Denaturierung mittels Denaturierungspuffer in einer kleinen Wanne, in die die Membran eingelegt wird. Es wird soviel Puffer zugesetzt, dass die Membran gerade mit Puffer bedeckt ist. Die Wanne mit der Membran wird dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf den Schwenker gestellt. Das Ziel dieses Puffers ist das Aufbrechen der viralen Core-Partikel und das gleichzeitige Denaturieren der WHV-Doppelstränge zu Einzelsträngen. Danach wird der Puffer abgeschüttet und direkt im Anschluss der Neutralisierungspuffer in gleicher Weise auf die Membran aufgebracht. Auch er sollte die Membran gerade bedecken und die Wanne mit der Membran und dem Puffer wird wiederum für 10 Minuten auf den Schwenker gestellt. Dann wird der Puffer ebenfalls verworfen und die Wanne mit zweifachem SSPE-Puffer aufgefüllt. Die Wanne wird erneut für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf den Schwenker gestellt. Danach wird der Puffer abgeschüttet, die Membran auf weißes Kartonpapier verbracht und mittels zweimaligen Bestrahlsens mit der UV-Lampe getrocknet. Ziel des Trocken-Vorganges ist es, die DNA direkt an die Membran zu vernetzen.

Dann kann die Membran in Tonkartonpapier eingepackt und in eine Plastiktüte verpackt im Kühlschrank mehrere Tage bis zur Weiterverwendung gelagert werden.

#### 4.2.4.2 Radioaktive Markierung der Gensonde

Für das Vorbereiten der Gensonde werden 42 µl Aqua bidest. und 5 µl Gensonde zusammengegeben und für 5 Minuten bei 94°C gekocht. Dann wird die Gensonde sofort in Eis verbracht. Im nächsten Schritt wird die vorbereitete Gensonden-Lösung so lange mit der Hybond-Lösung gemischt, bis sich der blaue Farbstoff komplett gelöst hat. Dann werden 3 µl dCTP zugegeben (angestrebtes Gesamtvolumen 50 µl, gegebenenfalls kann weniger Wasser und mehr dCTP verwendet werden) und gut vermischt. Diese Lösung wird für mindestens 15 bis maximal 60 Minuten bei 37°C im Thermoblock inkubiert. In der Zwischenzeit wird die vorbereitete Membran mit der DNA prähybridisiert. Dazu werden etwa zweifingerbreit der vorgewärmten Quick-Hyb-Lösung in ein Glasröhren für den Wärmeofen geben. Die Membran wird eingerollt und ebenfalls dazugeben. Das Glas wird danach mit einem Gegengewicht in den Dreher des Wärmeofens gebracht und die Membran für 30 Minuten bei 68°C prähybridisiert. Anschließend wird ein Filter vorbereitet und die zuvor hergestellte Sondenlösung auf den Filter gegeben und bei 3000rpm für 1 Minute zentrifugiert. Die vorher rosafarbene Sondenlösung (die dCTP-Lösung ist rosa) ist jetzt farblos. Die Sonde wird nun mit 100 µl Heringssperma vermischt und für 5 Minuten in sprudelnd kochendem Wasser gekocht. Die Sonden-Aktivität wird mittels Messung der Radioaktivität durch einen Geiger-Handzähler gemessen.

#### 4.2.4.3 DNA-Hybridisierung und Nachweis

Die so hergestellte radioaktiv markierte Gensonde wird komplett zu der bereits prähybridisierten Membran gegeben. Die Glasflasche wird erneut in den Drehspieß eingespannt. Nun wird die gesamte Anordnung über Nacht hybridisiert. Am nächsten Tag wird die Hybridisierungslösung abgegossen, etwa 15 ml Waschpuffer 1 zugegeben und die Membran für etwa 15 Minuten bei Raumtemperatur damit benetzt. Danach wird der Waschpuffer ebenfalls verworfen und erneut 15 ml Waschpuffer 1 aufgefüllt und der Puffer kann nochmals 15 Minuten bei Raumtemperatur auf die Membran einwirken. Dann wird nach Verwerfen des ersten Puffers das Glasröhrchen mit 15 ml Waschpuffer 2 aufgefüllt und dieser für etwa 30 Minuten in den 60°C heißen Wärmeofen eingespannt. Nun wird der Puffer komplett abgegossen, die Membran auf Filterpapier gelegt, damit sie bei Raumtemperatur

trocknen kann. Anschließend wird die trockene Membran in handelsübliche Frischhaltefolie eingewickelt und kann aus dem Radioaktiv-Labor genommen werden.

Zum Entwickeln wird der mehrfach verwendbare Film zum Löschen vorheriger Bilder für etwa zehn Minuten auf eine Lampe gelegt. Anschließend wird die in Folie eingeschlagene Membran direkt auf den Film gelegt und in eine Röntgenkassette eingelegt. Nach 1 - 3 Tagen kann das Bild mittels Photo-Cyclometer ausgewertet werden. Sollte das Ergebnis nach 1 Tag noch nicht zufrieden stellend sein, kann die Membran für erneute 24 - 48 Stunden auf den Film gelegt werden.

#### 4.2.5 Nachweis von DNA aus Lebergewebe (Southern Blot)

Als Substrat für diesen Nachweis wird Lebergewebe der Tiere verwendet, welches bei den Biopsien gewonnen wurde. Das Gewebe wird bis zur weiteren Verwendung bei - 80°C gelagert.

##### 4.2.5.1 Aufbereitung des Gewebes

Das Lebergewebe wird, sofern es eingefroren war, aufgetaut. Dann wird es in einer kleinen Petrischale so lange mit einem Pistill gemörsert, bis es ganz trocken und pulverisiert ist. Aus diesem Substrat wird mit Hilfe des QiAamp Blood Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) die DNA extrahiert. Zum Ende wird eine Konzentration von 1 µg/ml eingestellt. Diese Lösung kann für weitere Testverfahren wie z. B. den Southern Blot verwendet werden.

##### 4.2.5.2 Herstellung eines Agarose-Gels

Hierzu werden etwa 1,1 g Agarose in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und diese mit 100 ml TBA-Puffer (einfache Konzentration) vermischt. Diese Lösung wird in der Mikrowelle kurz bis zum Siedepunkt erhitzt, damit sich die Agarose vollständig löst. Anschließend wird in eine Elektrophoresekammer ein Spacer eingesetzt und dieser mit einer kleinen Menge der vorbereiteten Agarose-Lösung abgedichtet. Dann wird die heiße Lösung abgekühlt, 5 µl Ethidiumbromid dazugegeben und zum Aushärten

des Gels vollständig in die Elektrophoresekammer eingebracht. Wenn das Gel fest ist, werden die Spacer entfernt und die Kammer mit soviel TBA-Puffer aufgefüllt, bis das Gel vollständig bedeckt ist.

#### 4.2.5.3 Aufbringen der Proben

Als Nächstes werden die Proben auf ihren DNA-Gehalt vermessen. Dann werden 1 µg DNA sowie 10 µl Orange Gel als Marker eines Agarose-Gels aufgetragen und dieses Gel bei 120 mV etwa 1 h laufen gelassen. Anschließend wird der verbrauchte Puffer abgegossen und das Gel 30 Minuten in einer 0,5 M HCl-Lösung gelagert. Im Anschluss daran wird die Säure abgegossen und das Gel für 30 Minuten in Denaturierungspuffer eingelegt. Nach den 30 Minuten wird der Denaturierungspuffer durch Neutralisierungspuffer ersetzt, welcher ebenfalls 30 Minuten auf das Gel einwirken muss. Als Letztes wird das Gel für 30 Minuten in 2x SSPE-Puffer gewässert. Alle Lösungen wirken bei Zimmertemperatur auf das Gel ein. Ziel des Ganzen ist es, die im Gel enthaltene DNA so umzustrukturieren, dass sie im nächsten Schritt auf eine Membran übertragen werden und später mittels radioaktiver Markierung sichtbar gemacht werden kann.

#### 4.2.5.4 Übertragung der DNA auf eine Membran

Bisher ist die DNA zwar aufgeschlossen worden, liegt aber immer noch im Agarose-Gel gebunden vor. Mit Hilfe eines Vakuum-Blotters kann diese DNA nun auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen werden, damit diese im nächsten Schritt sichtbar gemacht werden kann. Dazu werden folgende Materialien in einen Vakuum-Blotter eingeschichtet (von unten nach oben): Filterpapier, Nitrozellulose-Membran, Gel. Das Gel wird zwei Stunden im Vakuum-Blotter belassen. Durch das Vakuum und die vorherige Behandlung des Gels mit den Puffern, kann die DNA sehr leicht aus dem Gel in die Membran diffundieren, wo sie erneut an die Membran gebunden wird. Danach wird die Membran auf weißes Kartonpapier verbracht und mittels zweimaligen Bestrahlsens mit der UV-Lampe getrocknet. Dieser Trocknungsvorgang vernetzt die DNA direkt an die Membran.

Dann kann die Membran in Tonkartonpapier eingepackt und in eine Plastiktüte verpackt im Kühlschrank mehrere Tage bis zur weiteren Bearbeitung gelagert werden.

#### 4.2.5.5 Radioaktive Markierung der Gensonde

Für das Vorbereiten der Gensonde werden 42 µl Aqua bidest. und 5 µl Gensonde zusammengegeben und für 5 Minuten bei 94°C gekocht. Anschließend wird die Gensonde sofort in Eis verbracht. Im Anschluss daran wird die vorbereitete Gensonden-Lösung so lange mit der Hybond-Lösung gemischt, bis sich der blaue Farbstoff komplett gelöst hat. Dann werden 3 µl dCTP zugegeben (angestrebtes Gesamtvolumen 50 µl, gegebenenfalls kann weniger Wasser und mehr dCTP verwendet werden) und gut vermischt. Diese Lösung wird für mindestens 15 bis maximal 60 Minuten bei 37°C im Thermoblock inkubiert. In der Zwischenzeit wird die vorbereitete Membran mit der DNA prähybridisiert. Dazu werden etwa zweifingerbreit der vorgewärmten Quick-Hyb-Lösung in Glasröhren für den Wärmeofen geben. Die Membran wird eingerollt und ebenfalls dazugeben. Das Glas zusammen mit einem Gegengewicht in den Dreher des Wärmeofens einspannen und die Membran für 30 Minuten bei 68°C prähybridisieren. Der Filter wird vorbereitet und die zuvor hergestellte Sondenlösung auf den Filter gegeben und bei 3000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Die vorher rosafarbene Sondenlösung (die dCTP-Lösung ist rosa) ist nun farblos. Die Sonde wird dann mit 100 µl Heringssperma vermischt und für 5 Minuten in sprudelnd kochendem Wasser gekocht. Danach wird zur Überprüfung der Sonden-Aktivität die Radioaktivität der Sonde mittels eines Geiger-Handzählers gemessen.

#### 4.2.5.6 DNA-Hybridisierung und Nachweis

Die so hergestellte radioaktiv markierte Gensonde wird komplett zu der bereits prähybridisierten Membran gegeben. Die Glasflasche wird erneut in den Drehspieß eingespannt. Nun wird das Ganze über Nacht hybridisiert. Am nächsten Tag wird die Hybridisierungslösung abgegossen und mit etwa 15 ml Waschpuffer 1 aufgefüllt. Diesen lässt man etwa 15 Minuten einwirken. Danach wird der Waschpuffer ebenfalls verworfen und die das Glasröhrchen erneut 15 ml Waschpuffer 1 aufgefüllt.



Der Puffer wirkt wieder 15 Minuten auf die Membran ein. Dann wird nach Verwerfen des Puffers 1 die Membran mit 15 ml Waschpuffer 2 aufgefüllt und diese Anordnung für etwa 30 Minuten in den 60°C heißen Wärmeofen eingespannt. Anschließend wird der Puffer komplett abgegossen, die Membran auf Filterpapier gelegt, damit sie bei Raumtemperatur trocknen kann. Im Anschluss daran wird die trockene Membran in handelsübliche Frischhaltefolie eingewickelt und kann aus dem Radioaktiv-Labor genommen werden.

Zum Entwickeln wird ein mehrfach verwendbarer Film zum Löschen vorheriger Bilder für etwa 10 Minuten auf eine Lampe gelegt. Danach wird die in Folie eingeschlagene Membran direkt auf den Film gelegt und in eine Röntgenkassette eingelegt. Nach 1 - 3 Tagen kann das Bild mittels Photo-Cyclometer ausgewertet werden. Sollte das Ergebnis nach 1 Tag noch nicht zufrieden stellend sein, kann die Membran für erneute 24 - 48 Stunden auf den Film gelegt werden.

#### 4.2.6 Histologische Untersuchung der Leber

Die bei der Biopsie gewonnene Gewebeprobe wird sofort in Formalin eingebracht. Im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Essen wird die Probe weiterverarbeitet und histologisch ausgewertet. Die Probe wird mittels Einbettungsverfahren mit Paraffin zur mikroskopischen Untersuchung aufbereitet.

Hierzu wird das zuvor gewonnene Gewebestück zunächst mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, da später das Paraffin als Einbettungsmedium das Wasser im Gewebe ersetzt. Da aber Wasser und Paraffin nicht mischbar sind, ist ein Zwischenschritt, in dem ein Intermedium eingebracht wird, notwendig. Als Intermedium wird Xylol verwendet, da es aufgrund seiner physikalischen und chemischen Eigenschaften sowohl mit Wasser als auch mit Paraffin mischbar ist. Im letzten Schritt wird zur Präparierung der Probe das Paraffin eingebracht. Da Paraffin bei Zimmertemperatur fest ist, muss dieser Schritt bei 58°C erfolgen. Ist das Paraffin dann wieder ausgehärtet, ist es möglich Schnitte von 1 - 40µm herzustellen. In diesem Fall liegt die Schnittdicke bei 5 - 20µm.

Um die einzelnen Strukturen genauer voneinander abgrenzen und beurteilen zu können, wurden die so hergestellten Schnitte mittels einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) eingefärbt. Diese Färbung gilt als Standard-Färbeverfahren und erlaubt eine gute Zuordnung von Zellkernen, Zellplasma und sonstigen Gewebsstrukturen. Bei dieser Färbung reagiert die basische, blaue Komponente Hämalaun/Hämatoxylin mit den sauren Anteilen der Zelle (Nukleinsäuren des Zellkerns, NS des rauen endoplasmatischen Retikulums, reR). Im Gegensatz dazu reagiert der saure, rote Farbstoff Eosin mit den basischen Zellkomponenten (Zytoplasma, Interzellulärsubstanz).

Die gesamte praktische Durchführung und histologische Auswertung erfolgte durch Frau Linker vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Essens.

#### 4.2.7 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)

Nach der oben beschriebenen Blutentnahme wird etwaiges gewonnenes Serum abzentrifugiert (2000 rpm, 20 Minuten). 200 µl werden für die oben beschriebene GOT- und GPT-Bestimmung abgenommen, während der Rest aliquotiert bei zunächst - 20, später - 80°C aufbewahrt wird. Die Isolierung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) erfolgt modifiziert nach der Methode von Böjum (1986) über eine Ficoll-Paque-Dichtegradienten-Zentrifugation. Das abgenommene EDTA-Blut (etwa 5 ml) wird mit PBS auf 10 ml aufgefüllt. Dann werden in ein Leukosept-Röhrchen 15 ml Biocoll Separating Solution vorgelegt und dieses bei 1000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Danach befindet sich die Ficoll-Lösung unterhalb der Membran. Auf die Membran, wird das Blut-PBS-Gemisch gegeben und für 10 Minuten bei 934 g und 10°C zentrifugiert. Vom Überstand wird für etwaige spätere Tests Plasma gewonnen und bei zunächst - 20°C, später - 80°C aufbewahrt. Der restliche Überstand wird in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Diese Lösung wird zentrifugiert (5 Minuten, 1200 rpm, 10°C), der Überstand vorsichtig verworfen und das rote Pellet mit 5 ml Hämolysepuffer resuspendiert. Dann wird erneut zentrifugiert (5 Minuten, 1200 rpm, 10°C). Der Überstand wird verworfen und das jetzt weiße Pellet wird mit 25 ml PBS resuspendiert und gewaschen, erneut zentrifugiert (5 Minuten, 1200 rpm, 10°C) und der Überstand verworfen. Das nun vorliegende weiße Pellet wird mit 1 ml AIM-V-

Medium resuspendiert. Das Medium enthält zusätzlich 1 % Penicillin-Streptomycin, 10 % natives Woodchuck-Serum und 50 µl β-Mercaptoethanol (auf 500 ml Medium). Die Bestimmung der Zellausbeute erfolgt manuell mit einer Neubauer-Zählkammer. Die Zellzahl der gewonnenen PBMCs wird auf  $1 \times 10^6$  eingestellt.

#### 4.2.8 Proliferationstest mit $2[{}^3\text{H}]$ -Adenin

Die Kultivierung der so isolierten Woodchuck-PBMCs erfolgt in 96-well-Mikrotiterplatten mit rundem Boden bei 37°C in einer mit 5 % CO<sub>2</sub> gesättigten Atmosphäre. Pro well werden  $1 \times 10^5$  in AIM-V-Medium suspendierte PBL's vorgelegt. Die Proliferationsantwort der Woodchuck-PBL's auf verschiedene WHV-Antigene und auf ConA wird in Dreifachansätzen fünf Tage nach Beginn der Stimulation gemessen. Als Kontrolle (Negativ-/Autolog-Werte) wird die Spontanproliferation der PBMC in Medium ohne Mitogen- oder Antigen-Zugabe definiert. 16 - 20 Stunden vor der Zellernte werden 1 µCi an  $2[{}^3\text{H}]$ -Adenin zu den PBMC gegeben. Die so radioaktiv markierten PBMC werden dann am nächsten Tag mit einem Zell-Harvester auf Filterpapier geerntet und danach dreimal mit Wasser gewaschen. Das Filterpapier wird bei Raumtemperatur getrocknet. Sobald das Papier trocken ist, wird es in Platten eingespannt, in jedes well werden 25 µl Szintillationsflüssigkeit gegeben und diese dann im Beta-Counter ausgewertet.

Die Ergebnisse der PBMC-Proliferation (Dreifachansätze) sind als SI-Wert angegeben. Dieser Stimulations-Index berechnet sich aus der Division der mittleren cpm-Werte nach Stimulation mit Mitogenen oder WHV-Antigenen durch die mittleren cpm-Werte der Negativ-Kontrollen. Ein SI von  $\geq 2,1$  bzw. von  $\geq 3,1$  (Cutoff) wird als geeignet angesehen, um eine spezifische PBMC-Proliferation durch  $2[{}^3\text{H}]$ -Adenin nachzuweisen.

##### 4.2.8.1 Stimulation der PBMCs mit Mitogenen

Die Woodchuck-PBMCs werden mit Concanavalin (ConA) stimuliert. Der sich daraus ergebende Stimulations-Index gilt als Positiv-Kontrolle. Mitogene stimulieren Zellen jeglicher Art unspezifisch, daher ist hier auch mit einer stärkeren Proliferationsantwort zu rechnen als bei den verwendeten WHV-Antigenen. Die optimale Konzentration ist

in Vorversuchen ermittelt worden (eigene Ergebnisse) und liegt bei 4 µl/ml. In jedes well werden 10 µl vorgelegt.

#### 4.2.8.2 Stimulation der PBMCs mit WHV-Antigenen

Woodchuck-PBMCs werden mit industriell synthetisierten Peptiden, die sich von WHV-Core-Protein (WHcAg) und WHV-Hüllprotein (WHsAg) ableiten, stimuliert (s. 4.1.3). Die Konzentration der eingesetzten Peptide beträgt 1 µg/ml. Diese Konzentration ist wie für die Mitogene in eigenen Vorversuchen ermittelt worden. Auch hier werden 10 µl/well vorgelegt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Allgemeines

Im Folgenden werden die Versuchsergebnisse vorgestellt. Dabei werden die erhobenen Parameter für die einzelnen Gruppen getrennt dargestellt und besprochen.

#### 5.1.1 Versuchstiere

Die 19 Tiere haben zu Beginn des Versuches (Frühjahr) ein durchschnittliches Gewicht von 3,49 kg (2,50 kg bis 5,20 kg). Zu Versuchsende, bzw. zum Zeitpunkt des Ausscheidens der Tiere aus dem Versuch, liegt das durchschnittliche Körpergewicht bei 3,74 kg (2,15 kg bis 6,00 kg). Bei den in den Versuch aufgenommenen Tieren handelt es sich um 12 Weibchen sowie 8 Männchen. Die Tiere sind zufällig den 4 Versuchsgruppen zugeordnet worden.

**Tabelle 8:** Verteilung der eingesetzten Versuchstiere in die Versuchsgruppen

<b>Gruppe A: Kontrollgruppe</b>
WH 23384
WH 23386
WH 25700 (gestorben in Woche 4)
WH 25702
<b>Gruppe B: Entecavirgruppe (ETV-Gruppe)</b>
WH 21030
WH 23382
WH 26524
WH 29543
<b>Gruppe C: ETV + DNA-Vakzine</b>
WH 25706
WH 26518
WH 26519 (gestorben in Woche 18 aufgrund einer Verletzung)
WH 26520
WH 26522

**Gruppe D: ETV + DNA/Protein-Vakzine**

WH 25696

WH 25703 (gestorben in Woche 27)

WH 26523 (gestorben in Woche 25)

WH 26528

Insgesamt sind bis einschließlich Woche 34 des Versuchs fünf Tiere aus verschiedenen Gründen gestorben. Zwei Tiere (WH 23384 und WH 29543) wurden zwei Wochen später in den Versuch aufgenommen. Bei diesen Tieren ist auf eine Biopsie verzichtet worden. Ein weiteres Tier (WH 25700) aus der Kontrollgruppe verstarb in Woche vier des Versuchs an den Folgen eines HCC. Der Tumor wurde bereits bei der offenen Biopsie festgestellt. Auch hier ist keine Sektion durchgeführt worden, sondern es wurden nur Lebergewebsproben gewonnen und für etwaige spätere Untersuchungen verwahrt. In Woche 16 des Versuchs verstarb ein Tier (WH 26519) aus der Entecavir-DNA-Gruppe infolge einer Verletzung, die durch einen Ausbruchversuch aus dem Käfig entstand. Dieses Tier hatte sich kurz nach Versuchsbeginn im Käfig eine Zehe abgerissen und ist daran verblutet. Das nächste Tier (WH 25702) gehört ebenfalls zur Kontrollgruppe und ist in Woche 20 des Versuchs an den Folgen eines HCC verstorben. Hier wurde zur Probensicherung vorgegangen wie bei Tier WH 25700. In Woche 25 ist ein Tier (WH 26523) erneut auf Grund von Kachexie, Apathie und Anorexie euthanasiert worden. Das Tier gehört zur ETV-DNA/Protein-Gruppe. Die anschließende Sektion ergab keinen endgültigen Befund. In Woche 27 ist ein weiteres Tier (WH 25703) aus der gleichen Gruppe euthanasiert worden. Bei ihm ist einige Wochen zuvor eine etwa walnussgroße Umfangsvermehrung an der linken Hüfte aufgefallen. Trotz sowohl medikamenteller Therapie und chirurgischer Abklärung konnte die Geschwulst weder entfernt werden, noch geklärt werden, um was es sich handelt. Da das Tier massive Beeinträchtigungen in seinem Allgemeinbefinden aufwies, ist es euthanasiert worden. In der Sektion ist dann ein hochgradiger Befall mit Bandwurm-Finnen nachgewiesen worden.

Generell ist zu sagen, dass die Tiere die Injektionen mit den Vakzinen, sowie die Narkosen gut vertrugen. Bei keinem der Tiere sind Spritzabszesse oder ähnliches oder extreme Probleme in der Aufwachphase beobachtet worden.

### 5.1.2 Entecavir-Aufnahme

Grundsätzlich ist zu sagen, dass alle Tieren den mit Entecavir versetzten Babybrei problemlos akzeptieren. Es wurde für die Verabreichung grundsätzlich Obstsorten (Banane, Apfel, Pfirsich, Birne, etc.) bzw. Brei auf Möhrenbasis gewählt, um so eine möglichst hohe Akzeptanz zu gewährleisten. Das Entecavir im Babybrei hat keinerlei negative geschmackliche Auswirkungen. In der Regel fressen die Tiere den mit Entecavir versetzten Babybrei sofort oder in der Nacht. Allerdings hat ein Tier (WH 25695) von Anfang an eine schlechte Entecavir-Aufnahme gezeigt. Daher kommt es bei diesem Tier nicht zu einem Abfall der Virusmenge im Serum bzw. Plasma. Dieses Tier ist demzufolge auch nicht in die weitere Auswertung aufgenommen worden.

## 5.2 Kinetik der WHV-DNA und anderer Parameter während der Therapie mit ETV

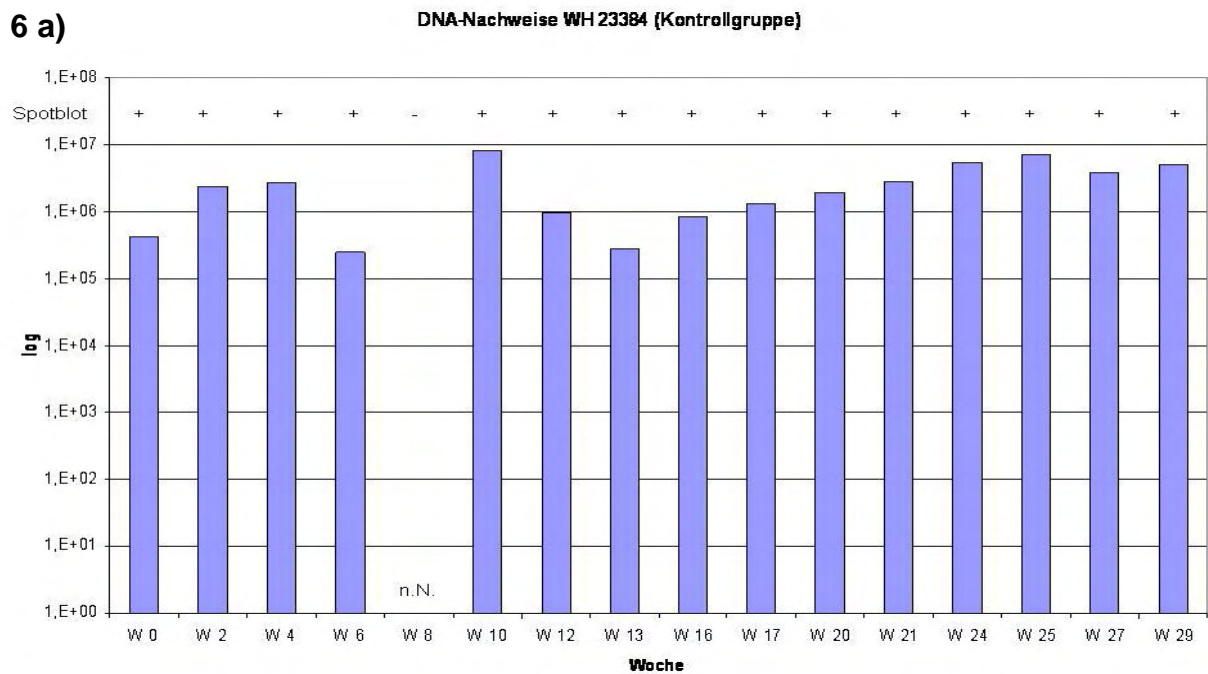
### 5.2.1 Kontrollgruppe (Gruppe A)

Zwei Drittel der Tiere haben zu Beginn des Versuches (Woche 1) Virus-Mengen-Werte zwischen  $1 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$ . Das restliche Drittel hat mehr als  $1 \times 10^6$  nachgewiesene Viruspartikel/-DNA im Serum bzw. Plasma. Ein Tier (WH 17660) zeigt schon zu Beginn des Versuches, im Gegensatz zu früheren Tests, keine nachweisbare DNA im Plasma/Serum. Dieses Tier, hatte ein Alter von mindestens 5 Jahren lebte davon schon 2 Jahre im Institut. Da dieses Tier den gesamten Versuchszeitraum über negativ getestet worden ist, wird es für die weitere Auswertung nicht herangezogen.

Zu Versuchsbeginn gibt es keine signifikanten Unterschiede der WHV-DNA-Mengen im Serum der Tieren, die keinerlei Behandlung bekommen haben (Kontrollgruppe) und den Tieren, die Entecavir (Gruppen 2 bis 4) bekommen haben.

Die Tiere der Kontrollgruppe sind bezüglich der Virusmenge (Abb. 6) den gesamten Beobachtungszeitraum über konstant. Es gibt nur geringe Schwankungen ( $1 \times 10^5$  –

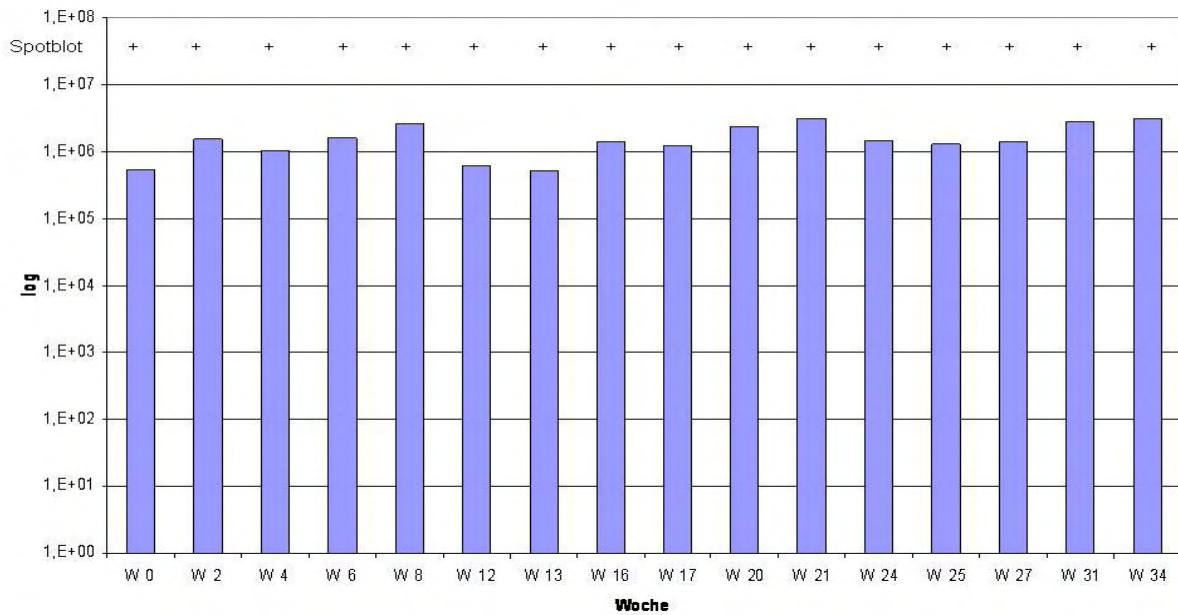
$1 \times 10^7$ ) im zeitlichen Verlauf. Diese lassen sich aber einfach über individuelle, Tagesform-abhängige und jahreszeitlich abhängige Unterschiede erklären. Auffällig ist hier, dass es bei hohen Virus-Mengen unerheblich ist, ob Serum oder Plasma als Ausgangsmaterial verwendet wird. Noch ist die Methode, welche für den Nachweis ausgewählt wird so gesehen nicht relevant, da mit allen drei Nachweisverfahren ein positives Ergebnis zustande kommt. Das bedeutet, dass bei erwartungsgemäß hohen Virus-Titern eine weniger sensitive Methode, wie der Spot Blot, verwendet werden kann.





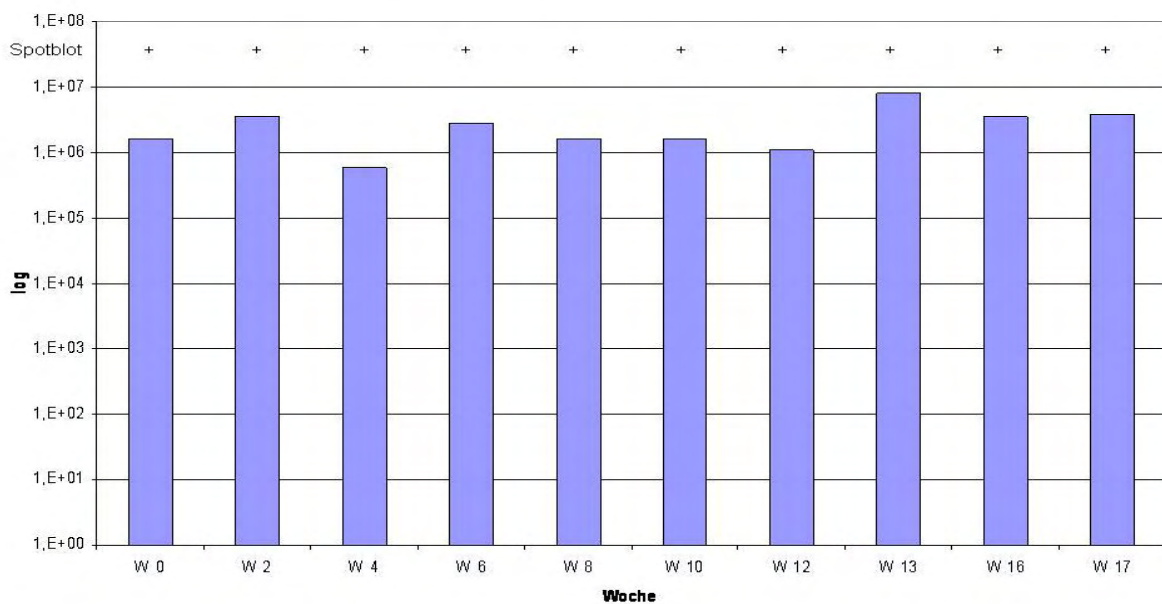
## 6 b)

## DNA-Nachweise WH 23386 (Kontrollgruppe)



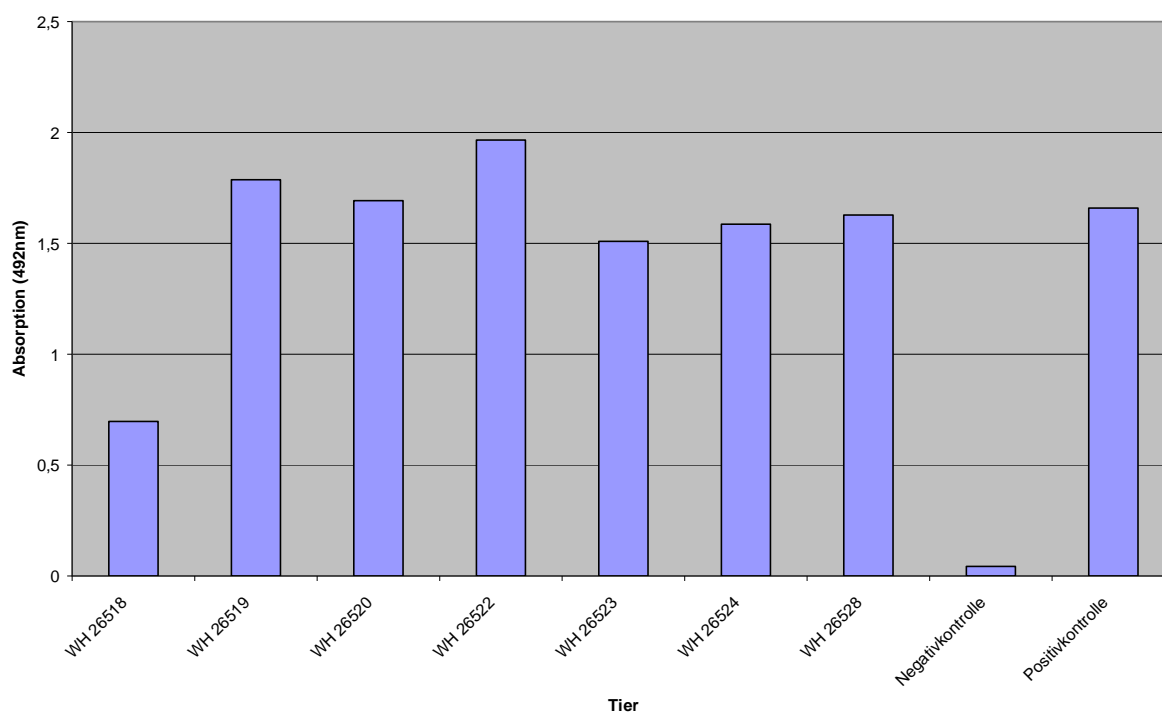
## 6 c)

## DNA-Nachweise WH 25702 (Kontrollgruppe)



**Abb. 6 a bis c: Tiere aus der Kontrollgruppe.** Bei diesen Tieren wurde zum DNA- bzw. Virusnachweis ein Spot Blot und eine quantitative PCR (s. Methoden) durchgeführt. Wie ersichtlich ist die Virusmenge über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant ( $1 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ ). Hierbei ist es unerheblich, ob mittels Spot Blot oder mittels PCR getestet wurde. Wichtig ist zu beachten, dass die Überlebenszeiten und damit die Gesamtbeobachtungszeiträume bei den einzelnen Tieren variieren können. (n. N. = nicht nachweisbar).

Zu Beginn des Versuches ist ein anti-WHc-ELISA durchgeführt worden, der mit dem Spot Blot zusammen ein Aufnahmekriterium für die Tiere darstellt. Nur ein Tier mit einem positiven anti-WHc-ELISA wird in den Versuch aufgenommen. Beispielhaft werden hier die Ergebnisse von einer Teilgruppe der Tiere dargestellt. Die Blutentnahme erfolgt bei der Eingangsuntersuchung der Tiere nach Ankunft im Institut für Virologie. Als Positivkontrolle wird Serum von einem Tier verwendet, welches in der Virämiephase einer akuten Infektion gewonnen worden ist. Die Negativkontrolle ist von einem immunologisch naiven Tier gewonnen und verwendet worden. Bei der Negativkontrolle wird keinerlei positive Reaktion erwartet, aber um etwaige unspezifische Reaktionen auf das Serum auszuschließen, wird es mitgetestet. Die Ergebnisse der anderen im Versuch eingesetzten Tiere stellen sich ähnlich dar.



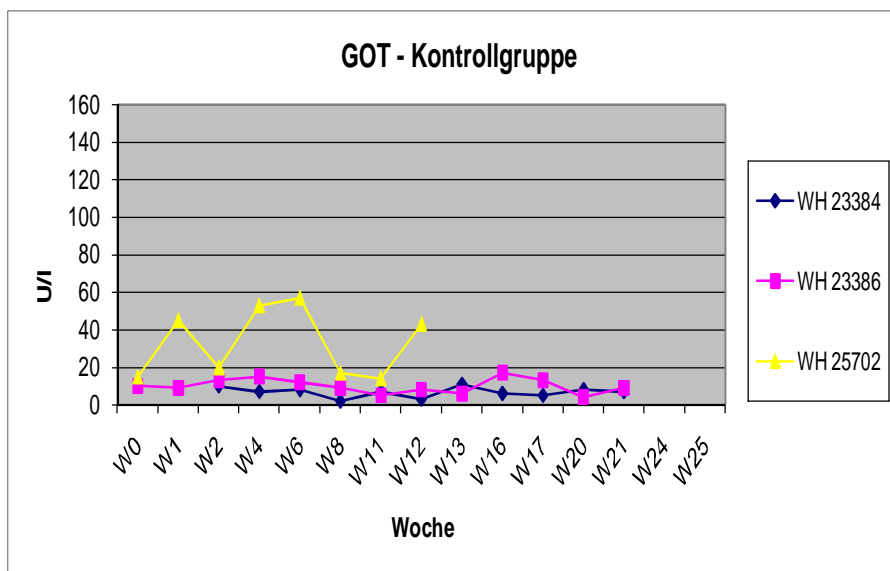
**Abb. 7: anti-WHc-ELISA.** Beispielhaft werden die Ergebnisse des ELISA bei der Eingangsuntersuchung dargestellt. Eine Absorption von über 0,5 wird als positiv angesehen. Sind die Tiere parallel auch im Spot Blot als positiv anzusprechen, werden sie in den Versuch aufgenommen.

Dieses Ergebnis, wie es sich in Abbildung 7 darstellt gilt für alle 4 Versuchsgruppen. Es wird daher in den anderen 3 Versuchsgruppen nicht mehr darauf eingegangen, sondern als gegeben vorausgesetzt. Dieser Parameter ist auch nicht wie alle anderen über den gesamten Versuchszeitraum verfolgt worden, da selbst bei einer

erfolgreichen Viruseliminierung davon ausgegangen werden muss, das anti-WHc bei den Tieren nachweisbar bleibt.

Im Gegensatz dazu ist bei jeder Blutentnahme zusätzlich etwas Serum bzw. Plasma zur Leberenzym-Bestimmung gewonnen worden. Mit Hilfe dieses Parameters sollen weitere Informationen über eine mögliche Schädigung der Leber im zeitlichen Ablauf des Versuches gewonnen werden. Es ist für die Enzymbestimmung unerheblich, ob Serum oder Plasma als Ausgangsmaterial genutzt wird. Im Gegensatz zu früheren Versuchen, ist eine Bestimmung von SDH (Sorbitoldehydrogenase) als Parameter für etwaige Leberzellschäden bzw. Leberfunktionsstörungen nicht möglich, da dieser Parameter sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin mittlerweile als obsolet gilt.

Im Vergleich der beiden Parameter gegeneinander fällt auf, dass GOT einen deutlich einheitlicheren Verlauf bei den Tieren innerhalb der Versuchsgruppe aufweist. Hier gibt es bezüglich der einzelnen Tiere in den Gruppen weniger Schwankungen, während die Ergebnisse der GPT-Bestimmung doch deutlich breitere Schwankungen aufweisen.



**Abb. 8: GOT-Verlauf der Tiere der Kontrollgruppe während des gesamten Versuchszeitraumes.** Die Angaben täglich und wöchentlich beziehen sich auf die ETV-Gabe. Die Tiere aus der Gruppe haben kein ETV bekommen, diese Angabe soll nur der besseren Vergleichbarkeit mit den anderen 3 Gruppen dienen.

Man kann gerade beim GOT-Verlauf bei einem Tier (WH 25702) feststellen (s. Abb. 8), dass es während der ersten dreimonatigen Phase (theoretische tägliche

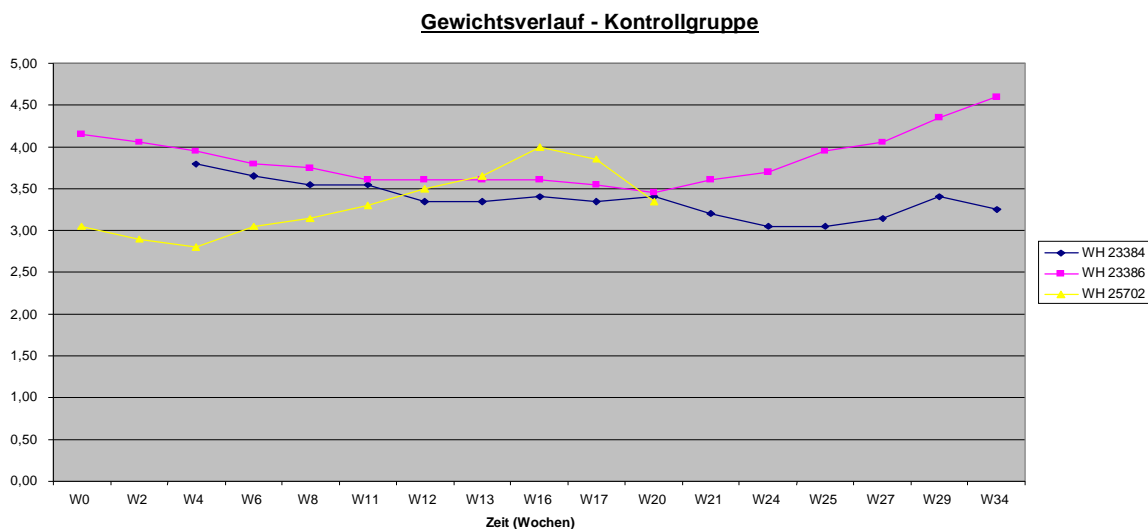
ETV-Gabe) einen zweiphasigen Verlauf gibt. Während der ersten zwei Wochen nach Beginn des Versuches kommt es zu einem moderaten Anstieg der GOT bis auf etwa 60 U/l, der aber nach 2 Wochen wieder auf das Ausgangslevel von etwa 20 U/l zurückgeht. Danach ist ein zweiter Anstieg der GOT zu verzeichnen. Für die anderen beiden beobachteten Tiere gilt dieser Kurvenverlauf nicht. Sie weisen die ganze Zeit (auch über die ersten drei Monate hinaus) nur geringe schwankende Werte von unter 20 U/l auf. Auch das Tier WH 25702 weist nach drei Monaten konstant niedrige Werte auf, nur der letzte Wert ist deutlich über diesem Niveau. Da dieses Tier an einem HCC verstarb, ist es möglich, dass dieser finale Anstieg etwas mit der erhöhten Schädigung des Lebergewebes durch den Tumor zu tun hat.

Während bei den Kurven der GOT doch Schwankungen zu erkennen sind, ergibt sich bei Betrachtung der GPT-Kurven kein solches – auch gruppen-einheitliches Bild. Hier zeigt jedes Tier einen individuellen Verlauf mit individuellen Schwankungen unabhängig von Entecavir-Aufnahme und möglichen Vakzinierungen. Daher wird auf eine grafische Darstellung für alle vier Gruppen verzichtet.

Das Gewicht der Tiere ist bei jeder Blutentnahme protokolliert worden. Die 20 Tiere haben zu Beginn des Versuches (Frühjahr) ein durchschnittliches Gewicht von 3,49 kg. Die Schwankungsbreite zwischen den Tieren ist relativ hoch (2,50 kg bis 5,20 kg, siehe Abbildung 9). Zu Versuchsende bzw. zum Zeitpunkt des Ausscheidens der Tiere aus dem Versuch liegt das durchschnittliche Körpergewicht bei 3,74 kg (Schwankungsbreite: 2,15 kg bis 6,00 kg, siehe Abbildung 9). Der Versuch beginnt Ende März. Zu diesem Zeitpunkt sind die meisten Tiere deutlich aus dem Winterschlaf erwacht und zeigen wieder Appetit und Interesse an ihrer Umwelt. Aufgrund des Winterschlafes ist das Gewicht zu Beginn des Versuches etwa  $\frac{1}{2}$  kg weniger als zu Versuchsende. Das Ende des Winterschlafes lässt sich auch anhand der zunehmenden Körpergewichte belegen. Dies lässt Rückschlüsse auf die ebenfalls zunehmende Fressaktivität zu. Es gibt einige wenige Tiere, die im Laufe des Versuches z. T. deutliche Gewichtsabnahmen zeigen. Ein Beispiel dafür ist das Tier WH 25700, welches relativ früh an einem HCC verstorben ist, es hat schon zu Versuchsbeginn ein Gewicht von unter 2,5 kg, welches hat innerhalb von 2 Woche noch weiter abgenommen. Dies ist durch den Tumor und die daraus resultierenden Schäden für den Organismus zu erklären. Dieses Phänomen kann man für mehr

oder weniger alle Tiere, die aus krankheitsbedingten Gründen aus dem Versuch ausscheiden, nachweisen. Ein weiteres Beispiel ist WH 25702, welches bis etwa Woche 16 gute Zunahmen zeigt, dann aber stagniert und zum Schluss mit Auftreten von Symptomen (schlechter Allgemeinzustand, Fressunlust, Apathie, ...) auch an Gewicht verloren hat. Zusammen mit weiteren Parametern, wie z. B. der Leberenzym-Messung kann man anhand des Gewichts Rückschlüsse auf das mögliche Vorliegen eines HCC, das zu gesundheitlichen Problemen führen kann, ziehen.

Die entsprechenden Grafiken bezüglich des Gewichtsverlaufes sind für die Gruppen zwei bis vier später dargestellt, allerdings wird dort dann nur kurz auf etwaige Besonderheiten im Verlauf verwiesen.



**Abb. 9: Gewichtsverlauf der Tiere der Kontrollgruppe während des Beobachtungszeitraumes von 34 Wochen.** Das Anfangsgewicht bei dieser Gruppe liegt zwischen 2,7 und 4,2 kg, das Endgewicht bei 3,2 – 4,7 kg.

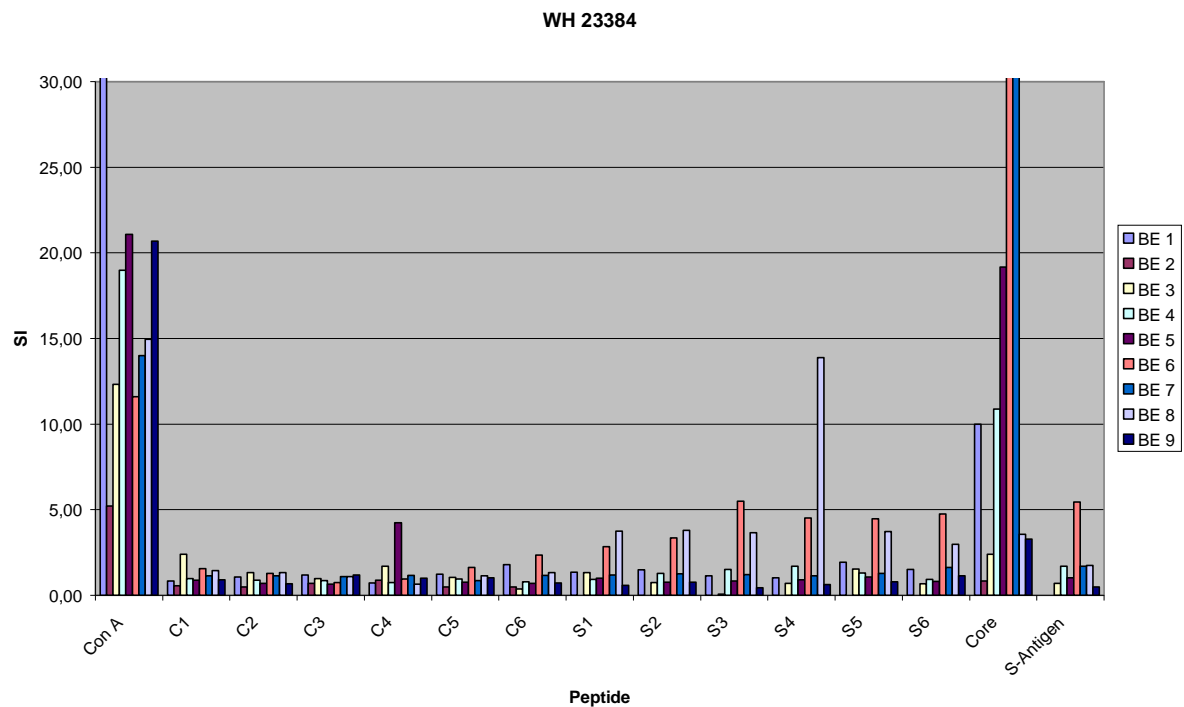
Von den Tieren der Kontrollgruppe ist weder ein Southern Blot noch eine Histologie von Leberproben durchgeführt worden. Hier wurde ein besonderes Augenmerk auf den Unterschied von alleiniger ETV-Gabe gegenüber ETV-Gabe mit Vakzinierung gelegt, so dass die entsprechenden Ergebnisse dort zu finden sind.

Bei den Proliferationstests gibt es keine für alle Tiere gleich aussehenden Ergebnisse, welche auch reproduzierbar sind.

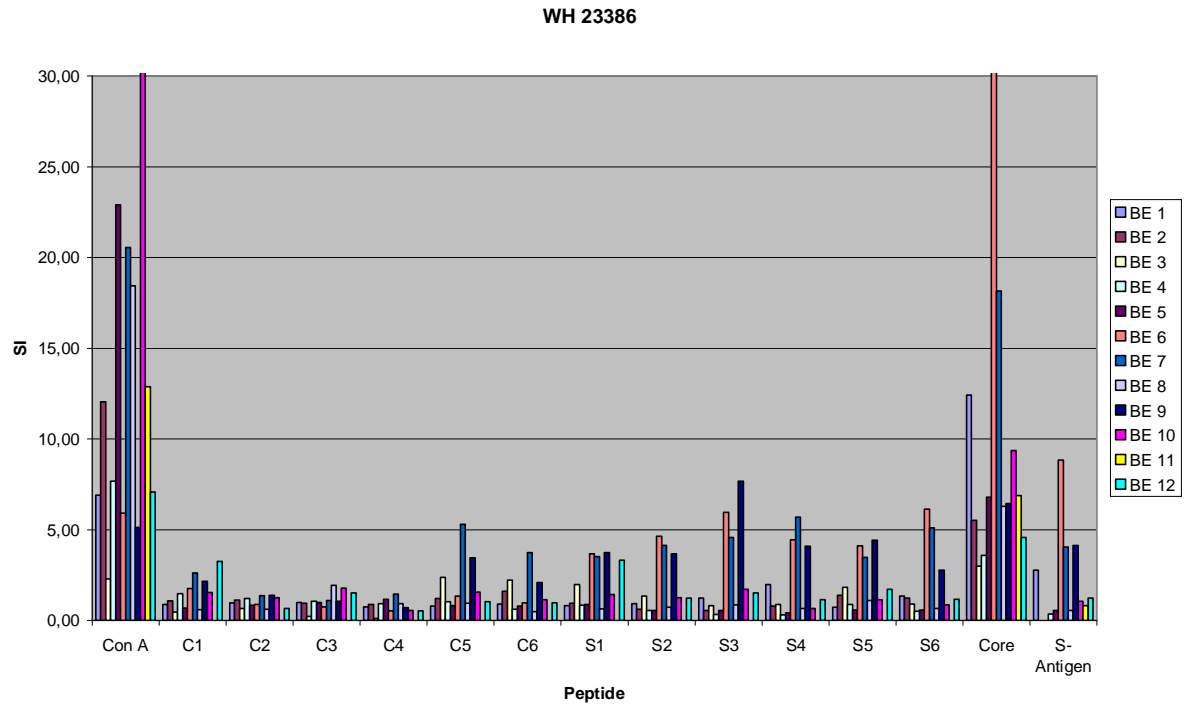
Für die Kontrollgruppe sind über den gesamten Versuch 29 Proliferationsassays durchgeführt worden. Als stimulierendes Mitogen zur Positivkontrolle wird ConA verwendet. In dieser Versuchsreihe klappt die Positiv-Stimulation mit ConA (d. h. der SI von ConA liegt über 10) bei 19 der durchgeführten Proliferationstests. Das entspricht einem Prozentsatz von 65,52 %. Dies ist ein vergleichsweise geringer Wert. In anderen Arbeiten (z. B. Menne 1994) werden deutlich höhere Werte erreicht. In eigenen Vorversuchen (unveröffentlicht) erweist sich ConA aber immer noch als deutlich potenter, was die Stimulierung der PBMC anbelangt, als andere Mitogene, wie z. B. PHA.

Insgesamt werden die PBMC mit 12 verschiedenen Peptiden (je 6 Core- und 6 S-Ag-Peptide), dem Core-Protein und dem S-Antigen stimuliert. Es stellt sich dabei heraus, dass auf das Core-Protein als Gesamtprotein sehr oft und unabhängig von der Versuchsgruppe zu einer Stimulation der Zellen führt (SI über 10). Teilweise liegen die berechneten SI's sogar über denen der Positivkontrolle mit ConA (s. Abb. 10, BE 6 und 7). Dies legt den Schluss nahe, dass es sich bei der Stimulation mit Core um eine relativ unspezifische Stimulation handelt, die nicht unbedingt mit dem Infektionsstatus des Tieres korreliert. So reagieren bei der Kontrollgruppe bei den 29 Tests insgesamt 8-mal Tiere (27,59 %) positiv auf Core. Im Vergleich dazu reagieren die Tiere auf das S-Antigen (SI > 3) 5-mal positiv, was ein Prozentsatz von 17,24 % bedeutet. Auf die einzelnen C-Peptide reagieren die Tiere mit 3,45 % (entspricht 6 positiven Reaktionen), im Vergleich dazu auf die S-Peptide 17,82 % (31 positive Reaktionen). Auch liegen die SI's bei den Reaktionen gegenüber den S-Peptiden deutlich höher als gegenüber den C-Peptiden (SI C-Peptide: 3,96; SI S-Peptide: 4,69). Insgesamt reagieren die Tiere auf die Peptide C1 und C4 je einmal und auf die Peptide C5 und C6 zweimal. Auf die Peptide C2 und C3 ist gar nicht reagiert worden. Im Vergleich dazu ist auf die Peptide S1, S3 und S5 jeweils sechsmal reagiert worden, auf die Peptide S2 und S4 je zweimal und auf das Peptid S6 nur dreimal.

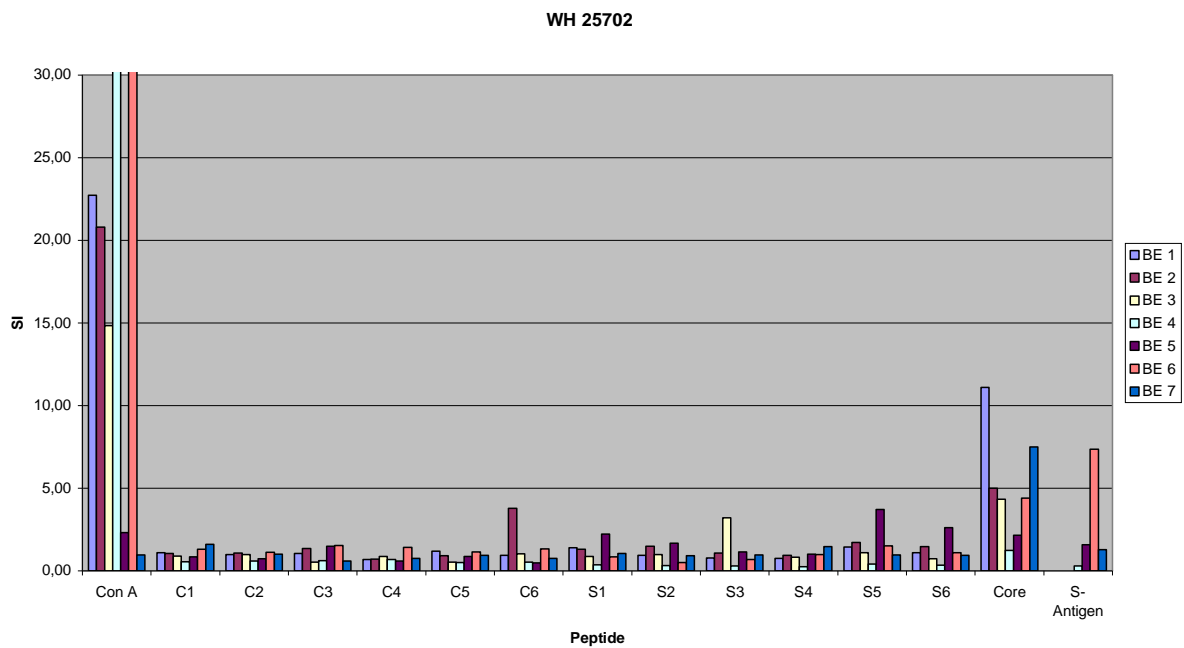
Zusammengefasst bedeutet das, dass eine Reaktion auf Core im Proliferationstest kein Hinweis auf den Infektionsstatus des Tieres gibt. Auf Peptide wird reagiert. Diese Reaktionen lassen sich allerdings nicht reproduzieren. Auffällig ist, dass häufiger auf die Peptide des S-Antigens als auf die des C-Antigens reagiert wurde. Die Hoffnung beruht darauf, dass diese stärkere Reaktion auf die S-Peptide einhergeht, mit der Ausbildung einer entsprechenden Immunabwehr. Immerhin wird den Antikörpern gegen das S-Antigen eine virusneutralisierende Eigenschaft zugesprochen.



**Abb. 10: Proliferationsergebnisse des Tieres WH 23384 aus der Kontrollgruppe.** BE steht für die einzelnen Blutentnahmen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Skala bei einem SI von 30 gekürzt. Dieses Tier ersetzt ein früh im Versuch verstorbenes Tier. Daher sind für WH 23384 zahlenmäßig weniger BE aufgezeichnet, als bei den übrigen Tieren der Kontrollgruppe.



**Abb. 11: Proliferationsergebnisse des Tieres WH 23386 aus der Kontrollgruppe.** BE steht für die einzelnen Blutentnahmen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Skala bei einem SI von 30 gekürzt.



**Abb. 12: Proliferationsergebnisse des Tieres WH 25702 aus der Kontrollgruppe.** BE steht für die einzelnen Blutentnahmen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Skala bei einem SI von 30 gekürzt. Dieses Tier verstarb an einem HCC, daher weist es weniger BE als die anderen beiden Tiere auf.



### 5.2.2 Entecavirgruppe (Gruppe B)

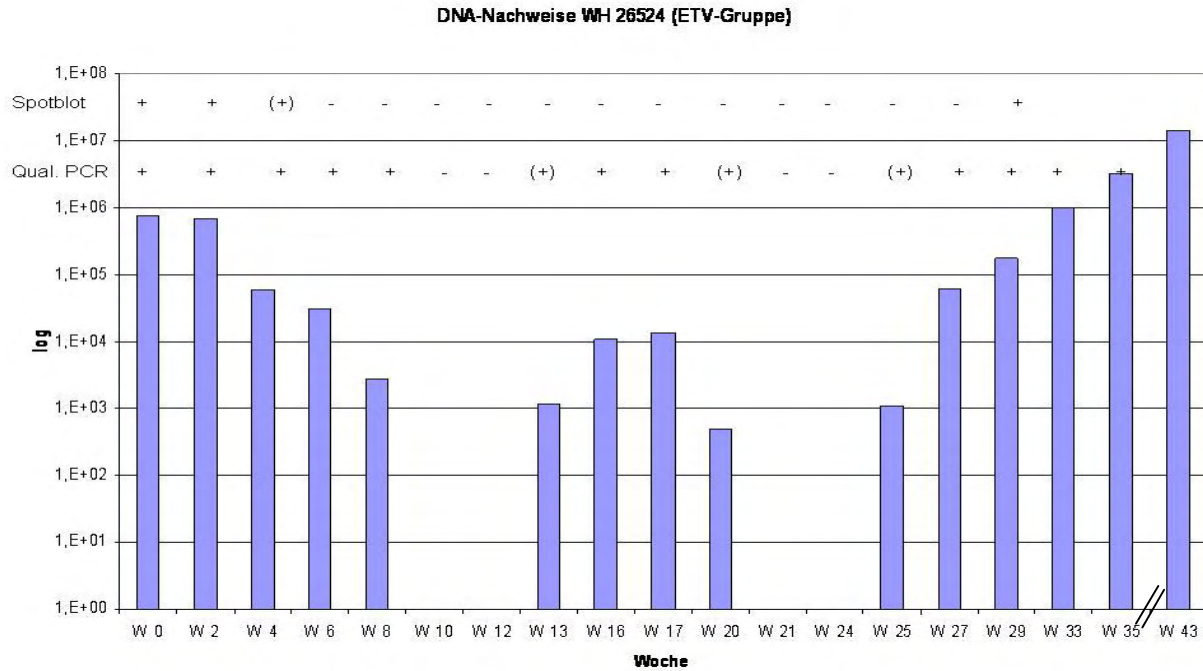
Im Gegensatz zur Gruppe A sinkt bei den Tieren, die Entecavir bekommen haben, die Viruslast unterschiedlich schnell ab. Die Nachweis-Grenze liegt bei der qualitativen PCR bei  $1 \times 10^2$  Viruspartikeln. Liegt der Wert darunter bzw. ist mit dieser Methode nicht mehr messbar, werden die Tiere als Virus-frei bzw. die Virusmengen als nicht nachweisbar betitelt.

Je nach Nachweismethode für die DNA des WHV ergibt sich ein unterschiedliches Bild. Hierbei muss man die einzelnen Nachweisverfahren (Spot Blot vs. PCR) unterscheiden. Im Spot Blot sind alle Tiere bis auf ein Tier spätestens nach der 4. Woche negativ (vgl. Abbildung 13a und b). Dieses einzelne Tier (WH 26524) ist ab Woche 6 negativ. Im Gegensatz dazu zeigt sich, dass die PCR wesentlich sensitiver ist. Mit Hilfe der PCR ist es möglich auch wesentlich geringere Mengen an DNA nachzuweisen. Dadurch erklärt sich auch, dass beim PCR-Nachweis die Tiere deutlich später negativ geworden sind, als beim Nachweis durch den Spot Blot. Das bedeutet, dass sich der Spot Blot als erstes Screening-Verfahren eignet, das Ergebnis aber immer mittels der PCR verifiziert werden sollte.

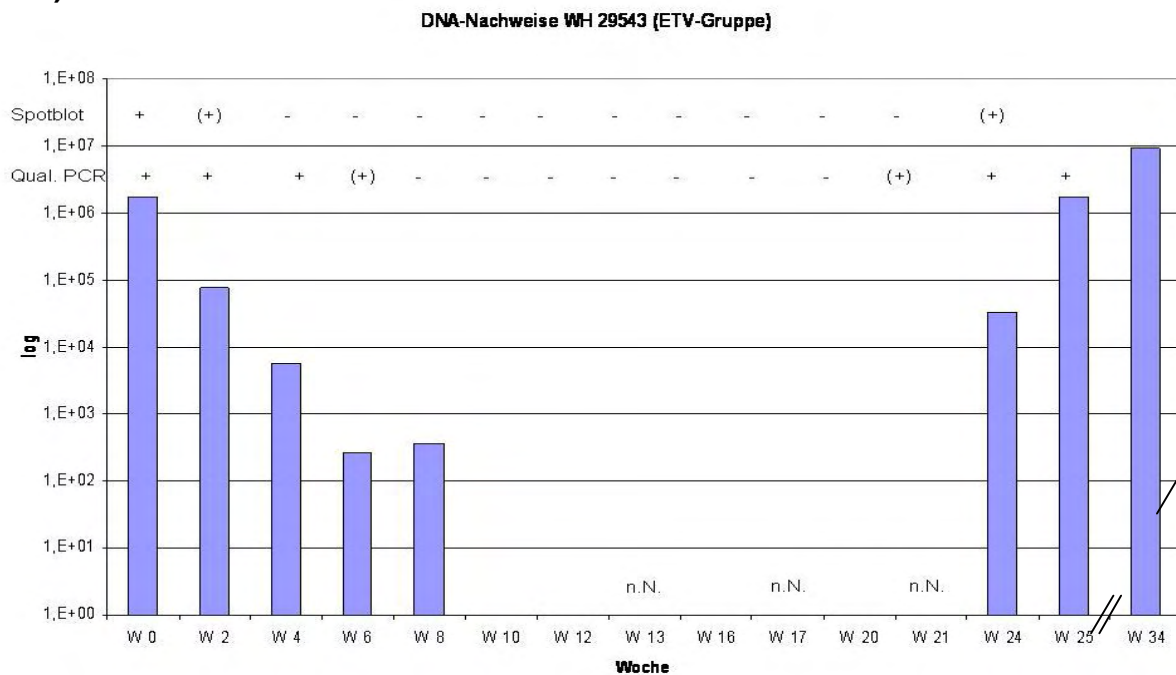
Innerhalb der ETV-Gruppe zeigt sich der Art und Abfall der Viruslast als recht einheitlich. Das heißt, dass es bei allen Tieren innerhalb von 2 Wochen zu einem Abfall der nachgewiesenen DNA von etwa einer Log-Stufe kommt. Hier werden nur zwei Tiere graphisch dargestellt, obwohl die Gruppe mehrere Tiere umfasst. Da aber der Rest der Tiere aus der Gruppe aus verschiedenen Gründen nicht ganz so lange beobachtet werden konnte (im Schnitt nur die ersten 3 Monate), wird hier auf deren graphische Darstellung verzichtet.

Bei dem Tier WH 26524 ist auffällig, dass das Tier noch während der wöchentlichen ETV-Gabe einen Anstieg der gemessenen Viruslast zeigt. Dieser Anstieg dauert etwa 7 Wochen und kann aber auch nur mittels PCR und nicht mittels Spot Blot nachgewiesen werden. Dies hängt mit den vorhandenen Virusmengen ( $1 \times 10^3$  bis  $1 \times 10^4$ ) zusammen.

## 13 a)



## 13 b)

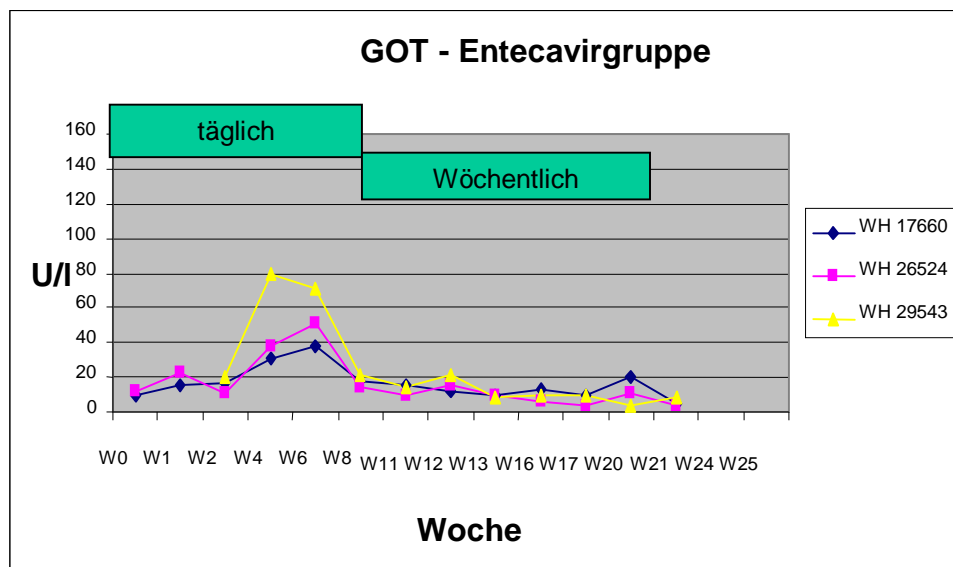


**Abb. 13 a und b: Tiere aus der Entecavirgruppe.** Deutlich erkennbar ist hier die Diskrepanz in der Sensitivität zwischen Spot Blot und quantitativer PCR als Nachweisverfahren. (n. N. = nicht nachweisbar). Wichtig ist zu beachten, dass die Überlebenszeiten und damit die Gesamtbeobachtungszeiträume bei den einzelnen Tieren variieren können.

Bereits kurze Zeit nach Absetzen der Entecavir-Gabe sind die Tiere wieder als DNA-positiv anzusprechen. Die Tiere erhalten bis Woche 20/21 ETV, danach werden sie nicht weiter behandelt. Bei diesen Tieren ist zu erkennen, dass bereits 3 – 4 Wochen später (Woche 24/25) sowohl in der PCR als auch im Spot Blot WHV-DNA nachgewiesen werden kann.

Zu den Ergebnissen des anti-WHc-ELISA siehe Kapitel 5.2.1. Auf die Ergebnisse wird hier nicht noch einmal eingegangen.

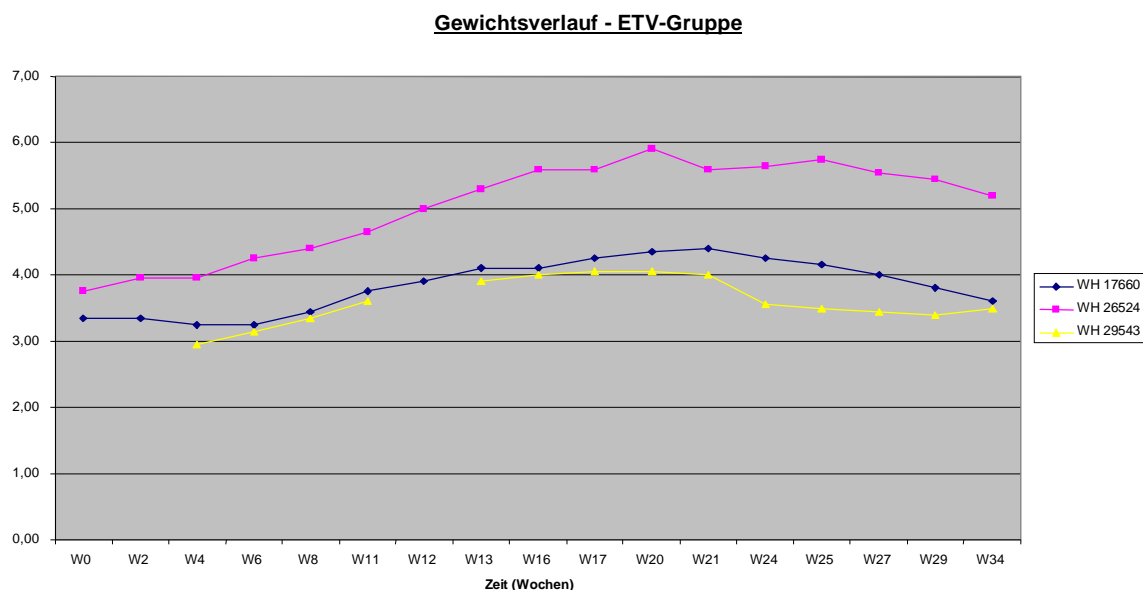
Der Verlauf der GOT stellt sich bis auf geringe Abweichungen ähnlich dar wie bei der Kontrollgruppe.



**Abb. 14: GOT-Verlauf der Tiere der ETV-Gruppe während des gesamten Versuchszeitraumes.** Die Angaben täglich und wöchentlich beziehen sich auf die ETV-Gabe.

In Gruppe 2 sieht man im Gegensatz zur Kontrollgruppe beim Verlauf der GOT einen zwei-phasigen Verlauf (s. Abbildung 14). Noch während der täglichen Gabe von ETV kommt es zu einem Anstieg von Werten unter 20 U/l auf bis zu 80 U/l. Dieser Wert liegt etwa um 20 U/l höher als bei der Kontrollgruppe, aber auch danach kommt es wieder zu einem Rückgang auf die Basalwerte (0 – 20 U/l). Im weiteren Verlauf bleiben die Werte dann konstant um den Basalwert, und keine weiteren Steigerungen sind zu beobachten. Insgesamt ist diese beobachtete Gruppe sehr homogen in ihrem Verlauf der GOT.

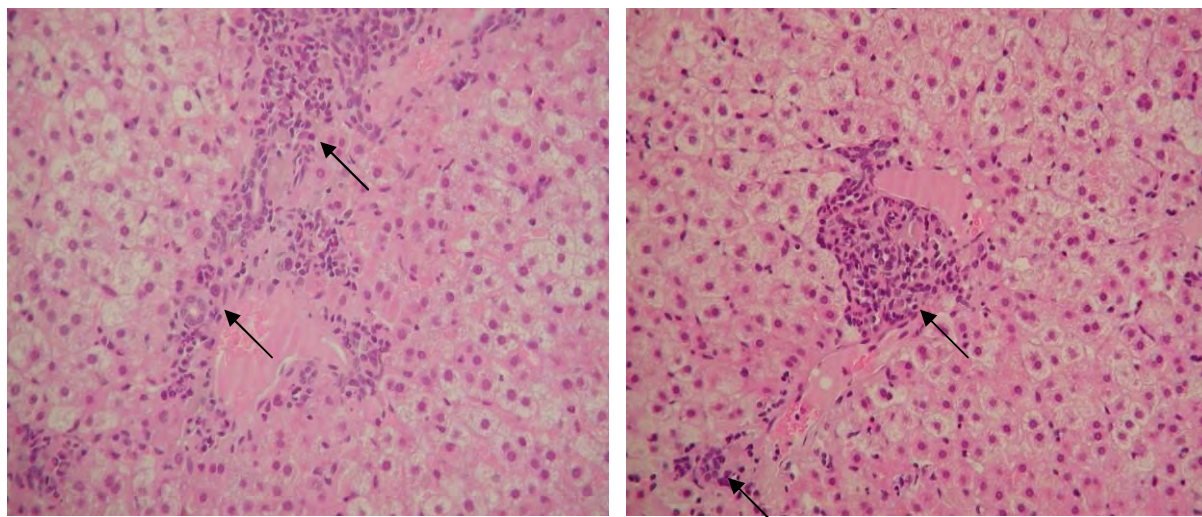
Im Vergleich dazu gibt es bei der Beurteilung der Gewichtsverläufe zwischen den beiden Gruppe nur wenig Unterschiede. Bei der Gruppe B liegt das Startgewicht zwischen 3,0 und 4,0 kg, während das Gewicht bei Versuchsende zwischen 3,5 und 5,2 kg schwankt. Das bedeutet, dass es auch in der Gruppe über das gesamte Versuchsjahr zu einer Zunahme der Tiere gekommen ist. Die Zunahmen liegen abhängig vom Ausgangsgewicht zwischen 0,5 und etwa 1 kg. Diese Werte sind vergleichbar mit der Kontrollgruppe (Gruppe A).



**Abb. 154: Gewichtsverlauf der Tiere der ETV-Gruppe während des Beobachtungszeitraumes von 34 Wochen.** Das Anfangsgewicht bei dieser Gruppe liegt zwischen 3,0 und 4,0 kg, das Endgewicht bei 3,5 – 5,2 kg.

Des Weiteren wird ein Southern Blot wurde vergleichend zwischen einem Tier aus der ETV-Gruppe und aus der Gruppe C (ETV + DNA-Vakzine) durchgeführt. Gleiches gilt für eine histologische Untersuchung von Leberproben. Die Ergebnisse werden vergleichend im Kapitel 5.2.2 besprochen.

In der Histologie werden ebenfalls vergleichend zwei Proben vom Tier WH 26524 untersucht. Die erste Probe ist zu Beginn der Versuches mittels einer offenen Leberbiopsie entnommen worden und gilt als „Null-/Ausgangswert“. Die zweite Probe ist zu Versuchsende gewonnen worden. Beide Proben sind wie im Material- und Methodenteil (s. Kapitel 4.2.6) behandelt worden.

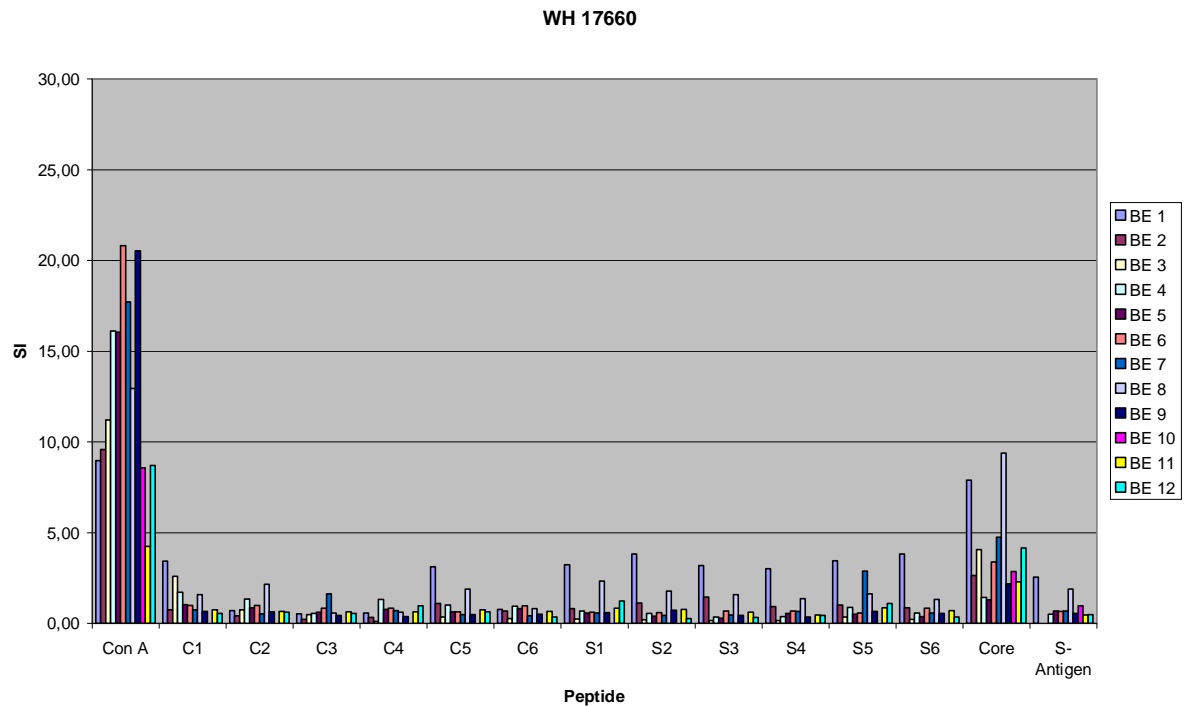


**Abb. 16. Histologische Untersuchung der Leber von WH 26524.** Links die Probe vor Beginn des Versuches, rechts nach Behandlung. Die beiden Ausschnitte sind aus dem portalen Leberbereich gewählt. Hier ist deutlich zu erkennen, dass es keinerlei Unterschiede in der Ausprägung und Anzahl der zellulären Infiltrate gibt (s. Pfeile). Das Tier bekommt nur ETV als Therapie (Gruppe 2).

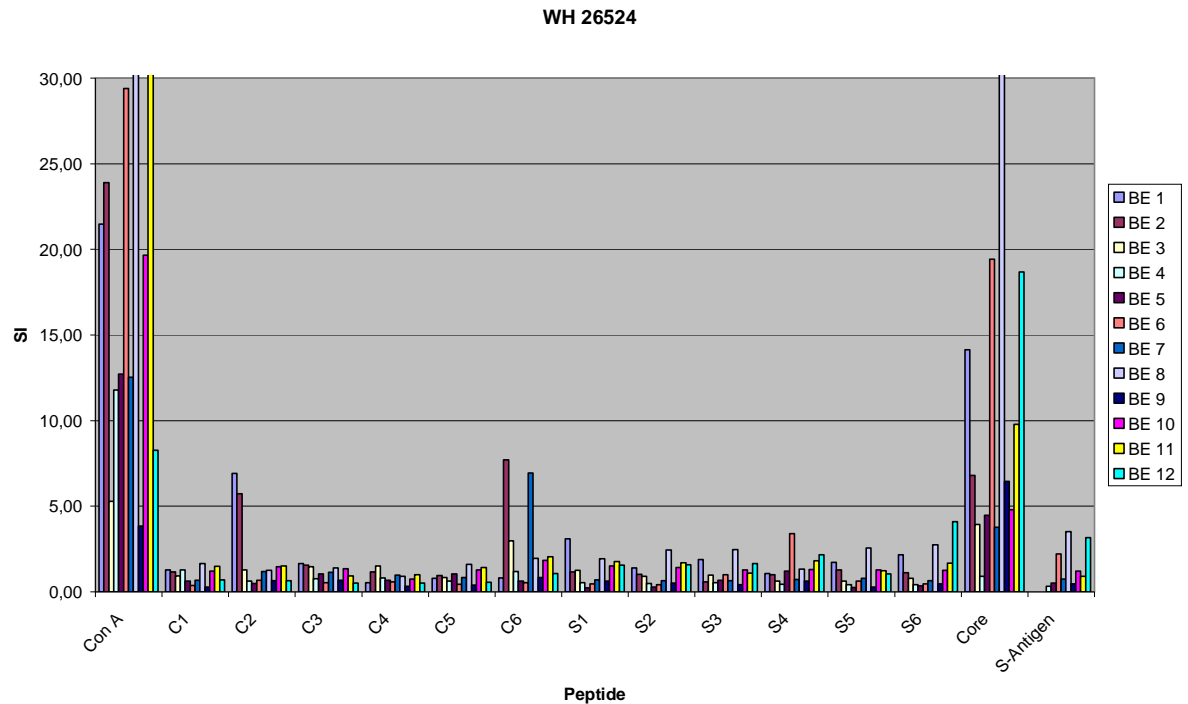
Für die ETV-Gruppe sind über den gesamten Versuch 34 Proliferationsassays durchgeführt und ausgewertet worden. Als stimulierendes Mitogen zur Positivkontrolle wird auch hier ConA verwendet. In dieser Versuchsreihe klappt die Positiv-Stimulation mit ConA (d. h. der SI von ConA liegt über 10) bei 22 der durchgeführten Proliferationstests. Das entspricht einem Prozentsatz von 64,71 %. Dies ist ebenfalls ein vergleichsweise geringer Wert, welcher aber im Bereich der Kontrollgruppe liegt (vgl. 65,52 %).

Insgesamt werden die PBMC mit den in Kapitel 5.2.1 erwähnten 12 Peptiden, Core und S-Antigen stimuliert. Es stellt sich dabei heraus, dass Core alleine als Gesamtprotein sehr oft und unabhängig von der Versuchsgruppe zu einer Stimulation der Zellen führt (SI über 10). Dies legt den Schluss nahe, dass es sich bei der Stimulation mit Core um eine relativ unspezifische Stimulation handelt, die nicht unbedingt mit dem Infektionsstatus des Tieres korreliert. So reagieren bei der ETV-Gruppe bei den 34 Tests insgesamt 5-mal (14,71 %) positiv auf das Core-Protein. Dieser Wert ist deutlich geringer (um etwa 15 %) als der der Kontrollgruppe. Im Vergleich dazu reagieren die Tiere auf das S-Antigen (SI > 3) 3-mal positiv, was einem Prozentsatz von 8,82 % bedeutet. Auch dieser Wert ist um die Hälfte kleiner als der der Kontrollgruppe. Auf die C-Peptide reagieren die Tiere 3,92 % positiv (entspricht 8 positiven Reaktionen). Dieser Wert bewegt sich im Rahmen der Werte, die für die Gruppe A ermittelt worden sind. Im Vergleich dazu ist auf die S-Peptide in 5,39 % der Fälle reagiert worden (11 positive Reaktionen). Dies ist ein signifikanter

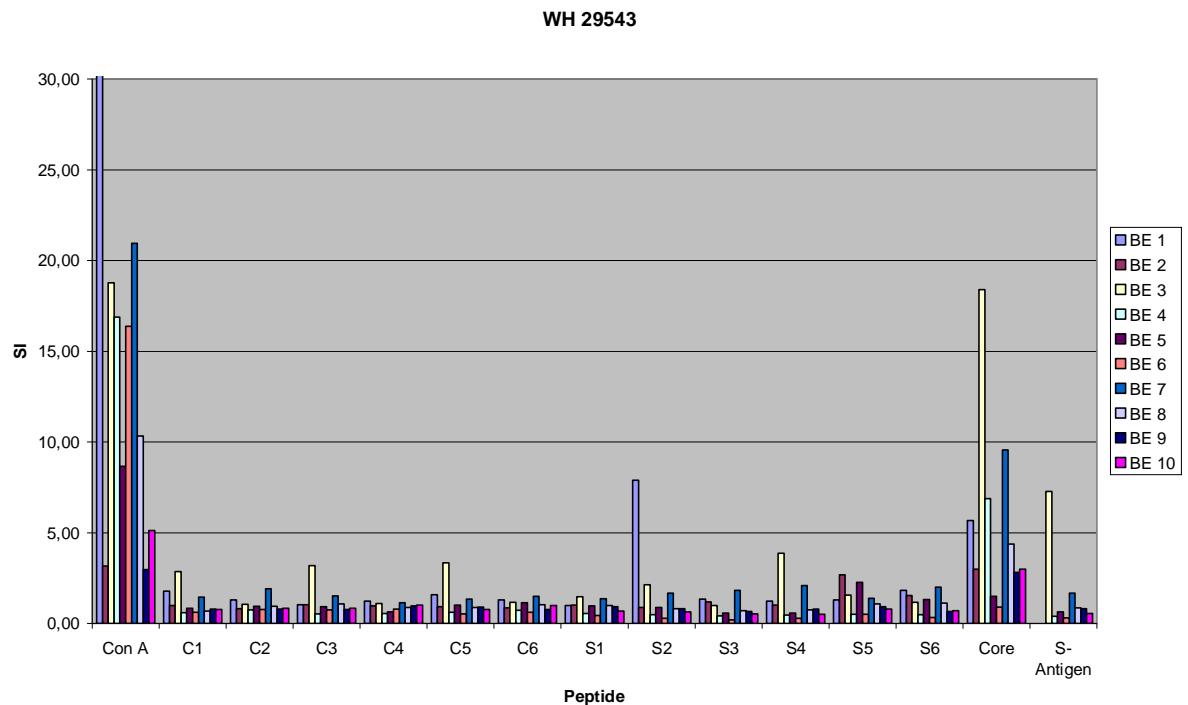
Unterschied zur Gruppe A, wo die Werte um fast das vierfache höher liegen. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe liegen die SI's bei den Reaktionen gegenüber den S-Peptiden niedriger als gegenüber den C-Peptiden (SI C-Peptide: 5,0; SI S-Peptide: 3,90). Während die SI-Werte für die S-Peptide um etwa 1 Punkt kleiner sind als bei der Kontrollgruppe (Gruppe A: 4,69; Gruppe B: 3,90) liegt der Wert für die C-Peptide um fast 2 Punkte höher als bei der Gruppe A. Insgesamt reagieren die Tiere auf die Peptide C2, C5 und C6 je zweimal und auf die Peptide C1 und C3 einmal. Auf das Peptid C4 ist nicht reagiert worden. Im Vergleich dazu ist auf das Peptid S4 dreimal, auf die Peptide S1, S2 und S6 zweimal reagiert worden und auf die Peptide S3 und S5 je einmal.



**Abb. 17: Proliferationsergebnisse des Tieres WH 17660 aus der ETV-Gruppe.** BE steht für die einzelnen Blutentnahmen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Skala bei einem SI von 30 gekürzt. Die tägliche ETV-Gabe erfolgt von BE 1 – 3, die wöchentliche bis einschließlich BE 8.



**Abb. 18: Proliferationsergebnisse des Tieres WH 26524 aus der ETV-Gruppe.** BE steht für die einzelnen Blutentnahmen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Skala bei einem SI von 30 gekürzt. Die tägliche ETV-Gabe erfolgt von BE 1 – 3, die wöchentliche bis einschließlich BE 8.



**Abb. 19: Proliferationsergebnisse des Tieres WH 29543 aus der ETV-Gruppe.** BE steht für die einzelnen Blutentnahmen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Skala bei einem SI von 30 gekürzt. Die tägliche ETV-Gabe erfolgt von BE 1 – 3, die wöchentliche bis einschließlich BE 8. Dieses Tier ersetzt ein nach 2 Wochen verstorbenes Tier. Daher weist es insgesamt weniger Blutentnahmen (BE) auf, als die anderen Tiere der Gruppe 2.

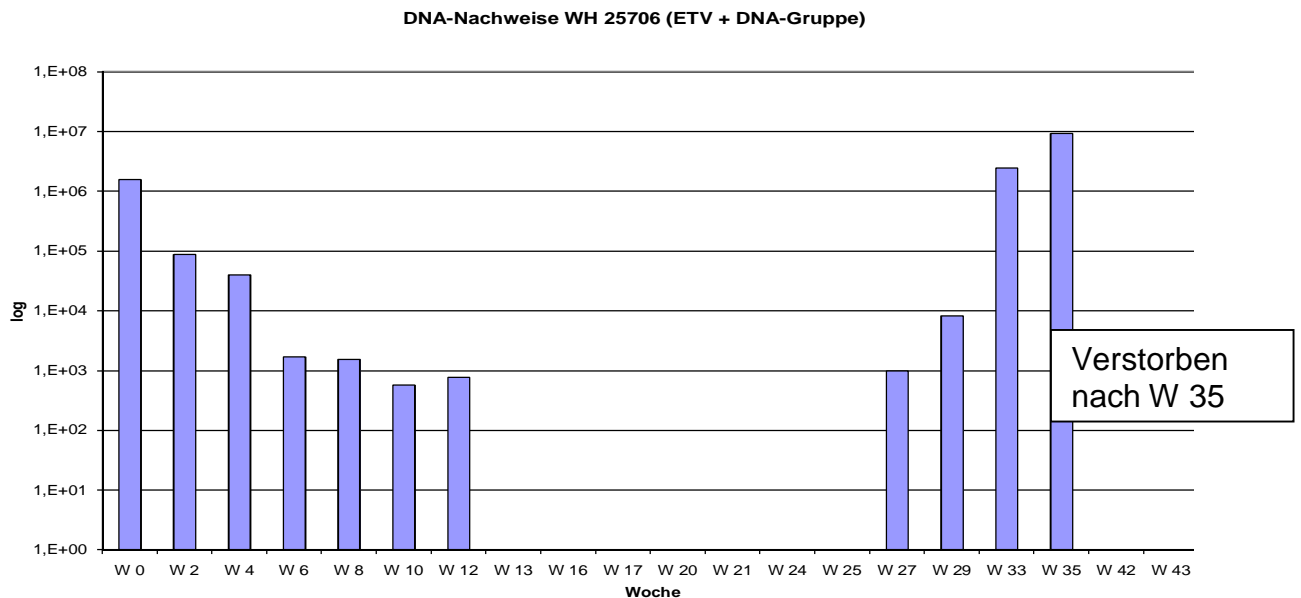
### 5.2.3 Entecavir + DNA-Vakzine-Gruppe (Gruppe C)

Wie bereits für Gruppe B beschrieben sinkt die Viruslast während Entecavir-Gabe ab. Als Nachweisgrenze gilt auch hier  $1 \times 10^2$  Viruspartikel. Dieser Wert stellt die untere mögliche Nachweisgrenze für die qualitative PCR dar. Tiere, die geringere Viruslast-Werte aufweisen, gelten laut Definition als virus-frei.

Auch die Werte für die Gruppe C bestätigen die Eignung des Spot Blot als Screening-Verfahrens für Tiere, bei denen eine hohe Viruslast zu erwarten ist. Im Spot Blot negativ getestete Tiere müssen deswegen dringend mittels der PCR-Methode nachgetestet werden, um das Ergebnis zu bestätigen.

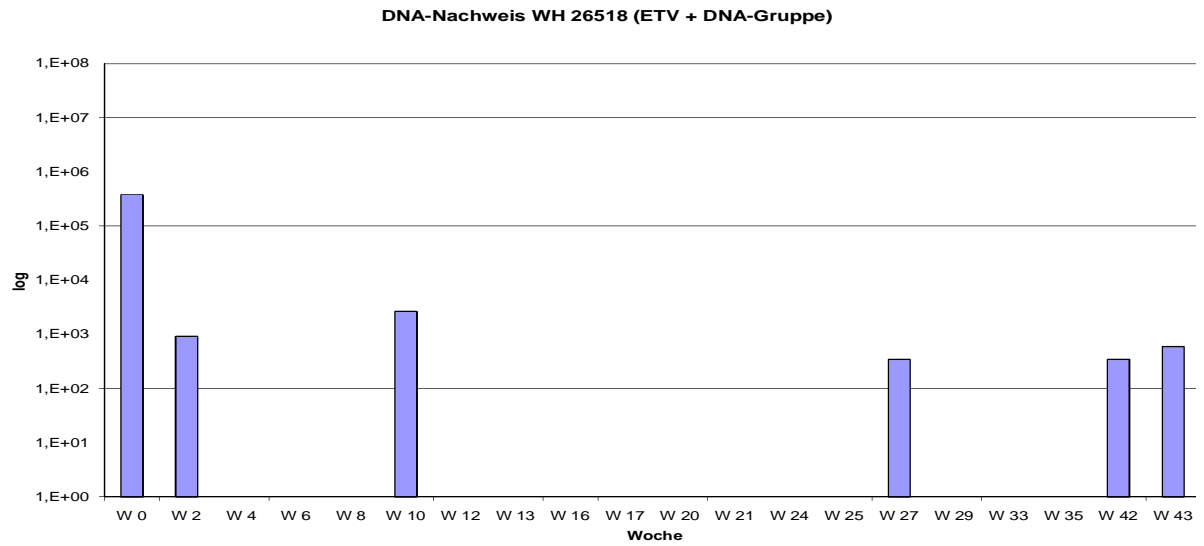
Innerhalb der ETV + DNA-Vakzine-Gruppe zeigt sich der Art und Abfall der Viruslast als recht einheitlich. Das heißt, dass es innerhalb von 2 Wochen zu einem Abfall der nachgewiesenen DNA von etwa einer Log-Stufe kommt. Ein ähnliches Ergebnis wird auch in Gruppe B gezeigt.

#### 20 a)

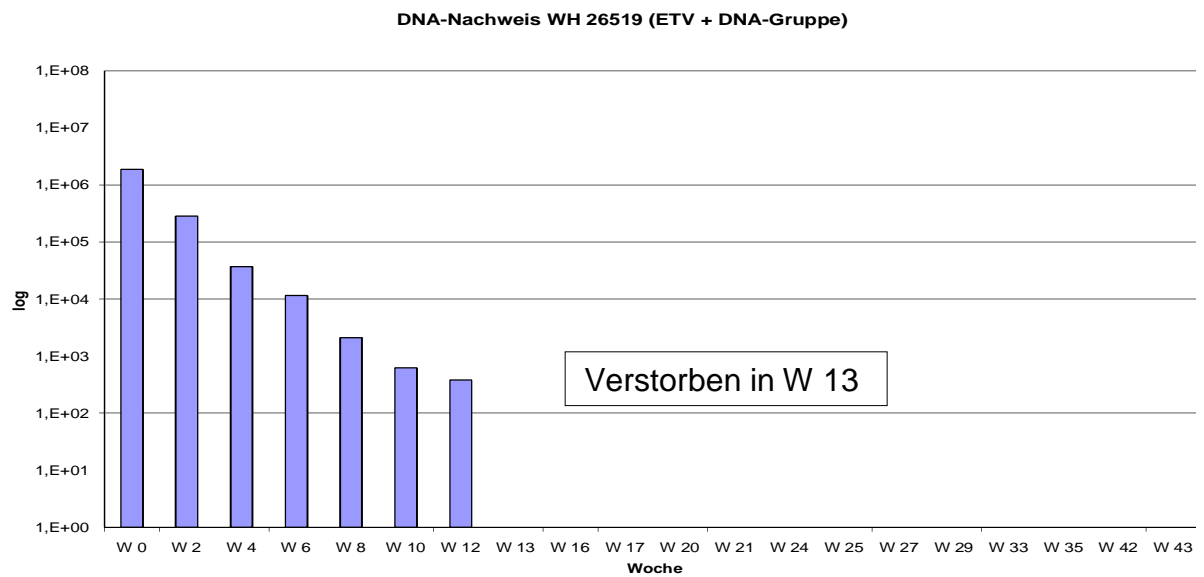




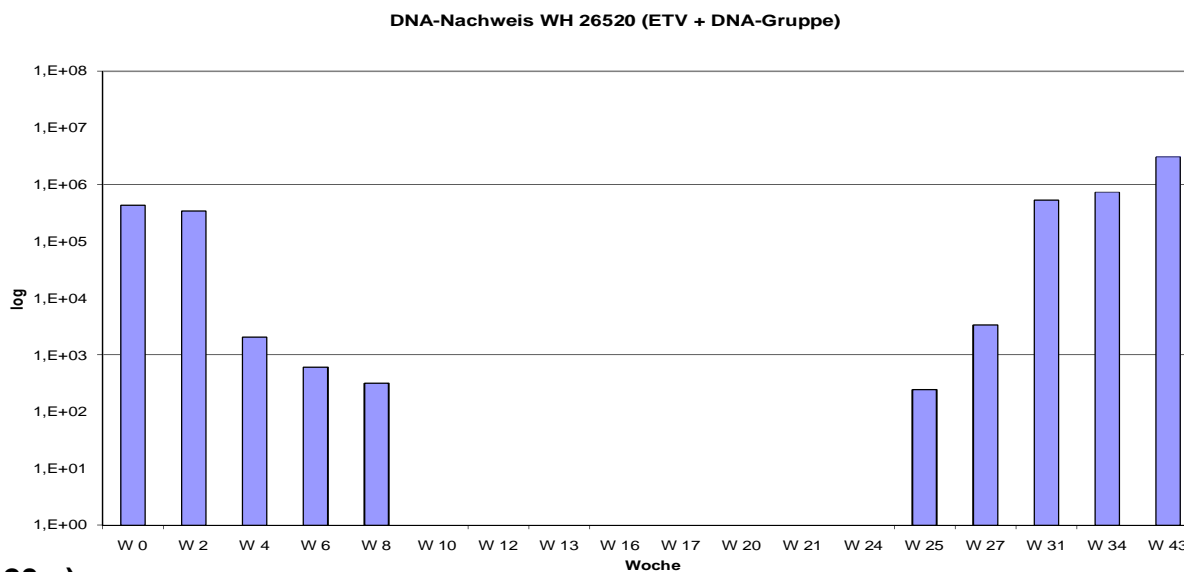
## 20 b)



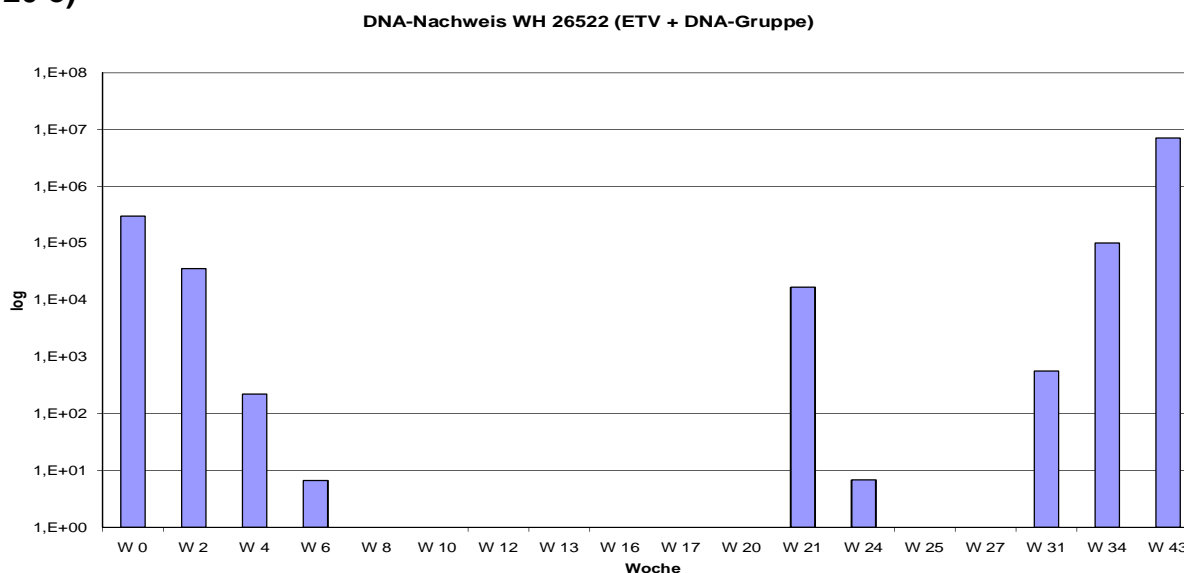
## 20 c)



## 20 d)



## 20 e)



**Abb. 20 a bis e: Tiere aus der Entecavir +DNA-Gruppe.** Deutlich erkennbar ist hier die Diskrepanz in der Sensitivität zwischen Spot Blot und quantitativer PCR als Nachweisverfahren. (n. N. = nicht nachweisbar). Wichtig ist zu beachten, dass die Überlebenszeiten und damit die Gesamtbeobachtungszeiträume bei den einzelnen Tieren variieren können.

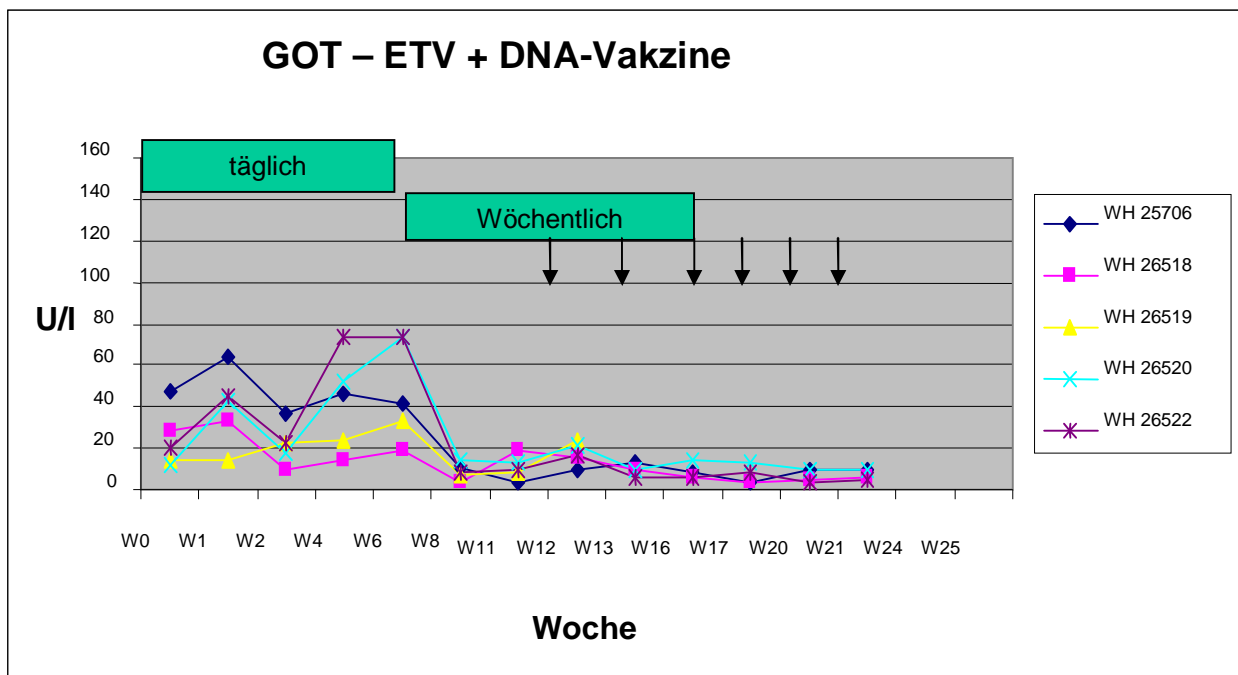
Auffällig ist die Zeitspanne, wann die Tiere nach Absetzen des ETV wieder positiv getestet werden. Die Tiere erhielten bis Woche 20/21 ETV, bereits vor dem Absetzen bekamen sie 3 Impfungen im Abstand von 4 Wochen, und auch nach dem Absetzen von ETV wurden den Tieren noch 3 weitere Impfungen alle 2 Wochen verabreicht. Die Tiere der Gruppe C sind frühestens 3 Wochen später als die der Gruppe B positiv getestet worden (WH 25706 Woche 27; im Vergleich Woche 24/25 bei Gruppe B). Einige Tiere sind sogar noch deutlich länger als virus-frei anzusprechen (Woche 31 bei WH 26522, WH 26518). In Woche 27 wird die letzte Vakzine verabreicht. Auffällig ist, dass das Tier WH 26518 nur zu diesem Zeitpunkt kurzzeitig

positiv auf WHV-DNA getestet wird. Danach gibt es einen Zeitraum von 15 Wochen, in dem mit keiner Nachweismethode (Spot Blot, qualitative PCR, quantitative PCR) Virus bzw. Virusteile bei dem Tier WH 26518 nachgewiesen werden können. In wie weit ein Anstieg erfolgt und sofern möglich noch weiter verfolgt werden kann, wird sich zeigen. Dieses Tier weist in Woche 47 einen reduzierten Allgemeinzustand mit Apathie, Anorexie, Aszites und einen palpablen Tumor im Abdomen auf und ist aufgrund dessen euthanasiert worden. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte keinerlei Virus im Serum des Tieres festgestellt werden.

Eine Ausnahme bei den Ergebnissen bildet das Tier WH 26519, es starb noch vor Beendigung der ETV-Gabe, so dass die Ergebnisse dieses Tieres auf den ersten Blick abweichend erscheinen. Sie sind jedoch mit den anderen Tieren der Gruppe vergleichbar im gleichen Zeitraum vergleichbar (vgl. Abbildung 20c).

Zu den Ergebnissen des anti-WHc-ELISA siehe Kapitel 5.2.1.

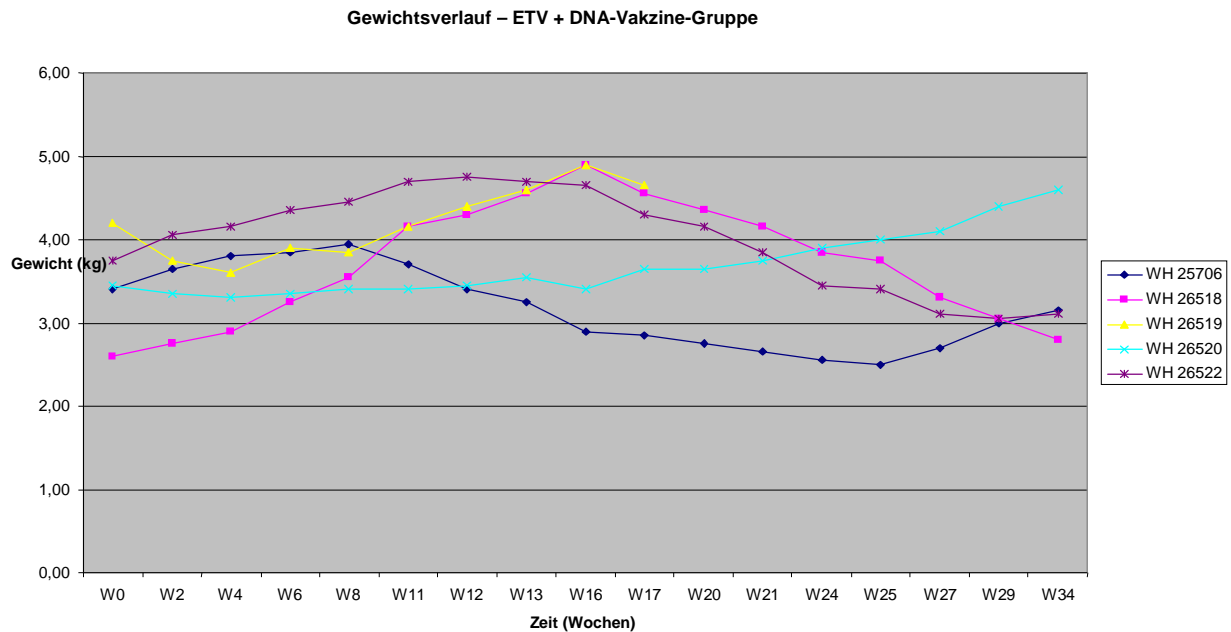
Der Verlauf der GOT stellt sich bis auf geringe Abweichungen ähnlich dar wie bei den Gruppen A und B (siehe Abbildung 21).



**Abb. 21: GOT-Verlauf der Tiere der ETV + DNA-Gruppe während des gesamten Versuchszeitraumes.** Die Angaben täglich und wöchentlich beziehen sich auf die ETV-Gabe. Die Pfeile stehen für die 6 Vakzinierungen, die die Tiere erhalten haben.

Auch hier sieht man beim Verlauf der GOT einen dreiphasigen Verlauf. Noch während der täglichen Gabe von ETV kommt es zu einem Anstieg auf bis zu 60 U/l. Dieser Wert liegt in etwa in dem Bereich der Entecavir-Gruppe (Höchstwerte von 80 U/l), aber auch danach kommt es wieder zu einem Rückgang auf die Basalwerte (20 – 40 U/l). Dieser Rückgang ist weniger stark als bei den ersten beiden Gruppen. In der zweiten Hälfte der täglichen ETV-Gabe kommt es zu einem zweiten Anstieg auf Werte um 80 U/l. Mit Umstellung auf die wöchentliche ETV-Gabe werden wieder Basalwerte (0 – 10 U/l) erreicht. Im weiteren Verlauf bleiben die Werte dann konstant um den Basalwert, und keine weiteren Steigerungen sind zu beobachten. Insgesamt ist diese beobachtete Gruppe sehr homogen in ihrem Verlauf der GOT.

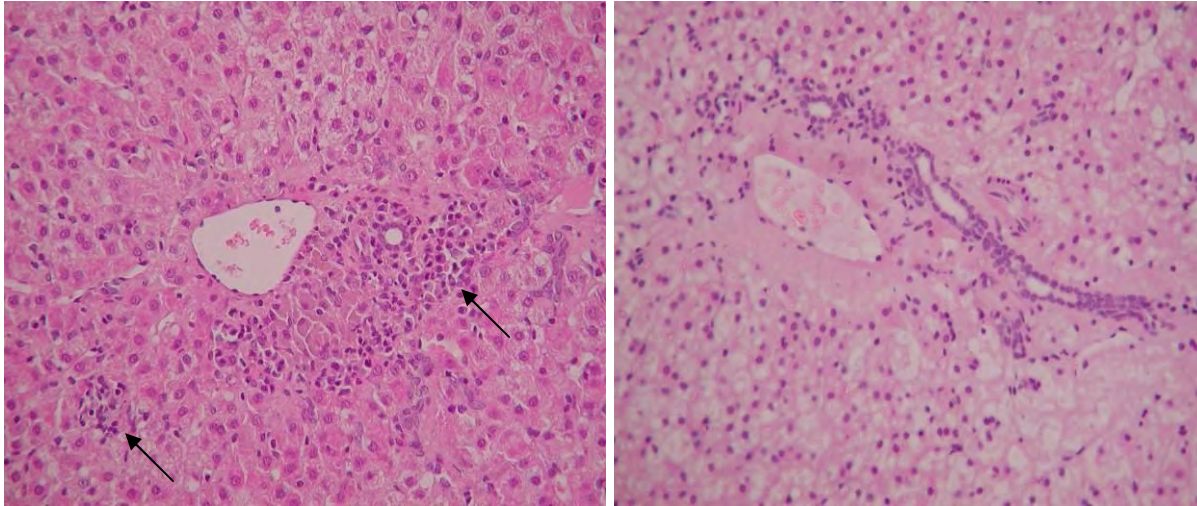
Im Vergleich dazu gibt es bei der Beurteilung der Gewichtsverläufe zwischen den drei Gruppen nur wenig Unterschiede. Bei der Gruppe C liegt das Startgewicht zwischen 2,7 und 4,2 kg, während das Gewicht bei Versuchsende zwischen 3,0 und 4,7 kg schwankt. Das bedeutet, dass es auch in dieser Gruppe über das gesamte Versuchsjahr zu einer Zunahme der Tiere kommt. Die Zunahmen liegen abhängig vom Ausgangsgewicht zwischen 0,5 und etwa 1 kg. Diese Werte sind vergleichbar mit der Kontrollgruppe (Gruppe A) und der Entecavirgruppe (Gruppe B). Bei den meisten Tieren kommt es bis etwa Woche 16 zu kontinuierlichen Gewichtszunahmen. 16 liegt im Sommer (ca. Juli). Dann ist das Höchstgewicht erreicht und die Tiere halten dieses Gewicht, oder es kann auch zu Abnahmen kommen. Bei den folgenden Abnahmen werden aber normalerweise die Startwerte nicht unterschritten. Dies entspricht den natürlichen Gewichtsschwankungen wildlebender Tiere.



**Abb. 22: Gewichtsverlauf der Tiere der ETV+DNA-Gruppe während des Beobachtungszeitraumes von 34 Wochen.** Das Anfangsgewicht bei dieser Gruppe liegt zwischen 2,7 und 4,2 kg, das Endgewicht bei 3,0 – 4,7 kg.

Ein Southern Blot , sowie eine histologische Untersuchung von Leberproben, wurde vergleichend zwischen einem Tier der ETV-Gruppe (Gruppe B) und der Gruppe C (ETV + DNA-Vakzine) durchgeführt. Die Ergebnisse werden vergleichend im Kapitel 5.2.2 besprochen.

In der Histologie werden ebenfalls vergleichend zwei Proben vom Tier WH 26524 untersucht. Die erste Probe ist zu Beginn des Versuches mittels einer offenen Leberbiopsie entnommen worden und gilt als „Null-/Ausgangswert“. Die zweite Probe ist zu Versuchsende gewonnen worden. Beide Proben sind wie im Material- und Methodenteil (s. Kapitel 4.2.6) behandelt worden.

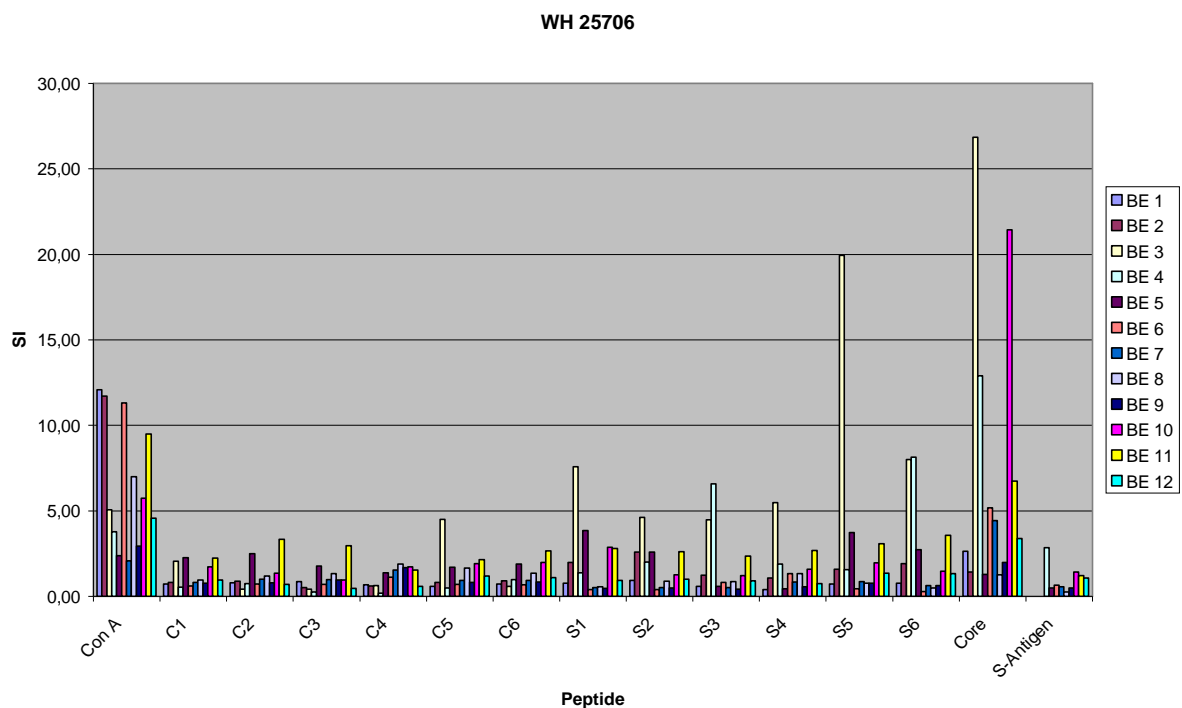


**Abb. 23: Histologische Untersuchung der Leber von WH 26518.** Links die Probe vor Beginn des Versuches, rechts nach Behandlung. Die beiden Ausschnitte sind wie in Abbildung 16 aus dem portalen Leberbereich gewählt. Hier ist zu erkennen, dass es deutliche Unterschiede in der Ausprägung und Anzahl der zellulären Infiltrate gibt (s. Pfeile). Während es zu Beginn des Versuches noch viele und ausgeprägte Areale mit zellulären Infiltraten gibt, findet man solche Bereiche später nicht mehr. Das Tier bekam ETV und DNA-Vakzinen als Therapie.

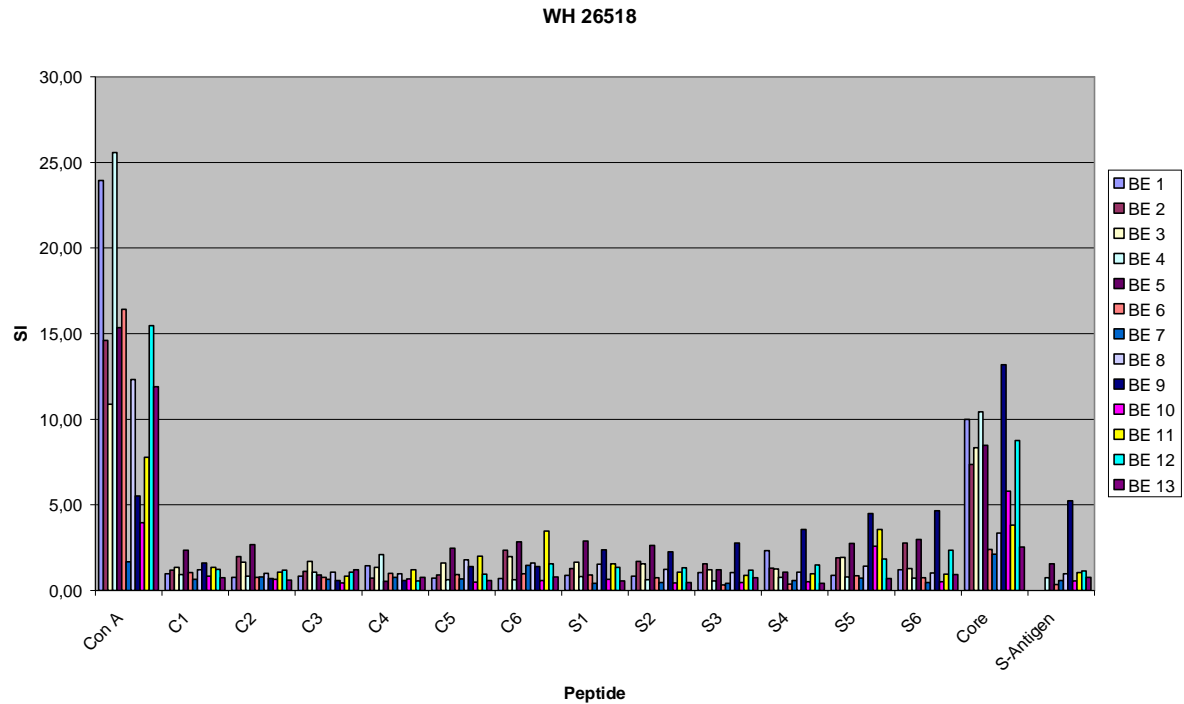
Für die ETV+DNA-Gruppe sind über den gesamten Versuch 56 Proliferationsassays durchgeführt und ausgewertet worden. Als stimulierendes Mitogen zur Positivkontrolle wird auch hier ConA verwendet. In dieser Versuchsreihe klappt die Positiv-Stimulation mit ConA (d. h. der SI von ConA liegt über 10) bei 25 der durchgeführten Proliferationstests. Das entspricht einem Prozentsatz von 44,64 %. Dies ist ein vergleichsweise sehr geringer Wert, welcher aber noch deutlich niedriger liegt als bei den beiden Gruppen (Gruppe A: 65,52 %; Gruppe B: 64,71 %) zuvor.

Insgesamt werden die PBMC mit 12 Peptiden, Core und S-Antigen stimuliert. Es stellt sich dabei heraus, dass Core alleine als Gesamtprotein sehr oft und unabhängig von der Versuchsgruppe zu einer Stimulation der Zellen führt (SI über 10). Dies legt den Schluss nahe, dass es sich bei der Stimulation mit Core um eine relativ unspezifische Stimulation handelt, die nicht unbedingt mit dem Infektionsstatus des Tieres korreliert. So reagieren bei der ETV-Gruppe bei insgesamt 56 durchgeführten Tests insgesamt 13-mal (23,21 %) Tiere positiv auf das Core-Protein. Dieser Wert ist deutlich höher als bei Gruppe B (14,71 %) und liegt in etwa im Bereich der Kontrollgruppe (27,59 %). Im Vergleich dazu reagieren die Tiere auf das S-Antigen (SI > 3) 6-mal positiv, was ein Prozentsatz von 10,71 % bedeutet. Dieser Wert liegt etwas höher als bei der ETV-Gruppe, aber immer noch deutlich unter dessen der Kontrollgruppe. Auf die C-Peptide reagieren die Tiere mit 0,89 %

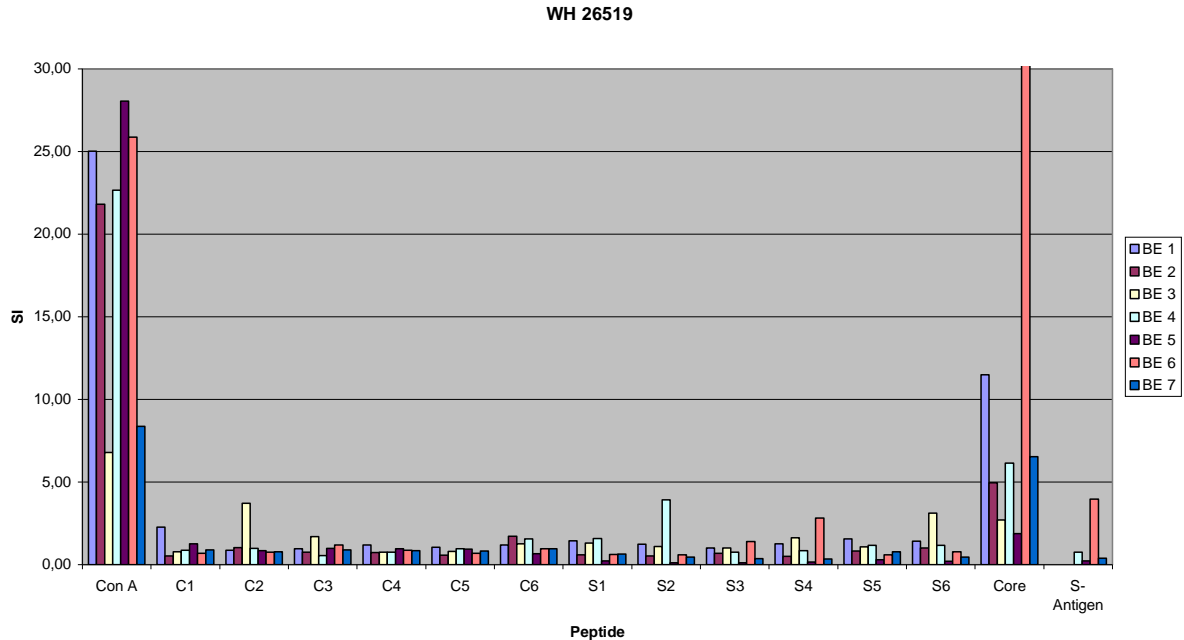
positiven Reaktionen (entspricht 6 positiven Reaktionen). Dieser Wert ist signifikant kleiner als die ermittelten Werte für die Gruppen A und B. Im Vergleich dazu ist auf die S-Peptide in 6,40 % der Fälle reagiert worden (43 positive Reaktionen). Dies ist ein signifikanter Unterschied zur Gruppe A, wo die Werte um fast das vierfache höher liegen. Wie bei der Kontrollgruppe und im Gegensatz zur ETV-Gruppe liegen die SI-Werte bei den Reaktionen gegenüber den S-Peptiden höher als bei den C-Peptiden (SI C-Peptide: 3,69; SI S-Peptide: 5,35). Während die SI-Werte für die S-Peptide um etwa 1 Punkt höher sind als bei der Kontrollgruppe und 2 Punkte kleiner als bei Gruppe B (Gruppe A: 4,69; Gruppe B: 3,90) liegt der Wert für die C-Peptide um fast 1 Punkt niedriger als bei der Gruppe B und im gleichen Rahmen wie Gruppe A. Insgesamt reagieren die Tiere auf die Peptide C2 und C6 je zweimal und auf die Peptide C4 und C5 einmal. Auf die Peptide C1 und C3 ist nicht reagiert worden. Im Vergleich dazu ist auf die Peptide S4 und S6 neunmal, auf die Peptide S2 und S5 siebenmal reagiert worden und auf das Peptid S3 sechsmal und das Peptid S1 fünfmal.



**Abb. 24: Proliferationsergebnisse des Tieres WH 25706 aus der ETV + DNA-Gruppe.** BE steht für die einzelnen Blutentnahmen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Skala bei einem SI von 30 gekürzt. Die tägliche ETV-Gabe erfolgt von BE 1 – 3, die wöchentliche bis einschließlich BE 8. Die Vakzinierungen erfolgten ab BE 5/6.

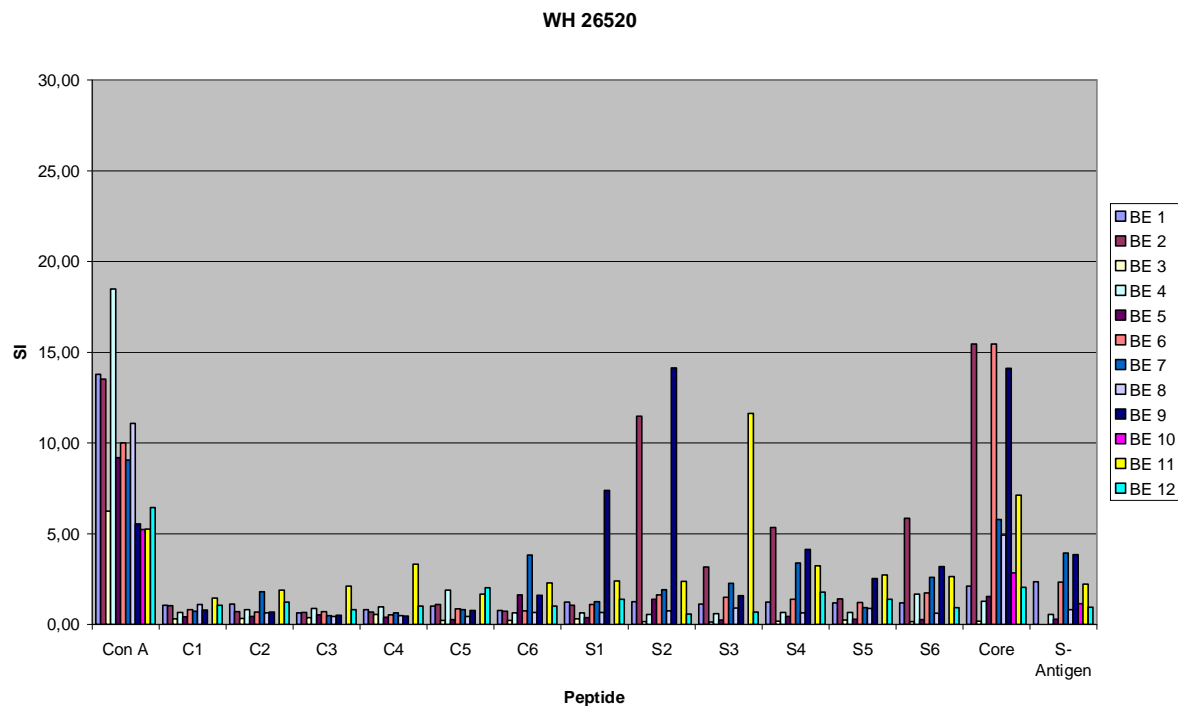


**Abb. 25: Proliferationsergebnisse des Tieres WH 26518 aus der ETV + DNA-Gruppe.** BE steht für die einzelnen Blutentnahmen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Skala bei einem SI von 30 gekürzt. Die tägliche ETV-Gabe erfolgt von BE 1 – 3, die wöchentliche bis einschließlich BE 8. Die Vakzinierungen erfolgten ab BE 5/6.

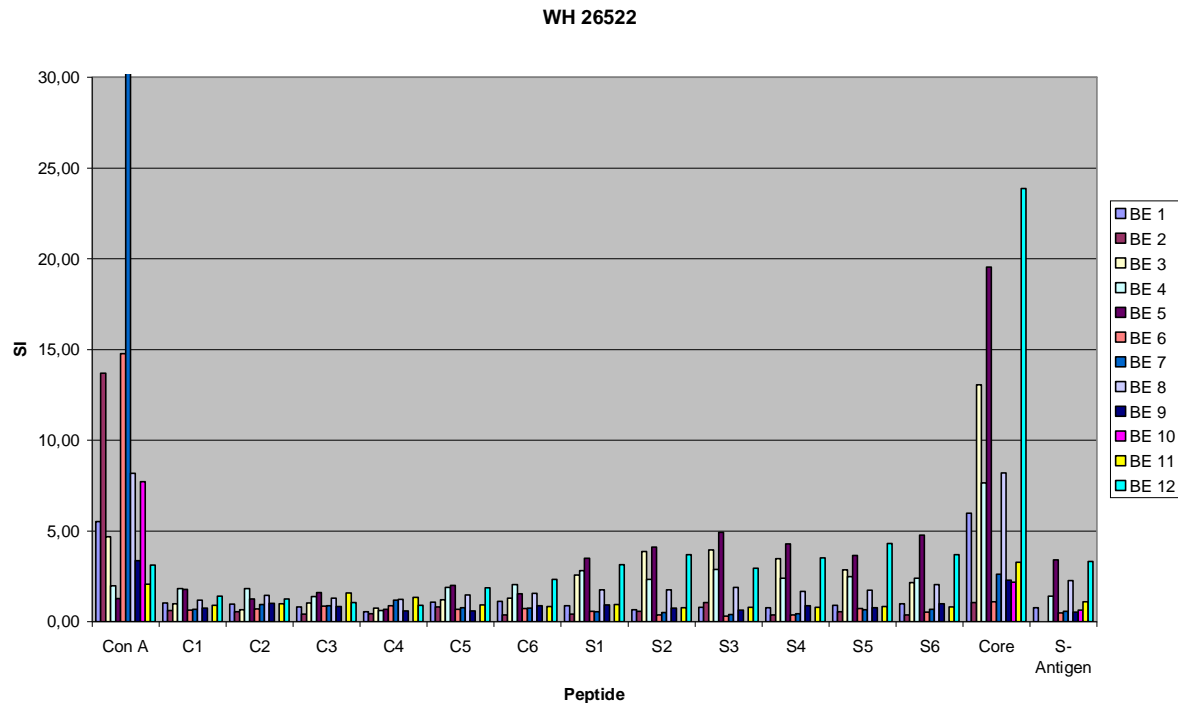


**Abb. 26: Proliferationsergebnisse des Tieres WH 26519 aus der ETV + DNA-Gruppe.** BE steht für die einzelnen Blutentnahmen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Skala bei einem SI von 30 gekürzt. Die tägliche ETV-Gabe erfolgt von BE 1 – 3, die wöchentliche bis einschließlich BE 8. Die Vakzinierungen erfolgten ab BE 5/6. Dieses Tier ist noch während der Vakzinierungsphase verstorben, daher weist es weniger Blutentnahmen als die anderen auf.





**Abb. 27: Proliferationsergebnisse des Tieres WH 26520 aus der ETV + DNA-Gruppe.** BE steht für die einzelnen Blutentnahmen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Skala bei einem SI von 30 gekürzt. Die tägliche ETV-Gabe erfolgt von BE 1 – 3, die wöchentliche bis einschließlich BE 8. Die Vakzinierungen erfolgten ab BE 5/6.



**Abb. 28: Proliferationsergebnisse des Tieres WH 26522 aus der ETV + DNA-Gruppe.** BE steht für die einzelnen Blutentnahmen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Skala bei einem SI von 30 gekürzt. Die tägliche ETV-Gabe erfolgt von BE 1 – 3, die wöchentliche bis einschließlich BE 8. Die Vakzinierungen erfolgten ab BE 5/6.

#### 5.2.4 ETV + DNA/Protein-Vakzine-Gruppe (Gruppe D)

Im Gegensatz zur Gruppe A sinkt bei den Tieren, die Entecavir bekommen haben (Gruppen B bis D), die Viruslast unterschiedlich schnell ab. Die Nachweis-Grenze liegt bei der PCR bei  $1 \times 10^2$  Viruspartikeln. Liegt der Wert darunter bzw. ist nicht mehr messbar, werden die Tiere als Virus-frei bzw. die Virusmengen als nicht nachweisbar bestimmt.

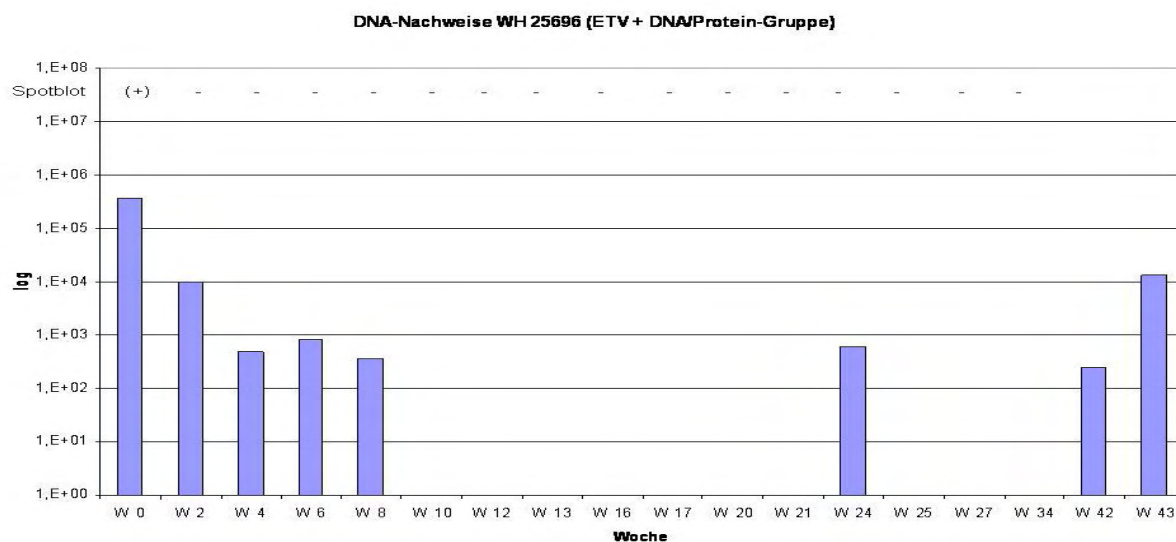
Die Aussagen über die Sensitivität der einzelnen Nachweisverfahren (Spot Blot, qualitative PCR, quantitative PCR) finden sich auch in den Ergebnissen der Gruppe B wieder. Im Gegensatz zur Gruppe B ist bei den vakzinierten Tieren (Gruppen C und D) nur eines von sieben Tieren in Woche 27 positiv getestet worden. Dieser Zeitpunkt liegt zwei Wochen nach der letzten Vakzinierung. In diese Auswertung gehen nur die Tiere ein, die zum Versuchsende (Woche 27) noch leben. Viele der Tiere (s. 5.1) sind noch unter Entecavirgabe verstorben und daher bei den letzten Probenentnahmen noch negativ getestet worden. Drei von sieben Tieren sind in Woche 33 immer noch negativ. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Tiere, die zusätzlich zur Entecavir-Gabe auch noch vakziniert worden sind, signifikant später wieder einen WHV-DNA-Anstieg aufweisen (bis zu zehn Wochen später). Ein Tier (WH 26518) weist in Woche 42 im Spot Blot immer noch keinen Rückfall auf. Vergleichend dazu kann man feststellen, dass ca. 1 - 8 Wochen vorher ein Anstieg in der quantitativen PCR festzustellen ist. Dieser fällt aber weniger dramatisch aus als bei den Tieren aus Gruppe B. Die Tiere aus Gruppe B (Entecavirgruppe) steigen deutlich schneller wieder an als die Tiere der Gruppen C und D. Die gemessenen Virustiter liegen schon bei der ersten positiven Messung über  $1 \times 10^3$  bzw.  $1 \times 10^4$ . Im Gegensatz dazu liegen die Virustiter der anderen Tiere deutlich niedriger. Vier von sieben Tieren haben zu Beginn einen moderaten Anstieg, mit knapp über  $1 \times 10^2$  nachgewiesenen WHV-DNA-Partikeln. Die anderen drei Tiere hatten Einstiegswerte von  $1 \times 10^3$  bzw. einmal  $1 \times 10^4$ . Im Gegensatz dazu gibt es keinerlei signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen C und D. Hauptproblem bei der Bewertung der beiden Gruppen ist die hohe Ausfallquote (drei von sieben Tieren bis Woche 27). Gerade in Gruppe D sind es nur zwei Tiere, die länger als bis Woche 27 beobachtet werden konnten. Zwei Tiere in dieser Gruppe sind bereits früher verstorben, ein

anderes, ist wie oben bereits erwähnt, aufgrund einer unzureichenden Entecaviraufnahme aus der Bewertung herausgenommen worden.

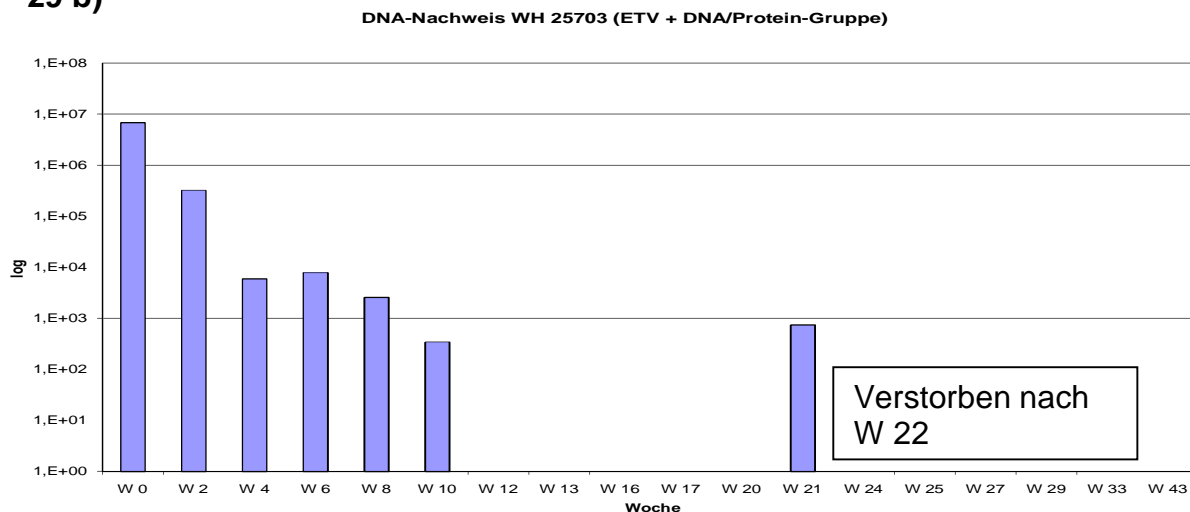
Besonders erwähnenswert ist die Tatsache, dass laut Spot Blot-Ergebnissen zwei von sieben Tieren (WH 26518 und WH 25696) bis einschließlich Woche 40 negativ sind. Erst danach kommt es bei dem ersten Tier (WH 25696) zu einem Titer-Anstieg. Dieses Tier ist mittlerweile aufgrund eines Leberkarzinoms und schlechten Allgemeinzustandes euthanasiert worden.

Die Virusreduzierung zumindest über einen gewissen Zeitraum (etwa 20 - 40) Wochen keinerlei positiven Effekt auf eine etwaige spätere Ausbildung eines HCC zu haben. Selbst die Tiere, die deutlich länger als virusfrei zu bezeichnen sind, sind später an den direkten oder indirekten Folgen einer HCC verstorben bzw. mussten euthanasiert werden. Dies betrifft insbesondere die Tiere WH 25696 und WH 26518, wo eine Virusfreiheit bis in Woche 40 beobachtet werden konnte (Abb. 28).

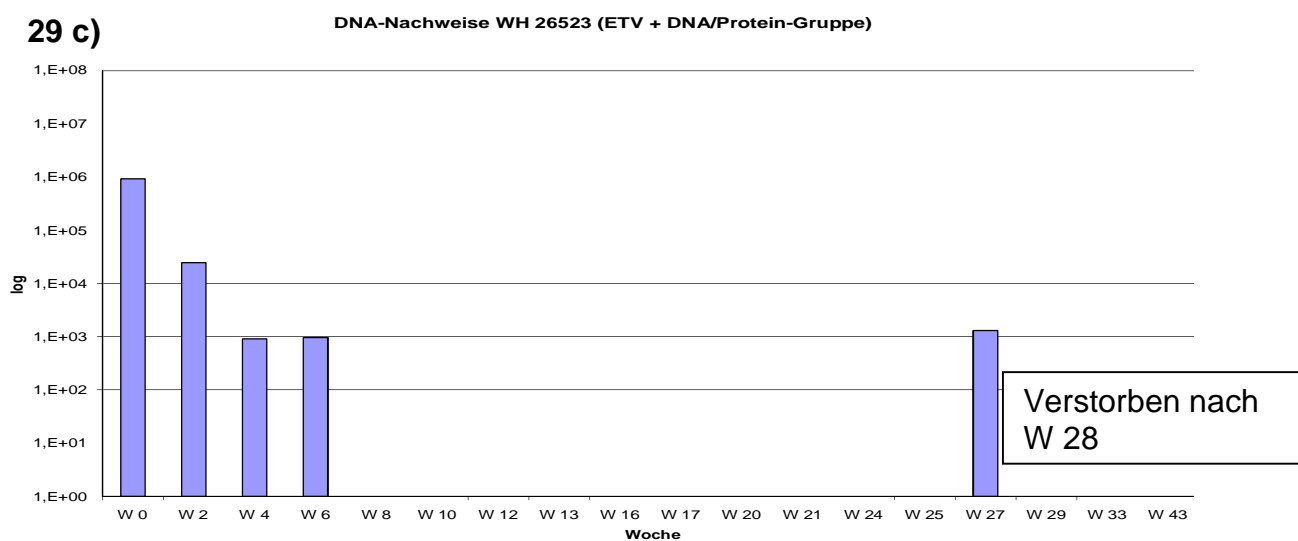
## 29 a)



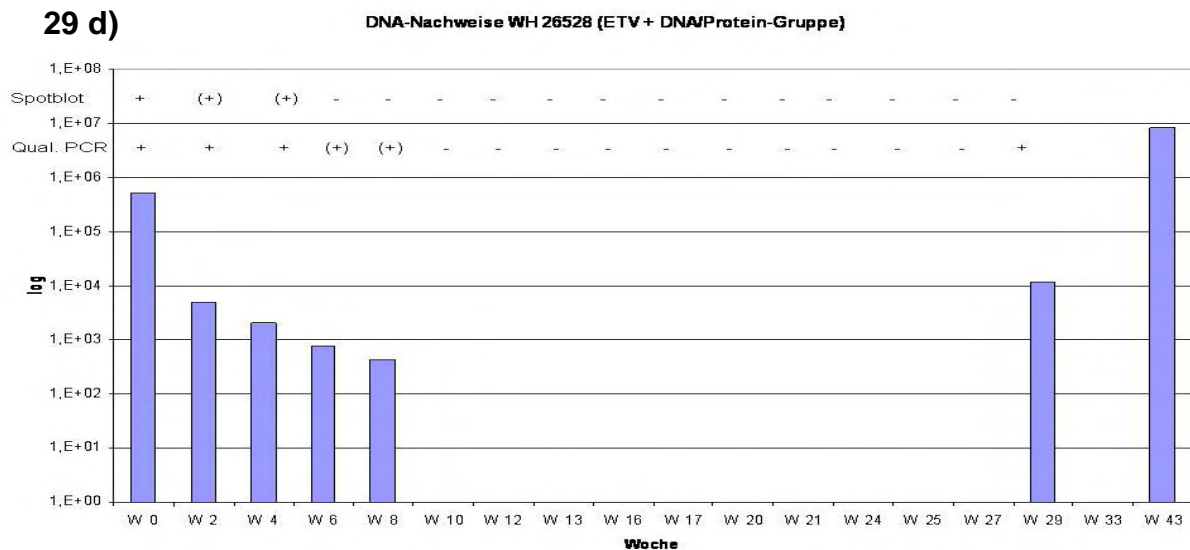
## 29 b)



## 29 c)

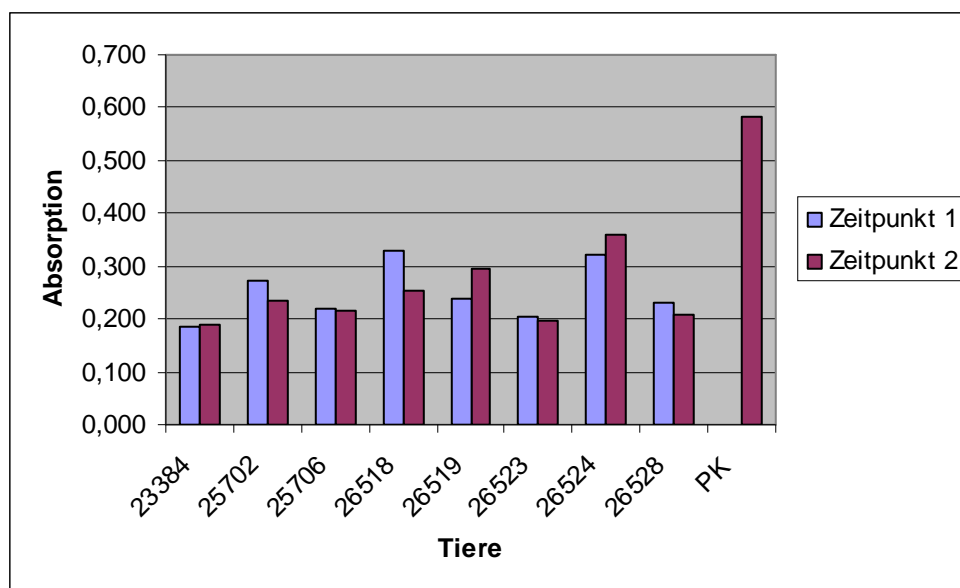


## 29 d)



**Abb. 29 a bis d: Tiere aus der Entecavir +DNA-Gruppe.** Deutlich erkennbar ist hier die Diskrepanz in der Sensitivität zwischen Spot Blot und quantitativer PCR als Nachweisverfahren. Wichtig ist zu beachten, dass die Überlebenszeiten und damit die Gesamtbeobachtungszeiträume bei den einzelnen Tieren variieren können.

Nachdem in den Gruppen C und D drei Vakzinierungen durchgeführt wurden, ist ein anti-WHs-ELISA durchgeführt worden. Dieses wurde durchgeführt, um abschätzen zu können, in wie weit die Tiere schon Antikörper gebildet haben oder nicht. Bis zu diesem Zeitpunkt sind die Immunisierungen alle vier Wochen durchgeführt worden. Je nach Ergebnis des ELISAs soll diese Zeitspanne angepasst werden. Es werden dazu die zu die Serumproben nach der dritten Vakzinierung im Vergleich zum Nullwert zu Beginn des Versuches als Kontrollpunkte herangezogen. Für die Gruppen 3 und 4 bedeutet dies zeitlich gesehen, dass die letzte Blutentnahme eine Woche nach der dritten Immunisierung lag. Die Blutentnahmen für die Gruppen 1 und 2 erfolgen zeitgleich. Diese Tiere sind bis zu diesem Zeitpunkt weiterhin unbehandelt bzw. werden ab diesem Punkt vom ETV abgesetzt. Da im ELISA auch eine Woche nach der dritten Immunisierung kein nennenswerter Booster-Effekt bezüglich der anti-WHs nachgewiesen worden ist, wurde das Immunisierungsintervall von vier auf zwei Wochen verkürzt.

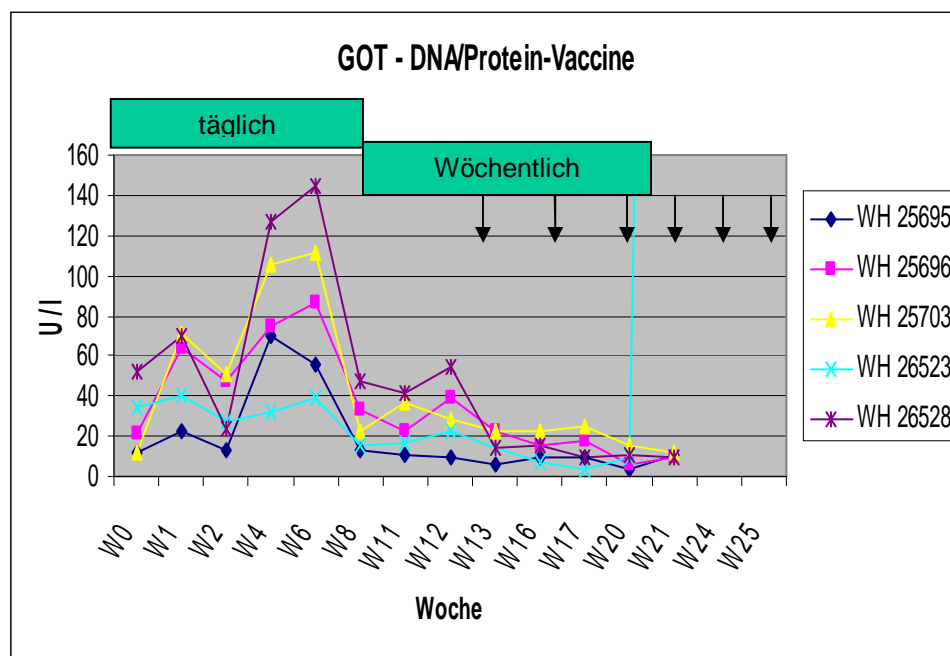


**Abb. 30. anti-WHs-ELISA.** Zu Versuchsbeginn (Zeitpunkt 1, Nullwert) und Zeitpunkt 2 (6 Monate später). Es sind 3 Monate täglich ETV-Gabe und 3 Monate wöchentlich ETV (ggf. mit einer Immunisierung) durchgeführt worden.

Betrachtet man die Gruppe D, so fällt auf, dass im zeitlichen Verlauf keinerlei Änderungen festzustellen sind. Bei keinem der fünf Tiere gibt es Steigerungen bzw. Abfälle bezüglich des anti-WHs-Titers. Eine Ausnahme stellt das Tier WH 26596 dar. Bei diesem Tier ist bereits der Ausgangswert mit 0,245 ab Woche 2 relativ hoch. Die anderen Tiere weisen Werte zwischen 0,049 bis 0,069 auf. Bei dem Tier WH 26596

verändern sich die Werte (0,121 bis 0,282) nur geringgradig, während die anderen Tiere keine Werte über 0,1 erreichen. Legt man zugrunde, dass das Auftreten von anti-WHs-Antikörpern mit einer möglichen Elimination des WHV assoziiert ist, muss man annehmen, dass keines der Tiere es geschafft hat, innerhalb des gewählten Beobachtungszeitraumes virusfrei zu werden. Ein besonderer Fall stellt das Tier WH 26596 dar. Dieses Tier war bis inkl. Woche 37 sowohl im Spot Blot als auch in der PCR als negativ getestet. Da allerdings danach wieder Virus nachzuweisen ist, muss man davon ausgehen, dass das Tier trotz leicht erhöhtem anti-WHs-Titer auch weiterhin chronisch mit WHV infiziert ist. Es gibt also nur eine kurzzeitige und zeitlich begrenzte Remission der Virusvermehrung. Bei den anderen Tieren kommt es auch nur während der Zeit der ETV-Gabe zu einem Abfall des nachweisbaren Virus im Serum, mit einem späteren Anstieg. Da diese Tiere ebenfalls keinerlei Veränderungen im Bezug auf den anti-WHs-Titer zeigen, ist anzunehmen, dass sie immer noch chronisch infiziert sind.

Der Verlauf der GOT stellt sich im Prinzip bis auf geringe Abweichungen ähnlich dar wie bei den Gruppen A bis C.

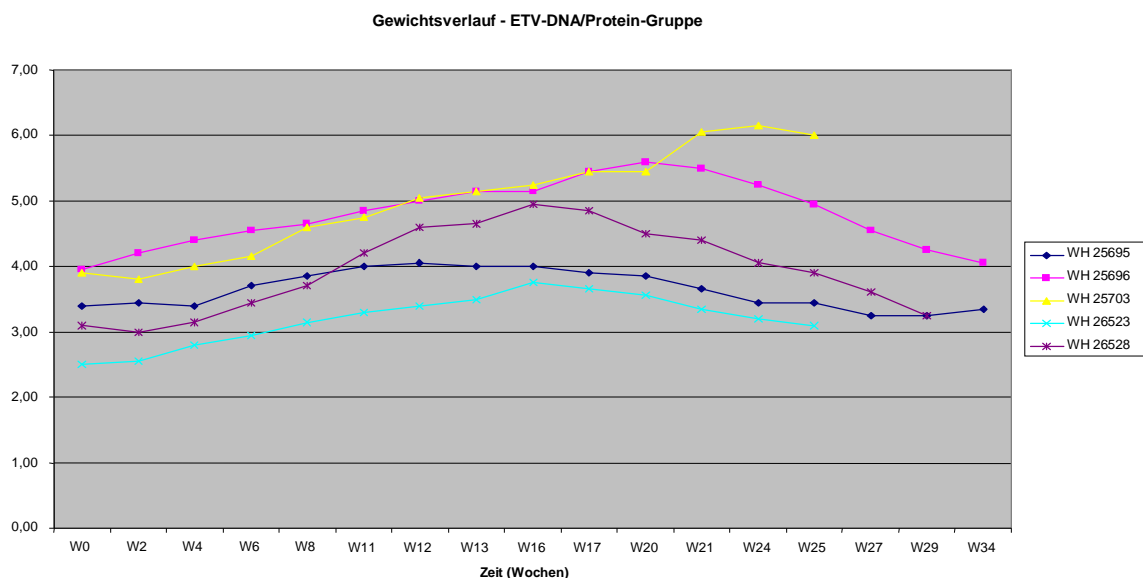


**Abb. 31: GOT-Verlauf der Tiere der ETV + DNA/Protein-Gruppe während des gesamten Versuchszeitraumes.** Die Angaben täglich und wöchentlich beziehen sich auf die ETV-Gabe. Die Pfeile stehen für die 6 Vakzinierungen, die die Tiere erhalten haben.

Auch hier sieht man beim Verlauf der GOT einen dreiphasigen Verlauf. Noch während der täglichen Gabe von ETV kommt es zu einem Anstieg auf bis zu 140 U/l.

Dieser Wert liegt im Vergleich mit den anderen drei Gruppen am höchsten, aber auch hier kommt es danach wieder zu einem Rückgang auf die Basalwerte (bis zu 40 U/l). Dieser Rückgang ist weniger stark als bei den ersten beiden Gruppen, aber in etwa vergleichbar mit der dritten Gruppe. In der zweiten Hälfte der täglichen ETV-Gabe kommt es zu einem zweiten Anstieg auf Werte um 60 U/l. Bei Umstellung auf wöchentliche ETV-Gabe wird wieder der Basalwert (0 – 20 U/l erreicht). Im weiteren Verlauf bleiben die Werte dann konstant um etwa 10 – 20 U/l und es sind keine weiteren Steigerungen zu beobachten. Insgesamt ist diese beobachtete Gruppe sehr homogen in ihrem Verlauf der GOT.

Im Vergleich dazu gibt es bei der Beurteilung der Gewichtsverläufe zwischen den vier Gruppen nur wenig Unterschiede (vgl. Abbildung 32). Bei der Gruppe D liegt das Startgewicht zwischen 2,5 und 4,1 kg, während das Gewicht bei Versuchsende zwischen 2,7 und 4,7 kg schwankt. Das bedeutet, dass es wie auch in den vorigen 3 Gruppen über das gesamte Versuchsjahr zu einer Zunahme der Tiere gekommen ist. Die Zunahmen liegen abhängig vom Ausgangsgewicht zwischen 0,5 und etwa 1 kg. Diese Werte sind vergleichbar mit der Kontrollgruppe (Gruppe A).



**Abb. 32: Gewichtsverlauf der Tiere der ETV-DNA/Protein-Gruppe während des Beobachtungszeitraumes von 34 Wochen.** Das Anfangsgewicht bei dieser Gruppe liegt zwischen 2,5 und 4,1 kg, das Endgewicht bei 2,7 – 4,7 kg.

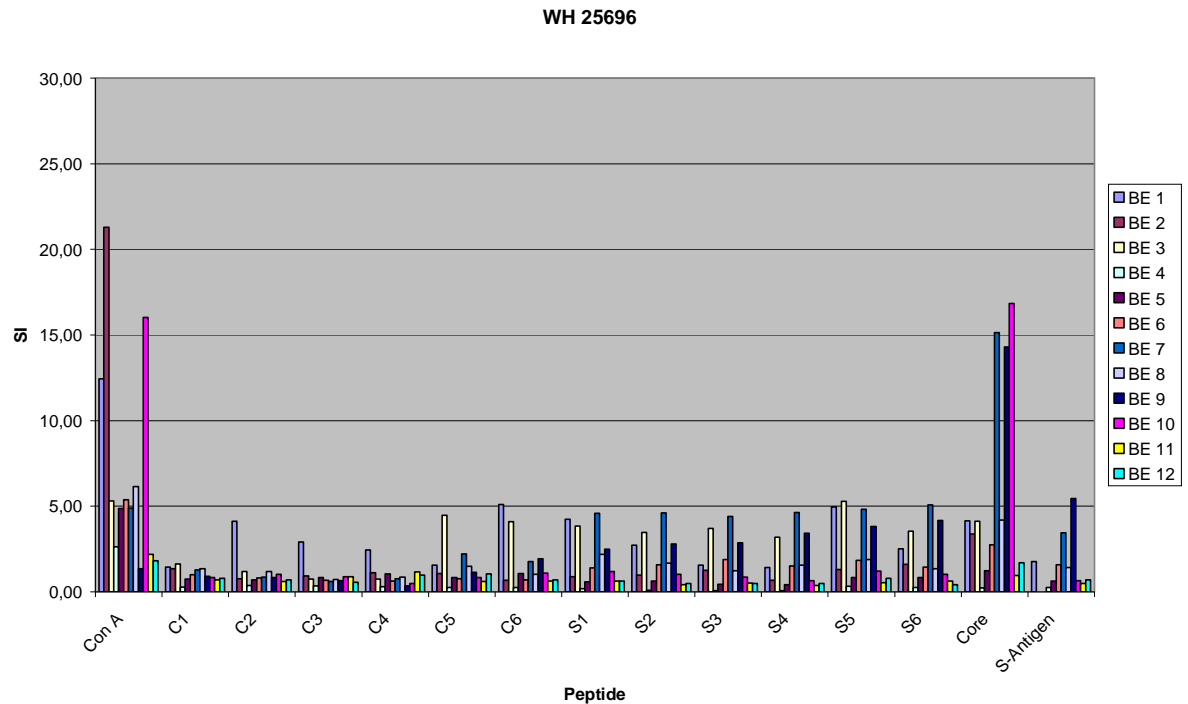
Ein Southern Blot wurde vergleichend zwischen einem Tier der ETV-Gruppe und der Gruppe C (ETV + DNA-Vakzine) durchgeführt. Ebenso wurde eine histologische

Untersuchung von Leberproben durchgeführt. Die Ergebnisse des Southern Blots vergleichend im Kapitel 5.2.2 besprochen.

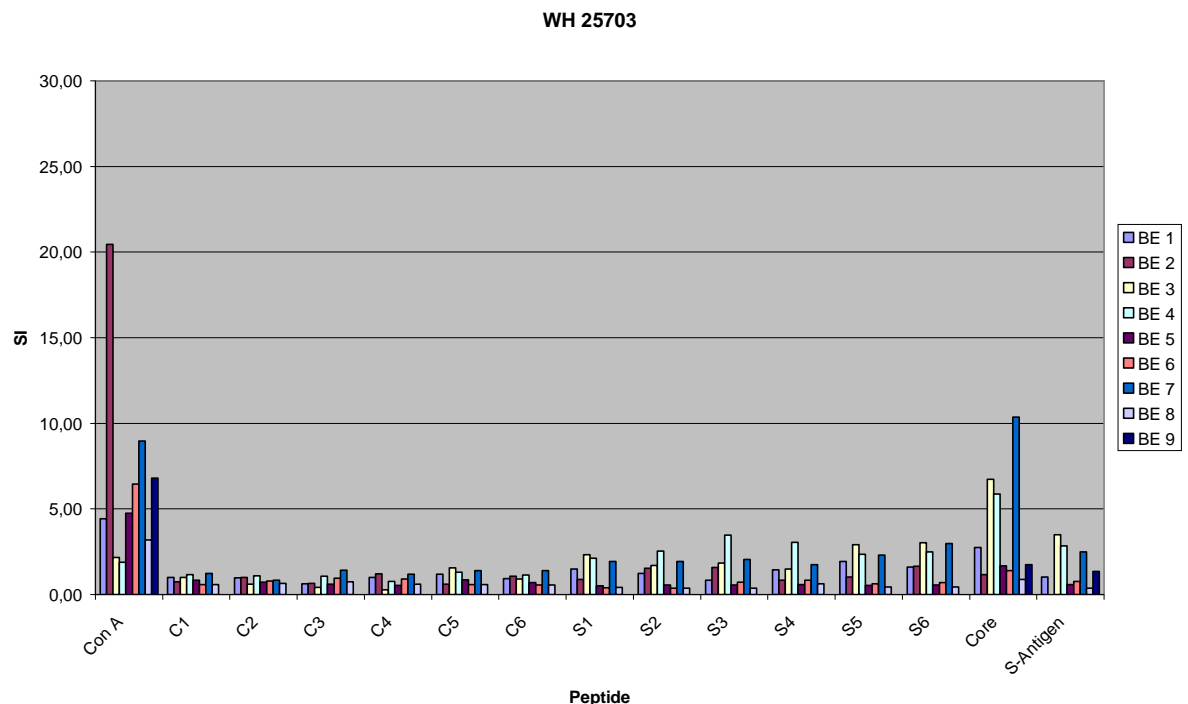
Für die ETV+DNA-Gruppe sind über den gesamten Versuch 45 Proliferationsassays durchgeführt und ausgewertet worden. Als stimulierendes Mitogen zur Positivkontrolle wird auch hier, wie in den 3 Gruppen zuvor, ConA verwendet.

Wie auch in den Gruppen A - C zeigt sich auch in Gruppe D, dass Core alleine als Gesamtprotein sehr oft und unabhängig von der Versuchsgruppe zu einer Stimulation der Zellen führt (SI über 10). Dies bestätigt, dass es sich bei der Stimulation mit Core um eine relativ unspezifische Stimulation handelt, die nicht unbedingt mit dem Infektionsstatus des Tieres korreliert. So reagieren bei der ETV-Gruppe bei den 45 Tests insgesamt 11-mal (24,44 %) positiv auf das Core-Protein. Dieser Wert ist deutlich höher als bei Gruppe B und liegt in etwa im Bereich der Kontrollgruppe und der ETV+DNA-Gruppe. Im Vergleich dazu reagieren die Tiere auf das S-Antigen (SI > 3) 3-mal positiv, was einem Prozentsatz von 6,66 % entspricht. Dies ist der niedrigste gemessene Wert für die Reaktion auf das S-Antigen bei allen vier Gruppen. Auf die C-Peptide reagieren die Tiere mit 1,11 % positiven Reaktionen (entspricht 6 positiven Reaktionen). Dieser Wert ist signifikant kleiner als die ermittelten Werte für die Gruppen A und B und nur geringgradig größer als bei Gruppe C. Im Vergleich dazu ist auf die S-Peptide in 4,44 % der Fälle reagiert worden (24 positive Reaktionen). Dies ist wie auch schon beim S-Antigen der kleinste gemessene Wert bei allen vier Gruppen. Im Gegensatz zu den anderen drei Gruppen liegen die Durchschnitts-SI's zwischen C- und S-Peptiden durchaus im vergleichbaren Rahmen (SI C-Peptide: 4,18; SI S-Peptide: 4,48). Damit bewegt sich der SI für die C-Peptide zwischen dem von Gruppe B (SI: 5,0) und Gruppe A (SI: 3,96), und der für die S-Peptide liegt im Bereich der Kontrollgruppe (SI: 4,48). Insgesamt reagieren die Tiere auf das Peptid C6 dreimal, auf das Peptid C5 zweimal und auf das Peptid C2 einmal. Auf die Peptide C1, C3 und C4 ist nicht reagiert worden. Im Vergleich dazu ist auf die Peptide S1 und S5 fünfmal, auf die Peptide S3, S4 und S6 viermal reagiert worden. Auf das Peptid S2 ist zweimal eine positive Reaktion gemessen worden.

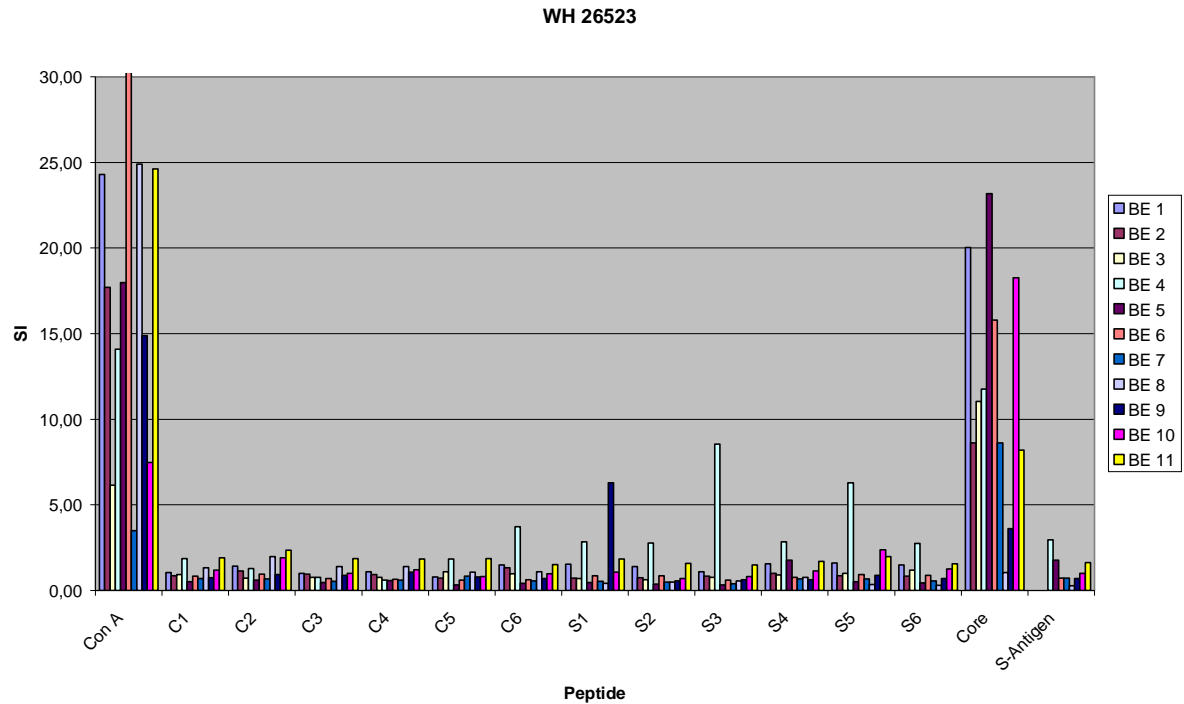




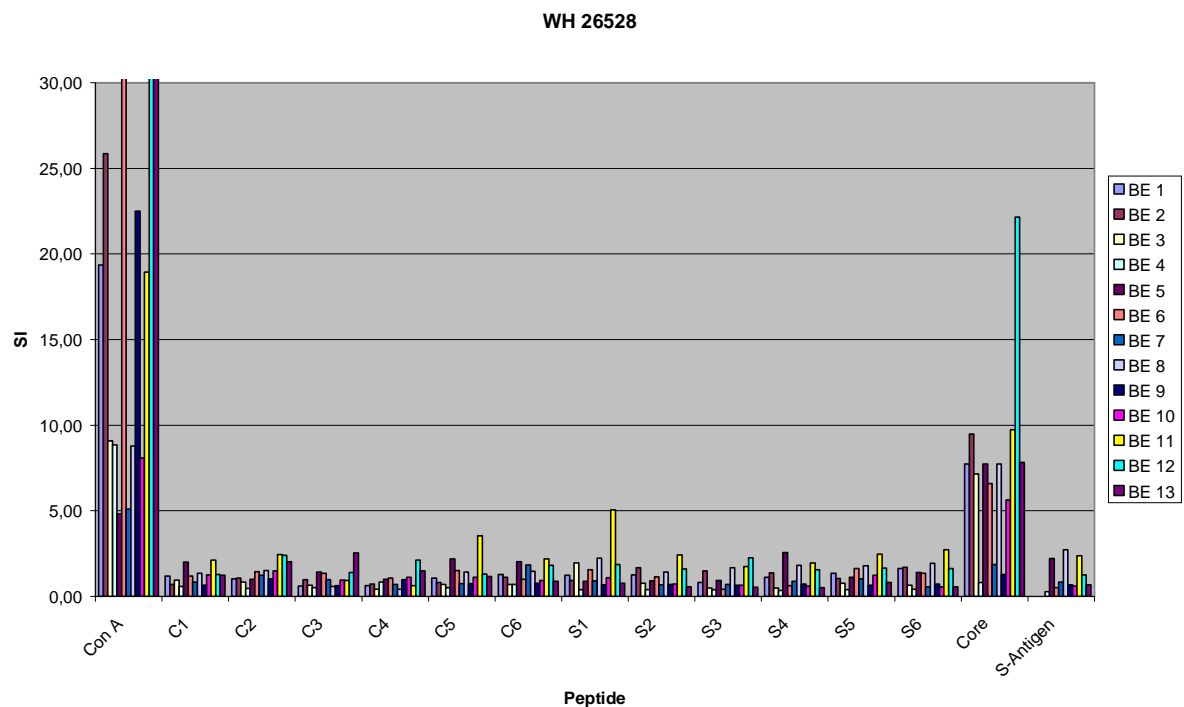
**Abb. 33: Proliferationsergebnisse des Tieres WH 25696 aus der ETV + DNA/Protein-Gruppe.** BE steht für die einzelnen Blutentnahmen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Skala bei einem SI von 30 gekürzt. Die tägliche ETV-Gabe erfolgt von BE 1 – 3, die wöchentliche bis einschließlich BE 8. Die Vakzinierungen erfolgten ab BE 5/6.



**Abb. 34: Proliferationsergebnisse des Tieres WH 25703 aus der ETV + DNA/Protein-Gruppe.** BE steht für die einzelnen Blutentnahmen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Skala bei einem SI von 30 gekürzt. Die tägliche ETV-Gabe erfolgt von BE 1 – 3, die wöchentliche bis einschließlich BE 8. Die Vakzinierungen erfolgten ab BE 5/6. Das Tier ist vor Versuchsende verstorben.



**Abb. 35: Proliferationsergebnisse des Tieres WH 26523 aus der ETV + DNA/Protein-Gruppe.** BE steht für die einzelnen Blutentnahmen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Skala bei einem SI von 30 gekürzt. Die tägliche ETV-Gabe erfolgt von BE 1 – 3, die wöchentliche bis einschließlich BE 8. Die Vakzinierungen erfolgten ab BE 5/6.



**Abb. 36: Proliferationsergebnisse des Tieres WH 26528 aus der ETV + DNA/Protein-Gruppe.** BE steht für die einzelnen Blutentnahmen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Skala bei einem SI von 30 gekürzt. Die tägliche ETV-Gabe erfolgt von BE 1 – 3, die wöchentliche bis einschließlich BE 8. Die Vakzinierungen erfolgten ab BE 5/6.

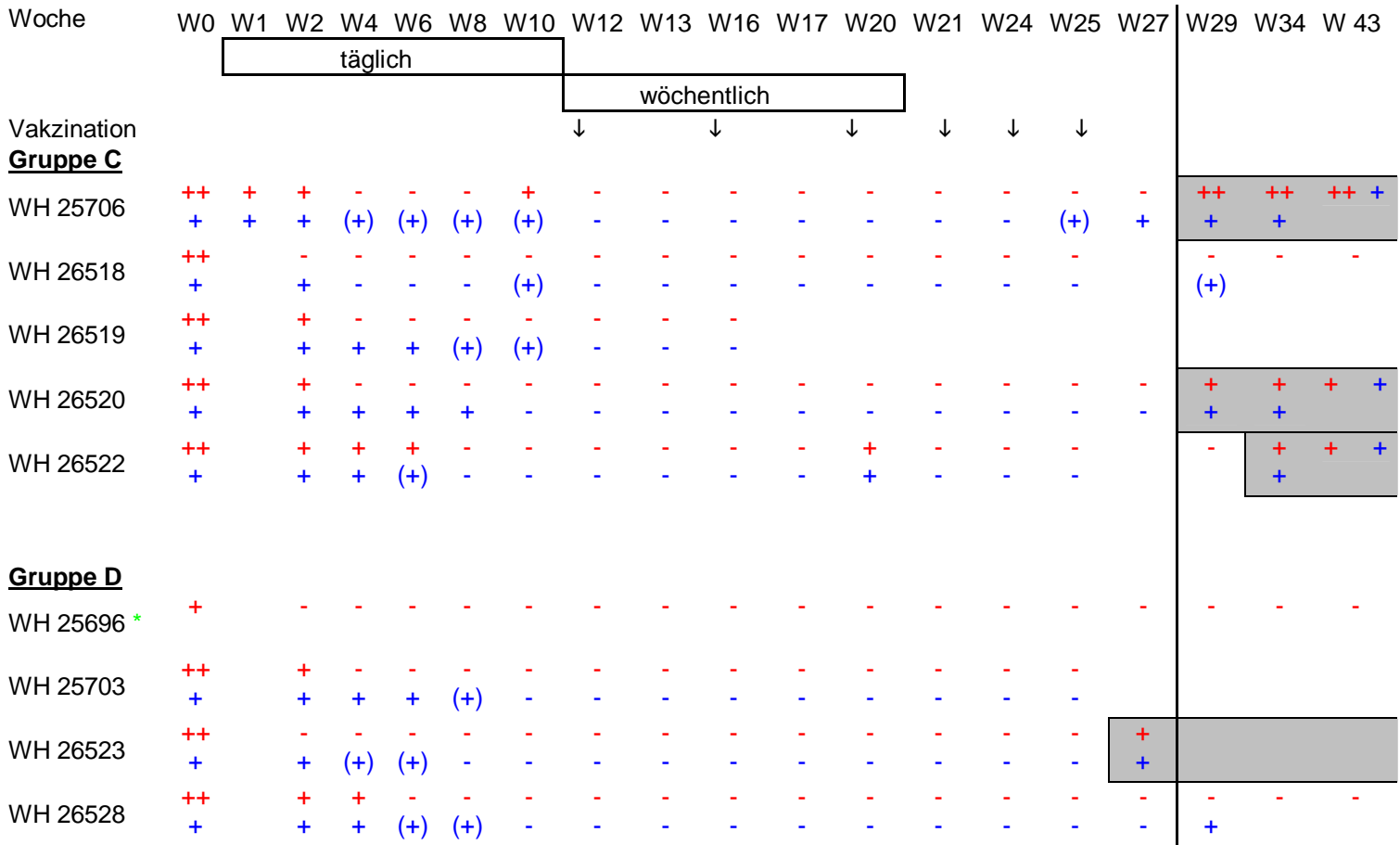
## 5.2.5 Allgemeines zu den Proliferationstests

Unabhängig von der Gruppen-Zugehörigkeit der Tiere reagieren die Tiere auf einzelne Peptide im Proliferationstest. Es gibt aber keinerlei zeitlich Zusammenhänge zwischen Entecavir-Gabe und eventuell durchgeführten Vakzinen. Auch sind die Ergebnisse beim folgenden Test zu reproduzieren. Um eine bessere Unterscheidung zwischen einer positiven und negativen Immunantwort bewerkstelligen zu können, müssen folgende Parameter gleichzeitig vorliegen, damit eine Reaktion im Proliferationstest als positiv definiert wird. So müssen die Tiere im Proliferationstest wie folgt reagieren, damit dies als positiv gewertet wird. Die SI folgender Antigene müssen folgende Werte erreichen:

- Core > 10
- S-Antigen > 3
- 3 Peptide über > 3

Woche	W0	W1	W2	W4	W6	W8	W10	W12	W13	W16	W17	W20	W21	W24	W25	W27	W29	W34	W 43	
		täglich						wöchentlich												
Vakzination								↓	↓		↓		↓	↓	↓					
<b>Gruppe A</b>																				
WH 23384	++		++	++	+	-	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++		++	++	++
WH 23386	++		++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++		++	++	++
WH 25700	++	++	++																	
WH 25702	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++								
<b>Gruppe B</b>																				
WH 21030	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++							
WH 23382	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	+	+	+	++		
WH 26524	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+			
	+	+	+	+	+	-	-	(+)	+	+	(+)	-	-	-	+	+				
WH 29543	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+						
	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	+						

**Abb. 37a: WHV-DNA im Serum der Tiere aus den Gruppen A und B.** Mittels Spot Blot (+) oder qualitativer PCR (+) wird WHV-DNA im Serum nachgewiesen. Die Tiere der Gruppe A sind über den gesamten Beobachtungszeitraum positiv getestet worden. Die Pfeile (↓) stehen für die einzelnen Vakzinierungen, die bei diesen beiden Gruppen nicht statt gefunden haben.



**Abb. 37b: WHV-DNA im Serum der Tiere aus den Gruppen C und D.** Mittels Spot Blot wird WHV-DNA im Serum nachgewiesen. Die Tiere aus den Gruppen C und D (WH 26518 und WH 25696) sind bis einschließlich Woche 43 negativ.  
 += Spot Blot  
 += qual. PCR

Treffen diese 3 Parameter bei einem Tier zu, so wird die Immunantwort zu diesem Zeitpunkt als positiv angesprochen, wobei keinerlei Unterscheidung gemacht wird, auf welche 3 Peptide reagiert wurde (Peptide des C- oder S-Antigens). Bei dieser Form der Auswertung bleibt auch ebenfalls die Positivkontrolle unberücksichtigt.

Legt man diesen Bewertungsmaßstab zugrunde, so wird deutlich, dass die Tiere mit zunehmender Versuchsdauer häufiger reagieren (s. Abb. 17). Es gibt allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen. Fasst man den Bewertungsmaßstab allerdings grozugiger (z. B. nur Core-SI > 10), dann kommt es zur schon oben erwahnten Häufung positiver Ergebnisse, welche auf die unspezifische Stimulation durch das Antigen zurückzuführen sind.

Wie schon oben erwähnt, wird bei dieser Art der Bewertung unberücksichtigt gelassen, auf welches der 12 Peptide die PBMC der Tiere wann reagiert haben. Bei einfacher Zählung der Häufigkeit der Peptide rufen die S-Peptide deutlich häufiger positive Immunreaktionen hervor, als die Peptide des Core-Antigens (S-Peptide: 82,44 %, C-Peptide 17,56 %). Dies steht nicht im Einklang mit früheren Arbeiten (Menne 1994), wo v. a. das C-Peptid 97 - 110 (in dieser Arbeit C4 genannt) immunreaktiv war. Dieses Peptid hat sich in der vorliegenden Studie in nur einem Fall als immunreaktiv erwiesen, was einem Prozentsatz von 0,76 % entspricht.

## 6. Diskussion

### 6.1 Ursachen der chronischen Infektion

Chronische Virus-Infektionen, wie z. B. HBV-Infektionen, resultieren aus einer ineffektiven CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort z. B. als Folge einer funktionellen Erschöpfung der virus-spezifischen T-Lymphozyten. Gerade persistierende Infektionen führen zu einer Unterbrechung der normalen immunodominanten Hierarchie innerhalb der Reifung der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Die ersten zelltypischen Funktionen, die verloren gehen, sind die Produktion von Interleukin-2 (IL-2) und die Fähigkeit zur Lyse von infizierten Gewebezellen. Im weiteren Verlauf geht noch die Produktion von TNF- $\alpha$  als weitere Funktion verloren. Dem gegenüber ist die INF- $\gamma$ -Produktion gegen Erschöpfung relativ resistent. Generelle Unterschiede zwischen einer akuten und chronischen Virus-Infektion bezüglich der CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort (akut  $\rightarrow$  chronisch) sind:

- Immunodominanz wird dramatisch modifiziert
- Gewebedistribution verändert sich; die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen finden sich vermehrt in Knochenmark und nicht-lymphoiden Geweben
- funktionelle Aktivität ist reduziert
- Aufgrund zunehmender funktioneller Erschöpfung steigt die Virus-Last

Das Phänomen der Zell-Erschöpfung bei chronischen Infektionen wird beobachtet bei HIV, HBV, HCV und auch anderen Virus-Infektionen. Allerdings ist der Grad der Abnahme und Erschöpfung der T-Zellpopulation von Virus zu Virus verschieden. „Erschöpfte“ Zellen sind nicht mehr in der Lage, Antigene aufzunehmen und zu prozessieren (Lee, 1999; Zajac, 1998). Bei chronischen infizierten Patienten besteht die vorhandene T-Zell-Population aus einer Mischung von funktionell erschöpften und nicht-erschöpften Zellen. Eine weitere Funktion, welche durch eine Infektion mit einem Virus beeinflusst wird, ist die zytotoxische Aktivität der T-Zellen. Die zytotoxische Aktivität der Zellen wird teilweise ausgelöst durch die Infektion selber und der daraus resultierenden Viruslast. Der Hauptfaktor, der die T-Zell-Funktion am stärksten beeinflusst, ist aber das Antigen selber. Der genaue Zusammenhang ist bisher noch unklar. Es gibt z. Z. aber Studien, die zeigen, dass hohe Virusmengen

einen negativen Effekt auf die Zytokin-Produktion oder die Zytotoxizität der Zellen haben (Edwards, 2002; Pontesilli, 1997). Andere Studien wiederum weisen keine Korrelation zwischen Viruslast und der T-Zell-Funktion nach (Goulder, 2000; Mueller, 2001). Eine neuere Studie von Wherry et al. (2003) zeigt demgegenüber wieder einen engen Zusammenhang zwischen Virustiter und Verlust der CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Funktionen. Insbesondere scheint das individuelle Muster der viralen Epitope eine wichtige Rolle bei der Erschöpfung der einzelnen Zelllinien (z.B. CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) zu spielen, da sich einige Epitop-spezifische T-Zelllinien früher erschöpfen als andere. Es gibt trotz aller Beeinflussung der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch das Virus aber auch den Fall, dass beide Parteien (Immunsystem und Virus) nebeneinander koexistieren können. Dies gilt allerdings nur unter der Voraussetzung, dass sich beide Systeme effektiv ignorieren. Auch wurde nachgewiesen, dass bei chronischen LCMV- ebenso wie bei murinen  $\gamma$ -Herpesvirus-Infektionen die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ein geringeres Maß an CD44-Expression aufwiesen (Liu, 2002). CD44 stellt einen Rezeptor auf u. a. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen dar und interagiert mit extrazellulären Matrix-Komponenten. Des Weiteren spielt es eine wichtige Rolle bei der Lymphozyten-Migration (Borland, 1998). Außerdem kann CD44 lösliche Faktoren wie z.B. Osteopontin binden (Ashkar, 2000; Borland, 1998). Interessant wäre festzustellen, in wie weit die reduzierte CD44-Expression auf den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei chronischen Infektionen eine echte funktionelle Konsequenz hat, oder ob es sich nur um einen Nebenbefund ohne Bedeutung für das Immunsystem handelt.

Weiterhin ist nachgewiesen, dass bei chronischen Infektionen das für die Aufrechterhaltung der CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Funktion auch die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wichtig sind. Bei chronischen LCMV-Infektionen oder HIV-Infektionen konnte gezeigt werden, dass die CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Dysfunktionen extreme Ausmaße annehmen können, wenn CD4<sup>+</sup>-T-Zellen fehlen (Matloubian, 1994; Zajac, 1998; Altfeld, 2000; Erickson, 2001). Des Weiteren haben verschiedene Studien demonstriert, dass Memory-T-Zellen kaum in peripheren Geweben gefunden werden (Marshall, 2001; Masopust, 2001; Reinhardt, 2001). Gerade bei chronischen Infektionen werden virus-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen massiv akkumuliert in nicht-lymphoiden Geweben und im Knochenmark gefunden. Inwieweit dies mit dem oben bereits beschriebenen Erschöpfungszustand der CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Population zusammenhängt, ist noch nicht genau geklärt. Häufig finden sich mehr Lymphozyten in der Leber als in der Milz.

Es stellt sich daher die Frage, ob und inwieweit die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die sich in einem inaktivierten und erschöpften Stadium bzw. Zustand befinden, ihre funktionellen Eigenschaften wieder zurückerlangen können, oder ob es nötig und möglich ist, einen neuen Pool an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zur Bekämpfung der chronischen Infektion etablieren und stabilisieren zu können.

## 6.2 Ziel der Kombinationstherapie

Aufgrund dieser Überlegungen wird deutlich, dass es das Ziel sein muss, chronisch HBV infizierte Patienten in die Lage zu versetzen, durch die Vakzinierung eine stabile T-Zell-Immunität aufzubauen, um so die chronische Infektion zu überwinden. Es herrscht mittlerweile Klarheit darüber, dass dieses Ziel nur mit einer Kombination von verschiedenen Therapieansätzen erreicht werden kann.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde daher versucht, mit einer Kombination aus Nukleosidanaloga-Gabe und therapeutischen Vakzinationen die T-Zell-Antwort zu unterstützen, um das WHV zu eliminieren und damit die chronische Infektion zu beenden.

## 6.3 Covalent closed circular DNA (ccc DNA)

Es handelt sich bei der cccDNA um ein Template für die Synthese der hepadnaviralen messenger RNA, welche im Nukleus infizierter Hepatozyten zu finden ist. Die cccDNA dient als Matrize für die Replikation viraler RNA, und zwar für alle RNA-Stränge des Virus (S-Gen, X-Gen und dem prägenomischen Anteil mit Core). Mit Hilfe der reversen Transkriptase wird diese RNA in DNA umgeschrieben, um dann als neu synthetisierte cccDNA in den Nukleus der infizierten Zelle einzudringen oder mit einer Hülle versehen aus der Zelle ausgeschleust zu werden. Dandri et al. (2000) zeigen, wie auch schon in früheren Studien (Moraleda, 1997), dass es sich bei der cccDNA um ein Molekül von äußerst hoher Stabilität handelt.



Die Beseitigung der cccDNA soll einhergehen mit der Zerstörung von infizierten Zellen, es ist aber auch möglich, dass der Abbau der cccDNA durch einen erhöhten Zellumsatz erleichtert wird (Fourel, 1994). Diese Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass cccDNA sogar so hochstabil ist, dass es Zellteilungen von kultivierten Hepatozyten *in vitro* überlebt. Es sind allerdings weitere Studien nötig, um zu zeigen, ob cccDNA auch die Zellteilung *in vivo* überleben kann. Es konnte von Guidotti et al. 1999 gezeigt werden, dass der cccDNA-Inhalt infizierter Zellen ebenso durch Immunantworten, ohne Ausbildung zytopathischer Effekte, kontrolliert werden kann. Das bedeutet, dass verschiedene antivirale Prozesse ko-existieren können und gleichzeitig auch notwendig sind, um ein Virus vollständig zu beseitigen. Es scheint für die vollständige Eliminierung essentiell zu sein, die in den Hepatozyten vorliegende cccDNA zu entfernen, damit eine vollständige Ausheilung der chronischen Infektion erfolgen kann.

Sowohl die Behandlung mit Lamivudin als auch die Behandlung mit Adefovir führt aber zu keinerlei Reduzierung des cccDNA-Levels in den Hepatozyten (Moraleda, 1997). Da diese als Matrize für die RNA-Synthese dient, bleibt die Mengen der viralen RNA konstant, das heißt, neuere, potentere Inhibitoren müssten folgende Effekte aufweisen, um auch auf Ebene der cccDNA erfolgreich ansetzen zu können:

- substantielle Effekte auf die Inhibition der Infektion
- Effekte auf den intrazellulären Amplifikations-Pfad der cccDNA

Fest steht aber, dass die Elimination der cccDNA durch das Absterben infizierter Hepatozyten erfolgt. Ob die cccDNA auch in lebenden Zellen verloren gehen kann, ohne dass diese Zelle zugrunde gehen muss, ist nicht bekannt. Die wichtigste Frage ist daher also, ob es möglich ist, dass die Hepatozyten eine Infektion überstehen können, bei gleichzeitigem Verschwinden der cccDNA, ohne dass sie zugrunde gehen (müssen).

## 6.4 Nucleosidanaloga

### 6.4.1 Lamivudin (3TC)

Bereits 2005 testeten Horiike et al. eine Kombinationstherapie von Lamivudin und therapeutischen Vakzinen bei chronisch HBV-infizierten Patienten. Im Zuge dieser Studie wiesen sie nach, dass es sich bei Lamivudin um ein potentes antivirales Agens mit allerdings nur minimaler immunmodulatorischer Wirkung handelt. Ein großes Problem des Lamivudins ist die z. T. starke Resistenzbildung bei alleiniger Gabe, mit damit einhergehenden Anstieg von HBV-DNA in Serum und Lebergewebe, oder Ausbruch eines akuten Hepatitis-Schubs bei chronischer HBV-Infektion. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der therapeutischen Vakzine um ein Instrument mit hohem immun-modulatorischem Potential ohne Nebenwirkungen, mit aber nur geringer antiviraler Kapazität. Das bedeutet, dass die Kombination aus beiden ein besseres therapeutisches Regime repräsentiert, bei dem nur wenige Komplikationen am Patienten zu erwarten sind, da sich beide Partner der Therapie in ihren jeweiligen Schwachstellen (z.B. Resistenzbildung, etc.) ergänzen sollen und so synergistische Effekte erwartet werden. Eine komplette Eradikation des HBV bei Patienten mit chronischer Infektion ist durch alleinige Gabe von Nucleosidanaloga wie Lamivudin nicht möglich, so lange kovalent geschlossene zirkuläre DNA in der Leber und den extrahepatischen Geweben vorhanden ist. Horiike et al. (2005) konnten in ihrer Versuchsreihe auch zeigen, dass die Kombinationstherapie, wie sie in diesem Versuch durchgeführt wurde, noch nicht vollständig ausgereift ist. So zeigen immer wieder Patienten Reaktivierungen mit deren Nebenwirkungen. Da bisher auch die genaue Wirkungsweise der Kombinationstherapie unklar ist, sind mehr Studien mit u. a. auch größeren Fallzahlen und abgeänderten Studiendesigns vonnöten.

Wie oben bereits ausgeführt liegt das Hauptproblem des Lamivudins darin, dass es zur Ausbildung von Resistenzen seitens des Virus kommt. Paik et al. konnten 2006 zeigen, dass es schon innerhalb von 3-6 Monaten zur Ausbildung dieser Resistenzen kommt. Diese treten infolge von Punktmutationen im Polymerase-Gen des Hepatitis B Virus auf. Im Zuge dessen ist eine Langzeit-Gabe von Lamivudin oft nicht möglich. Dies ist laut Studie von Horiike et al. (2005) aber sinnvoll und notwendig, um den

Weg für eine optimale Immunantwort auf die therapeutischen Vakzinierungen zu bereiten.

#### 6.4.2 Adefovir

Bei Adefovir, einem weiteren Nukleosidanalogen, bestehen diese Probleme mit dem Auftreten möglicher Resistenzen bei längerer Gabe nicht (Dandri et al. 2000). Damit weist es gegenüber 3TC erhebliche Vorteile auf. Dandri et al. haben 2000 getestet, ob es bei einer Therapie mit Adefovir zu einer Reduktion der WHV-Replikation kommt und gleichzeitig den Pool vorhandener cccDNA in Gewebekulturen reduziert wird. Dafür werden drei Behandlungsregimes mit jeweils unterschiedlichen Tagesdosen (1, 10 und 100  $\mu\text{mol/l}$ ) für 24 Tage getestet. Bei allen drei Gruppen kommt es innerhalb dieses Zeitraumes zu einer starken Reduktion der WHV-DNA-Synthese (90 %), sowie der –sekretion (98 %). Die Sekretion der Hüllproteine und der viralen RNA bleiben im Gegensatz dazu konstant. Die Menge des intrazellulär vorliegenden Core-Proteins sinkt unter der Adefovir-Behandlung ebenfalls, allerdings nicht im gleichen Maße wie die das der nicht mehr gebildeten WHV-DNA (nur 50 % statt 90 %). Des Weiteren können keinerlei Hinweise dafür gefunden werden, dass es zu einem Abfall von cccDNA in den Zellen kommt.

#### 6.4.3 Entecavir (ETV)

Genovesi et al. konnten 1998 zeigen, dass bereits tägliche ETV-Dosen von 0,02 – 0,5 mg/kg über einen Zeitraum von 1 – 3 Monaten ausreichen, das Level der WHV-Virämie effektiv zu senken. Bereits eine 4-wöchige Therapie mit 0,5 – 1 mg/kg reduziert die Mengen an endogener WHV-Polymerase im Serum um das 1000fache. Sowohl im Spot Blot als auch im Southern Blot (Reduzierung um das  $10^7$  –  $10^8$ -fache) konnten diese Zahlen nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte im Southern Blot eine deutliche Reduzierung der cccDNA in der Leber festgestellt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Studien zur Effektivität von ETV bei HBV-Infektionen (Bisacchi 1997; Innaimo 1997; Seifer 1998). Zwischen den täglichen Dosen von 0,5 oder 1 mg/kg pro Tag gibt es keinerlei signifikanten Unterschiede. Es wurde außerdem noch festgestellt, dass es außer der Reduktion der WHV-DNA im Serum auch noch zu einer beträchtlichen Reduktion von zwei

weiteren WHV-DNA-Spezies kommt, nämlich den cytoplasmatischen virale Replikations-Zwischenprodukten (RNA) und der nukleären cccDNA. Gerade bei der Reduzierung der cccDNA-Mengen waren die höheren Dosen, wie z. B. 0,5 oder 1 mg/kg/Tag deutlich erfolgreicher als 0,1 mg/kg/Tag (Locarnini, 1996; Tuttleman, 1986; Wu, T. 1990). Da angenommen wird, dass die cccDNA hartnäckig gegenüber einer reinen Nukleosid-Therapie ist und daher ein großes Hindernis für die Eradikation der HBV-Infektion darstellt, scheint eine vorherige ETV-Gabe für eine erfolgreiche Therapie unerlässlich. Daher scheint unter den gegebenen Umständen ETV das beste antivirale Agens bei Woodchucks zu sein.

Colonno et al. (2001) verabreichten in seiner Studie ETV über 14 bzw. 36 Monate. Die Medikamentengabe erfolgte nach einer achtwöchigen Startphase, in der ETV täglich verabreicht wurde, wöchentlich. Hierbei konnten zum einen die hervorragenden pharmakokinetischen Eigenschaften von ETV nachgewiesen werden. Zum anderen zeigten sie, dass es auf Grund seiner relativ langen zellulären Halbwertszeit ausreichend ist, ETV wöchentlich zu verabreichen. Es scheint allerdings empfehlenswert, zuerst eine Phase der täglichen Gabe vor einer Umstellung auf eine wöchentliche Gabe durchzuführen. Dies wurde auch im Versuch von Colonno et al. (2001) durchgeführt. So ist gewährleistet, dass es zu einer raschen und stabilen Anflutung des Medikamentes im Organismus kommt. In diesem Versuch wurden Perioden von 3 Monaten für die tägliche und wöchentliche Behandlung gewählt.

Ein Vorteil von ETV ist, dass bisher noch keinerlei Resistenzen aufgetreten sind. Bei der Langzeitstudie von Colonno et al. konnten auch nach dreijähriger Dauerbehandlung mit ETV, im Gegensatz zu 3TC, keine Resistenzen beobachtet werden. Damit kann abschließend gesagt werden, dass eine alleinige Langzeit-Therapie mit ETV die Lebensspanne verlängern kann und sich positiv auf das Auftreten von HCC auswirken kann. Damit ist gemeint, dass es weniger häufig zur Ausbildung von HCC kommt bzw. diese eine geringere Wachstumsgeschwindigkeit zeigen. Es kann mit der ETV-Behandlung aber nur die im Organismus zirkulierende Virusmenge konstant niedrig gehalten werden. Damit wird sozusagen eine Patt-Situation im Körper geschaffen. Das Virus liegt noch in geringen Mengen im Organismus vor, kann sich aber nicht weitervermehren. Im Gegensatz dazu ist das körpereigene Immunsystem aber auch nicht in der Lage das Virus zu eliminieren.

Dieses Manko soll mit Hilfe der sich nun anschließenden Vakzinierungen überwunden werden. Denn gerade diese effektive Suppression der cccDNA in der Leber wird verantwortlich gemacht für eine bestehende Virus-Suppression und damit für eine erfolgreiche Elimination des Virus aus dem Wirtsorganismus eine Grundlage schaffen (Ganem, 1996).

Es bleibt aber festzuhalten, dass in dieser Studie, wie auch schon in früheren Studien (z. B. Colonna et al.) der hohe antivirale Effekt von ETV nachgewiesen werden konnte. Da es gleichzeitig gute Aufnahmeeigenschaften aufweist, stellt es bei chronischen HBV-Infektionen das z. Z. beste verfügbare Nukleosidanalogen dar. Allerdings wird es auch in dieser Studie wieder deutlich, dass es alleine nicht ausreicht, eine HBV-Infektion zu überwinden. Daher müssen noch weitere Behandlungsschemata zusätzlich angewendet werden, um das Virus vollständig eliminieren zu können.

## 6.5 DNA-Vakzine

Die therapeutische Vakzine, als zweites Standbein der hier eingesetzten Kombinations-Therapie, hat das Ziel eine zelluläre Immunantwort eines Organismus zu induzieren und damit die Viruskontrolle durch den Wirt während einer chronischen Infektion zu steigern (Autran, 2004). Trotzdem ist es bisher noch nicht zu dem wirklich großen Durchbruch im Einsatz von therapeutischen Vakzinierungen gekommen (Dikici, 2003; Lindenburg, 2002; Nevens, 2003; von Herrath, 2000), da die theoretisch erwarteten Ergebnisse bisher nicht immer erreicht worden sind. Es wird postuliert, dass das geringe proliferative Potential der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und eine hohe Viruslast mit ursächlich zu sein scheinen für eine schlechte Antwort des Immunsystems auf therapeutische Vakzinierungen. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass therapeutische DNA-Vakzinierungen dann erfolgreicher sein können, wenn die Viruslast im infizierten Organismus niedrig ist (Wherry, 2005) und das proliferative Potential der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Gegensatz hoch. Diese Erkenntnis deckt sich auch gut mit dem bisherigen Kenntnisstand der T-Zell-Dysfunktion bei chronischen Infektionen (Wherry, 2004). Deshalb wird in diesem Versuch eine Vorbehandlung mit

ETV durchgeführt, um so die Viruslast der Tiere zu senken und um optimale Bedingungen für den Einsatz der therapeutischen Vakzinierung zu schaffen.

Ein weiteres generelles Problem beim Einsatz therapeutischer Vakzinierungen bei chronischen Virus-Infektionen ist die Dosis. Ein Mehr an Antigen – in Form der Vakzine – kann zum Einen helfen bzw. hat einen positiven stimulativen Effekt auf das Immunsystem, ein Zuviel kann zum Anderen aber zu T-Zell-Dysfunktionen und damit zu einem Erschöpfungszustand des Immunsystems (insbesondere der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und ihrer spezifischen Funktionen) führen (Wherry 2003). Daher ist die Dosis von großer Bedeutung für Erfolg oder Mißerfolg einer therapeutischen Vakzinierung. Zwar ist bisher noch nicht genau klar, welche Mechanismen für die Beurteilung der eingesetzten Antigenmenge verantwortlich sind, es scheint aber immer deutlicher zu werden, dass auch andere Komponenten des Immunsystems, und hier an erster Stelle die dendritischen Zellen, eine wichtige Funktion für diese Beurteilung haben. In dieser Studie wurden Mengen an Antigen eingesetzt, die auch schon in früheren Studien eingesetzt wurden (Lu, unveröffentlicht) und sich dort als wirksam erwiesen haben. Die Tiere vertragen die Vakzinierungen ohne große gesundheitliche Probleme. Gleiches gilt für die zuvor durchgeführte Injektion von Cardiotoxin. Dies wurde gemacht, um lokal im Muskel eine Entzündung zu setzen und so die Menge an aktivierten T-Lymphozyten zu erhöhen und so eine effektive Immunantwort zu erzielen. Dieses wurde aber nur vor der ersten Vakzinierung durchgeführt. Das gesamte Prozedere erfolgte in Anlehnung an frühere Arbeiten, bei denen sich dieses Vorgehen als sinnvoll erwiesen hat (Lu, unveröffentlicht). Auch konnten während des gesamten Versuches keinerlei negative Folgen an den Tieren selber festgestellt werden. Es wurden während des gesamten Versuchszeitraumes regelmäßig Blutproben gewonnen und untersucht. Dabei wurden keinerlei Auffälligkeiten, wie z. B. ein Absinken der Zahl der PBMC oder ein mangelndes Ansprechen auf Antigene im Proliferationstest, festgestellt. Daher scheint die eingesetzte Menge an Antigen nicht „Zuviel“ gewesen zu sein. Inwieweit bei der Menge des eingesetzten Antigens noch Spielraum nach oben bleibt, muss Gegenstand weiterer Studien sein. Des Weiteren müssen in nachfolgenden Studien und Arbeiten folgende Faktoren berücksichtigt und weiter untersucht werden, damit die Effektivität der therapeutischen Vakzinen noch weiter gesteigert werden kann (Wherry, 2005). Die zu berücksichtigenden Faktoren sind:

- Menge des eingesetzten Antigens
- Formulierung des Antigens bzw. Antigenpräsentation in der Vakzine
- Generell sollen die Entzündungssignale im Körper gesteigert werden, um damit eine effektivere Boosterung zu erreichen
- Generell ist die Rolle/Reifung sowie die mögliche Erschöpfung der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei chronischen Infektionen, und außerdem die Rolle von dendritischen Zellen kritisch zu beleuchten

## 6.6 Probleme Woodchuck-Modell: Winterschlaf, Applikation von Medikamenten, etc.

Die Gabe von ETV erfolgte bei den Tieren ohne nennenswerte Probleme. Bis auf zwei Tiere, die die ETV-Babybrei-Mischung nicht aufnahmen, gab es keine Probleme mit der Akzeptanz. ETV als Substanz besitzt nur eine geringe Löslichkeit. Da im Versuch darauf geachtet wird, dass ETV in nur eine geringe Menge Wasser eingebracht wird, um eine möglichst hohe Akzeptanz zu gewährleisten, ist immer mit Ausfällung des Feststoffes zu rechnen, dem mit besonderer Sorgfalt beim Pipettieren begegnet werden muss. Die Untermischung in den Babybrei erfolgt leicht und ohne Geschmacksbeeinträchtigungen desselben. In diesem Versuch wurden fünf verschiedene Sorten Babybrei (Fruchtsorten wie z. B. Alete Apfel-Pfirsich) verwendet. Besondere Präferenzen seitens der Tiere gibt es nicht.

Die Aufnahme und auch die Verträglichkeit des ETV erweisen sich im Versuch als gut. Bei keinem der Tiere gibt es Probleme seitens der Verdauung wie z. B. Durchfall oder andere Beeinträchtigungen. Bereits Colunno et al. zeigten 2001 in ihrer Langzeit-Studie mit ETV dessen gute Aufnahmeeigenschaften und die hohe antivirale Potenz von ETV.

Die Gesamtlänge der Medikation (6 Monate) wurde vor allem durch den Winterschlaf der Tiere begrenzt. Da es sich bei den im Versuch eingesetzten Tieren um Wildfänge handelt, weisen sie noch einen ausgeprägten Winterschlaf-Zyklus auf, d. h., die Tiere fangen in der Regel erst ab März wieder an zu fressen und legen dementsprechend wieder an Gewicht zulegen. Daher ist ein früherer Start als März/April für diese Art

und Aufbau des Versuches nicht möglich. Der Winterschlaf setzt ab etwa Oktober ein. Damit ist die gesamte Fütterungsperiode auf maximal 7 Monate begrenzt. Da es bisher auch noch keine echten Alternativen zur oralen ETV-Gabe gibt, kann ein längeres Fütterungsregime z. Z. nicht umgesetzt werden. Von täglichen bzw. wöchentlichen Injektionen des ETV ist abzuraten, da sonst die Gefahr von Spritzabszessen und anderen lokalen Reaktionen auf Injektionen steigt. Dies würde sich wiederum negativ auf den gesamten Versuchsaufbau und -ablauf auswirken. Subkutan gelagerte Pumpen, die z. B. osmotisch wirken, sind noch nicht so weit ausgereift bzw. für solch lange Versuchszeiträume nicht geeignet. Nachteile solcher Pumpen, die Kosten und der Faktor, dass die Pumpen nur einmal zu verwenden sind, also nicht „wieder-aufladbar“ sind. Des Weiteren spricht die geringe Löslichkeit des Feststoffes ETV gegen die Verwendung solcher osmotisch wirksamer Pumpen. Auch stellt sich die Frage nach der Akzeptanz durch die Tiere. Da die Pumpen chirurgisch mit dem Tier verbunden werden. In wie weit die Tiere so etwas tolerieren bleibt eine noch offene Frage. Mechanisch oder anders betriebene Pumpen sind für derartige Zwecke zur Zeit nicht erhältlich. Daher bleibt zum jetzigen Zeitpunkt nur die orale Gabe für die Verabreichung des ETV. Andere Möglichkeiten zur Umgehung des Winterschlafes liegen bei einer entsprechenden Vorbereitung und Training der Tiere. Wie oben bereits erwähnt, handelt es sich bei den Versuchstieren um Wildfänge. Im Gegensatz dazu ist bei selbst aufgezogenen Woodchucks der Winterschlaf nicht so deutlich bis z. T. nicht ausgeprägt. Auch könnte man die Tiere schon im frühen Aufzuchtalter an eine Flaschenfütterung gewöhnen, was die orale Aufnahme erleichtern könnte. Dies setzt aber einen immensen Arbeitsaufwand bereits im Vorfeld des Versuches voraus. Ebenso ist für diese Art von Studie immer eine Mindest-Anzahl von Tieren vonnöten, welche auch erst einmal bereitgestellt werden muss. Dieses nur aus eigener Nachzucht zu bewerkstelligen ist schwierig. Es ist am Institut für Virologie des Universitätsklinikums aus Platz- und Personalmangel leider nicht möglich, eine eigene Zuchtstation für Woodchucks zu betreiben. Daher muss für diese Versuchsanordnungen immer auf Wildfänge zurückgegriffen werden, was aber mit den oben bereits erwähnten Problemen des Winterschlafes einhergeht.

Die Tiere haben die Injektionen sowohl für die Narkosen als auch für die Impfungen gut vertragen. Spritzabszesse wurden nicht beobachtet.



Im Laufe des gesamten Versuchszeitraumes von 34 Wochen starben 7 von 19 Tieren, also 36,84 % der Tiere. Dies ist ein relativ hoher Prozentsatz an Ausfällen im Versuch. Man muss allerdings bedenken, dass alle Tiere mit WHV chronisch infiziert waren. Bei mehreren Tieren (u. a. WH 25702) wurden schon während der Leberbiopsie zu Beginn des Versuches makroskopisch sichtbare hepatozelluläre karzinomatöse Veränderungen festgestellt. Daher war bei diesen Tieren mit einer verkürzten Lebensdauer zu rechnen, da insbesondere die Narkosen und die Verstoffwechslung des ETV zu einer verstärkten Belastung der Leber führen. Aus diesen Gründen wurden diese Tiere, die bereits ein makroskopisch sichtbares HCC aufwiesen, den Kontrollgruppen eins bzw. zwei zugeordnet. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in der Versuchsreihe von Colonna et al. (2001), bei der vier von elf Tieren an einem HCC trotz ETV und auch nachweisbaren Effekten von ETV starben. Das legt den Schluss nahe, dass wenn es bereits zu Veränderungen im Wirtsgenom durch die virale DNA gekommen ist, und es sich dadurch schon HCC gebildet haben bzw. in Bildung begriffen sind. Durch die entsprechenden Veränderungen im Wirtsgenom werden die zellulären Proto-Onkogene aktiviert und dadurch scheint eine Therapie nicht mehr oder nur teilweise erfolgreich zu sein. Trotzdem konnte ein Erfolg durch eine Lebensverlängerung nachgewiesen werden. Verstorben sind diese Tiere trotzdem an einem HCC. Da es sich hier um Wildtiere als Grundlage für den Versuch handelt, kann eine Parasitose der Tiere ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Zwar werden alle Tiere bei ihrer Ankunft in den Stallungen des Institutes mit Antiparasitaria (Droncit ®, Ivomec ®) behandelt, aber bereits vorliegende Finnen o. ä. können damit nicht mehr abgetötet werden. Dies war bei mindestens einem Tier der Fall (WH 25703), welches im Versuchsverlauf an einer hochgradigen Parasitose aufgrund von Bandwurmfinnen verstarb. Dies sind Faktoren, bezogen auf die Sterblichkeit der Tiere, welchen nur im geringen Maße begegnet werden kann. Gänzlich auszuschließen sind sie nicht, und es muss immer mit ihnen gerechnet werden.

## 6.7 WHV-DNA und Antikörperbestimmung

Bei der Beurteilung und Diskussion über Erfolg oder nicht Nicht-Ansprechen der Kombinationstherapie ist zwischen der ETV-Behandlung auf der einen Seite und der therapeutischen Vakzinierung auf der anderen Seite unterscheiden. Des Weiteren müssen mögliche Wechselwirkungen in Bezug auf beide Therapie-Schemata untersucht werden. Diese Wechselwirkungen müssen in Abhängigkeit von der Verträglichkeit bei den Tieren und eines möglichen Erfolges, bezogen auf die Immunantwort, untersucht werden. Generelles Ziel dieser Kombinations-Therapie ist die Elimination des Virus bei den Tieren, um das Immunsystem der Tiere damit in die Lage zu versetzen, eine stabile Immunität gegen WHV aufzubauen und damit die chronische Infektion zu überwinden.

In der vorliegenden Doktorarbeit konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass es sich bei ETV um ein hochpotentes Nukleosidanalogen handelt. Bereits 1998 wurde von der Arbeitsgruppe Genovesi et al. (1998) gezeigt, dass ETV schon bei kleinen Mengen (20 µg/kg/Tag) eine hohe Wirksamkeit aufweist. Die im vorliegenden Versuch eingesetzte Menge liegt mit 0,5 mg/kg/Tag deutlich höher. Da Genovesi et al. 1998 aber ebenfalls zeigen konnten, dass es bei Dosen von 0,5 – 1 mg/kg/Tag auch zu einem deutlichen Abfall der cccDNA in der Leber kommt, wurde eine Dosis von 0,5 mg/kg/Tag gewählt. Es wird postuliert, dass ein Absinken bzw. die vollständige Elimination der cccDNA für eine totale Ausheilung einer chronischen HBV-Infektion nötig ist. Bei allen Tieren, der Gruppen B - D, kam es zu einem schnellen und deutlichen Absinken der Viruslast in nur wenigen Wochen. Im günstigsten Fall erfolgte der Abfall in nur 2 Wochen, die Regel waren 4 Wochen. Der Effekt des ETV hält solange an, wie das Medikament verabreicht wird, danach kommt es zu einem Wiederanstieg (Rebound) der WHV-DNA.

In dieser Versuchsreihe kam es bei den Tieren der Gruppe 2 (Entecavirgruppe) schon kurz nach der letzten Gabe des ETV zu einem erneuten Anstieg des Virustiters. Inwieweit dieser Anstieg nach Absetzen des Medikamentes durch eine längere Behandlungsdauer verzögert werden kann, bleibt zu untersuchen. In früheren Arbeiten (Colonna 2001) zeigte sich, dass eine längere Behandlungsdauer durchaus einen stabileren Langzeit-Effekt bezüglich der Virusfreiheit haben kann.

Völlige Virusfreiheit kann durch die alleinige Gabe des ETV aber nicht erreicht werden. Colonna et al. konnten jedoch zeigen, dass die Gabe von ETV nicht nur zu einem Abfall der Viruslast im Serum der Tiere führen, sondern auch zu einer erheblichen Reduktion der cccDNA in der Leber führen kann. Diese Eigenschaften konnten für 3TC und Adefovir als weitere Nukleosidanaloga aus der Hepatitis-Therapie nicht nachgewiesen werden (Dandri, 2000; Moralade, 1997).

Während des gesamten Versuches ist der Verlauf der Viruslast der einzelnen Tiere mittels verschiedener Methoden untersucht und verfolgt worden. Als Nachweismethoden sind ein WHV-DNA Spot Blot sowie die qualitative und quantitative PCR als Nachweismethoden durchgeführt worden. Hierbei ist deutlich geworden, dass die einzelnen Methoden eine unterschiedlich hohe Nachweisgrenze, bzgl. der möglichen nachweisbaren Virusmenge, aufweisen. So ist das Spot Blot-Verfahren das Verfahren mit der geringsten Sensitivität, wohingegen die quantitative PCR in der Lage ist, auch geringste DNA-Mengen ( $1 \times 10^1$  DNA-Kopien) nachzuweisen. Ist ein Tier im Spot Blot positiv getestet worden, so ist es aber auch immer in den anderen beiden Nachweismethoden positiv getestet worden. Die Entscheidung, wann welcher Test durchgeführt werden soll, hängt daher entscheidend von der Ausgangs-Fragestellung ab. Es kann durchaus sinnvoll sein, einen Spot Blot als Screening-Verfahren vorweg zu schalten und bei ungenauen Ergebnissen mittels PCR-Tests nachzutesten. Dies empfiehlt sich v.a. aus Kostengründen und weil für den Spot Blot deutlich weniger Serum (5 $\mu$ l) als Material benötigt wird, als für eine PCR (200 $\mu$ l).

Ähnliche Parameter sollten für die Durchführung der verschiedenen ELISAs berücksichtigt werden. Eine kontinuierliche Verlaufskontrolle des anti-WHc erscheint während des gesamten Versuches wenig sinnvoll, da keinerlei nennenswerte Änderungen zu erwarten sind. Denn laut Eingangskriterien müssen die Tiere chronisch mit WHV infiziert sein, was gleichbedeutend mit dem Vorliegen eines anti-WHc-Titers ist. Da sich dieser Titer auch mit Überwinden einer chronischen Infektion nicht verändern wird, haben wir hier auf Verlaufskontrollen verzichtet. Anders sieht es bei den anti-WHs- bzw. WHs-ELISAs aus. Schon Tyler et al. wiesen 1986 nach, dass die anti-WHs-Antikörper virusneutralisierende Eigenschaften aufweisen und somit bei Auftreten im Serum als Marker in Kombination mit dem Verschwinden von

WHV-DNA im Serum für eine etwaige Überwindung einer chronischen Infektion herangezogen werden können. Wie bei der Untersuchung der anti-WHs-Verläufe der vierten Gruppe ersichtlich wird, treten bei den Tieren, mit Ausnahme von WH 26596, keinerlei Änderungen bei dem anti-WHs-Titer auf. Bei dem Tier WH 26596 tritt bereits nach zwei Wochen eine deutliche Steigerung im Titer der WHs-Antikörper auf. Diese ist auch bis zum Ableben des Tieres wegen HCC bestehen geblieben. Bei diesem Tier handelt es sich um eines der beiden Tiere, welche bis einschließlich Woche 37 virusfrei getestet wurden. Es ist daher anzunehmen, dass die moderate Steigerung des Antikörper-Titers durchaus im Zusammenhang mit dem langen virusfreien Zeitraum steht. Dies würde ein Ansprechen der Tiere auf die Therapie bedeuten. Dann wäre allerdings zu klären, warum es nicht bei allen vakzinierten Tieren der Gruppe 3 und 4 zu einem anti-WHs-Titer mit gleichzeitigem stabilem Virusabfall kommt. Das bedeutet, dass hier noch weitere genauere Studien nötig sind. Inwieweit die MHC-Klassen der Tiere eine Rolle bei ihrem Ansprechen auf die Therapie von Bedeutung sind, muss noch in zukünftigen Studien geklärt werden.

## 6.8 Messung der T-Zell-Antwort

Im Vergleich zu anderen Tierarten und Testsystemen (Mäuse, Ratten, Mensch) ist der Proliferationstest mit Thymidin bei den Woodchucks nicht erfolgreich (Cote, 1995; Korba, 1988). Eine Ursache liegt darin, dass die Thymidinkinaseaktivität der PBMC der Woodchucks zu gering ist. Es kommt daher nicht zu einem genügenden Einbau des Thymidins in die DNA, und damit ist es nicht möglich, genaue Aussagen über eine mögliche Proliferation der PBMC zu treffen. Weitere Möglichkeiten sind die Verwendung eines BrdU- oder eines [ $H^3$ ]-Adenin-Proliferationstests. Beide Stoffe werden zu etwa 97 % in die DNA eingebaut (Menne, 1996; Kreuzfelder, 1996). Mittlerweile hat sich die Verwendung des Adenin-Testsystems etabliert, da gezeigt werden konnte, dass er für die Verwendung im Woodchuck-System besser geeignet ist (Menne, 1997; Kreuzfelder, 1996). Menne et al. konnten 1996 auch zeigen, dass bei dem gesamten Versuchsaufbau „Proliferationstest“ der Großteil der reagierenden Zellen auch wirklich T-Zellen sind. Dafür wurden die Zellen mittels Nylonwolle getrennt, was eine Unterscheidung in B- und T-Zellen möglich gemacht hat.

Menne et al. konnten 1998 zeigen, dass die Ergebnisse des Stimulationsindex (SI) gegenüber den Antigenen im T-Zell-Proliferationstest dann am höchsten sind, wenn sich die Tiere während einer akuten Infektion in der Phase der Serokonversion befinden. Außerdem stellten sie fest, dass eine Abnahme der T-Zell-Antwort mit der Beseitigung der viralen DNA einhergeht. Rund ein Jahr nach überstandener, akuter Infektion konnte keine Proliferation von T-Zellen gegen Antigene beobachtet werden. Allerdings kann die T-Zell-Antwort durch eine Re-Infektion mit dem Virus wieder hervorgerufen werden. Auch wies die Arbeitsgruppe um Menne (1996) nach, dass das Muster der Peptid-induzierten T-Zell-Antwort und ihre Ausprägung bei allen Tieren im Versuch variiert und somit individuell sind. Es gibt bestimmte Peptide, gegen die die Tiere vermehrt reagieren. Hier ist an erster Stelle das Peptid C 97 – 110 (entspricht im eigenen Versuch dem Peptid C 4).

Die Ergebnisse der Proliferationstests in dieser Studie sind etwas differenzierter zu betrachten. Zu Beginn des Versuches werden einige Vorkehrungen getroffen, was die Handhabung der Tests anbelangte, um mögliche Fehler während der Durchführung möglichst gering zu halten. Generell ist der Test immer von derselben Person durchgeführt worden. Des Weiteren sind alle benötigten Peptide, Mitogene, etc. zu Beginn in kleinen Aliquots abgefüllt und eingefroren worden. So ist sichergestellt, dass für jeden neu angesetzten Testtag ein neues Aliquot verwendet werden kann, um etwaige Störungen bzw. Schäden der eingesetzten Substanzen durch Wieder-Einfrieren und erneutes Auftauen zu minimieren. Außerdem sind die weiteren verwendeten Lösungen, wie AIM-V-Medium etc. maximal 7 Tage im Kühlschrank gelagert und verwendet worden.

Insgesamt sind die Ergebnisse, betrachtet man nur die Positivkontrollen, im Vergleich zu anderen Arbeiten (Menne, 1996) wenig zufriedenstellend. Da nur 49,43 % der Tests positiv reagiert haben, stellt sich die Frage, wie man der Test objektiv und vergleichbar ausgewertet werden kann. Da auch dann, wenn die Positivkontrolle versagt hat, Immunreaktionen gegenüber Peptiden auftreten. In eigenen Vorversuchen ist festgestellt worden, dass ConA als Mitogen deutlich besser reagiert, als z. B. PHA. Dies konnte auch von Menne et al. 1996 in Proliferationstests nachgewiesen werden. Es steht also zu erwarten, dass wenn ein anderes Mitogen, wie eben z. B. PHA, als Positivkontrolle eingesetzt worden wäre, die Ergebnisse

noch schlechter ausgefallen wären. Auch ist oftmals keine typische Farbveränderung des Mediums in der Positivkontrolle festgestellt worden. Ein solcher Farbumschlag kann schon einen makroskopischen Hinweis darauf liefern, dass die Zellen auf ConA reagiert haben und es dabei zu einem Verbrauch des Mediums durch die Zellen gekommen ist. Tritt dieses Phänomen auf, wäre eine mögliche Erklärung, dass die Zeitdauer des gesamten Tests zu lange gewählt worden ist, und es daher zu einem zu starkem Wachstum mit nachfolgender Proliferation und Absterben der Zellen gekommen ist. Das würde bedeuten, dass die Zellen aufgrund von Medium-Mangel zum Zeitpunkt der Auswertung schon abgestorben sind und daher nicht mehr in der Lage sind, Adenin einzubauen. Es ist aber wie oben bereits beschrieben nicht zu derartigen Farbveränderungen gekommen, was gegen die Annahme einer zu lang gewählten Testdauer spricht. Da außerdem die Testdauer aus anderen Arbeiten (Menne, 1996) entlehnt worden ist und es dort keinerlei überproportional großen Probleme mit einer Überexpression seitens der Zellen gegeben hat, kann bisher nicht genau festgestellt werden, warum die Positivkontrolle nicht regelmäßig und reproduzierbar reagiert.

Bisher konnten keine zufriedenstellenden Gründe für das Versagen der Positivkontrolle gefunden bzw. Thesen dafür aufgestellt werden. So wird der Test strikt nach den Vorgaben von Menne et al. durchgeführt. Die einzige Abweichung gegenüber dem ursprünglich eingeführten Proliferationstest ist die Verwendung von naivem Woodchuck-Serum an Stelle von foetalem Kälber-Serum als Zusatz zum AIM-V-Medium, sowie der Einsatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol als weiteren Zusatz. Der Zusatz von naivem Woodchuck-Serum an Stelle von FCS erweist sich in eigenen Vorversuchen (nicht veröffentlicht) als günstiger, da so etwaige unspezifische Reaktionen auf das FCS ausgeschlossen werden können. Daher konnten so deutlich höhere Werte bei den SI erreicht werden. Ähnliche Beobachtungen haben auch Menne et al. gemacht (nicht veröffentlicht). Grundsätzlich stellt es ein gewisses logistisches Problem dar, aber bei dieser Größe der Versuchsgruppen ist es noch ohne größeren Aufwand möglich, die erforderlichen Serummengen zu gewinnen. Wenn dies nicht durchführbar sein sollte, kann auch auf handelsübliches FCS zurückgegriffen werden. Hauptproblem bei der Verwendung von Woodchuck-Serum ist es aber, sicherzustellen, dass das verwendete Serum immer von gleicher Qualität und Quantität bzgl. der Inhaltsstoffe ist. Um diesen Parameter möglichst konstant zu

halten, wurde nur Serum von zwei Tieren verwendet. Das Serum wurde regelmäßig gewonnen und gepoolt, um individuelle Schwankungen möglichst auszuschließen. Außerdem wurde das Serum vor seinem Einsatz mindestens eine Woche bei -20°C eingefroren und nach dem Auftauen noch einmal auf mindestens 55°C für eine halbe Stunde erhitzt, um das Serum zu inaktivieren. Gerade bei Proliferationstests von Mäusen konnte die Höhe der Immunantwort so signifikant gesteigert werden, was sich wiederum positiv auf den gesamten Test und die Auswertung auswirkt.

Bezogen auf die Reaktion der PBMC auf die einzelnen Peptide gibt es abweichende Ergebnisse zu früheren von anderen Arbeitsgruppen durchgeführten Versuchsreihen (Menne et al., 1996). So zeigt diese Arbeitsgruppe, dass insbesondere akut infizierte Woodchucks auf folgende Peptide im Proliferationstest reagierten: WHc 1 – 20 (entspricht in diesem Versuch dem Peptid C 1), WHc 110 - 119 (C 5) und WHc 112 – 131 (C 6). Insbesondere das Peptid, welches die Aminosäuren WHc 97 - 110 (C 4) enthielt, erwies sich bei Menne et al. als hoch stimulatив. In der vorliegenden Arbeit wurden die Peptide in Anlehnung an diese Arbeit ausgewählt, wobei WHc 97 - 110 dem eingesetzten Peptid C4 entspricht. Die Arbeitsgruppe von Menne et al. (1996) konnte auch zeigen, dass eine Impfung mit dem vorgenannten Peptid WHc 97 - 110 sogar naive Tiere vor einer Infektion mit WHV schützt, was den antigenstimulatorischen Charakter dieses Peptids unterstreicht. Es wird erwähnt, dass es zu ähnlichen Ergebnissen im Proliferationstest der akut infizierten Tiere auch bei chronisch infizierten Tieren kommt. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Dort reagierten die chronisch infizierten Tiere nur in einem Fall auf das Peptid C 4 (AS 97 - 110), sonst vor allem auf Peptide des S-Antigens. Auch die Peptide wurden in Anlehnung an Menne et al. (1996) ausgewählt. So scheint es dennoch auffällig, dass die Tiere in erster Linie auf die Peptide des S-Antigens reagiert haben (S-Peptide: 82,44 %, C-Peptide 17,56 %). Es stellt sich die Frage inwieweit dies mit einem möglichen Auftreten von anti-WHs Antikörpern und damit einer Elimination des WHV korreliert. Generell gibt es aber kein spezielles Peptid, welches zur gleichen Zeit bei allen Tieren reagiert hat. Auffällig ist, dass die meisten Tiere im Verlaufe des gesamten Versuches verstärkt immunproliferativ reagieren. Dieses Phänomen ist allerdings Gruppen-unspezifisch, was u. a. damit erklärt werden kann, dass die Tiere sich dann nicht mehr im Winterschlaf befinden, sondern in ihrem „biologischen Sommer“. Somit steigt auch die Aktivität des gesamten

Organismus und damit auch des Immunsystems. Es scheint sich hierbei eher um eine unspezifische Steigerung denn eine Steigerung in Folge der Therapie zu handeln. Es gibt dennoch Unterschiede zwischen den Gruppen 2 und 3 und der Kontrollgruppe, allerdings fallen sie durch dieses Phänomen der unspezifischen Steigerung der Immunantwort nicht allzu deutlich aus.

Die optimal einzusetzende Konzentration der Peptide bei den Proliferationstests wurde bei Menne et al. (1996) in Verdünnungsreihen ermittelt und betrug 1 µg/ml. Dieses Ergebnis deckt sich mit den eigenen durchgeführten Vorversuchen zur Ermittlung der optimalen Konzentration. Höhere Konzentrationen scheinen daher nicht mit einer höheren Immunantwort zu korrelieren. Eher scheint es so zu sein, dass eine Erhöhung der eingesetzten Antigen-Menge zur Abtötung der PBMC im Proliferations-Test führt. Auch in der Humanmedizin sind derartige Beobachtungen bei Einsatz von Antigenen im Proliferationstest-System gemacht worden (Jung, 1995). Allerdings ist sowohl in der Humanmedizin, als auch bei den Woodchucks gezeigt worden, dass chronisch infizierte Patienten/Tiere eine generell schlechtere Proliferationsantwort in diesem Testsystem zeigen. Eine mögliche Ursache kann darin liegen, dass sowohl bei einer chronischen HBV- als auch bei einer chronischen WHV-Infektion die meisten aktivierten Lymphozyten in der Leber zu finden sind und nicht im peripheren Blut (Ferrari, 1986). Eine weitere mögliche Erklärung kann in einer Antigen-spezifischen Suppression mit Deregulation der Effektoren und damit in einer inadäquaten T-Zell-Antwort liegen (Bertoletti, 1994; Ferrari, 1987; Franco, 1995).

Aufgrund dieser gesamten Problematik stellt sich die Frage nach einer sachgerechten Auswertung dieser Proliferationstests. Man kann zwar je nach Anlegung gewisser Maßstäbe, wie z. B. SI von Core > 10, etc. Aussagen treffen, inwieweit diese Reaktion im Proliferationstest mit der Realität des Immunstatus der Tiere zusammenhängt, bleibt fraglich. Zudem ist das Problem, dass es z. Z. keine echte Alternative für den Einsatz des T-Zell-Proliferationstests zur Bestimmung der Immunreaktivität der peripheren Blut-Lymphozyten gibt. In diesem Test wird deutlich, dass es im zeitlichen Verlauf keinerlei signifikante Häufungen bezüglich eines oder mehrerer Peptide gibt. Genauso reagieren die Tiere nicht mehrere Male hintereinander auf dasselbe Peptid. Es zeigt sich in diesem Testsystem also, dass



die Tiere eine Immunantwort, die auch gesteigert sein kann, zeigen. Diese Immunantwort scheint aber nicht sehr stabil zu sein und weist auch keinerlei Parallelen mit dem Peptid-Muster bei akut infizierten Tieren auf. Trotzdem kann dieser Test in gemeinsamer Beurteilung mit den anderen Untersuchungen dazu beitragen, ein genaueres Bild über den Immunstatus der Tiere zu geben.

Zur Auswertung des T-Zell-Proliferationstestes werden folgende Parameter angelegt, um ein positives von einem negativen Ergebnis abgrenzen zu können (SI):

- Core-SI > 10
- S-Antigen-SI > 3
- Mindestens 3 Peptide müssen mit einem SI > 3 reagiert haben

## 6.9 Schlussfolgerung

Ziel der Therapie ist, die Viruslast langfristig auch ohne Gabe von ETV zu reduzieren und das Virusgenom zu eliminieren. Gerade im Zusammenhang mit dem WHV-DNA-Verlauf zeigt sich, dass die Tiere, welche sehr früh unter ETV virusfrei geworden sind erst deutlich später, nach Absetzen von ETV, wieder einen Anstieg der Viruslast aufweisen. Bei Zwei von sieben Tieren aus den Gruppen drei und vier waren sogar bis zu 37 bzw. 42 Wochen keine Virus-DNA nachweisbar. Es zeigt sich also, dass ein die Kombinationstherapie über den Zeitraum der ETV-Gabe hinaus, kein Virus nachweisbar ist. In dieser Zeit haben die Tiere vereinzelt auf einzelne Peptide im T-Zell-Proliferationstest reagiert. Allerdings bietet auch diese Therapie keinen Schutz vor dem Auftreten von HCC. Dies ist aber auch schon in früheren Arbeiten gezeigt worden (Colunno et al. 2001). Es gibt aber einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, die keine Vakzinierungen bekommen haben, und jenen, welche zusätzlich zum ETV nur vakziniert worden sind. Die Tiere mit der zusätzlichen Vakzinierung sind im Durchschnitt erst 4-6 Wochen später WHV-positiv getestet worden als die Tiere der Gruppe 2. Insgesamt zeigten drei Tiere eine länger andauernde Virämie in der ETV-Gruppe als in den Gruppen 3 und 4 mit zusätzlicher Vakzinierung. Dieses Ergebnis zeigt erneut die deutlichen Vorteile einer Kombinationstherapie im Gegensatz zur ETV-Gruppe Vakzinierungen alleine. Es ist sicherlich möglich den positiven Effekt dieser hier angewandten Kombinationstherapie durch eine längere ETV-Gabe und/oder häufigere Anzahl von Vakzinierungen zu steigern. In dieser Studie gab es keinerlei signifikanten Unterschiede in der Gruppen 3 und 4. Jeweils ein Tier, welches für mindestens 37 Wochen virusfrei geblieben ist, stammte aus je einer der beiden Gruppen. Daher ist es auf Grund der vorliegenden Daten nicht möglich, eine der beiden Vakzinen der anderen vorzuziehen. Es ist sicherlich sinnvoll, eine Vakzine, die möglichst verschiedene Komponenten enthält, mindestens aber Core- und S-Antigen, zu verwenden. Das muss aber Gegenstand weiterer Untersuchungen mit größeren Studien-Zahlen und einer größeren Bandbreite an Vakzinen sein. Problem in dieser Studie ist auch gewesen, dass mit drei von zehn Tieren relativ viele Tiere gestorben sind, was eine sichere Aussage über einen möglichen Unterschied zwischen den beiden verwendeten Vakzinen schwierig macht.

## 7. Zusammenfassung

Chronische HBV-Infektionen können Folgeschäden nach sich ziehen, z. B. eine Leberzirrhose oder primäre „hepatozelluläre“ Karzinome verursachen. Bisher wurden keine ausreichend wirksamen Monotherapien, z. B. mit Interferonen oder Nukleosidanaloga, gefunden, da Interferone Nebenwirkungen haben und Nukleosidanaloga bei Langzeit-Therapie Resistenzen entwickeln. Daher ist man auf die weitere Erforschung und Evaluierung von Kombinationstherapien angewiesen.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, eine Kombinationstherapie mit einem Nukleosidanalogon und einer therapeutischen Vakzine auf ihre Wirksamkeit zur Bekämpfung einer chronischen WHV-Infektion hin zu testen. Die grundsätzliche Fragestellung war, in wie weit diese Therapie helfen kann, eine chronische Infektion mit WHV zu beenden bzw. den besten Langzeiteffekt zur Reduktion der Virämie aufweist.

Dazu wurden 4 Versuchsgruppen getestet. Gruppe 1 war die unbehandelte Kontrollgruppe, Gruppe 2 erhielt als Monotherapie das Nukleosidanalogon Entecavir (ETV) für 3 Monate täglich, dann für 3 Monate einmal wöchentlich. Die Gruppen 3 und 4 erhielten ebenfalls ETV mit dem gleichen Schema wie die Gruppe 2. Zusätzlich wurden die Tiere der Gruppe 3 ab dem 4. Monat mit einer DNA-Vakzine und die Gruppe 4 mit einer DNA-Protein-Kombinationsvakzine geimpft.

In der Gruppe 2 konnte gezeigt werden, dass man durch die Gabe von ETV alleine eine deutliche Reduzierung der Viruslast erreichen kann. Allerdings hält diese Reduzierung nur für die Dauer der Gabe des Medikamentes an. Schon kurze Zeit nach Absetzen des ETV kam es zu einem erneuten Anstieg des Viruslast, der z. T. sogar noch höhere Werte als vor Beginn des Versuches annehmen konnte. Dies deckt sich auch mit früheren Arbeiten, in denen ein Effekt von ETV alleine für Dauer der Gabe gezeigt wurde. In den Gruppen 3 und 4 konnte z. T. eine dramatische Reduzierung der Viruslast, sogar unter die Nachweisgrenze, aufgezeigt werden. Der virämiesenkende Effekt der Kombinationstherapie durch die zusätzliche therapeutische Vakzinierung deutlich verlängert werden. Es gab sogar zwei Tiere,

bei denen auch nach 43 Wochen kein messbarer Anstieg der Viruslast festgestellt werden konnte.

Es konnte also gezeigt werden, dass der Einsatz von einer Kombinationstherapie aus dem Nukleosidanalogon ETV und einer therapeutischen DNA-Vakzine helfen kann, eine chronische Infektion zu beenden und eine stabile Immunität aufzubauen bzw. über den Zeitraum der Gabe von ETV hinaus eine deutliche Reduktion der Virämie zu erreichen.

Dies legt den Schluss nahe, dass der Einsatz dieser Kombinationstherapie auch bei Patienten eine neue Behandlungsmöglichkeit der chronischen HBV-Infektion bietet.

In Zukunft muss allerdings noch weiter untersucht werden, um die bestmögliche Kombination beider Behandlungsformen (ETV-Gabe, Vakzinierung) herauszufinden. Insbesondere die Länge der ETV-Gabe, Häufigkeit und Art der therapeutischen Vakzinierung (nur DNA- oder DNA-Protein-Kombinationstherapie), Menge des eingesetzten Antigens in der Vakzine, ist in nachfolgenden Arbeiten noch näher zu untersuchen.

## 8. Summary

Possible consequences of chronic HBV-infections are liver cirrhosis or primary hepatocellular carcinomas. Until now there are no effective mono therapies known. Mono therapies contain the application of interferon's or nucleoside analogas. The problems of interferons are unwelcome side effects and the developing of resistances during long time therapy of nucleoside analogues. Therefore the developing and evaluation of combination therapies is necessary.

Aim of this study has been the test for the effectiveness of combination therapy. The combination therapy consists of the application of nucleoside analogas and therapeutic vaccinations. The main formulation of question has been the investigation either this therapy is able to stop a chronic HBV infection or has a measurable long time effect for reduction of viremia.

The study contains of 4 groups of experiments. Group 1 is the control group, group receive only ETV as a mono therapy during 3 months daily and another 3 months weekly. Groups 3 and 4 receive also ETV within the same scheme like group 2. Additionally the animals receive either a DNA-vaccine or DNA-protein-combination-vaccine since the 4<sup>th</sup> month of therapy.

The results of group 2 show a clear reduction of virus titers. But the effect of the reduction last as long as the application of ETV lasts. Shortly after dismission of ETV the virus titers decrease again. Other early papers also show this course. In contrast to these results the groups 3 and 4 show significant reduction of virus titers below detection level. Combination therapy prolongs the effect of decreasing vermeil clearly. There have been already two animals showing now longer virus titers in blood for 43 weeks altogether.

This study confirms the positive results of combination therapy, containing therapeutic vaccination and intake of ETV. The combination of these two therapies helps stopping chronic HBV infections and building up firmable immunity already over and above the ETV intake.

So there are new possible strategies and approaches for using the combination strategy in human patients within chronic HBV infection.

Further investigations are necessary for finding out the possible combination of both axle of the therapy (including ETV-dose, vaccination). Especially the duration of ETV intake, frequency and kind of therapeutic vaccination, quantity of used antigen has to be content of further studies.

## 9. Danksagung

Ich danke meinen beiden Doktorvätern Herr Prof. Dr. Roggendorf in Essen und Herrn Prof. Dr. Thiel in Gießen für die Möglichkeit der Durchführung einer externen Doktorarbeit. Ich danke Herrn Prof. Dr. Roggendorf für die Mühe und die vielen Gespräche über meine Doktorarbeit und immer wieder neuen Denkanstösse, die er mir gegeben hat.

Ich danke den MTA's und den Tierpflegern des Institutes für Virologie in Essen für Ihre fachliche Unterstützung bei der Durchführung der Tests sowie beim Handling der Tiere.

Ich danke meiner Familie für die unermüdliche Unterstützung während der Erstellung der Doktorarbeit, dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben und mich immer wieder angespornt haben, weiter zu machen.

## 10. Anhang

### 10.1 Erklärung zur „Guten wissenschaftlichen Praxis“

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



## 10.2 Abkürzungsverzeichnis

3TC	Lamivudin
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
anti-HBc	Antikörper gegen HBcAg
anti-HBe	Antikörper gegen HBeAg
anti-HBs	Antikörper gegen HBsAg
anti-WHc	Antikörper gegen WHcAg
anti-WHe	Antikörper gegen WHeAg
anti-WHs	Antikörper gegen WHsAg
APC	„antigen presenting cell“ = Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Blutentnahme
bp	“base pairs” = Basenpaare
Bq	Becquerel
bzgl.	Bezüglich
C	Cytosin
cccDNA	circular closed DNA
Con A	Concanavalin A
cpm	“counts per minute” = Zerfälle pro Minute
CTL	“cytotoxic T lymphocyte” = zytotoxischer T-Lymphozyt, CD8 <sup>+</sup> -T-Zelle
CTP	Cytidintriphosphat
d	Tag(e)
DC	dendritic cells (Dendritische Zellen)
d. h.	dass heißt
DHBV	Duck Hepatitis B Virus
DNA	„deoxyribonucleic acid“ = Desoxyribonukleinsäure, DNS
E. coli	Escherichia coli
ELISA	„enzyme linked immuno sorbent assay“
eR	endoplasmatisches Retikulum
ETV	Entecavir
g	gramm
G	Guanin
GOT	Glutamatoxalacetattransaminase (heute: Aspartataminotransferase, ASAT)
GPT	Glutamatpyruvattransaminase (heute: Alaninaminotransferase, ALT)
GSHV	Ground Squirrel Hepatitis Virus
GTP	Guanosintriphosphat

h	Stunde(n)
HAV	Hepatitis A
HB	Hepatitis B
HBV	Hepatitis B Virus
HBcAg	„hepatitis B core antigen“ = Core-/Kern-/Nukleocapsidprotein des HBV
HBeAg	„hepatitis B e antigen“ = e-Antigen des HBV
HbsAg	„hepatitis B surface antigen“ = Oberflächen-/Hüllantigen des HBV
HCC	„hepatocellular carcinoma“ = Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HLA	„human leucocyte antigen“ = menschliches Leukozyten-Antigen
HWZ	Halbwertszeit
ID	Infektiöse Dosis
IL	Interleukin
i. m.	intramuskulär
INF	Interferon
i. v.	intravenös
Kap.	Kapitel
kb	„kilo base pairs“ = Kilobasenpaare
kd	Kilodalton
l	Liter
LCMV	Lympho-Chorio-Meningitis Virus; Virus, tritt bei Mäusen auf
m	milli-, $10^{-3}$
M	Molar
$\mu$	mikro-, $10^{-6}$
MCS	„multiple cloning site“ = Multiple Klonierungsstelle
MHC	„major histocompatibility complex“ = Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex
min	Minute(n)
mRNA	„messenger RNA“ = Boten-RNA
NK-cells	Natural Killer-cells (natürliche Killer-Zellen)
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“ = offener Leserahmen
PBL	„peripheral blood lymphocyte“ = Peripherer Blutlymphozyt
PBMC	„peripheral blood mononuclear cell“ = Periphere mononukleäre Blutzelle
PBS	phosphate buffered saline = phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“ = Polymerase-Ketten-Reaktion
pers.	persönlich
PRR	pattern-recognition receptor (Gewebe-Erkennungs-Rezeptor)
reR	raues endoplasmatisches Retikulum
RNA	„ribonucleic acid“ = Ribonukleinsäure, RNS

RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s.	siehe
s. c.	subkutan
sec	Sekunde(n)
SDH	Sorbitoldehydrogenase
SI	Stimulationsindex
sog.	so genannt
s. u.	siehe unten
T	Thymin
Tab.	Tabelle
tgl.	täglich
Th	„T helper lymphocyte“ = T-Helfer-Lymphozyt, CD4 <sup>+</sup> -Zelle
TL	Teelöffel
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
usw.	und so weiter
v. a.	vor allem
WHcAg	„woodchuck hepatitis core antigen“ = Core-/Kern-/Nukleocapsidprotein des WHV
WHeAg	„woodchuck hepatitis e antigen“ = e-Antigen des WHV
WHO	„World Health Organization“ = Weltgesundheitsorganisation
WHsAg	„woodchuck hepatitis surface antigen“ = Hüll-/Oberflächenprotein des WHV
WHV	Woodchuck Hepatitis Virus
wtl.	Wöchentlich
z. B.	zum Beispiel
z. Z.	zurzeit

### 10.3 Literaturverzeichnis

1. Abbas A. K., Lichtmann A. H., et al. (1994). "Cellular and molecular immunology." (2nd ed.), W. B. Saunders Co., Philadelphia
2. Altfeld M. and S. Rosenberg (2000). "The role of CD4(+) T helper cells in cytotoxic T lymphocyte response to HIV-1." *Curr Opin Immunol* 12: 375-380
3. Ashkar S., Weber G. F., et al. (2000). "Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity." *Science* 287: 860-864
4. Autran B., Carcelain G., et al. (2004). "Therapeutic vaccines for chronic infections." *Science* 305(5681): 205-8
5. Balsano C., Billet O., et al. (1993). "The hepatitis B virus X gene product transactivates the HIV-LTR in vivo." *Arch Virol Suppl* 8: 63-71
6. Balsano C., Billet O., et al. (1994). "Hepatitis B virus X gene product acts as a transactivator in vivo." *J Hepatol* 21(1): 103-9
7. Bancroft W. H., Mundon F. K., et al. (1972). "Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen." *J Immunol* 109(4): 842-8
8. Bancroft W. H., Snitbhan R., et al. (1979). "Transmission of Hepatitis B Virus to gibbons by exposure to human salival containing hepatitis B surface antigen." *J Inf Dis* 79: 135
9. Barker L. F., Chiari F. V., et al. (1973). "Transmission of type B viral hepatitis to chimpanzees." *J Infect Dis* 127(6): 648-62
10. Bavand M. and Laub O. (1987). "Multiple reverse transcriptase activities in hepatitis B virus like particles." *J Virol* 62: 626-628
11. Bavand M., Feitelson M., et al. (1989). "The hepatitis B virus-associated reverse transcriptase is encoded by the viral pol gene." *J Virol* 63(2): 1019-21
12. Bertoletti A., Sette A., et al. (1994). "Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells." *Nature* 369(6479): 407-10
13. Birnbaum F. and Nassal M. (1990). "Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein." *J Virol* 64(7): 3319-30
14. Bisacchi G. S., Chao S. T., et al. (1997). "BMS-200475, a novel carbocyclic 2'-deoxyguanosine analog with potent and selective anti-hepatitis B virus activity in vitro." *Bioorg. Med Chem Lett* 7: 127-132
15. Blattman J. N., Grayson J. M., et al. (2003). "Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo." *Nat Med* 9(5): 540-7

16. Blum H. E., Haase A. T., et al. (1984). "Asymmetric replication of hepatitis B virus DNA in human liver: demonstration of cytoplasmic minus-strand DNA by blot analyses and in situ hybridization." *Virology* 139(1): 87-96
17. Blum H. E., Zhang Z. S., et al. (1992). "Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro." *J Virol* 66(2): 1223-7
18. Blumberg B. S., Alter H. J., et al. (1965). "A "New" Antigen in Leukemia Sera." *Jama* 191: 541-6
19. Böjum A. (1986). "Isolation of mononuclear cells and granulocytes in human blood. *Scand Clin Invest* 97: 77-89
20. Borland G., Ross J. A., et al. (1998). "Forms and functions of CD44." *Immunology* 93: 139-148
21. Budkowska A., Petit M. A., et al. (1984). "Isolation and characterization of liver-derived hepatitis B e antigen." *J Med Virol* 13(3): 269-79
22. Buendia M. A. (1994). "Hepatitis B Viruses and liver cancer: The Woodchuck model." In: *Viruses and Cancer*; A. Mason, J. Neu, M. McCrea (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, 183-187
23. Cattaneo R., Will H., et al. (1984). "Hepatitis B virus transcription in the infected liver." *Embo J* 3(9): 2191-6
24. Cattaneo R., Will H., et al. (1987). "Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription." *Nature* 305:336-338
25. Cerny A., Ferrari C., et al. (1994). "The class I-restricted cytotoxic T lymphocyte response to predetermined epitopes in the hepatitis B and C viruses." In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol. 189, M. B. A. Oldstone (ed.), Springer-Verlag, Berlin, 169-183
26. Chang M. H. (2007). "Hepatitis B virus infection." *Semin Fetal Neonatal Med* 12(3): 160-7
27. Chen H. S., Kaneko S., et al. (1993). "The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks." *J Virol* 67(3): 1218-26
28. Chisari F. V., Ferrari C., et al. (1989). "Hepatitis B virus structure and biology. *Microbiol. Pathogen.* 6:311-325
29. Chisari F. V. and Ferrari C. (1994). "Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis." In: *Viral Pathogenesis*, N. Nathenson (ed.), Raven Press Ltd., New York, 102-145
30. Chisari F. V. and Ferrari C. (1995). "Hepatitis B virus immunopathogenesis." *Annu Rev Immunol* 13: 29-60

31. Chomel B., Trepo C., et al. (1984). "Spontaneous and experimental infection of alpine marmots (*Marmota marmota*) by the North American woodchuck hepatitis virus (*Marmota monax*)." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 7(3-4): 179-94
32. Cohen B. J. and Richmond J. E. (1982). "Electron microscopy of hepatitis B core antigen synthesized in *E. coli*." *Nature* 296(5858): 677-9
33. Colonno R. J., Genovesi E. V., et al. (2001). "Long-term entecavir treatment results in sustained antiviral efficacy and prolonged life span in the woodchuck model of chronic hepatitis infection." *J Infect Dis* 184(10): 1236-45
34. Cote P. J., Shapiro M., et al. (1986). "Protection of chimpanzees from type B hepatitis by immunization with woodchuck hepatitis virus surface antigen." *J Virol* 60(3): 895-901
35. Cote P. J. and Gerin J. L. (1995). "In vitro activation of woodchuck lymphocytes measured by radiopurine incorporation and interleukin-2 production: implications for modeling immunity and therapy in hepatitis B virus infection." *Hepatology* 22(3): 687-99
36. Couillin I., Pol S., et al. (1999). "Specific vaccine therapy in chronic hepatitis B: induction of T cell proliferative responses specific for envelope antigens." *J Infect Dis* 180(1): 15-26
37. Couroucé A. M., Holland P. V., et al. (1976). "HBsAg subtypes." In: *Proceedings of the International Workshop on HBs antigen subtypes*, *Bibl. Haematol* 42: 1-56
38. Crowther R. A., Kiselev N. A., et al. (1994). "Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy." *Cell* 77(6): 943-50
39. Dandri M., Burda M. R., et al. (2000). "Increased hepatocyte turnover and inhibition of woodchuck hepatitis B virus replication by adefovir in vitro do not lead to reduction of the closed circular DNA." *Hepatology* 32(1): 139-46
40. Dane D. S., Cameron C. H., et al. (1970). "Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis." *Lancet* 1(7649): 695-8
41. Davison F., Alexander G. J., et al. (1987). "Leucocyte hepatitis B virus DNA in acute and chronic hepatitis B virus infection." *J Med Virol* 22(4): 379-85
42. Dikici B., Kalayci A. G., et al. (2003). "Therapeutic vaccination in the immunotolerant phase of children with chronic hepatitis B infection." *Pediatr Infect Dis J* 22(4): 345-9
43. Edwards B. H., Bansal A., et al. (2002). "Magnitude of functional CD8+ T-cell responses to the *gag* protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates inversely with viral load in plasma." *J Virol* 76: 22989-2305

44. Enders G. H., Ganem D., et al. (1985). "Mapping the major transcripts of ground squirrel hepatitis virus: the presumptive template for reverse transcriptase is terminally redundant." *Cell* 42(1): 297-308
45. Erickson A. L., Kimura S., et al. (2001). "The outcome of hepatitis C Virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes." *Immunity* 15: 883-895
46. Etiemble J., Möröy T., et al. (1986). "Nucleotide sequence of the woodchuck hepatitis virus surface antigen mRNAs and the variability of three overlapping viral genes." *Gene* 50(1-3): 207-14
47. Feitelson M. A., Millman I., et al. (1988). "Presence of antibodies to the polymerase gene product(s) of hepatitis B and woodchuck hepatitis virus in natural and experimental infections." *J Med Virol* 24(2): 121-36
48. Ferrari C., A. Penna A., et al. (1986). "Selective sensitization of peripheral blood T lymphocytes to hepatitis B core antigen in patients with chronic active hepatitis type B." *Clin Exp Immunol* 66(3): 497-506
49. Ferrari C., Penna A., et al. (1987). "Intrahepatic, nucleocapsid antigen-specific T cells in chronic active hepatitis B." *J Immunol* 139(6): 2050-8
50. Ferrari C., Penna A., et al. (1990). "Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection." *J Immunol* 145(10): 3442-9
51. Ferrari C., Bertoletti A., et al. (1991). "Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapsid antigen." *J Clin Invest* 88(1): 214-22
52. Fields B. N., Knipe D. M., et al. (1990). "Virology (2<sup>nd</sup> ed.), Raven Press Ltd., New York
53. Fourel I., Saputelli J., et al. (1994). "The carbocyclic analog of 2'-deoxyguanosine induces a prolonged inhibition of duck hepatitis B virus DNA synthesis in primary hepatocyte cultures and in the liver." *J Virol* (68): 1059-1065
54. Fowler M. J., Monjardino J., et al. (1984). "The mechanism of replication of hepatitis B virus: evidence of asymmetric replication of the two DNA strands." *J Med Virol* 13(1): 83-91
55. Franco A., Ferrari C., et al. (1995). "Viral mutations, TCR antagonism and escape from the immune response." *Curr Opin Immunol* 7(4): 524-31
56. Frommel D., Crevat D., et al. (1984). "Immunopathologic aspects of woodchuck hepatitis." *Am J Pathol* 115(1): 125-34
57. Fuchs K., Heberger C., et al. (1989). "Characterization of woodchuck hepatitis virus DNA and RNA in the hepatocellular carcinomas of woodchucks." *Hepatology* 10(2): 215-20

58. Fuchs K. (1990). "Untersuchung zur Integration und Transkription von WHV-DNA und zur Expression und Immunfunktion des Core-Gens in primären Leberkarzinomen. Diss. Universität München
59. Galibert F., Chen T. N., et al. (1982). "Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: comparison with the hepatitis B virus sequence." *J Virol* 41(1): 51-65
60. Gallina A., Bonelli F., et al. (1989). "A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids." *J Virol* 63(11): 4645-52
61. Ganem D. and Varmus H. E. (1987). "The molecular biology of the hepatitis B viruses." *Annu Rev Biochem* 56: 651-93
62. Ganem D. (1996). "Hepadnaviridae and their replication." Fields, B. N., Knipe, D. N., Howley, P. N., eds. *Virology* 2d ed., Philadelphia: Lippincott-Raven: 2703-39
63. Genovesi E. V., Lamb L., et al. (1998). "Efficacy of the carbocyclic 2'-deoxyguanosine nucleoside BMS-200475 in the woodchuck model of hepatitis B virus infection." *Antimicrob Agents Chemother* 42(12): 3209-17
64. Gerin D. (1990). "Of marmots and men." *Nature* 347:230-232
65. Gerin J. L., Tennant B. C., et al. (1986). "Woodchuck model of hepadnavirus infection and disease: Vaccine studies." In: *Vaccines* 86, F. Brown, R. M. Chanock, R. A. Lerner (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 383-386
66. Gerin J. L., Cote P. J., et al. (1991). "Hepatitis B virus and liver cancer: the woodchuck as an experimental model of hepadnavirus-induced liver cancer." In: *Viral Hepatitis and Liver Disease*, F. B. Hollinger, S. M. Lemon, H. Margolis (eds.), The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 556-559
67. Gerlich W. H., Bruss V., et al. (1987). "Presurface and precore products of human hepatitis B virus." In: *Hepadna Viruses*, Vol. 70, W. Robinson, K. Koike, H. Will (eds.) Alan R Liss Inc., New York, 52-78
68. Germain R. N. (1994). "MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation." *Cell* 76(2): 287-99
69. Girones R., Cote P. J., et al. (1989). "Complete nucleotide sequence of a molecular clone of woodchuck hepatitis virus that is infectious in the natural host." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(6): 1846-9
70. Goulder P. J., Tango Y., et al. (2000). "Functionally inert HIV-specific cytotoxic T lymphocytes do not play a major role in chronically infected adults and children." *J Exp Med* 192: 1819-1832



71. Grizell R. A. (1955). "A study of the southern woodchuck, *Marmota monax monax*." *The American Midland Naturalist* 53:257-293
72. Guidotti LG., Rochford R., et al. (1999). "Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection." *Science* (284): 825-829
73. Gust I. D., Burrell C. J., et al. (1986). "Taxonomic classification of human hepatitis B virus." *Intervirology* 25(1): 14-29
74. Hatton T., Zhou S., et al. (1992). "RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication." *J Virol* 66(9): 5232-41
75. Heermann, K. H., Goldmann U., et al. (1984). "Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence." *J Virol* 52(2): 396-402
76. Hervas-Stubbs S., Lasarte J. J., et al. (1997). "Therapeutic vaccination of woodchucks against chronic woodchuck hepatitis virus infection." *J Hepatol* 27(4): 726-37
77. Hervas-Stubbs S., Lasarte J. J., et al. (2001). "T-helper cell response to woodchuck hepatitis virus antigens after therapeutic vaccination of chronically-infected animals treated with lamivudine." *J Hepatol* 35(1): 105-11
78. Höhne M., Schaefer S., et al. (1990). "Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA." *Embo J* 9(4): 1137-45
79. Hollinger F. B. (1996). "Hepatitis B Virus." In: *Virology*, B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howler (eds.), Raven Publishes, Philadelphia, 2739-2790
80. Horiike N., Fazle Akbar S. M., et al. (2005). "In vivo immunization by vaccine therapy following virus suppression by lamivudine: a novel approach for treating patients with chronic hepatitis B." *J Clin Virol* 32: 156-161
81. Howard C. R. (1986). "The biology of hepadnaviruses." *J Gen Virol* 67 ( Pt 7): 1215-35
82. Hull R. and Covey S. N. (1986). "Genome organization and expression of reverse transcribing elements: variations and a theme." *J Gen Virol* 67 ( Pt 9): 1751-8
83. Innaimo S. F., Seifer M., et al. (1997). "Identification of BMS-200475 as a potent and selective inhibitor of hepatitis B virus." *Antimicrob Chemother* 41: 1444-1448
84. Jung M. C., Stemler M., et al. (1990). "Immune response of peripheral blood mononuclear cells to HBx antigen of Hepatitis B virus." *Hepatol.* 13: 637-643
85. Jung, M. C., U. Spengler, et al. (1991). "Hepatitis B virus antigen-specific T-cell activation in patients with acute and chronic hepatitis B." *J Hepatol* 13(3): 310-7

86. Jung M. C., Diepolder H. M., et al. (1995). "Activation of a heterogeneous hepatitis B (HB) core and e antigen-specific CD4+ T-cell population during seroconversion to anti-HBe and anti-HBs in hepatitis B virus infection." *J Virol* 69(6): 3358-68
87. Kai M. (1988). "Woodchuck Hepatitis Virus infection in some colonies of Chinese marmots." In: *Viral Hepatitis and Liver Disease*, A. J. Zuckerman (ed.), Alan R. Liss Inc., New York, 456-461
88. Kawamoto S., Yamamoto S., et al. (1990). "Translation of hepatitis B virus DNA polymerase from the internal AUG codon, not from the upstream AUG codon for the core protein." *Biochem Biophys Res Commun* 171(3): 1130-6
89. Klocke G. (1991). *Nachweis des e-Antigens in akuter und chronischer Infektion mit Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)*. Diss. Universität München
90. Kodama K., Ogasawara N., et al. (1985). "Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: evolutionary relationship between hepadnaviruses." *J Virol* 56(3): 978-86
91. Koike K., Moriya K., et al. (1994). "High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice." *Hepatology* 19(4): 810-9
92. Korb, B. E., Wells F., et al. (1986). "Hepadnavirus infection of peripheral blood lymphocytes in vivo: woodchuck and chimpanzee models of viral hepatitis." *J Virol* 58(1): 1-8
93. Korba B. E., Wells F., et al. (1987). "Lymphoid cells in the spleens of woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks are a site of active viral replication." *J Virol* 61(5): 1318-24
94. Korba B. E., Cote P. J., et al. (1988). "Mitogen-induced replication of woodchuck hepatitis virus in cultured peripheral blood lymphocytes." *Science* 241(4870): 1213-6
95. Korba B. E., Cote, et al P. J. (2004). "Clevudine therapy with vaccine inhibits progression of chronic hepatitis and delays onset of hepatocellular carcinoma in chronic woodchuck hepatitis virus infection." *Antivir Ther* 9(6): 937-52
96. Kreuzfelder E., Menne S., et al. (1996). "Assessment of peripheral blood mononuclear cell proliferation by [2-3H]adenine uptake in the woodchuck model." *Clin Immunol Immunopathol* 78(3): 223-7
97. Landolfo S., Gribaudo G., et al. (1995). "Mechanisms of viral inhibition by interferons." *Pharmacol Ther* 65(3): 415-42
98. Lanford R. E., Chavez D., et al. (1998). "Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(10): 5757-61

99. Laub O., Rall L. B., et al. (1983). "Synthesis of hepatitis B surface antigen in mammalian cells: expression of the entire gene and the coding region." *J Virol* 48(1): 271-80
100. Lee P. P., Yee C., et al. (1999). "Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients." *Nat Med* 5: 677-685
101. Lindberg J., Pichoud C., et al. (1985). "Woodchuck hepatitis virus infection: serologic and histopathologic course and outcome." *Eur J Clin Microbiol* 4(1): 59-61
102. Lindenburg C. E., Stolte I., et al. (2002). "Long-term follow-up: no effect of therapeutic vaccination with HIV-1 p17/p24: Ty virus-like particles on HIV-1 disease progression." *Vaccine* 20(17-18): 2343-7
103. Liu H., Andreansky S., et al. (2002). "Reduced functional capacity of CD8+ T cells expanded by post-exposure vaccination of gamma-herpesvirus-infected CD4-deficient mice." *J Immunol* 168: 3477-3483
104. Locarnini S. A., Civitico G. M., et al. (1996). "Hepatitis B: new approaches for antiviral chemotherapy." *Antivir Chem Chemother* 7: 53-64
105. Löhr H. F., Weber W., et al. (1995). "Proliferative response of CD4+ T cells and hepatitis B virus clearance in chronic hepatitis with or without hepatitis B e-minus hepatitis B virus mutants." *Hepatology* 22(1): 61-8
106. Lu M., Hilken G., et al. (1999). "Immunization of woodchucks with plasmids expressing woodchuck hepatitis virus (WHV) core antigen and surface antigen suppresses WHV infection." *J Virol* 73(1): 281-9
107. Lu M. and Roggendorf M. (2001). "Evaluation of new approaches to prophylactic and therapeutic vaccinations against hepatitis B viruses in the woodchuck model." *Intervirology* 44(2-3): 124-31
108. Lu M., Klaes R., et al. (2003). "Induction of antibodies to the PreS region of surface antigens of woodchuck hepatitis virus (WHV) in chronic carrier woodchucks by immunizations with WHV surface antigens." *J Hepatology* 39(3): 405-13
109. Malmgaard L. (2004). "Induction and regulation of IFNs during viral infections." *J Interferon Cytokine Res* 24(8): 439-54
110. Mandart E., Kay A., et al. (1984). "Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genome: comparison with woodchuck and human hepatitis B virus sequences." *J Virol* 49(3): 782-92
111. Marion P. L., Oshiro L. S., et al. (1980). "A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(5): 2941-5

112. Marshall D. R., Turner S. J., et al. (2001). "Measuring the diaspora for virus-specific CD8+ T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6313-6318
113. Maruyama T., Iino S., et al. (1993). "Serology of acute exacerbation in chronic hepatitis B virus infection." *Gastroenterology* 105(4): 1141-51
114. Maruyama T., McLachlan A., et al. (1993). "The serology of chronic hepatitis B infection revisited." *J Clin Invest* 91(6): 2586-95
115. Mason W. S., Seal G., et al. (1980). "An HBV-like virus of domestic ducks." In: *Proceedings of the 1980 Symposium on viral Hepatitis*, H. Alter (ed.), The Franklin Institute Press, Philadelphia 1980:107-16
116. Mason W. S., Taylor J. M., et al. (1987). "Retroviral genome replication." In: *Advances in Virus Research*, K. Maramorosch, F. Murphy, A. J. Shatkin (eds.), Academic Press, Orlando, 35-96
117. Masopust D., Vezys V., et al. (2001). "Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue." *Science* 291: 2413-2417
118. Matloubian M., Concepcion R. J., et al. (1994). "CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection." *J Virol* 68: 8056-8063
119. Menne S. (1996). "Zelluläre Immunantwort gegen Strukturproteine des Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) in Woodchucks während der akuten und chronischen Infektion. Diss. Universität Essen
120. Menne S., Maschke J., et al. (1997). "Determination of peripheral blood mononuclear cell responses to mitogens and woodchuck hepatitis virus core antigen in woodchucks by 5-bromo-2'-deoxyuridine or 2[3H]adenine incorporation." *Arch Virol* 142(3): 511-21
121. Menne S., Maschke J., et al. (1997). "Characterization of T-cell response to woodchuck hepatitis virus core protein and protection of woodchucks from infection by immunization with peptides containing a T-cell epitope." *J Virol* 71(1): 65-74.
122. Menne S, Maschke J., et al. (1998). "T-cell response to Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) antigens during acute self-limited WHV infection and convalescence and after viral challenge." *J Virol* 72 (7):60683-91
123. Menne S, Roneker, CA, et al. (2002). "Immunogenic effects of woodchuck hepatitis virus surface antigen vaccine in combination with antiviral therapy: breaking of humoral and cellular immune tolerance in chronic woodchuck hepatitis virus infection." *Intervirology* 45(4-6): 237-50
124. Menzo S., Clementi M., et al. (1993). "Trans-activation of epidermal growth factor receptor gene by the hepatitis B virus X-gene product." *Virology* 196(2): 878-82

125. Milich D. R. and McLachlan A. (1986). "The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen." *Science* 234(4782): 1398-401
126. Milich D. R., McLachlan A., et al. (1987). "Antibody production to the nucleocapsid and envelope of the hepatitis B virus primed by a single synthetic T cell site." *Nature* 329(6139): 547-9
127. Milich D. R., Hughes J. L., et al. (1988). "Hepatitis B synthetic immunogen comprised of nucleocapsid T-cell sites and an envelope B-cell epitope." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(5): 1610-4
128. Miller R. H. (1987). "Proteolytic self-cleavage of hepatitis B virus core protein may generate serum e antigen." *Science* 236(4802): 722-5
129. Mille, R. H., Kaneko S., et al. (1989). "Compact organization of the hepatitis B virus genome." *Hepatology* 9(2): 322-7
130. Millman I., Halbherr T., et al. (1982). "Immunological cross-reactivities of woodchuck and hepatitis B viral antigens." *Infect Immun* 35(2): 752-7
131. Millman I., Southam L., et al. (1984). "Woodchuck hepatitis virus: experimental infection and natural occurrence." *Hepatology* 4(5): 817-23
132. Missale G., Redeker A., et al. (1993). "HLA-A31- and HLA-Aw68-restricted cytotoxic T cell responses to a single hepatitis B virus nucleocapsid epitope during acute viral hepatitis." *J Exp Med* 177(3): 751-62
133. Moraleda G., Saputelli J., et al. (1997). "Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus." *J Virol* 71(12): 9392-9
134. Moriarty A. M., Alexander H., et al. (1985). "Antibodies to peptides detect new hepatitis B antigen: serological correlation with hepatocellular carcinoma." *Science* 227(4685): 429-33
135. Möröy T., Etienne J., et al. (1985). "Transcription of woodchuck hepatitis virus in the chronically infected liver." *Embo J* 4(6): 1507-14
136. Mueller Y. M., De Rosa S. C., et al. (2001). "Increased CD95/Fas-induced apoptosis of HIV-specific CD8(+) T cells." *Immunity* 15: 871-882
137. Nassal M. and Schaller H. (1996). "Hepatitis B virus replication--an update." *J Viral Hepat* 3(5): 217-26
138. Nayersina R., Fowler P., et al. (1993). "HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection." *J Immunol* 150(10): 4659-71
139. Neurath A. R., Kent S. B., et al. (1985). "Hepatitis B virus contains pre-S gene-encoded domains." *Nature* 315(6015): 154-6

140. Neurath A. R. and Thanavala Y. (1990). "Hepadnaviruses." In: immunochemistry of viruses II: The Basis for Serodiagnosis and Vaccines, M. H. V. van Regenmortel; Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 403-458
141. Nevens F., Roskams T., et al. (2003). "A pilot study of therapeutic vaccination with envelope protein E1 in 35 patients with chronic hepatitis C." *Hepatology* 38(5): 1289-96
142. Ogston C. W., Jonak G. J., et al. (1982). "Cloning and structural analysis of integrated woodchuck hepatitis virus sequences from hepatocellular carcinomas of woodchucks." *Cell* 29(2): 385-94
143. Paik Y. H., Han K. H., et al. (2006). "The clinical impact of early detection of the YMDD mutant on the outcomes of long-term lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B." *Antiviral Therapy* 11(4): 447-55
144. Parker D. C. (1993). "T cell-dependent B cell activation." *Annu Rev Immunol* 11: 331-60
145. Parmar S. and Plataniias L. C. (2003). "Interferons: mechanisms of action and clinical applications." *Curr Opin Oncol* 15(6): 431-9
146. Pasek M., Goto T., et al. (1979). "Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*." *Nature* 282(5739): 575-9
147. Penna A., Chisari F. V., et al. (1991). "Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen." *J Exp Med* 174(6): 1565-70
148. Peters M. (1996). "Actions of cytokines on the immune response and viral interactions: an overview." *Hepatology* 23(4): 909-16
149. Pol S., Driss F., et al. (1993). "Vaccination against hepatitis B virus: an efficient immunotherapy against hepatitis B multiplication." *C. R. Acad. Sci. Paris* 316:688-689
150. Pontesilli O., Klein M. R., et al. (1997). "Kinetics of immune functions and virus replication during HIV-1 infection." *Immunol Lett* 57: 125-130
151. Ponzetto A., Cote P. J., et al. (1982). "Radioimmunoassay and characterization of Woodchuck core antigen and antibody." *Virus Research* 2, 301-315
152. Ponzetto A., Cote P. J., et al. (1984). "Core antigen and antibody in woodchucks after infection with woodchuck hepatitis virus." *J Virol* 52(1): 70-6
153. Popper H., Shih J. W., et al. (1981). "Woodchuck hepatitis and hepatocellular carcinoma: correlation of histologic with virologic observations." *Hepatology* 1(2): 91-8

154. Popper H., Roth L., et al. (1987). "Hepatocarcinogenicity of the woodchuck hepatitis virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(3): 866-70
155. Reinhardt R. L., Khoruts A., et al. (2001). "Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body." *Nature* 410: 101-105
156. Robinson W. S. and Greenman R. L. (1974). "DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate." *J Virol* 13(6): 1231-6
157. Robinson W. S., Marion P., et al. (1982). "The hepadna virus group: hepatitis B and related virus." In: *Viral Hepatitis*, H. Szmuness, J. Alter, J. E. Maynard (eds.), Franklin Institute Press, Philadelphia, 57-68
158. Robinson W. S., Miller R. H., et al. (1987). "Hepadnaviruses and retroviruses share genome homology and features of replication." *Hepatology* 7(1 Suppl): 64S-73S
159. Roggendorf M. and Tolle K. (1995). "The woodchuck: an animal model for hepatitis B virus infection in man." *Intervirology* 38:100-112
160. Roggendorf M., Lu M., et al. (2007). "Therapeutic vaccination in chronic hepatitis B: preclinical studies in the woodchuck model." *J Viral Hepatol* Nov: 14 Suppl 1: 51-7.
161. Rogler C. E. and Summers J. (1982). "Novel forms of woodchuck hepatitis virus DNA isolated from chronically infected woodchuck liver nuclei." *J Virol* 44(3): 852-63.
162. Schödel F., Sprengel R., et al. (1989). "Animal Hepatitis B Viruses." In: *Advances in Viral Oncology*, Vol. 8, G. Klein (ed.), Raven Press Ltd., New York, 72-103
163. Schödel F., Neckermann G., et al. (1993). "Immunization with recombinant woodchuck hepatitis virus nucleocapsid antigen or hepatitis B virus nucleocapsid antigen protects woodchucks from woodchuck hepatitis virus infection." *Vaccine* 11(6): 624-8
164. Seifer M., Hamatake R. K., et al. (1998). "In vitro inhibition of hepadnavirus polymerase by the triphosphates of BMS-200475 and lobucavir." *Antimicrob Chemother* 42: 3200-3208
165. Sprengel R., Kaleta E. F., et al. (1988). "Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons." *J Virol* 62(10): 3832-9
166. Sprotte H. L. H. (1987). "Untersuchung zur Replikation des Woodchuck Hepatitis Virus und serologische Marker nach experimenteller Infektion von Amerikanischen Waldmurmeltieren (Woodchucks) mit dem WHV. Diss. München 1987

167. Standing D. N., Rutter W. J., et al. (1984). "Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in cultured murine cells initiates within the presurface region." *J Virol* 50(2): 563-71
168. Stemler M., Weimer T., et al. (1990). "Mapping of B-cell epitopes of the human hepatitis B virus X protein." *J Virol* 64(6): 2802-9
169. Stibbe W. and Gerlich W. H. (1983). "Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen." *J Virol* 46(2): 626-8
170. Su Q., Liu Y. F., et al. (1994). "Expression of insulin-like growth factor II in hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma: its relationship with hepatitis B virus antigen expression." *Hepatology* 20(4 Pt 1): 788-99
171. Summers J., Smolec J. M., et al. (1978). "A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks." *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(9): 4533-7
172. Summers J. and Mason W. S. (1982). "Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate." *Cell* 29(2): 403-15
173. Szmunes W., Stevens C. E., et al. (1981). "A controlled clinical trial of the efficacy of the hepatitis B vaccine (Heptavax B): a final report." *Hepatology* 1(5): 377-85
174. Takahashi K., Imai M., et al. (1978). "Duality of hepatitis B e antigen in serum of persons infected with hepatitis B virus: evidence for the nonidentity of e antigen with immunoglobulins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(4): 1952-6
175. Testut P., Renard C. A., et al. (1996). "A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska." *J Virol* 70(7): 4210-9
176. Tiollais P., Pourcel C., et al. (1985). "The hepatitis B virus." *Nature* 317(6037): 489-95
177. Tiollais P., Buendia M. A., et al. (1988). "Structure, genetic organization and transcription of hepadnaviruses." In: *Viral Hepatitis and Liver Disease*, A. J. Zuckerman (ed.), Alan R. Liss Inc., New York, 295-300
178. Toh H., Kikuno R., et al. (1985). "Close structural resemblance between putative polymerase of a Drosophila transposable genetic element 17.6 and pol gene product of Moloney murine leukaemia virus." *Embo J* 4(5): 1267-72
179. Toshkov I., Hacker H. J., et al. (1990). "Phenotypic patterns of preneoplastic and neoplastic hepatic lesions in woodchucks infected with woodchuck hepatitis virus." *J Cancer Res Clin Oncol* 116(6): 581-90
180. Tuttleman J. S., Pourcel C., et al. (1986). "Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus infected cells." *Cell* 47: 451-460



181. Twu J. S. and Robinson W. S. (1989). "Hepatitis B virus X gene can transactivate heterologous viral sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(6): 2046-50
182. Tyler G. V., Summers J. W., et al. (1981). "Woodchuck hepatitis virus in natural woodchuck populations." *J Wildl Dis* 17(2): 297-301
183. Tyler G. W. (1984). "Natural and experimental infections of WHV." Diss. University of Pennsylvania
184. Tyler G. V., Snyder R. L., et al. (1986). "Experimental infection of the woodchuck (*Marmota monax monax*) with woodchuck hepatitis virus." *Lab Invest* 55(1): 51-5
185. Uy A., Bruss V., et al. (1986). "Precore sequence of hepatitis B virus inducing e antigen and membrane association of the viral core protein." *Virology* 155(1): 89-96
186. Valenzuela P., Quiroga M., et al. (1980). "The nucleotide sequence of the hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes." In: *Animal Virus genetics*, B. Fields, R. Jaenisch, C. F. Fox (eds.), Academic Press, New York, 57-70
187. Vento S., Rondanelli E. G., et al. (1987). "Prospective study of cellular immunity to hepatitis-B-virus antigens from the early incubation phase of acute hepatitis B." *Lancet* 2(8551): 119-22
188. Vitetta E. S., Fernandez-Botran R., et al. (1989). "Cellular interactions in the humoral immune response." *Adv Immunol* 45: 1-105
189. Vitvitski-Trepo L., Kay A., et al. (1990). "Early and frequent detection of HBxAg and/or anti-HBx in hepatitis B virus infection." *Hepatology* 12(6): 1278-83
190. Von Herrath M. G., Berger D. P., et al. (2000). "Vaccination to treat persistent viral infection." *Virology* 268(2): 411-9
191. Wang C. C., Liu C. J., et al. (2007). "Dynamics of hepatitis B e antigen index ratio correlate with treatment response in chronic hepatitis B patients." *Liver Int* 27(2): 235-9
192. Weimer T., Schödel F., et al. (1990). "Antibodies to the RNase H domain of hepatitis B virus P protein are associated with ongoing viral replication." *J Virol* 64(11): 5665-8
193. Werner B. G., Smolec J. M., et al. (1979). "Serological relationship of woodchuck hepatitis virus to human hepatitis B virus." *J Virol* 32(1): 314-22
194. Wherry E. J., Blattman J. N., et al. (2003). "Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment." *J Virol* 77(8): 4911-27

195. Wherry E. J. and Ahmed R. (2004). "Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection." *J Virol* 78(11): 5535-45
196. Wherry E. J., Blattman J. N., et al. (2005). "Low CD8 T-cell proliferative potential and high viral load limit the effectiveness of therapeutic vaccination." *J Virol* 79(14): 8960-8
197. Will H., Reiser W., et al. (1987). "Replication strategy of human hepatitis B virus." *J Virol* 61(3): 904-11
198. Wong D. C., Shih J. W., et al. (1982). "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* 15(3): 484-90
199. Wright J., Tennant B. C., et al. (1987). "Genetic variation between woodchuck populations with high and low prevalence rates of woodchuck hepatitis virus infection." *J Wildl Dis* 23(2): 186-91
200. Wu T.-T., Coates L., et al. (1990). "In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for RNA synthesis is amplified by an intracellular conversion pathway." *Virology* 175: 255-261
201. Yaginuma K., Shirakata Y., et al. (1987). "Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(9): 2678-82
202. Yewdell J. W. and Bennink J. R. (1992). "Cell biology of antigen processing and presentation to major histocompatibility complex class I molecule-restricted T lymphocytes." *Adv Immunol* 52: 1-123
203. Zajac A. J., Blattman J. N., et al. (1998). "Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function." *J Exp Med* 188: 2205-2213
204. Zoulim F., Saputelli J., et al. (1994). "Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo." *J Virol* 68(3): 202



*édition scientifique*

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5573-X



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

© rémy guerrier - Fotolia.com