

Untersuchungen zur Rolle der  
impfinduzierten HBsAg-spezifischen CD4<sup>+</sup>T-Zellen  
bei der Hepatitis-B-Virusinfektion humaner Hepatozyten

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III  
- BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN -  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



durchgeführt am  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

vorgelegt von

**Elena Simone Röhl**

aus Wörth a. d. Donau  
Januar 2009

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen Februar 2005 und Oktober 2008 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Jilg durchgeführt.

Promotionsgesuch eingereicht am 07. Januar 2009.

Tag der mündlichen Prüfung: 03. April 2009.

Diese Arbeit wurde angeleitet von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Jilg.

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Reinhard Wirth

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Ralph Witzgall

Prof. Dr. Wolfgang Jilg

Prof. Dr. Herbert Tschochner

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Wörth, den 07. Januar 2009

Elena Röhl

# Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Jilg für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen. Darüber hinaus möchte ich mich auch ganz herzlich für die Betreuung und die angenehme Atmosphäre, in der diese Arbeit angefertigt werden konnte, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Klinikum der Universität Regensburg.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralph Witzgall für die Übernahme des Erstgutachtens.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Tanja Bauer für ihre Unterstützung und positive Motivation im Rahmen dieser Arbeit bedanken. Außerdem danke ich meinen ehemaligen Kollegen, Dr. Sven Schimanski und Dr. Jürgen Wenzel, für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Schließlich danke ich auch den MitarbeiterInnen der diagnostischen Routineabteilung des Instituts für die immer währende freundliche Arbeitsatmosphäre.

# Inhaltsverzeichnis

Erklärung	III
Danksagung	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	XI
Abbildungsverzeichnis	XII
Zusammenfassung	XIII
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Hepatitis-B – von der Entdeckung des auslösenden Virus zum Impfstoff . . .	1
1.2 Das Hepatitis-B-Virus . . . . .	3
1.3 Molekularbiologie des Hepatitis-B-Virus . . . . .	4
1.4 Die Hepatitis-B . . . . .	10
1.5 Immunpathogenese . . . . .	14
1.6 Infektionsmodelle des Hepatitis-B-Virus . . . . .	19
1.7 Ziel der Arbeit . . . . .	21
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1 Zellkultur . . . . .	22
2.1.1 Primäre humane Hepatozyten . . . . .	22
2.1.2 Hepatom-Zell-Linien . . . . .	25
2.1.3 Beeinflussung der HBV-Infektion durch antiviral wirkende Zytokine .	25
2.1.4 Periphere Blut-Lymphozyten . . . . .	26
2.1.5 Kokultur von peripheren Blut-Lymphozyten mit HBV-infizierten He- patozyten . . . . .	26
2.2 Etablierung von <i>real-time</i> RT-PCR-Systemen zum Nachweis der Hepatitis-B- Virus-RNA und der RNA des Haupthistokompatibilitätskomplexes . . . . .	27
2.2.1 Nachweis der Hepatitis-B-Virus-RNA . . . . .	27
2.2.2 Nachweis des Haupthistokompatibilitätskomplexes . . . . .	28

2.2.3	Herstellung der RNA-Eichreihen . . . . .	31
2.3	Nachweissysteme . . . . .	33
2.3.1	Nachweis der HLA-RNA und Hepatitis-B-Virus-RNA . . . . .	33
2.3.2	Nachweis der Hepatitis-B-Virus-DNA . . . . .	34
2.3.3	Quantifizierung von Hepatitis-B-Virus-Antigen . . . . .	36
2.3.4	<i>Elispot-Assay</i> . . . . .	37
2.4	Computer-Programme . . . . .	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1	Hepatitis-B-Virus-Infektionsmodell . . . . .	39
3.1.1	Primäre humane Hepatozyten als Modell für die Infektion . . . . .	39
3.1.2	Untersuchung der HBV-Infektion primärer humaner Hepatozyten . .	40
3.1.3	Untersuchung der HBV-Infektion humaner Hepatom-Zell-Linien . . .	55
3.2	Einfluss der $T_H$ -Typ1-Zytokine $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$ auf die HBV-Infektion . .	58
3.3	Kokultur HBV-infizierter humaner Hepatozyten mit HBV-spezifischen peri- pheren Blut-Lymphozyten . . . . .	70
3.3.1	Etablierung des Kokultur-Modells . . . . .	70
3.3.2	Wirkung HBV-spezifischer Immunzellen auf die akute HBV-Infektion primärer humaner Hepatozyten . . . . .	76
3.3.3	Wirkung HBV-spezifischer und HBV-naiver Immunzellen auf die Vi- rusreplikation in HBV-infizierten humanen Hepatom-Zellen . . . . .	83
3.3.4	Charakterisierung der die Virusreplikation hemmenden Effektorzellen	87
3.3.5	Zusammenfassende Darstellung antiviraler Effekte HBV-spezifischer und HBV-naiver Immunzellen . . . . .	92
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>93</b>
4.1	Humane Infektionsmodelle für das Hepatitis-B-Virus . . . . .	94
4.2	Einfluss der $T_H$ -Typ1-Zytokine auf die Kultur und Virusreplikation der He- patozyten . . . . .	101
4.3	Effekte HBV-spezifischer und HBV-naiver Immunzellen auf die Virusreplika- tion HBV-infizierter humaner Hepatozyten . . . . .	103
	<b>Sequenzen</b>	<b>XIV</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>XXII</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>XXXVII</b>

# Abkürzungsverzeichnis

Ag .....	Antigen
anti-HBc .....	Antikörper gegen das Hepatitis-B-Virus-Core-Antigen
anti-HBe .....	Antikörper gegen das Hepatitis-B-Virus-e-Antigen
anti-HBs .....	Antikörper gegen das Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigen
bp .....	pair of bases, Basenpaare
°C .....	Grad in Celsius
CD .....	Cluster of Differentiation
cccDNA .....	covalently closed circular DNA, kovalent geschlossene zirkuläre DNA
CTL .....	cytotoxic T-Lymphocytes, zytotoxische T-Lymphozyten
DEPC .....	Diethylpyrocarbonat
DHBV .....	Duck hepatitis B virus, Hepatitis-B-Virus der Ente
DMEM .....	Dulbeccos Modified EAGLE Medium
DMSO .....	Dimethylsulfoxid
DNA .....	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP .....	desoxynucleotidtriphosphat, Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA .....	double stranded DNA, doppelsträngige DNA
et al. ....	und andere
EtOH .....	Ethanol
g .....	Gramm
g <sub>e</sub> .....	gravity, Erdbeschleunigung
h .....	Stunde(n)
HBcAg .....	hepatitis B core antigen, Hepatitis-B-Virus-Kapsid-Antigen
HBeAg .....	hepatitis B e antigen, Hepatitis-B-Virus-e-Antigen

---

HBsAg	hepatitis B surface antigen, Hepatitis-B-Virus-Oberflächen- antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBV <sub>S</sub>	HBV-spezifisch
HBV <sub>N</sub>	HBV-naiv
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IU	international unit, Internationale Einheit
kb	kilo-Basen
kD	kilo-Dalton
lHBsAg	large hepatitis B surface antigen, großes Hepatitis-B-Virus- Oberflächenantigen
$\mu$	mikro
m	milli
M	Molar
max.	maximum, maximal
mHBsAg	middle hepatitis B surface antigen, mittleres Hepatitis-B- Virus-Oberflächenantigen
MHC	major histocompatibility complex
MHL	major hydrophilic loop
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MW	Molekulargewicht
n	nano
ng	Nanogramm
NKZ	Natürliche Killer-Zellen
NKTZ	Natürliche Killer-T-Zellen
nm	Nanometer



---

PBL .....	periphere Blut-Lymphozyten
PBS .....	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR .....	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PEG .....	Polyethylenglykol
PHH .....	primäre humane Hepatozyten
pgRNA .....	pregenomic RNA, prägenomische RNA
Pol .....	Polymerase
RNA .....	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNase .....	ribonuclease, Ribonuklease
RT .....	Raumtemperatur
RT-PCR .....	Reverse Transkriptase-PCR
sHBsAg .....	small hepatitis B surface antigen, kleines Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigen
ssDNA .....	single stranded DNA, Einzelstrang-DNA
Taq-Polymerase .....	Thermostabile DNA-Polymerase ( <i>Thermus aquaticus</i> )
T <sub>H</sub> -Zellen .....	T-Helferzellen
TLR .....	Toll-like receptor, Toll-like Rezeptor
TNF .....	Tumornekrosefaktor
U .....	units, Enzymeinheit
v/v .....	volume per volume, Volumeneinheit pro Volumeneinheit
WHV .....	Woodchuck Hepatitis Virus, Hepatitis-Virus des Walddarmtiers
w/v .....	weight per volume, Gewichtseinheit pro Volumeneinheit

# Tabellenverzeichnis

1.1	Virale Proteine des Hepatitis-B-Virus . . . . .	7
1.2	Funktionale Klassen der Effektor-T-Lymphozyten . . . . .	14
2.1	Oligonukleotide für den spezifischen Nachweis der 3,5-kb C-HBV RNA sowie der 2,4-kb S-HBV RNA . . . . .	28
2.2	Oligonukleotide für die Amplifikation der zu klonierenden viralen Sequenzabschnitte . . . . .	28
2.3	Oligonukleotide für den spezifischen Nachweis der MHC-II-Expression . . . .	29
2.4	Oligonukleotide für den spezifischen Nachweis der MHC-I-Expression . . . .	30
2.5	Oligonukleotide für die Amplifikation der zu klonierenden Sequenzabschnitte	30
2.6	<i>Annealing</i> -Temperaturen für die konventionelle PCR . . . . .	31
2.7	<i>TaqMan</i> -Reaktionskomponenten für die Quantifizierung der Hepatitis-B-Virus-RNAs und der MHC-RNAs . . . . .	34
2.8	Temperaturschema der <i>TaqMan</i> -PCR für die Quantifizierung der Hepatitis-B-Virus-RNAs und der MHC-RNAs . . . . .	34
2.9	Oligonukleotide für den spezifischen Nachweis der Hepatitis-B-Virus-DNA . .	35
2.10	<i>TaqMan</i> -Reaktionskomponenten für die Quantifizierung der Hepatitis-B-Virus-DNA . . . . .	35
2.11	Temperaturschema der <i>TaqMan</i> -PCR für die Quantifizierung der Hepatitis-B-Virus-DNA . . . . .	36
3.1	Reduktion der viralen DNA-Synthese und Antigen-Produktion in HepG2.215-Zellen durch TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$ . . . . .	60
3.2	Reduktion der viralen Transkription in HepG2.215-Zellen durch TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$ . . . . .	62
3.3	Reduktion der viralen DNA-Synthese und der Antigen-Produktion in HBV-infizierten primären humanen Hepatozyten durch TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$ . . . . .	63
3.4	Reduktion der viralen Transkription in HBV-infizierten primären humanen Hepatozyten durch TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$ . . . . .	66
3.5	Reduktion der Antigen-Produktion und der viralen DNA-Synthese in HBV-infizierten primären humanen Hepatozyten durch HBV-spezifische PBL eines geimpften Spenders und HBV-naive PBL eines ungeimpften Spenders . . . .	78
3.6	Reduktion der Antigen-Produktion, der viralen DNA-Synthese und der viralen Transkription in HepG2.215-Zellen durch HBV-spezifische und -naive PBL .	85

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Struktur der Hepatitis-B-Virus Partikel . . . . .	4
1.2	Elektronenmikroskopische Darstellung der Hepatitis-B-Virus Partikel . . . . .	5
1.3	Genomorganisation des Hepatitis-B-Virus . . . . .	5
1.4	Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus (nach NTHU, 2008) . . . . .	8
3.1	Morphologische Veränderungen und Differenzierung primärer humaner Hepatozyten nach Isolierung und Aussaat im Zeitverlauf . . . . .	39
3.2	Kinetik der im Zellkulturüberstand nachweisbaren Konzentrationen an viraler DNA, HBeAg und HBsAg . . . . .	41
3.3	Kinetik der viralen HBeAg-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Infektion der PHH in Abhängigkeit vom Infektionszeitpunkt . . . . .	43
3.4	Kinetik der im Zellkulturüberstand nachweisbaren Konzentrationen an viraler DNA, HBeAg und HBsAg in drei Parallelansätzen einer HBV-infizierten Hepatozytenkultur . . . . .	45
3.5	Maximale HBeAg-Konzentration 18 verschiedener Hepatozytenkulturen nach Infektion mit dem gleichen HBV-haltigen Serum . . . . .	46
3.6	RNA-Eichreihen zum quantitativen Nachweis HBV-spezifischer RNAs . . . . .	48
3.7	Konzentration der Hepatitis-B-Virus RNA nach <i>in vitro</i> Infektion der PHH mit unterschiedlichen Inokula . . . . .	49
3.8	Kinetik der im Zellkulturüberstand nachweisbaren Konzentrationen von HBeAg, HBsAg und DNA nach <i>in vitro</i> Infektion primärer humaner Hepatozyten mit unterschiedlichen Inokula . . . . .	50
3.9	RNA-Eichreihen zum Nachweis der Expression von MHC-I und MHC-II . . . . .	52
3.10	Expression von MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II durch PHH . . . . .	53
3.11	Expression von HLA-A und HLA-DR $\alpha$ durch unter Standard-Bedingungen kultivierte und HBV-infizierte PHH . . . . .	54
3.12	Im Kulturüberstand der Hepatom-Zell-Linien nachweisbare Konzentrationen von HBeAg, HBsAg und viraler DNA . . . . .	56
3.13	Konzentration der Hepatitis-B-Virus RNA in den Hepatom-Linien HepG2.215 und HepG2.4A5 . . . . .	57
3.14	Virusreplikation in humanen Hepatom-Zellen nach Zugabe von TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$ . . . . .	59

3.15	Synthese viraler RNA in humanen Hepatom-Zellen nach Zugabe von TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$ . . . . .	61
3.16	Kinetik von HBeAg, HBsAg und viraler DNA unter Einfluss von TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$ . . . . .	64
3.17	Konzentration der Hepatitis-B-Virus RNA unter Einfluss von TNF- $\alpha$ und IFN- $\gamma$ . . . . .	65
3.18	Expression von HLA-Klasse-II durch PHH unter Einfluss von IFN- $\gamma$ . . . . .	68
3.19	Morphologische Veränderungen der PHH nach direktem Zell-Zell-Kontakt mit heterologen peripheren Blut-Lymphozyten . . . . .	70
3.20	Kinetik der im Zellkulturüberstand nachweisbaren Konzentrationen von HBeAg, HBsAg und DNA nach HBV-Infektion und Kultivierung der Hepatozyten im Standardmodell und im Kokulturmodell . . . . .	72
3.21	Kinetik der im Zellsieb nachweisbaren Konzentrationen von HBeAg, HBsAg und DNA nach HBV-Infektion und Kultivierung der Hepatozyten mit dem Zelleinsatz . . . . .	73
3.22	Zytokinprofil HBV-spezifischer Immunzellen . . . . .	74
3.23	<i>Trans-Well</i> -System . . . . .	75
3.24	Kinetik der im Zellkulturüberstand nachweisbaren Konzentrationen von HBeAg, HBsAg und viraler DNA nach Kokultur mit HBV-spezifischen und HBV-naiven PBL . . . . .	77
3.25	Reduktion der HBeAg-Produktion in HBV-infizierten Hepatozyten durch HBV-spezifische und HBV-naive PBL . . . . .	79
3.26	Korrelation der PBL-vermittelten Reduktion der HBeAg-Produktion mit der Zahl IFN- $\gamma$ -sezernierender Zellen verschiedener Spender . . . . .	79
3.27	HBeAg-Kinetik nach Infektion und Zugabe HBV-spezifischer und HBV-naiver PBL zu bestehender Infektion . . . . .	80
3.28	HBeAg-Kinetik während und nach Kokultur mit HBV-spezifischen und HBV-naiven PBL . . . . .	81
3.29	Virale Aktivität in HepG2.215-Kokultur mit HBV-spezifischen und HBV-naiven PBL . . . . .	84
3.30	Reduktion der HBeAg-Produktion in HepG2.215-Zellen in Kokultur mit HBV-spezifischen und HBV-naiven PBL verschiedener Spender . . . . .	85
3.31	Zytokinprofil und Zahl der Zytokin-sezernierenden Zellen der PBL nach Kokultivierung mit HBV-exprimierenden Hepatom-Zellen . . . . .	88
3.32	Zahl der Zytokin-sezernierenden Zellen der PBL nach Kokultivierung mit HBV-exprimierenden Hepatom-Zellen und HBsAg-exprimierenden Hepatom-Zellen . . . . .	90

# Zusammenfassung

Die erfolgreichste Prophylaxe gegen eine Hepatitis-B-Virusinfektion ist die aktive Immunisierung, die die Induktion einer adaptiven Immunantwort zur Folge hat. Die aktive Immunisierung erfolgt mit einem rekombinanten Impfstoff, der als immunogene Determinante das Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigen (HBsAg) enthält und die Bildung von anti-HBs induziert. Die humorale Immunität und die erfolgreiche Wirksamkeit von anti-HBs zum Schutz vor einer Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus wurde bereits eingehend untersucht. Dabei ist die Aktivierung HBsAg-spezifischer CD4<sup>+</sup>T-Zellen essenziell für die Stimulation spezifischer B-Lymphozyten und der dadurch initiierten Produktion von anti-HBs. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der zellulären Immunität, die durch aktive Immunisierung gegen das Hepatitis-B-Virus induziert wird, und untersucht die Rolle der HBsAg-spezifischen CD4<sup>+</sup>T-Zellen bei der Hepatitis-B-Virusinfektion.

Die funktionelle Charakterisierung der Rolle impfinduzierter HBsAg-spezifischer CD4<sup>+</sup>T-Zellen bei der Hepatitis-B-Virusinfektion erfolgte anhand humaner Infektionsmodelle für das Hepatitis-B-Virus. Die Untersuchungen wurden mit HBV-infizierten primären humanen Hepatozyten, die als Modell für die akute Primärinfektion gelten, und mit humanen Hepatom-Zellen, die einen chronischen Infektionsstatus repräsentieren, durchgeführt.

HBV-spezifische periphere Blut-Lymphozyten von HBV-geimpften Spendern bewirkten in Kokultur mit HBV-infizierten Hepatozyten eine signifikante Reduktion der viralen Transkription, der Virusreplikation und der Antigen-Produktion. Der antivirale Effekt der peripheren Blut-Lymphozyten einzelner Spender stand in Abhängigkeit ihrer spezifischen T-Zellreaktivität und war reversibel. Die negative Beeinflussung der Infektion durch die peripheren Blut-Lymphozyten erfolgte höchstwahrscheinlich über Sekretion antiviral wirkender Zytokine. Die gewonnenen Daten weisen impfinduzierten HBsAg-spezifischen CD4<sup>+</sup>T-Zellen eine eindeutige, antivirale Effektorfunktion bei der Hepatitis-B-Virusinfektion humaner Hepatozyten zu. Da überraschenderweise auch HBV-naïve periphere Blut-Lymphozyten ungeimpfter Spender eine negative Beeinflussung der Virusreplikation bewirkten und die HBV-Infektion reversibel inhibierten, scheint auch die angeborene Immunität bei der Kontrolle der Hepatitis-B-Virusinfektion eine Rolle zu spielen.

# 1 Einleitung

## 1.1 Hepatitis-B – von der Entdeckung des auslösenden Virus zum Impfstoff

Im Rahmen einer Impfkampagne gegen Pockenviren im Jahre 1883, bei der Schiffswerftarbeiter in Bremen mit einer aus humaner Lymphe bereiteten Vakzine immunisiert wurden, erlangte die Gelbsucherkrankung, die schon seit dem Altertum bekannt ist, zum ersten Mal die Aufmerksamkeit der gesamten Bevölkerung. Wie von *A. Luerman* 1885 beschrieben, entwickelten 15 % der insgesamt 1.289 geimpften Personen Wochen nach der Immunisierung eine Gelbsucht (Luerman, 1885). Die Gelbsucht galt seitdem als infektiöse Krankheit.

In den Vierziger Jahren stellte der britische Arzt *F. O. MacCallum* gehäuftes Auftreten einer Hepatitis bei Soldaten fest, die einen Gelbfieber-Impfstoff verabreicht bekamen, der ebenfalls menschliches Serum enthielt (MacCallum et al., 1951). Zudem waren auch Fälle bekannt, wonach eine Hepatitis nach Behandlung mit unsterilisierten, wiederverwendeten medizinischen Instrumenten auftrat. *MacCallum* begann, ein Virus im menschlichen Blut als Verursacher einer Hepatitis zu vermuten. Mit der Bezeichnung „*Hepatitis-B*“ bzw. „*Serum-hepatitis*“ grenzte er daraufhin die Form der Lebererkrankung ein, die hauptsächlich durch Kontakt mit kontaminiertem Blut übertragen wird. Für die Form der Krankheit, die vor allem nach Verzehr von kontaminierter Nahrung und kontaminiertem Wasser auftrat, prägte er den Begriff „*Hepatitis-A*“ (MacCallum, 1953).

Im Jahre 1965 entdeckte *B. Blumberg* ein Antigen im Serum eines australischen Ureinwohners – das sog. *Australia-Antigen* –, welches mit dem Serum eines amerikanischen Hämophilie-Patienten reagierte (Blumberg et al., 1965). 1966 fanden *B. Blumberg*, *W. T. London* und *A. Sutnick* im Serum eines 12-jährigen Jungen mit *Down-Syndrom* das parallele Auftreten des *Australia-Antigens* und einer Hepatitis-B (Blumberg et al., 1967).

Nach intensiver Forschung bestätigten mehrere Arbeitsgruppen einen Zusammenhang zwischen dem *Australia-Antigen* und der Serumhepatitis (Ragazzini und Vierucci, 1970; Prince, 1968a; Prince, 1968b; Okochi und Murakami, 1993).

*D. S. Dane* und Kollegen stellten 1970 die direkte Verbindung zwischen dem *Australia-Antigen* und der Hepatitis her, als sie in elektronenmikroskopischen Befunden virusähnliche Partikel im Serum von *Australia-Antigen*-positiven Individuen entdeckten. Diese Partikel fanden sie auch in Leberzellen von Patienten mit Hepatitis (Dane et al., 1970).

In der Folge wurde klar, dass sich das *Australia-Antigen* hauptsächlich auf der Oberfläche von Partikeln fand, die hinsichtlich ihrer Größe sehr unregelmäßig waren und eine viel geringere Dichte aufwiesen als bereits bekannte Viren ähnlicher Größe. Auch weil sie keine genetische Information enthielten, kam die Forschung zu der Schlussfolgerung, dass das *Australia-Antigen* nur ein Teil des Virus ist, welches Hepatitis-B auslöst. Der Begriff *Australia-Antigen* wurde zunächst abgewandelt in „Hepato-assoziiertes Antigen“ und schließlich wurde die Bezeichnung „*Hepatitis B Surface Antigen*“ (HBsAg, Hepatitis-B-Oberflächenantigen) übernommen. Das vollständige und infektiöse Virus – beschrieben als 42 nm großes Partikel mit Hülle und ikosaedrischem Nukleokapsid – wurde nach seinem Entdecker „*Dane-Partikel*“ benannt.

Die Entdeckungen von *S. Krugman* im Jahre 1971, dass hitzeinaktiviertes Hepatitis-B-kontaminiertes Blut nach Injektion zu keiner Lebererkrankung führte (Krugman et al., 1971), sowie des Auftretens von Antikörpern nach einer Hepatitis-B-Primärinfektion (Lander et al., 1971) resultierten in der Idee, dass HBsAg eine schützende Immunantwort auslösen könnte (Krugman, 1975). Nach vielen Jahren umfangreicher Forschung entwickelte das Unternehmen *Merck* einen Hepatitis-Impfstoff, der aus von humanem Blut isolierten HBsAg hergestellt wurde. Nach Beschreibung eines von mehr als 90 %igen Schutzes gegen Hepatitis-B und fehlender unerwünschter Nebenwirkungen durch *W. Szmuness* und Kollegen (Szmuness et al., 1980), wurde der aus humanem Serum gewonnene Impfstoff im Jahre 1981 zugelassen.

Um dem flächendeckenden Bedarf großer Mengen des HBsAg-Impfstoffes gerecht zu werden, wurden Anstrengungen unternommen, einen Hepatitis-B-Impfstoff aus rekombinantem HBsAg zu entwickeln. Nach Klonierung und Sequenzierung der viralen DNA gelang es *W. Rutter* und *B. Hall*, reine HBsAg-Partikel in genetisch manipulierten Hefezellen herzustellen (Valenzuela et al., 1982; McAleer et al., 1984). Dieser Impfstoff stellte eine sichere Alternative zur Vakzinierung mit attenuierten Viren dar und konnte in gleich bleibender Qualität sowie Immunogenität produziert werden. Die Vakzine zum Schutz vor Hepatitis-B wurde als weltweit erster rekombinanter Impfstoff zugelassen und eingesetzt.

## 1.2 Das Hepatitis-B-Virus

Das hepatotrope Hepatitis-B-Virus (HBV) gehört weltweit zu den häufigsten viralen Infektionserregern und ist verantwortlich für eine akute oder chronische Leberentzündung. Jährlich sterben etwa 0,6 bis 1 Million Menschen an den Folgen einer HBV-Infektion und rund 40 % der Weltbevölkerung weisen entsprechende Antikörper als Merkmal einer bereits stattgefundenen oder noch bestehenden Infektion auf (Perz et al., 2006).

Das HBV gehört zu der Familie der *Hepadnaviridae*, deren Mitglieder neben einem ausgeprägten Hepatotropismus und hoher Speziesspezifität sowie fehlender Zytopathogenität auch die Fähigkeit aufweisen, persistierende Infektionen mit ausgeprägter Virämie zu erzeugen. Entsprechend der Systematik ihrer Wirtsorganismen lassen sich *Hepadnaviridae* in die beiden Genera der Orthohepadnaviren und der Avihepadnaviren unterteilen. Die tierischen Viren dieser Familie – vor allem das *woodchuck hepatitis virus* (WHV) (Waldmurmeltier-Virus; Summers et al., 1978) und das *duck hepatitis B virus* (DHBV) (Enten-Virus; Mason et al., 1980) – dienen in der Hepatitisforschung häufig als Modellsysteme.

Eine Einteilung des HBV in verschiedene Untergruppen kann über serologische Subtypen oder Genotypen vorgenommen werden. Die verschiedenen serologischen Subtypen des HBV unterscheiden sich in der Antigenität ihrer Oberflächenglykoproteine (HBsAg). Ausgehend von der a-Determinante, die alle Isolate besitzen, wurden die allelisch auftretenden und sich gegenseitig ausschließenden Subtypen *d*, *y* und *r*, *w* identifiziert. Die serologische Einteilung wird allmählich verdrängt durch die Einteilung des HBV in die Genotypen A bis F, die durch DNA-Sequenzunterschiede von 10 - 15 % und eine charakteristische geographische Verbreitung gekennzeichnet sind (Norder et al., 2004; Echevarria und Avellon, 2006).

Die Übertragung des HBV erfolgt perinatal, perkutan durch Blut-zu-Blut-Kontakt oder durch Sexualkontakte. Chronisch HBV-infizierte Personen stellen das Reservoir für die Viren dar, wobei besonders symptomarm oder symptomlos chronisch Infizierte eine Infektionsquelle bilden (Robert Koch-Institut, 2006). Ein wichtiger Übertragungsweg ist die Infektion Neugeborener durch infizierte Mütter, wobei die mit dem Virus infizierten Frauen die Infektion in der Regel durch perinatale Übertragung an das Kind weitergeben können. Als epidemiologische Durchseuchungsmarker gelten Antikörper gegen das virale Nukleokapsid-Antigen (anti-HBc), da sie nach Kontakt mit dem Virus lebenslang erhalten bleiben und somit Marker einer stattgefundenen HBV-Infektion sind. Trotz der weltweiten Verbreitung gibt es große Unterschiede in der Prävalenz, je nach geographischer Lage, ethnischer Zugehörigkeit und persönlichem Risikoverhalten. In der Bundesrepublik Deutschland beträgt dem *Robert Koch-Institut* zufolge die Prävalenz von aktiven HBsAg-positiven HBV-Infektionen 0,4 bis 0,8 %, während sich die Prävalenz von anti-HBc auf ca. 7 % beläuft (Robert Koch-Institut, 2006). Laut *Walter et al.* erfolgen hierzulande 30 bis 40 % der Infektionen bei Angehörigen entsprechender Risikogruppen, was die – nach wie vor bestehende – Notwendigkeit der Aufklärung und entsprechender Impfkampagnen verdeutlicht (Walter et al., 2005).



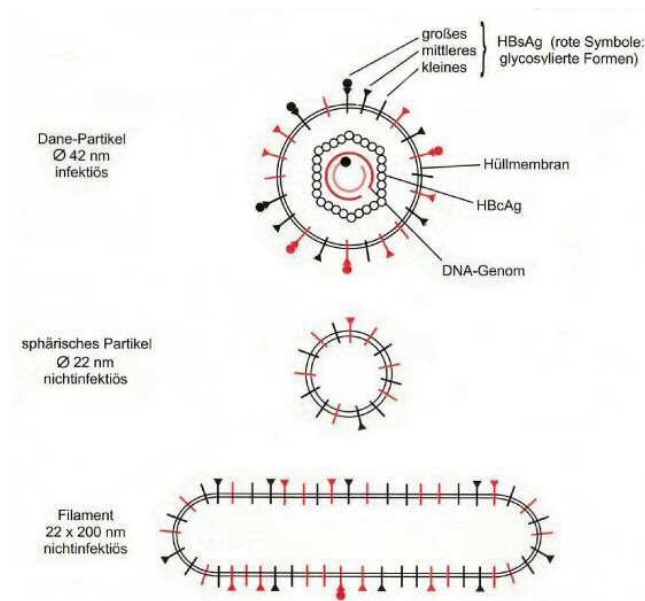
## 1.3 Molekularbiologie des Hepatitis-B-Virus

Das Hepatitis-B-Virus ist ein humanes DNA-Virus, das sich auch aufgrund seiner molekularbiologischen Eigenschaften von anderen Viren unterscheidet.

### Morphologie der viralen und subviralen Partikel

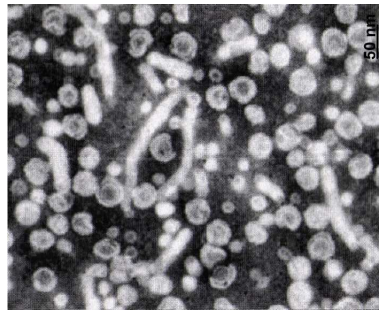
Infektiöse Viruspartikel, die auch als „Dane-Partikel“ bezeichnet werden, besitzen eine durchschnittliche Größe von 42 nm (Abb. 1.1). In Seren chronischer Virusträger können Virusmengen von bis zu  $10^{10}$  und mehr Virionen/ml vorkommen. Ihre äußere Hülle ist ca. 7 nm dick und zellulären Ursprungs. Sie leitet sich von der Membran des endoplasmatischen Retikulums der Wirtszelle ab (Hollinger, 1996). In diese lipidhaltige Hülle sind die drei verschiedenen Formen des Hepatitis-B-Oberflächenantigens (großes, mittleres und kleines HBsAg) eingelagert. Die äußere Hülle umgibt das 36 nm messende ikosaedrische Nukleokapsid, das sog. Core-Partikel (Crowther et al., 1994). Das Nukleokapsid-Antigen (Core-Antigen, HBcAg) fungiert dabei als strukturgebendes Protein des Kapsids, welches das virale Genom und die virale DNA-Polymerase umschließt.

Neben den Virionen können im Serum von akut oder chronisch infizierten Personen sog. subvirale Partikel nachgewiesen werden. Die nichtinfektiösen subviralen Partikel bestehen aus leeren Virushüllen und enthalten die im Überschuss synthetisierten Hüllproteine (Bruss, 2007; Chai et al., 2008). Aufgrund ihrer Morphologie und der Zusammensetzung ihrer Hülle werden sie aufgeteilt in sphärische und filamentöse Partikel. Die sphärischen Partikel besitzen einen Durchmesser von etwa 17 - 25 nm und werden daher als „22 nm-Partikel“ bezeichnet. Sie können im Serum chronischer Virusträger Konzentrationen von mehr als  $10^{13}$  Partikel/ml erreichen, während die filamentösen Partikel seltener auftreten (bis zu  $10^{11}$  Partikel/ml).



**Abb. 1.1:** Schematische Struktur der Hepatitis-B-Virus Partikel (entnommen aus Modrow et al., 2003)

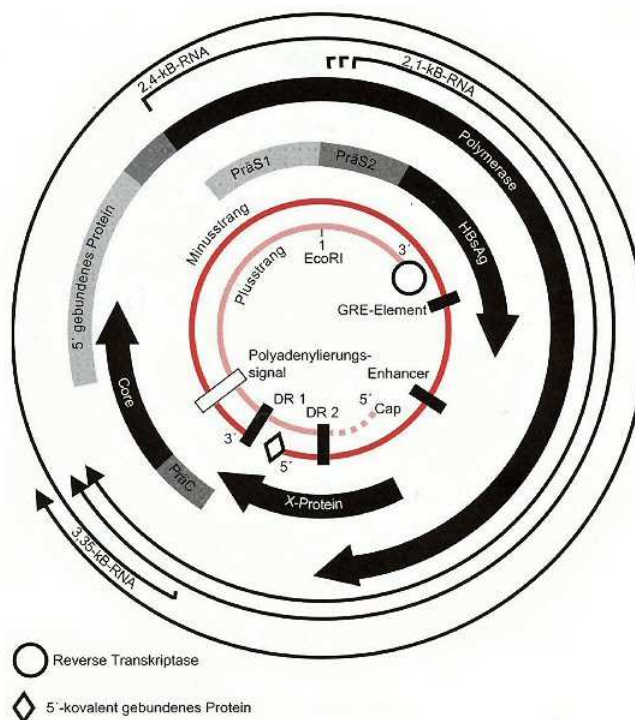
Das parallele Auftreten von Virionen, sphärischen und filamentösen Partikel zeigt die folgende elektronenmikroskopische Aufnahme von Serum eines Virusträgers.



**Abb. 1.2:** Elektronenmikroskopische Darstellung der Hepatitis-B-Virus Partikel (entnommen aus Ganem und Prince, 2004)

## Genomorganisation

Das Hepatitis-B-Virus besitzt ein zirkuläres, partiell doppelsträngiges DNA-Genom, welches je nach Genotyp 3.181 bis 3.221 bp groß ist (Abb. 1.3). Der Minus-Strang weist eine Länge von ca. 3.200 Nukleotiden auf, während der Plus-Strang mit einer Länge von 1.000 - 2.500 Nukleotiden unvollständig ist (Hruska und Robinson, 1977; Landers et al., 1977). Der Minus-Strang bindet am 5'-Ende das terminale Protein (TP) der viralen Polymerase kovalent, während am 3'-Ende des Plus-Strangs die DNA-Polymerase/Reverse Transkriptase nichtkovalent assoziiert vorliegt. Die Zirkularisierung der zwei DNA-Stränge erfolgt durch Überlappen einer komplementären 226 bp-langen Sequenz zwischen den 5'-Enden der beiden Stränge über die *direct repeats* DR1 und DR2.



**Abb. 1.3:** Schematische Genomorganisation des Hepatitis-B-Virus (entnommen aus Modrow et al., 2003)

Die virale Nukleinsäure enthält vier offene, sich teilweise überlappende Leserahmen, die in verschiedenen Leserastern abgelesen werden. Die Prä*Core*/*Core*-Region kodiert für das Präkapsid- und das Kapsidprotein, die PräS/S-Region kodiert die drei Oberflächenproteine, die P-Region die virale Polymerase (P-Protein) und die X-Region das HBx-Protein (Tiollais et al., 1985).

Der kodierende Bereich für die Oberflächenantigene enthält die kodierende Region für das kleine HBsAg, dem am 5'-Ende die PräS1- und PräS2-Region vorangestellt sind. In Abhängigkeit vom Start der Translation können dadurch die drei verschiedenen Formen des Oberflächenantigens synthetisiert werden.

In ähnlicher Weise liegt im 5'-Bereich der *Core*-Region der sog. Prä*Core*-Bereich, der bei der Synthese des Hepatitis-e-Antigens abgelesen wird (Kramvis und Kew, 1999).

Die Genexpression wird reguliert von vier Promotoren und zwei *Enhancern*, die unabhängig voneinander gesteuert werden können. Der *Core*-Promotor ist verantwortlich für die Transkription der prägenomischen RNA. Der X-Promotor reguliert die Transkription einer 700 bp-langen mRNA für das HBx-Protein. Die Synthese des lHBsAg wird kontrolliert durch den PräS1-Promotor, wohingegen das mHBsAg und das sHBsAg von einem gemeinsamen PräS2/S-Promotor reguliert werden.

Da die virale DNA-Polymerase aufgrund fehlender oder ungenügend wirksamer Exonuklease-Aktivität nur eine unzureichende Korrekturlesefunktion ausüben kann und die genetische Information äußerst konzentriert vorliegt, treten häufig Mutationen im Genom auf. Dabei führen bereits einzelne Nukleotid-Austausche zu pleiotropen Effekten, so dass sich die meisten Mutationen als signifikante Nachteile während der Virusreplikation erweisen und für das Virus letal sind. Bestimmte Mutationen können sich jedoch unter entsprechendem Selektionsdruck durchsetzen und dadurch z. B. zu einer Resistenz gegenüber antiviralen Substanzen oder zu einem Auftreten von sog. *Immune-escape*-Varianten führen (Protzer und Schaller, 2000). Treten Mutationen bei den Genen für die Oberflächenproteine auf, können mehrere Leserahmen beeinflusst werden. Nukleotid-Austausche in der S-Region wirken sich möglicherweise aufgrund der Rolle des sog. *major hydrophilic loop (MHL)* als Ziel sowohl neutralisierender als auch diagnostischer Antikörper in der Immunantwort als auch letztlich bei der Detektion des HBsAg in diagnostischen Systemen nachteilig aus (Hollinger, 2007). Zusätzlich zu *Immune-escape*-Varianten führen entsprechende Mutationen auch zu *Diagnosis-escape*-Varianten.

## Virale Proteine

Die virale Nukleinsäure kodiert für die in Tabelle 1.1 gelisteten Proteine.

		Leserahmen	Bezeichnung	MW
Oberflächenproteine	kleines Antigen	S-Region	sHBsAg	24 kD 27 kD glykosyliert
	mittleres Antigen	PräS2-S-Region	mHBsAg	33 kD 36 kD glykosyliert
	großes Antigen	PräS1/PräS2-S-Region	lHBsAg	39 kD 42 kD glykosyliert
Nukleokapsidproteine	Core-Antigen	C-Region	HBcAg	22 kD
	HepB-early Antigen	PräC-C-Region	HBeAg	16 kD
Hepatitis-B-X-Protein		X-Region	HBxAg	17 kD
Hepatitis-B-Polymerase		P-Region	Polymerase	90 kD

**Tab. 1.1:** Virale Proteine des Hepatitis-B-Virus

Die Oberflächenantigene (HBsAg) werden im rauen endoplasmatischen Retikulum gebildet, während posttranslationale Modifikationen im Golgi-Apparat erfolgen (Hollinger, 1996). Der sog. *major hydrophilic loop (MHL)* befindet sich auf der äußeren Oberfläche der viralen Hüllmembran. Die in diesem Bereich liegende a-Determinante stellt als Bindungsstelle für spezifische Antikörper das wichtigste immunogene Epitop der Oberflächenantigene dar.

Das virale Kapsid-Protein (HBcAg) entsteht durch Translation des *Core*-Leserahmens und bildet die Strukturkomponenten des viralen Nukleokapsids (Crowther et al., 1994).

Das HBe-Protein (*Hepatitis B early protein*) entsteht durch Translation der Prä*Core*- und *Core*-Region und anschließender Prozessierung des Vorläuferproteins. N-terminale Modifikation dieses Vorläuferproteins führt zum Auftreten eines Zwischenproteins, welches nach Spaltung in der C-terminalen Region das HBe-Protein bildet (Kramvis und Kew, 1999). Der Großteil des produzierten HBe-Proteins wird sezerniert. Bereits 1972 wurde dieses lösliche Protein entdeckt und gilt seitdem als serologischer Marker für die virale Genexpression und Replikation (Ou, 1997).

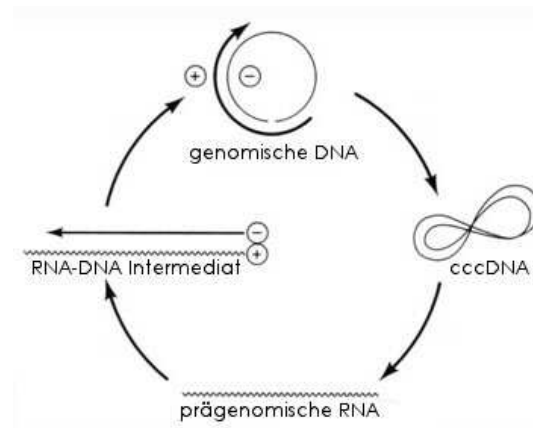
Die Translation des offenen Leserahmens der viralen Polymerase liefert ein multifunktionelles Protein mit vier verschiedenen Domänen (Ganem, 1996). Das terminale Protein ist für das *Priming* bei der DNA-Synthese verantwortlich. Die Reverse Transkriptase zeigt RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität. Eine Ribonuklease (RNase H) spaltet während der reversen Transkription die RNA. Diese Ribonuklease-Aktivität ist zusätzlich beteiligt an der Verpackung der viralen RNA, am optimierten *Priming* des kodierenden Stranges und an der Elongation der viralen Minus-Strang-DNA (Nassal, 2008).

Beim HBx-Protein handelt es sich um ein nichtstrukturelles, akzessorisches Protein des Hepatitis-B-Virus mit vielfältigen, regulatorischen Funktionen (Tang et al., 2006). Es dient

als Transaktivator für die virale und zelluläre Genexpression und hat darüber hinaus onkogenes Potential (Su und Schneider, 1997; Diao et al., 2001; Murakami, 2001; Lee et al., 2002).

## Replikationszyklus

Der Replikationszyklus der *Hepadnaviridae* (Abb. 1.4) ist charakterisiert durch die Synthese des 3,2-kb großen, partiell doppelsträngigen und zirkulären DNA-Genoms.



**Abb. 1.4:** Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus (nach NTHU, 2008)

Nach der spezifischen Bindung des Virus an die Hepatozyten erfolgt die Aufnahme des Virions in die Zelle, wobei der zelluläre Rezeptor für das Virus im humanen System noch nicht identifiziert wurde (Lu und Block, 2004).

Nach Internalisierung der Virionen wird im Zytoplasma das Nukleokapsid freigesetzt und zum Nukleus transportiert. Über Kernporenkomplexe gelangt das virale Genom in das Kerninnere.

Im Nukleus wird die partiell doppelsträngige genomische DNA durch zelluläre Enzyme komplettiert. Durch Entfernung des RNA-Oligonukleotides und des terminalen Proteins, Abspaltung des Überhangs am Minus-Strang, Vervollständigung des Plus-Stranges und kovalente Ligation der beiden Stränge entsteht die cccDNA (*covalently closed circular DNA*). Die cccDNA wird in Nukleosomen konzentriert und bildet sog. virale Minichromosomen, die als Matrize für die anschließende Transkription der viralen mRNAs dienen (Nassal, 2008).

Ausgehend von den Minichromosomen werden durch die zelluläre DNA-abhängige RNA-Polymerase II genomische und subgenomische Transkripte synthetisiert. Dabei treten vier mRNA-Klassen auf, die unterschiedliche Startpunkte, aber jeweils das gleiche 3'-Ende (Polyadenylierungssequenz) besitzen (Kann und Gerlich, 1998). Die als prägenomische RNA bezeichnete 3,5-kb lange mRNA weist eine Überlänge auf. Das Abschreiben dieser mRNA von der cccDNA führt zur Synthese des HBcAg und der viralen Polymerase. Eine 3,1-kb lange mRNA dient als Matrize für das HBe-Antigen. Für die Bildung der Oberflächenantigene

stehen die 2,4-kb und die 2,1-kb mRNA zur Verfügung. Eine kurze mRNA von 0,7-kb-Länge dient der Synthese des HBxAg. Nach Modifikation der 5'-Enden durch *Cap*-Strukturen und Polyadenylierung der 3'-Enden durch zelluläre Enzyme werden die viralen mRNAs ins Zytoplasma exportiert und translatiert.

Im Zytosol lagern sich die synthetisierten HBc-Dimere zum Viruskapsid zusammen. Wechselwirkungen zwischen der DNA-Polymerase und den HBc-Proteinen sowie zwischen der Polymerase und der prägenomischen RNA führen zur Kapsidbildung mit Aufnahme des RNA-Polymerase-Komplexes (Bartenschlager et al., 1990; Lott et al., 2000). Die Polymerase erkennt und bindet nun spezifisch das  $\varepsilon$ -Verpackungssignal, eine RNA-Sekundärstruktur am 5'-Ende der prägenomischen RNA (Junker-Niepmann et al., 1990). Mit der Inkorporation der viralen prägenomischen RNA beginnt die reverse Transkription und Reifung der neu gebildeten Viruspartikel (Pollack und Ganem, 1994).

Die weiteren Schritte der Virusreplikation finden innerhalb der *Core*-Partikel im Zytoplasma statt. Als *Primer* für die sog. Erststrangsynthese dient die N-terminale Domäne der viralen Polymerase – das terminale Protein. Durch reverse Transkription wird das RNA-Prägenom in einzelsträngige DNA überschrieben, währenddessen die RNase H-Aktivität der Polymerase den RNA-Anteil des entstehenden Duplexmoleküls degradiert. Der neu synthetisierte Minus-DNA-Strang dient während der sog. Zweitstrangsynthese als Matrize für die Synthese des Plus-Strangs. Die Synthese des Plus-Strangs kommt nach ungefähr zwei Dritteln zum Erliegen, so dass der Plus-Strang 50 bis 70 % der Länge des Minus-Strangs erreicht und die reife genomische DNA in ihrer charakteristischen, partiell doppelsträngigen, zirkulären, aber nichtkovalent geschlossenen Form entsteht (Ganem, 1996). Die umhüllten Virionen und subviralen Partikel werden sezerniert.

Die Regulation der viralen cccDNA zum Zwecke der Etablierung einer Persistenz ist ein zentraler Aspekt der Hepatitis-B-Virusreplikation (Caruntu und Molagic, 2005). Über Neuinfektion der Hepatozyten mit dem Virus oder durch Wiedereintritt neu synthetisierter viraler DNA in den Nukleus kann die Aufrechterhaltung der viralen Replikation gesteuert werden.

## 1.4 Die Hepatitis-B

Die „Hepatitis-B“ ist eine durch das Hepatitis-B-Virus hervorgerufene akute oder chronische Leberentzündung. Eine Primärinfektion kann sich in einer akuten Erkrankung äußern, verläuft jedoch in der Mehrheit der Fälle inapparent.

### Symptomatik der Hepatitis-B

Die Übertragung von Hepatitis-B-Viren geschieht durch Blut oder blutkontaminierte Körperflüssigkeiten, wobei kleinste Mengen für eine Infektion genügen können. Nach der Inokulation gelangt das Virus über den Blutweg in die Leber. Die Inkubationszeit der Hepatitis-B beträgt sechs Wochen bis sechs Monate. Im Prodromalstadium treten Appetitlosigkeit, Muskel- und Gelenksbeschwerden, Fieber, Übelkeit, Erbrechen und ein allgemeines Krankheitsgefühl auf. Das akute Stadium ist charakterisiert durch Ikterus, dunklen Urin, entfärbten Stuhl und tastbare Leber- und Milzvergrößerung. Es zeigen sich starke parenchymale Leberveränderungen und Entzündungsreaktionen, wobei die antivirale Immunantwort das pathogenetische Geschehen bestimmt. Das Virus selbst weist eine sehr geringe Zytopathogenität auf. Die starken Gewebeschädigungen entstehen – ausgehend von verschiedenen Immunzellen – durch Zytolyse infizierter Hepatozyten (Vierling, 2007).

### Verlaufsformen der Hepatitis-B

Bei an Hepatitis-B-Erkrankten können verschiedene Krankheitsverläufe auftreten. Bei ca. 1 % kommt es zu einer fulminanten Hepatitis, die unbehandelt im Leberversagen endet und oft tödlich verlaufen kann. Ein selbstlimitierender Verlauf mit Elimination des Virus, Ausheilung der Erkrankung und Erwerb einer lebenslang schützenden Immunität tritt in ca. 90 % aller Hepatitis-B-Fälle bei Erwachsenen auf. Bei 5 bis 10 % der Patienten älter als 12 Jahre und in über 95 % bei perinatal erworbener HBV-Infektion entwickelt sich jedoch eine chronische Hepatitis (Rehermann und Nascimbeni, 2005).

Die chronische Hepatitis reicht von der Hepatitis des scheinbar gesunden Virusträgers ohne klinische Symptome bis hin zur chronisch-aggressiven Hepatitis mit starker Virusvermehrung und erheblichen entzündlichen Veränderungen der Leber. Als Folge einer chronischen Hepatitis-B kann durch die Schädigung des Lebergewebes eine Fibrose entstehen, die nach mehrjährigem Verlauf zur Leberzirrhose fortschreiten und bis zum Leberversagen führen kann. Neben der Zirrhose, die per se onkogen ist, ist auch das Virus selbst onkogen und kann die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms bewirken (Brechot, 2004; Szabo et al., 2004).

## Diagnostik der Hepatitis-B

Die Diagnostik der Hepatitis-B-Virusinfektion beruht auf dem serologischen Nachweis viraler Antigene und spezifischer Antikörper sowie der viralen DNA. Das zeitliche Muster der serologischen Marker ist dabei die Grundlage für die Beurteilung des Infektionsstatus (Servoss und Friedman, 2004; Hatzakis et al., 2006; Hollinger, 2007; Valsamakis, 2007).

Der Nachweis von HBV-DNA im Serum wird als Marker einer signifikanten Virämie angesehen. Bereits in der Frühphase der Infektion ist der direkte Virusnachweis mittels PCR oder Hybridisierungsassays möglich und erlaubt eine Beurteilung der Virus-Aktivität und Infektiosität.

HBsAg kennzeichnet eine HBV-Infektion und kann bereits in der Frühphase der Infektion serologisch nachgewiesen werden. HBsAg zeigt das Vorhandensein von Virus in der Leber und potentielle Infektiosität an.

HBeAg gilt als Replikationsmarker, wobei die Höhe des HBeAg-Titers in gewisser Korrelation zur Infektiosität steht.

Der Nachweis spezifischer Antikörper gegen die viralen Antigene erlaubt ebenfalls eine den Infektionsstatus der Hepatitis-B kennzeichnende Beurteilung. Antikörper gegen das virale Oberflächenprotein – anti-HBs – treten erst nach völligem Verschwinden von HBsAg auf und charakterisieren eine abgelaufene Infektion. Das nach Seroconversion von HBeAg entstehende anti-HBe steht für eine meist niedrige Virus-Aktivität und damit geringe Infektiosität. Anti-HBc-IgM bzw. anti-HBc-IgG (Antikörper gegen das virale Kapsid-Antigen) bleiben nach Kontakt mit HBV lebenslang erhalten und sind Marker einer stattgefundenen Infektion. Da es in allen Infektionsverläufen auftritt, dient anti-HBc als epidemiologischer Durchseuchungsmarker.

## Therapie der Hepatitis-B

Die primären Ziele einer antiviralen Therapie sind eine Senkung der Viruslast und Verminderung der intrahepatischen entzündlichen Aktivität. Als therapeutische potentielle Langzeiteffekte werden damit die Verhinderung von Zirrhose und hepatozellulärem Karzinom angestrebt. Eine erfolgreiche Therapie bewirkt eine dauerhafte Reduktion der Viruslast, dauerhafte Seroconversion zu anti-HBe sowie Verlust des HBsAg (Balsano und Alisi, 2008).

Die akute Hepatitis-B heilt bei Erwachsenen in über 90 % der Fälle spontan aus, so dass in der Regel nur die klinischen Symptome behandelt werden, da eine Verbesserung der Ausheilung durch eine antivirale Therapie kaum nachweisbar zu sein scheint (Cornberg et al., 2007).

Zur Behandlung der chronischen Hepatitis-B gibt es gegenwärtig zwei verschiedene Behandlungsoptionen. Zum einen werden immunmodulierende Substanzen wie z. B. Interferon- $\alpha$  in der Therapie verwendet, zum anderen die Virusreplikation hemmende Nukleosid- und Nukleotidanaloga. Die immunmodulatorische antivirale Wirkung von rekombinantem IFN- $\alpha$



wird durch eine unspezifische Stimulation der zellulären Immunantwort (z. B. Erhöhung der Expression des Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-I oder Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten) vermittelt. Nukleosidanaloga wie z. B. *Lamivudin*, *Telbivudin* oder *Entecavir* bzw. Nukleotidanaloga wie *Adefovir* oder *Tenofovir* hemmen die Virusreplikation auf direktem Wege. Die Analoga wirken über Konkurrenz mit Nukleosiden bzw. Nukleotiden um den Einbau in den wachsenden DNA-Strang. Die folgende Hemmung der DNA-Polymerase mit anschließendem Kettenabbruch resultiert in einer Verminderung der viralen Replikation. Da das Absetzen der Therapie mit Nukleosidanaloga in einem Wiederanstieg der Virämie resultiert, muss die antivirale Therapie über einen längeren Zeitraum, u. U. lebenslang, durchgeführt werden. Jedoch führte die Entwicklung und der Einsatz spezifischer antiviraler Dauertherapien zum Auftreten verschiedener resistenter HBV-Varianten, was ein virologisches Nichtansprechen auf die Behandlung zur Folge haben kann (Balsano und Alisi, 2008; Ferir et al., 2008).

## Immunprophylaxe der Hepatitis-B

Durch die aktive und passive Immunisierung ist eine gezielte Prophylaxe der Hepatitis-B möglich. Im Jahre 1992 empfahl die Weltgesundheitsorganisation *WHO* allen Ländern die generelle Impfung gegen Hepatitis-B (Hollinger et al., 2007). Da der Mensch der einzig epidemiologisch relevante Wirt des Hepatitis-B-Virus ist, könnte durch die weltweite Umsetzung dieser Empfehlung die Hepatitis-B langfristig ausgerottet werden.

### Aktive Immunprophylaxe

Die wichtigste und erfolgreichste präventive Maßnahme gegen eine Hepatitis-B-Virusinfektion ist die aktive Impfung, welche die Induzierung einer adaptiven Immunantwort zur Folge hat. Für die aktive Immunisierung wird ein gentechnisch hergestellter Totimpfstoff verwendet, der mit Hilfe des Hefesystems *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen wird. Dieses Kultursystem ermöglicht die Expression intakter 22 nm-Partikel, die nur nicht glykosyliertes HBsAg enthalten (Waters et al., 1987). Die 22 nm-Partikel bilden die immunogene Komponente für die aktive Immunisierung und induzieren die Bildung neutralisierender Antikörper, die gegen die a-Determinante im sHBsAg gerichtet sind (anti-HBs) (Zuckerman, 2000; Inchauspe und Michel, 2007). Die Grundimmunisierung gegen HBV besteht aus drei Impfungen und ist in den Routineimpfplan für Säuglinge und Kleinkinder integriert (Cornberg et al., 2007).

Die Aktivierung HBsAg-spezifischer CD4<sup>+</sup>T-Zellen ist essenziell für die Stimulation spezifischer B-Lymphozyten und die dadurch initiierte Produktion von anti-HBs. *Szmunn et al.* zufolge entwickeln über 95 % der Geimpften eine humorale Immunität mit schützendem anti-HBs-Titer (Szmunn et al., 1980). Zudem treten HBsAg-spezifische T-Helferzellen und die T-zellabhängige Synthese neutralisierender Antikörper bereits innerhalb von zwei Wochen nach der Immunisierung auf (Bocher et al., 1996; Bocher et al., 1999). Nach Kontakt

mit HBsAg setzen die impfinduzierten HBsAg-spezifischen CD4<sup>+</sup>T-Zellen die Zytokine IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  frei (Bocher et al., 1999; Bauer et al., 2002). Die Immunisierung durch die HBV-Vakzine führt bei den Impfungen zu einer unterschiedlichen Reaktivität, die sich serologisch anhand des Antikörper-Titers bestimmen lässt. Verschiedene Studien konnten allerdings zeigen, dass ca. 80 % der Geimpften, die auf die Impfung nicht ansprechen – trotz fehlender bzw. schwacher humoraler Immunität – eine zelluläre Immunität aufbauen können, deren Bedeutung noch ungeklärt ist (Jarrosso et al., 2004; Bauer und Jilg, 2006).

## Passive Immunprophylaxe

Eine passive Immunisierung mit Hepatitis-B-spezifischem Immunglobulin dient vor allem der postexpositionellen Prophylaxe. Spezifische Immunglobulin-Präparate werden aus Seren von Patienten mit einer abgelaufenen HBV-Infektion und zum Teil aus Seren von geimpften Personen gewonnen. Deshalb enthalten sie neben anti-HBs auch anti-HBc. Der hohe Titer an Antikörper gegen HBsAg dieser Hyperimmunglobulinpräparate vermittelt über Komplexierung freier Virionen einen sofortigen Schutz nach Kontakt mit dem Virus. Da der Antikörper-vermittelte Schutz nur bis zum Abfall des Titers anhält, erfolgt die passive Immunisierung meist in Kombination mit dem Totimpfstoff als aktiv-passive Immunisierung (Zuckerman, 2007). Die aktiv-passive Impfung ist besonders wichtig für Neugeborene HBV-infizierter Mütter. Die passive Immunisierung dient – neben der postexpositionellen Indikation – auch zum Schutz vor Reinfektion mit dem Virus nach einer Lebertransplantation sowie der Prophylaxe immunsupprimierter Patienten und Personen, die durch eine aktive Impfung keinen eigenen Impfschutz aufbauen können.

## Aktiv-passive Postexpositionsprophylaxe bei Neugeborenen HBV-infizierter Mütter

Besonders gefährlich ist die Infektion Neugeborener durch HBsAg-positive Mütter, da hier ein hohes Risiko zur Entwicklung einer chronischen Hepatitis besteht (Rehermann und Nascimbeni, 2005). Zur Verhinderung der Infektion bei Neugeborenen von Hepatitis-B-infizierten Müttern sollte die passive Immunisierung innerhalb von zwölf Stunden postnatal erfolgen. Zusätzlich sollte die Grundimmunisierung mit Hepatitis-B-Impfstoff begonnen werden. Die Übersichtsarbeit von Lee et al. beschreibt die Effizienz der aktiv-passiven Postexpositionsprophylaxe, die in 85 bis 95 % aller Fälle einen Schutz bei perinataler Übertragung und späterer Infektion im Kleinkindalter bewirkt (Lee et al., 2006).

## 1.5 Immunpathogenese

### Die angeborene und erworbene Immunität im Überblick

Die angeborene oder natürliche Immunität, die für die frühen Phasen einer Abwehrreaktion verantwortlich ist, setzt sich zusammen aus phagozytotischen Zellen (Neutrophile, Monozyten und Makrophagen) und aus Zellen, die inflammatorische Mediatoren freisetzen (Basophile, Mastzellen und Eosinophile) sowie aus Natürlichen Killer-Zellen. *Toll-like*-Rezeptoren (*TLR*), die sowohl intrazellulär (*TLR7*, *TLR8* und *TLR9*) als auch auf der Oberfläche (*TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR6* und *TLR11*) v. a. von Makrophagen auftreten, stellen einen konservierten Abwehrmechanismus dar und haben in der angeborenen Immunität eine besondere Bedeutung. Über Erkennung und Bindung pathogen-assoziiierter molekularer Muster (*pathogen-associated molecular patterns*; *PAMPs*) setzen sie Signalkaskaden in Gang, die über Aktivierung verschiedener immunologisch aktiver Zellpopulationen eine erste, zeitlich rasch auftretende Immunreaktion induzieren. Die adaptive oder erworbene Immunität hingegen wird durch antigenspezifische B- und T-Lymphozyten vermittelt, die durch Infektion oder Impfung induziert werden. Eine effektive Elimination von Pathogenen resultiert in der Regel aus der Kombination von angeborener und erworbener Immunität (Delves und Roitt, 2000a; Delves und Roitt, 2000b).

Neben der B-Lymphozyten-vermittelten humoralen Immunität spielt die T-Lymphozyten-vermittelte zelluläre Immunität eine entscheidende Rolle bei der adaptiven Immunantwort. Es gibt zwei wichtige Untergruppen von T-Zellen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen, die die Zelloberflächenproteine CD4 oder CD8 tragen:

Phänotyp	Subpopulation		Effektorfunktionen vermittelt durch	
CD3 <sup>+</sup> / CD4 <sup>+</sup>	T-Helferzellen	T <sub>H</sub> -Typ1	IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$	Makrophagen-Aktivierung
CD3 <sup>+</sup> / CD4 <sup>+</sup>	T-Helferzellen	T <sub>H</sub> -Typ2	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13	B-Zell-Aktivierung
CD3 <sup>+</sup> / CD8 <sup>+</sup>	zytotoxische T-Zellen	CTL	IL-2, IFN- $\gamma$ , Perforine	Lyse virusinfizierter Zellen

**Tab. 1.2:** Funktionale Klassen der Effektor-T-Lymphozyten

Vor allem TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  haben entscheidende Bedeutung an der Regulation immunologischer Prozesse und Antworten (Herbein und O'Brien, 2000; Randall und Goodbourn, 2008). Dabei kann die primär antivirale Wirkung der von T-Lymphozyten sezernierten Zytokine oftmals auch – wie bei der Hepatitis-B – für pathogenetische Effekte und Zellschädigungen verantwortlich sein (Guidotti und Chisari, 1999; Guidotti und Chisari, 2000).

T-Lymphozyten erkennen die durch HLA-Moleküle präsentierten Fremdantigene über ihren T-Zell-Rezeptor. Über die T-Zell-Oberflächenproteine CD4 bzw. CD8 erfolgt während der Antigenerkennung eine spezifische Bindung an definierte Bereiche der HLA-Moleküle, wobei CD8<sup>+</sup>T-Zellen an HLA-Klasse-I-Moleküle und CD4<sup>+</sup>T-Zellen an HLA-Klasse-II-Moleküle

binden. In Kombination mit dem sog.  $CD3^+$ -Komplex, der nach Bindung des HLA-Peptid-Komplexes für die Signalübertragung zuständig ist, fungieren die  $CD4$ - bzw.  $CD8$ -Proteine als wichtige Korezeptoren.

## Die Leber als immunologisch aktives Organ

Die Leber gilt als zentrales Organ des gesamten Stoffwechsels und ist Zielgewebe des hepatotropen Hepatitis-B-Virus. Die Blutzufuhr – und damit der Transport des Virus – in die Leber erfolgt zum einen über die hepatische Arterie, zum anderen wird nährstoffreiches Blut vom Darm über die Pfortader in die Leber transportiert. Das Blut strömt durch die Sinusoide – das Kapillarnetz der Leber – und verlässt die Leber über die Lebervene.

Lebergewebe besteht zu ca. 65 % aus Hepatozyten, der Rest sind nichtparenchymale, hauptsächlich sinusoidale Zellen. Die Sinusoide enthalten neben den Endothelzellen (lebersinusoidale Endothelzellen, LSEZ) vor allem leberresidente Makrophagen (Kupffer-Zellen) und Ito-Zellen (Fett-speichernde Zellen) (Knolle und Gerken, 2000). Zudem findet man im Lebergewebe residente dendritische Zellen und Lymphozyten. Die LSEZ bilden zusammen mit den phagozytierenden Kupffer-Zellen einen wichtigen Teil des angeborenen Immunsystems (Enomoto et al., 2004; Naito et al., 2004).

Die Kupffer-Zellen, die hepatischen dendritischen Zellen und die LSEZ exprimieren als leberspezifische Antigen-präsentierende Zellen HLA-Klasse-I- und Klasse-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche und können Fremdanigene – sezernierte Antigene oder DNA-Partikel HBV-infizierter Hepatozyten – aufnehmen, prozessieren und den  $CD4^+$ T-Zellen bzw.  $CD8^+$ T-Zellen präsentieren (Knolle und Limmer, 2003).

## Immunpathogenese der Hepatitis-B

Zahlreiche Untersuchungen zur Pathogenese der Hepatitis-B im humanen System und im Tiermodell erbrachten eindeutige Hinweise, dass das Virus selbst nicht zytopathogen ist und die Hepatitis durch zelluläre virusspezifische und angeborene, unspezifische Immunreaktionen initiiert wird. Neben der virusspezifischen, T-Zell-vermittelten Lyse infizierter Hepatozyten spielen auch inflammatorische Zytokine, die von antigenspezifischen und unspezifischen mononukleären Zellen sezerniert werden, eine wichtige Rolle, da sie direkt und nichtzytolytisch eine Inhibition der Virusreplikation und der viralen Genexpression induzieren (Guidotti und Chisari, 2001). Für die effektive Kontrolle der Infektion mit dem Ziel der Viruselimination sind sowohl zelluläre als auch humorale Immunmechanismen nötig (Wieland und Chisari, 2005; Rehmann, 2007). Dabei entscheidet die Differenzierung der  $CD4^+$ T-Zellen in die inflammatorischen  $T_H$ -Typ1- oder die  $T_H$ -Typ2-Effektorzellen, ob eine zelluläre und antigenspezifische Immunantwort oder eine humorale Immunantwort vorherrschend sein wird. Patienten mit einer akuten, selbstlimitierenden Infektion zeigen vorwiegend ein  $T_H$ -Typ1-spezifisches Zytokinmuster, während chronisch Infizierte ein variables Muster einzelner  $T_H$ -

Typ1- und T<sub>H</sub>-Typ2-Klone in Kombination verschiedener Zytokine aufweisen (Inoue et al., 1989; Barnaba et al., 1994; Kakumu et al., 1994).

In verschiedenen Modellsystemen wurde eine Zytokin-vermittelte antivirale Wirkung auf die Hepatitis-B-Virusreplikation gezeigt. Allen voran stehen IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (Guidotti et al., 2002). IFN- $\gamma$  und IL-2 wirken auch indirekt über Aktivierung von Lebermakrophagen zur Sekretion von TNF- $\alpha$ , welches konsekutiv die Expression von viralen Proteinen hemmt (Guilhot et al., 1993; Guidotti et al., 1994). Auch IL-12, welches von Antigen-präsentierenden Zellen produziert wird, wirkt über Induktion der IFN- $\gamma$ -Sekretion durch T-Zellen und Natürlichen Killerzellen stark inhibitorisch (Cavanaugh et al., 1997).

### **Humorale Immunantwort nach Hepatitis-B-Virusinfektion**

Bislang wurden in den Hüllproteinen, im Nukleokapsidprotein und im HBeAg immunogene Bereiche identifiziert, die zur Induktion spezifischer Antikörper-produzierender B-Zellen und zur Bildung von anti-HBs, anti-HBc sowie anti-HBe führen.

Die neutralisierenden Antikörper, die gegen die viralen Oberflächenproteine gerichtet sind, spielen eine entscheidende Rolle bei der Elimination des Virus. Anti-HBs komplexiert durch Bindung des HBsAg freie Viruspartikel und vermittelt zugleich den Schutz vor einer Reinfektion. Im Gegensatz dazu üben Antikörper gegen das Nukleokapsid (anti-HBc) sowie gegen HBeAg (anti-HBe) keine neutralisierende Funktion aus. Sie sind sowohl bei akut Infizierten als auch bei chronisch Infizierten in hohen Titern nachweisbar (Huang et al., 2006).

### **HLA-Klasse-II-restringierte CD4<sup>+</sup>T-Zellantworten nach Hepatitis-B-Virusinfektion**

HBV-spezifische HLA-Klasse-II-restringierte CD4<sup>+</sup>T-Zellantworten beobachtet man hauptsächlich bei Patienten mit akuter, selbstlimitierender Infektion. Diese starke, multispezifische und polyklonale Antwort richtet sich primär gegen die Kapsidantigene HBcAg und HBeAg und führt zu einer Aktivierung HBcAg-spezifischer zytotoxischer T-Zellen, welche die virale Genexpression und Replikation in der Leber nichtzytolytisch unterdrücken können (Ferrari et al., 1990).

Entgegen der hohen Immunogenität der Nukleokapsid-Antigene induzieren die viralen Oberflächenproteine (HBsAg) während der Infektion eine scheinbar schwächer ausgeprägte Expansion spezifischer CD4<sup>+</sup>T-Zellen. Dass es sich bei HBsAg allerdings nicht um ein generell schwaches Immunogen handelt, zeigt die starke humorale Immunantwort und die HBsAg-spezifische CD4<sup>+</sup>T-Zellantwort bei immunisierten Personen (Celis et al., 1988; Jin et al., 1988).

Als dominierende T-Helferzell-Immunreaktion in Zusammenhang mit der Eliminierung des Virus gilt die nukleokapsidspezifische CD4<sup>+</sup>T-Zellantwort. Weitere immunogene Epitope bei der viralen Polymerase (identifiziert von Mizukoshi et al., 2004) oder dem HBx-Antigen sind

noch unzureichend erforscht, könnten aber in der Entwicklung neuer Vakzinierungsstrategien von Bedeutung sein.

Eine chronische Hepatitis-B-Virusinfektion weist eine deutlich schwächer ausgeprägte zelluläre Immunantwort auf, die nicht ausreicht, die Infektion effizient zu kontrollieren und das Virus zu eliminieren.

### **HLA-Klasse-I-restringierte zelluläre Immunantwort nach Hepatitis-B-Virusinfektion**

HLA-Klasse-I-restringierte  $CD8^+$ T-Zellantworten bei Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus richten sich gegen verschiedene Epitope des Nukleokapsids (Bertoletti et al., 1991; Penna et al., 1991), der Hüllproteine (Nayersina et al., 1993), der Polymerase (Nayersina et al., 1993) und des HBx-Antigens (Hwang et al., 2002). Die virusspezifische  $CD8^+$ T-Zellantwort ist bei der akuten, selbstlimitierenden Infektion bedeutend stärker ausgeprägt als bei chronischem Infektionsverlauf (Vierling, 2007). Es wurde vielfach gezeigt, dass für die Reduktion der Viruslast im infizierten Gewebe hauptsächlich die zytotoxischen  $CD8^+$ T-Zellen (*cytotoxic T-lymphocytes*, *CTL*) verantwortlich sind. Die antivirale Wirkung erfolgt durch diese Zellen sowohl auf zytolytischem als auch nichtzytolytischem Weg (Guidotti und Chisari, 2001; Bertoletti und Gehring, 2006).

Die nichtzytolytische antivirale Wirkung aktivierter  $CD8^+$ T-Zellen resultiert aus Sekretion der Zytokine  $IFN-\gamma$  oder  $TNF-\alpha$ , die eine effiziente Inhibition der viralen Genexpression und Replikation vermitteln. Zytolytisch wirken aktivierte  $CD8^+$ T-Zellen über Induktion der Apoptose infizierter Zellen. Eine *CTL*-induzierte Apoptose betrifft insgesamt jedoch nur 5 % aller Hepatozyten. Erst durch das konsequente Einwandern weiterer Entzündungszellen kommt es zu einer nekroinflammatorischen Reaktion des Gewebes. Nach *Walewska-Zielecka et al.* bestehen die infiltrierenden und inflammatorisch-wirkenden Zellen zu 20 bis 25 % aus  $CD8^+$ T-Zellen und zu 50 bis 60 % aus  $CD4^+$ T-Zellen (Walewska-Zielecka et al., 2008). Hinzu kommt die von aktivierten Kupffer-Zellen ausgelöste antigenunspezifische Zerstörung von Hepatozyten durch Sekretion von  $IFN-\gamma$  oder  $TNF-\alpha$ .

### **Die Bedeutung impfinduzierter HBsAg-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen**

Erste Hinweise auf eine möglicherweise bedeutende Rolle der HBsAg-spezifischen  $CD4^+$ T-Zellen für den Verlauf der HBV-Infektion wurden durch Untersuchungen an HBV-transgenen Mäusen erbracht. Nach Injektion HBsAg-spezifischer  $T_H1$ -Zell-Klone wurde in den entsprechenden Mäusen die Virusreplikation signifikant reduziert. Verantwortlich für diese antiviralen Effekte waren  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha$ , die nach Antigenerkennung durch die  $T_H1$ -Zellen freigesetzt wurden (Franco et al., 1997). Mit Hilfe von T-Zell-Klonen HBV-geimpfter Personen konnte gezeigt werden, dass HBsAg-spezifische  $CD4^+$ T-Zellen sowohl exogene als auch endogene virale Hüll-Polypeptide erkennen. Die endogenen Hüllantigene werden den

CD4<sup>+</sup>T-Zellen durch HLA-Klasse-II-Moleküle auf der Oberfläche von Leberzellen präsentiert (van den Oord et al., 1986; Penna et al., 1992). In transgenen HBsAg-exprimierenden Mäusen wurde eine Reduktion der HBsAg-Produktion sowie der RNA-Expression durch sowohl CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten als auch CD4<sup>+</sup>T-Zellen beobachtet. Dabei war die Kinetik der Antigen-Reduktion durch beide T-Zellpopulationen ähnlich und ebenso effektiv in der Eliminierung der viralen RNA. Daher beschreiben *Mancini et al.* die T<sub>H</sub>1-Antwort als adäquate und starke Antwort des Immunsystems zur Kontrolle der viralen Expression bis hin zur Virus-Elimination (Mancini et al., 1998). Auch im Schimpansen-Modell wurden Hinweise für die Bedeutung der spezifischen CD4<sup>+</sup>T-Zellen gewonnen. Obwohl in einer späteren Phase der Infektion die Viruslast trotz zunehmender CD4<sup>+</sup>T-Zellen unverändert blieb, wurde in Abwesenheit der CD4<sup>+</sup>T-Zellen (Depletion der Zellen) eine länger andauernde Leberentzündung festgestellt. CD4<sup>+</sup>T-Zellen spielen demzufolge eine entscheidende Rolle in der frühen Immunantwort und sind somit essenziell für die Kontrolle des Virus (Thimme et al., 2003).

### Regulatorische T-Zellen

Es stellte sich heraus, dass regulatorische T-Zellen (T<sub>Reg</sub>-Zellen) eine bedeutende Rolle in der Suppression virusspezifischer Immunantworten spielen. Natürliche T<sub>Reg</sub>-Zellen mit dem Phänotyp CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> tragen einen Anteil von ungefähr 5 bis 10 % der CD4<sup>+</sup>T-Zellen (Sakaguchi, 2005). Nach *Manigold und Racanelli* unterdrücken T<sub>Reg</sub>-Zellen die Aktivierung, Proliferation, Differenzierung und Effektorfunktionen verschiedener Zelltypen, wie z. B. T-Lymphozyten, B-Zellen oder Natürlicher Killer-Zellen. Die Kontrolle der Immunantwort erfolgt über Sekretion antiinflammatorischer Zytokine, direkte Lyse der Zielzellen oder Zell-Zell-Kontakt-abhängige Mechanismen (Manigold und Racanelli, 2007).

Es wurde gezeigt, dass Patienten mit einer chronischen HBV-Infektion signifikant mehr T<sub>Reg</sub>-Zellen im Blut als auch akkumuliert in der Leber vorweisen als Patienten mit akuter Infektion (Xu et al., 2006; Yang et al., 2007). Daneben initiierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T<sub>Reg</sub>-Zellen eine erhöhte suppressive Aktivität gegen HBV-spezifische T-Zellantworten. Diese Erkenntnisse führen zu der Vermutung, dass spezifische T<sub>Reg</sub>-Zellen HBV-spezifische T-Zellen unterdrücken und so entscheidend an der Entstehung einer chronischen Infektion beteiligt sind (Xu et al., 2006).

### Die Rolle der angeborenen Immunität bei der Hepatitis-B-Virusinfektion

Als erste Barriere gegen Pathogene sollen die Effektormechanismen der angeborenen Immunität die erworbene Immunität komplettieren und die Effektivität der Pathogenabwehr optimieren. Im HBV-transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass über *Toll-like*-Rezeptoren ausgelöste Signalkaskaden oder die Aktivierung von Natürlichen Killer-Zellen sowie Natürlichen Killer-T-Zellen zur Zytokinproduktion letztlich zu einer Inhibition der Virusreplikation führen (Kimura et al., 2002a; Kimura et al., 2002b; Isogawa et al., 2005). *Cooper et al.* zeigten, dass die HBcAg-induzierte Zytokinproduktion ursächlich *TLR2*-vermittelt ist

(Cooper et al., 2005). Obwohl die von unterschiedlichen Zellpopulationen der angeborenen Immunität sezernierten Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  eine Reduktion der viralen Replikation bewirken können, ist bisher nicht eindeutig geklärt, welche Rolle die angeborenen Immunmechanismen in der Pathogenese bzw. Viruseliminierung während der Frühphase der Infektion spielen.

## 1.6 Infektionsmodelle des Hepatitis-B-Virus

Wegen der globalen Bedeutung, die durch das Hepatitis-B-Virus verursachte Infektionen tragen, ist die Erforschung dieses Virus anhand verschiedener Tier- und Zellkultur-Modellsysteme von immenser Wichtigkeit (Guha et al., 2004). Auf natürlichem Weg ist das Hepatitis-B-Virus nur für Menschen und höhere Primaten infektiös (De Meyer et al., 1997). Diese Speziespezifität limitiert dabei die potenziellen Modellsysteme für eine direkte Untersuchung des Virus. Neben der Speziespezifität und dem Hepatotropismus stellt das Virus zudem Anforderungen an den Differenzierungsgrad seiner Zielzellen (Schulze-Bergkamen et al., 2003). Somit müssen für entsprechende *in vitro* Infektionsversuche primäre Leberzellen verwendet werden, da die zur Verfügung stehenden humanen Hepatom-Zell-Linien aufgrund ihres geringen Differenzierungsgrades nicht mehr infizierbar sind. Nach Transfektion von replikationskompetenten Plasmidkonstrukten können jedoch auch in den Hepatom-Zell-Linien (z. B. HepG2.4A5, HepG2.215) infektiöse Nachkommenviren gebildet werden, so dass mit diesem Modellsystem die späteren Schritte im Replikationszyklus des HBV weitgehend aufgeklärt werden konnten (Sun und Nassal, 2006). Da für die späteren Schritte keine strenge Speziespezifität besteht, konnten HBV-transgene Mausmodelle etabliert werden, bei denen die Versuchstiere entweder einzelne Virusproteine oder ein gesamtes Virusgenom als Fremdgen enthalten (Chisari, 1996; Dandri et al., 2006). Durch die Übertragung virusspezifischer Immunzellen von HLA-identischen Mäusen auf die transgenen Tiere konnten wichtige Erkenntnisse zur Immunpathogenese der Hepatitis-B gewonnen werden.

Einige der tierpathogenen Hepadnaviren sind zu wichtigen Modellen der HBV-Infektion geworden und geben Aufschluss über die Biologie des Virus. Es existieren etablierte Modelle für die Hepatitis-Viren der Walddarmeltiere (*woodchuck hepatitis virus*, *WHV*), der Enten (*duck hepatitis B virus*, *DHBV*) und der Erdhörnchen (*ground squirrel hepatitis virus*, *GSHV*).

Das *WHV*-Modell der Walddarmeltiere stellt ein gutes System für die Untersuchung der viralen Karzinogenese dar, da diese Tiere bei einer chronischen Infektion eine hohe Progressionsrate zur Entwicklung eines Leberzelltumors aufweisen. Nachteile bei diesem Modell ergeben sich aus der Größe der Tiere und der Tatsache, dass Walddarmeltiere Winterschlaf halten (Menne und Cote, 2007).

Das *DHBV*-Modell der Enten ist ein wichtiges Modell für die Untersuchung der einzelnen Replikationsschritte der Hepadnaviren und lieferte wichtige Beiträge zur Molekularbiologie



dieser Virenfamilie. Aufgrund einer nur geringen Verwandtschaft zwischen dem *DHBV* und dem *HBV* können Ergebnisse aus dem *DHBV*-Modell nur mit gewissen Einschränkungen auf das humane Virus übertragen werden (Schultz et al., 2004; Funk et al., 2007).

Bereits kurz nach der Entdeckung und Identifizierung des Hepatitis-B-Virus dienten Schimpansen als Modell für *in vivo* Studien. Nachdem ihre Empfänglichkeit für experimentelle *HBV*-Infektionen erkannt war, wurde die Hepatitis-B-Infektion über drei Jahrzehnte an diesem *in vivo* Modell studiert (Muchmore, 2001; Prince und Brotman, 2001). Aus ethischen Gründen sind diese Tiere jedoch nur begrenzt für experimentelle Untersuchungen verfügbar.

Ein neueres *in vitro* Modell für das Hepatitis-B-Virus stellen primäre Hepatozyten der Spezies *Tupaia belangeri* dar (Cao et al., 2003). Tupaias sind asiatische Spitzhörnchen, die innerhalb der Ordnung der Scandentia zur Familie der *Tupauidae* gehören und in den tropischen Wäldern Südost-Asiens heimisch sind. Experimentelle *in vivo* Infektionen dieser Tiere führen ausschließlich zu einer akuten, selbstlimitierenden Infektion und nicht zu einer Chronifizierung. Daher sind sie nicht vergleichbar mit dem Verlauf einer natürlichen *HBV*-Infektion. Ergebnisse aus *in vitro* Infektionen von primären *Tupaia*-Hepatozyten deuten jedoch darauf hin, dass die Interaktionen der Viruspartikel mit den Zielzellen bei *Tupaia*-Hepatozyten und humanen Hepatozyten sehr ähnlich sind. Somit scheint das *in vitro* Modell der primären *Tupaia*-Hepatozyten für die Untersuchung der ersten Schritte der Virusreplikation gut geeignet zu sein (Walter et al., 1996).

Primäre humane Hepatozyten hingegen stellen ohne Zweifel das optimale *in vitro* Modell für die Hepatitis-B-Virusinfektion dar, weil sie dem *in vivo* Verhältnis von Virus und Wirt bezüglich Speziespezifität und Gewebetropismus am nächsten kommen.

Die Schaffung entsprechender ethisch-rechtlicher Rahmenbedingungen für die Nutzung von menschlichem Material für wissenschaftliche Zwecke ermöglicht eine verbesserte Verfügbarkeit von primären humanen Hepatozyten. Für die Isolation humaner Hepatozyten stehen Gewebestücke von Operationspräparaten zur Verfügung, die bei Eingriffen zur Tumorentfernung in der Leber anfallen und nach feingeweblicher Untersuchung nicht mehr für diagnostische Zwecke benötigt werden. Durch die Entwicklung zellschonender Isolationsmethoden wird die Vitalität der Hepatozyten nach dem Lösen aus dem Gewebeverband bewahrt. Die Etablierung von Bedingungen zur Erhaltung der Vitalität und der zellspezifischen Morphologie ermöglichen zudem eine Langzeit-Kultivierung (Ryan et al., 1993; Alpini et al., 1994).

Im *Zentrum für Leberzellforschung (ZLF)* am Klinikum der Universität Regensburg werden unter standardisierten Bedingungen primäre humane Hepatozyten aus nicht mehr benötigtem menschlichem Gewebe isoliert, konserviert und kultiviert. In enger Kooperation mit dem *ZLF* konnten von Böhm et al. am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene ein standardisiertes *in vitro* Infektionsmodell für das Hepatitis-B-Virus etabliert werden (Boehm et al., 2005).

## 1.7 Ziel der Arbeit

Diese Arbeit hatte zum Ziel, die durch aktive Immunisierung induzierten HBsAg-spezifischen CD4<sup>+</sup>T-Zellen und deren Interaktion mit HBV-infizierten humanen Hepatozyten funktionell zu charakterisieren. Durch experimentelle Untersuchungen anhand der Infektionsmodelle der primären humanen Hepatozyten und der Hepatom-Zell-Linien sollte die Wirkung von impfinduzierten HBsAg-spezifischen CD4<sup>+</sup>T-Zellen auf die HBV-Infektion humaner Hepatozyten untersucht werden.

Hierfür sollte zunächst am humanen *in vitro* HBV-Infektionsmodell die Virusreplikation auf Protein- und RNA-Ebene untersucht werden. Für den Nachweis der viralen Transkription sollte ein quantitatives Echt-Zeit RT-PCR-System etabliert werden, um damit die 3,5-kb RNA (prägenomische RNA) sowie die 2,4-kb RNA (RNA für die Oberflächenantigene) zu detektieren. Anhand der Nachweissysteme der Infektion auf Translations- und Transkriptionsebene sollte die Wirkung der T<sub>H</sub>-Typ1-Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  auf die HBV-Infektion humaner Hepatozyten untersucht werden.

Voraussetzung für die funktionellen Interaktionen der CD4<sup>+</sup>T-Zellen mit den Hepatozyten ist die Expression von MHC-Klasse-II in Lebergewebe. Deshalb sollte die Expression von MHC-Klasse-II sowie MHC-Klasse-I anhand etablierter quantitativer Echt-Zeit RT-PCR-Systeme untersucht werden.

Nach Etablierung eines Kokulturmodells für Immunzellen und Hepatozyten sollte eine Beeinflussung der Hepatitis-B-Virusreplikation durch virusspezifische Immunzellen untersucht und näher charakterisiert werden. Parallel dazu sollten diese Versuche mit dem Kontrollkollektiv HBV-naiver Immunzellen ungeimpfter Spender durchgeführt werden. Des Weiteren sollte festgestellt werden, durch welche löslichen Faktoren – Zytokine – seitens der Immunzellen eine Beeinflussung der Virusreplikation vermittelt werden könnte.

**Zusammenfassend lassen sich die Ziele dieser Arbeit wie folgt formulieren:**

- Charakterisierung der Virusreplikation im humanen HBV-Infektionsmodell auf Protein- und RNA-Ebene
- Untersuchung der antiviralen Wirkung der rekombinanten T<sub>H</sub>-Typ1-Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  auf die HBV-Infektion
- Überprüfung der MHC-Expression im humanen Hepatozyten-Kulturmodell als Grundlage für die Interaktion von CD4<sup>+</sup>T-Zellen mit Hepatozyten
- Etablierung eines Kokulturmodells für HBV-infizierte Hepatozyten und Immunzellen
- Untersuchung der Effekte impfinduzierter HBsAg-spezifischer CD4<sup>+</sup>T-Zellen auf die HBV-Infektion humaner Hepatozyten
- Identifizierung der durch die Kokultur bei den Immunzellen induzierten Zytokine

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### Allgemeine Bedingungen

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Zellen erfolgte unter Wasserdampf-Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> (Brutschrank Heraeus Institutes; Langenselbold). Das Fötale Kälberserum (FCS; PAN<sup>TM</sup>Biotech; Aidenbach), das allen Kulturmedien zugesetzt wurde, wurde vor Gebrauch zur Zerstörung der Komplementfaktoren 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert.

#### Bestimmung von Konzentration und Vitalität der Zellen

Die Bestimmung der Konzentration und der Vitalität der in Kultur gehaltenen Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, die die Quantifizierung der Zellen durch ein in die Zählkammer integriertes Raster ermöglicht. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension, falls nötig 1 : 10 verdünnt, auf die Zählkammer aufgebracht, wobei die unter dem Lichtmikroskop ermittelte Zellzahl aus 16 Kleinquadraten durch Multiplikation mit dem Faktor 10<sup>4</sup> und eventuellem Verdünnungsfaktor die Anzahl von Zellen pro ml Gesamtkultur wiedergibt.

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden 100 µl der Zellsuspension mit der gleichen Menge einer 0,5 %igen Trypanblau-Lösung (Sigma Aldrich; Taufkirchen) vermischt. Diese Lebend-Tot-Färbung lässt tote, durch Eindringen des Farbstoffes in die Zellmembran blau gefärbte Zellen, von lebenden, transparenten Zellen unterscheiden und so die Vitalität der Gesamtkultur errechnen.

#### 2.1.1 Primäre humane Hepatozyten

Die für diese Arbeit verwendeten primären humanen Hepatozyten stammten von Patienten, bei denen aufgrund eines sekundären Lebertumors eine Indikation zur Leberteilresektion gegeben war. Die Betreuung der Patienten und die operative Entfernung des Lebertumors erfolgte in der Klinik und Poliklinik für Chirurgie. Durch die Stiftung *Human Tissue and Cell Research (HTCR)* wurden die rechtlich und ethischen Rahmenbedingungen für die Verwendung des humanen Gewebes geschaffen und die Aufklärung der Patienten zur Leberzellspende durchgeführt. Nach operativer Entfernung des Gewebes und histopathologischer

Begutachtung im Institut für Pathologie wurde das nicht benötigte gesunde Lebergewebe zur weiteren Präparation der Leberzellen dem *Zentrum für Leberzellforschung (ZLF)* übergeben und dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene für die geplanten *in vitro* Infektionsversuche zur Verfügung gestellt.

### Isolierung von primären humanen Hepatozyten

Die Isolierung und Reinigung primärer humaner Hepatozyten (PHH) wurde nach einer modifizierten Zwei-Schritt-Kollagenase-Perfusionstechnik (Alpini et al., 1994) von Mitarbeitern des *ZLF* durchgeführt.

Die gewogenen, tumorfreien und nicht zirrhotischen Leberresektate wurden mit Lochsonden geeigneter Größe kanüliert und mit Krebs-Ringer-Puffer (154 mM NaCl; 5,6 mM KCl; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 20 mM HEPES; 5 mM Glukose; 1 mM EDTA; pH 7,4) zur Entfernung von Blutresten gespült. Diese 10-minütige Perfusion wurde mit auf 37°C erwärmter, über poröse Silikonschläuche carbogener Spüllösung durchgeführt. Zum proteolytischen Abbau der extrazellulären Matrix und zur Lösung der Hepatozyten aus dem Gewebeverband erfolgte eine 10-minütige Kollagenase-Behandlung (0,05 % (w/v) Kollagenase und 5 mM CaCl). Nach Öffnung der Kapsel mit einem Skalpell wurde das Gewebe in Waschpuffer (120 mM NaCl; 6,2 mM KCl; 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM HEPES; 0,2 % (v/v) Rinderserumalbumin) geschüttelt. Zur Vereinzelung der Zellen wurde diese Zellsuspension nacheinander durch zwei Nylon-Netze mit 210 µm und 70 µm Porenweite filtriert. Nach vorsichtiger Sedimentation der Hepatozyten wurden die Zellen dreimal mit Waschpuffer gewaschen und zur Anreicherung der vitalen Zellen dreimal im Ausschwingrotor zentrifugiert (20 × g<sub>e</sub>; 5 min; 4°C). Die kurzzeitige Lagerung der isolierten primären humanen Hepatozyten bis zur Inkulturnahme erfolgte auf Eis.

### Inkulturnahme primärer humaner Hepatozyten

Das Aussäen der Hepatozyten erfolgte in Kulturmedium *DMEM* (Sigma Aldrich; Taufkirchen) mit 10 % FCS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (Sigma Aldrich; Taufkirchen), 1,4 % (v/v) Insulin (Insuman Rapid 40 IU/ml; Aventis Pharma; Bad Soden a. Ts.) und 0,8 % (v/v) Glukagon (GlucaGen® 1 IU/ml; Novo Nordisk A/S Bagsvaerd; Norwegen) auf Kollagenbeschichteten 6-well-Platten (*Biocoat Collagen I Cellware*; Becton Dickinson; Heidelberg) in einer Konzentration von  $1,6 \times 10^6$  Zellen pro well. Für eine gleichmäßige Absetzung der Hepatozyten und zur Vermeidung der Zusammenlagerung der Zellen in der Mitte der well, wurden die Hepatozyten nach Aussaat dreimal im Abstand von je 20 Minuten vorsichtig aufgeschüttelt.

## Kultivierung primärer humaner Hepatozyten

Zum Entfernen von verstoffwechseltem und verbrauchtem Kulturmedium und zur Aufrechterhaltung der Stoffwechselvorgänge der Hepatozyten wurde täglich ein Medienwechsel durchgeführt. Je nach Vitalitätszustand der Zellen (beurteilt mittels Mikroskopie) wurde an Tag 2 beziehungsweise Tag 3 nach der Inkulturnahme auf Kulturmedium mit Zusatz von 1 % (v/v) DMSO (Sigma Aldrich; Taufkirchen) umgestellt.

## *In vitro* Infektionen mit Hepatitis-B-Virus-haltigen Seren

Für die *in vitro* Infektionsversuche wurden verschiedene Serumproben chronischer Hepatitis-B-Virus-Träger aus der virologischen Diagnostikabteilung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg bezogen. Die Viruslast der verwendeten Serumproben, die über Amplifizierung der viralen DNA mittels *TaqMan*-PCR bestimmt wurde, betrug  $1 \times 10^9$  Virus-Kopien/ml. Die einzelnen Serumproben wurden nach der Blutentnahme aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Infektion der primären humanen Hepatozyten mit Hepatitis-B-Virus erfolgte an Tag 6 bis 8 nach Aussaat. Pro Infektionsansatz (*well*) wurde in 1 ml Inokulum eine Virus-Konzentration von  $1 \times 10^7$  Kopien/ml eingesetzt. Dafür wurde das entsprechende Volumen des HBV-haltigen Serums zum Kulturmedium gegeben. Dem Inokulum wurden zusätzlich 5 % (w/v) PEG 6'000 (Fluka Chemie AG; Buchs; Schweiz) zugesetzt, das aufgrund seiner fusogenen Wirkung auf die Zellmembran die spezifische Anlagerung und Aufnahme des Virus erleichtert (Gripon et al., 1993).

In allen Versuchsreihen wurde eine Negativ-Kontrolle mitgeführt, für die vor Infektionsbeginn die Zellen eines *well* mit EtOH abgetötet wurden. Hiefür wurden die Zellen drei Minuten mit 1 ml 50 % EtOH inkubiert. Nach Absaugen des EtOH wurden die Zellen dreimal mit Kulturmedium für je mindestens 15 Minuten gewaschen.

Für die Infektion wurden die Hepatozyten 14 Stunden mit dem viralen Inokulum inkubiert. Nach Abnahme der Infektionsüberstände wurden die Zellen in den folgenden zehn Stunden fünfmal – im Abstand von zwei Stunden – mit Kulturmedium gewaschen, um passiv gebundene und mit dem Inokulum im Überschuss zugeführte virale DNA und Antigene (HBsAg, HBeAg) zu entfernen. Je nach Fragestellung im jeweiligen Versuch wurden ab Tag 1 bis Tag 14 nach Infektion die Zellüberstände im regelmäßigen 24-Stunden-Wechsel abgenommen und durch neues Kulturmedium ersetzt. Die gesammelten Kulturüberstände wurden bis zu ihrer quantitativen Vermessung von viraler DNA, HBsAg und HBeAg (vgl. Kapitel 2.3 auf Seite 33) bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

Eine Interpretation des Infektionsverlaufs erfolgte durch die täglich im Zellkulturüberstand gemessenen Konzentrationen an viraler DNA und viraler Antigene, HBsAg und HBeAg.

### 2.1.2 Hepatom-Zell-Linien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HepG2.215-Zellen und HepG2.4A5-Zellen kultiviert, die stabil mit dem Hepatitis-B-Virus transfiziert sind und konstitutiv HBV-DNA, HBsAg und HBeAg produzieren und in den Zellkultur-Überstand abgeben (Sells et al., 1987; Weiss et al., 1996). Aufgrund dieser konstitutiven Virusexpression repräsentieren HepG2.215- und HepG2.4A5-Zellen einen chronischen Hepatitis-B-Infektionsstatus. Zudem wurden die Linien HepG3 und PLK/PRF verwendet, die ausschließlich HBsAg exprimieren und sezernieren (Hofschneider et al., 1979; Daemer et al., 1980).

#### Kultivierung der Hepatom-Linien

Die adhärenenten Hepatom-Zell-Linien wurden als *Monolayer* in Polystyren-Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größe (Becton Dickinson; Heidelberg) in *DMEM*-Medium (Invitrogen; Karlsruhe) mit Zusatz von 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin (Sigma Aldrich; Taufkirchen) und 100 µg Streptomycin (Sigma Aldrich; Taufkirchen) kultiviert. Konfluente Zellen wurden zunächst mit PBS gespült und nach 3- bis 5-minütiger Inkubation mit Trypsin-EDTA (PAN<sup>TM</sup>Biotech; Aidenbach) abgelöst. Die abtrypsinisierten Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen und im Verhältnis 1 : 3 auf neue Kulturflaschen verteilt.

#### Konservierung und Rekultivierung der Hepatom-Linien

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen zunächst gewaschen, abtrypsinisiert, in Kulturmedium aufgenommen und dann durch Zentrifugation ( $300 \times g_e$ ; 8 min; RT) geerntet. Die Zellmenge von  $1 \times 10^7$  Zellen wurde in 1 ml bereits vorgekühltem Einfrier-Medium (*DMEM* mit 10 % FCS und 20 % DMSO) aufgenommen und in ein Kryogefäß abgefüllt. Nach einer 24-stündigen Zwischenlagerung bei  $-80^\circ\text{C}$  wurden die Zellen in den flüssigen Stickstoff überführt. Zur Rekultivierung wurden die Zellen auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmt, in ausreichend Medium verdünnt, pelletiert ( $300 \times g_e$ ; 8 min; RT) und nochmals mit Medium gewaschen, bevor sie in Kulturgefäße überführt wurden.

### 2.1.3 Beeinflussung der HBV-Infektion durch antiviral wirkende Zytokine

Um eine Beeinflussung der HBV-Infektion der Hepatom-Zellen und der *in vitro* infizierten PHH durch antiviral wirkende Zytokine zu untersuchen, wurde dem Kulturmedium rekombinantes TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  (beides von Immunotools; Friesothye) zugesetzt. Für die Bestimmung eines dosisabhängigen antiviralen Effektes wurden die Zytokine in unterschiedlichen Konzentrationen (1 ng/ml; 10 ng/ml; 20 ng/ml) eingesetzt.

### 2.1.4 Periphere Blut-Lymphozyten

#### Spender peripherer Blut-Lymphozyten

Die zur Durchführung dieser Arbeit benötigten peripheren Blut-Lymphozyten (PBL) stammten von freiwilligen, gesunden Personen im Alter von 22 bis 60 Jahren. Das Spender-Kollektiv beinhaltet Personen mit vollständiger Grundimmunisierung gegen Hepatitis-B sowie ungeimpfte Kontrollprobanden. Alle Geimpften wiesen einen anti-HBs Titer von  $> 100$  IU/ml auf. Zur funktionellen Charakterisierung HBV-spezifischer PBL wurden die Immunzellen in Kokulturversuchen mit HBV-infizierten humanen Hepatozyten eingesetzt.

#### Isolierung und Kultivierung von peripheren Blut-Lymphozyten

Die Gewinnung von PBL erfolgte aus heparinisiertem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation. Hierfür wurde in speziellen *Leucosep*-Röhrchen (Becton Dickinson; Heidelberg) 15 ml Ficoll (PAN<sup>TM</sup>Biotech; Aidenbach) vorgelegt und mit Blut, das 2 : 1 mit PBS (684 mM NaCl, 13 mM KCl, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O, 7,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; Merck; Darmstadt) verdünnt wurde, überschichtet. Die Auftrennung der Subzellfraktionen erfolgte bei der anschließenden 15-minütigen Zentrifugation bei  $1.000 \times g_e$  (Ausschwingrotor; RT) in Phasen aus Plasma, Lymphozyten, Ficoll und Erythrozyten. Die Lymphozytensuspension wurde abgezogen, zweimal mit je 30 ml PBS gewaschen und sedimentiert ( $300 \times g_e$ ; 8 min; RT). Nach Aufnahme des Zell-Pellets in *RPMI*-Medium (RPMI 1640; PAN<sup>TM</sup>Biotech; Aidenbach) mit Zusatz von 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg Streptomycin wurde die Zellzahl ermittelt und die Zellen in die entsprechenden Versuche eingesetzt.

### 2.1.5 Kokultur von peripheren Blut-Lymphozyten mit HBV-infizierten Hepatozyten

Um eine Wirkung impfinduzierter HBsAg-spezifischer CD4<sup>+</sup>T-Zellen auf die Hepatitis-B-Virusinfektion humaner Hepatozyten zu untersuchen, wurden PBL mit primären *in vitro* infizierten Hepatozyten und mit den konstitutiv HBV-exprimierenden Hepatom-Zellen kultiviert. Zur Vermeidung der Alloreaktivität der heterologen Immunzellen gegen die Hepatozyten, wurden in Kokulturversuchen die PBL von den Hepatozyten durch ein Zellsieb getrennt. Die Membran der verwendeten Zellsiebe (Becton Dickinson; Heidelberg) wies Porendurchmesser von 0,4 µm auf und war für lösliche Faktoren permeabel. Nach Etablierung des Kokultur-Modells wurden die Versuche wie folgt durchgeführt:

Um den Einfluss der HBV-spezifischen PBL auf die Virusreplikation der Primärinfektion zu untersuchen, wurden 24 Stunden nach *in vitro* Infektion der primären Hepatozyten  $5 \times 10^6$  PBL in einem Zellsieb auf die Hepatozytenkultur eines *well* transferiert und die Zellüberstände der Kokultur im Verlauf von 14 Tagen gewonnen. Um die Wirkung der PBL

auf die Virusreplikation der Hepatom-Zellen zu untersuchen, wurden  $1 \times 10^6$  Hepatozyten *pro well* in 6-*well*-Platten ausgesät. Nach Bildung eines konfluenten Zellrasens wurden die PBL in den Zellsieben auf die Hepatom-Kultur transferiert und für 48 Stunden kokultiviert.

## 2.2 Etablierung von *real-time* RT-PCR-Systemen zum Nachweis der Hepatitis-B-Virus-RNA und der RNA des Haupthistokompatibilitätskomplexes

Der Nachweis spezifischer RNA wurde quantitativ mittels Echt-Zeit (*real-time*) Reverser Transkriptase-PCR durchgeführt. Hierfür wurden spezifische RT-PCR-Systeme entwickelt und etabliert, mit welchen anhand entsprechender Eichreihen, die auf einer Verdünnungsreihe *in vitro* transkribierter RNA basieren, die RNA quantifiziert werden konnte. Die quantitative Bestimmung der RNA erfolgte am *ABI PRISM 7000 Sequence Detection System* (Perkin Elmer; Applied Biosystems; Foster City; USA) mittels *TaqMan*-PCR. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) bezogen und in einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  in 10 mM Tris (pH 8,5; Invitrogen; Karlsruhe) gelöst.

### Technologie der *TaqMan*-PCR

Die Technologie der *TaqMan*-PCR beruht auf dem Einsatz einer fluorogenen Sonde, die am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff *FAM* (6-Carboxy-fluorescein) und am 3'-Ende mit dem *Quencher TAMRA* (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin) markiert ist. Beide Farbstoffe besitzen ein unterschiedliches Emissionsmaximum. Die fluorogene Sonde bindet unmittelbar hinter dem 5'-*Primer* an den gleichen Strang wie dieser. Solange die Sonde intakt ist, wird bei Anregung mittels Laser die absorbierte Energie von *FAM* direkt auf *TAMRA* übertragen, so dass nur dessen Fluoreszenz detektiert wird. Durch Synthese eines Amplifikationsproduktes spaltet die 5'-3' Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase die Sonde und trennt die beiden Farbstoffe damit voneinander. In diesem Falle wird die Fluoreszenz von *FAM* messbar, wobei der Anstieg dieses Signals direkt proportional zur Menge des entstehenden PCR-Produktes ist.

### 2.2.1 Nachweis der Hepatitis-B-Virus-RNA

Neben der Beurteilung der HBV-Infektion anhand der aus dem Zellkulturüberstand gewonnenen viralen Produkte (HBsAg, HBeAg, virale DNA) wurde der definierte Beginn der Virusreplikation durch Messung der viralen Transkripte festgestellt. Zum Nachweis der HBV-spezifischen RNAs wurde jeweils ein System für die 3,5-kb RNA (C-HBV; dient als RNA für die Translation des HBcAg sowie der Polymerase) sowie für die 2,4-kb RNA (S-HBV; RNA für die verschiedenen Formen des HBsAg) entwickelt.



Die für die Quantifizierung der viralen RNAs verwendeten Oligonukleotide sind der Tabelle 2.1 zu entnehmen.

Oligonukleotid		Sequenz (5' - 3')
<b>C-HBV</b>	Primer Reverse	GTT TCC GGA AGT GTT GAT AAG ATA GG
<b>C-HBV</b>	Primer Forward	TGG TCT CTT TCG GAG TGT GGA T
<b>C-HBV</b>	Sonde	<i>FAM</i> - CGC ACT CCT CCA GCC TAT AGA CCA CCA A - <i>TAMRA</i>
<b>S-HBV</b>	Primer Reverse	ATA TGA TAA AAC GCC GCA GAC AC
<b>S-HBV</b>	Primer Forward	CAA CCT CCA ATC ACT CAC CAA C
<b>S-HBV</b>	Sonde	<i>FAM</i> - TCC TCC AAT TTG TCC TGG TTA TCG CT - <i>TAMRA</i>

**Tab. 2.1:** Oligonukleotide für den spezifischen Nachweis der 3,5-kb C-HBV RNA sowie der 2,4-kb S-HBV RNA

Mit Hilfe des Programmes *Primer Express<sup>TM</sup>*, Version 2.0, (ABI Prism<sup>®</sup>; Applied Biosystems; Foster City; USA) wurden äußere *Primer* (*ex Reverse* bzw. *ex Forward*) für die Amplifikation der zu klonierenden Sequenzabschnitte generiert (Tabelle 2.2).

Oligonukleotid		Sequenz (5' - 3')
<b>C-HBV</b>	ex Reverse	TGA AGT TTC CCA CCT TAT GAG TCC AAG
<b>C-HBV</b>	ex Forward	TGG GTG GGT AAT AAT TTG GAA GAT CCA
<b>S-HBV</b>	ex Reverse	TCG TGC AGG TTT TGC ATG GT
<b>S-HBV</b>	ex Forward	ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCG CAG

**Tab. 2.2:** Oligonukleotide für die Amplifikation der zu klonierenden viralen Sequenzabschnitte

## 2.2.2 Nachweis des Haupthistokompatibilitätskomplexes

Immunologische Voraussetzung und Grundlage für eine funktionelle Interaktion HBV-spezifischer PBL mit virusinfizierten Hepatozyten stellt die Expression der Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*Major Histocompatibility Complex; MHC*) dar. HLA-Klasse-I-Moleküle werden konstitutiv exprimiert, während HLA-Klasse-II-Moleküle generell von Zellen des Immunsystems gebildet werden. Zur Überprüfung der HLA-Expression durch Hepatozyten wurden quantitative und spezifische Nachweissysteme entwickelt.

Für den Nachweis von MHC-Klasse-II wurden neben dem Locus CD40 die bereits in der Literatur beschriebenen Loci von HLA-DR $\alpha$  und des Ko-Transaktivators CIITA gewählt (Magner et al., 2000; Tab. 2.3).

Oligonukleotid		Sequenz (5' - 3')
<b>CD40</b>	Primer Reverse	CAA TCT GCT TGA CCC CAA AG
<b>CD40</b>	Primer Forward	GAG GCC TGT GAG AGC TGT GT
<b>CD40</b>	Sonde	<i>FAM</i> - TGC ACC GCT CAT GCT CGC C - <i>TAMRA</i>
<b>HLA-DR<math>\alpha</math></b>	Primer Reverse	ATG AAG ATG GTC CCA ATA ATG ATG
<b>HLA-DR<math>\alpha</math></b>	Primer Forward	CTC TTC TCA AGC ACT GGG AGT TT
<b>HLA-DR<math>\alpha</math></b>	Sonde	<i>FAM</i> - TGC TCC AAG CCC TCT CCC AGA GAC - <i>TAMRA</i>
<b>CIITA</b>	Primer Reverse	TGG GAG TCC TGG AAG ACA TAC TG
<b>CIITA</b>	Primer Forward	AGC AGG CTG TTG TGT GAC ATG
<b>CIITA</b>	Sonde	<i>Fam</i> - AGG GAG GCT TAT GCC AAT ATC GCG G - <i>TAMRA</i>

**Tab. 2.3:** Oligonukleotide für den spezifischen Nachweis der MHC-II-Expression

Der Nachweis von MHC-Klasse-I sollte anhand der Loci HLA-A, HLA-B, HLA-C und  $\beta_2$ M (beta<sub>2</sub>-Mikroglobulin) erfolgen. Aufgrund des polygenen und polymorphen Charakters des HLA-Komplexes wurden zunächst alle Einträge kaukasischer Gensequenzen der *NCBI*-Datenbank (*National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) für diese Loci mit Hilfe der *HUSAR*-Anwenderplattform (*Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources*; <http://genius.embnnet.dkfz-heidelberg.de>) gegeneinander verglichen. Dadurch konnten konservierte Bereiche lokalisiert werden. Für das Design der PCR-Systeme innerhalb der konservierten Bereiche wurde das Programm *Primer Express<sup>TM</sup>*, Version 2.0, (ABI Prism<sup>®</sup>; Applied Biosystems; Foster City; USA) verwendet. *Primer* und Sonden wurden damit hinsichtlich Schmelzpunkt und GC-Gehalt optimal aufeinander abgestimmt. Die Oligonukleotide für die spezifische Quantifizierung von MHC-Klasse-I sind in der Tabelle 2.4 beschrieben.

Oligonukleotid		Sequenz (5' - 3')
HLA-A	Primer Reverse	TGG GAA GAC AGC TCC CAT CT
HLA-A	Primer Forward	TGC CAT GTG CAG CAT GAG
HLA-A	Sonde	FAM - TCT GCC CAA GCC CCT CAC CC - TAMRA
HLA-B	Primer Reverse	TAC ATG CTC TGG AGG GTG TGA
HLA-B	Primer Forward	GAA CCT GCG CGG CTA CT
HLA-B	Sonde	FAM - CAA CCA GAG CGA GGC CGG G - TAMRA
HLA-C	Primer Reverse	CCA CAG CTG CCC ACT TCT
HLA-C	Primer Forward	ACY CAG GAC ACC GAG CTT
HLA-C	Sonde	FAM - TGG AGA CCA GGC CAG CAG GAG A - TAMRA
β <sub>2</sub> M	Primer Reverse	TTA CAT GTC TCG ATC CCA CTT AAC T
β <sub>2</sub> M	Primer Forward	GAG TAT GCC TGC CGT GTG A
β <sub>2</sub> M	Sonde	FAM - CCA TGT GAC TTT GTC ACA GCC CAA GA - TAMRA

**Tab. 2.4:** Oligonukleotide für den spezifischen Nachweis der MHC-I-Expression

Zur Amplifikation der zu klonierenden Sequenzabschnitte von MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II wurden die in Tabelle 2.5 gelisteten *Primer* (*ex Reverse* bzw. *ex Forward*) verwendet.

Oligonukleotid		Sequenz (5' - 3')
CD40	ex Reverse	CGA TCC TGG GGA CCA CAG A
CD40	ex Forward	ATG CCT TCC TTG CGC TGA
HLA-A	ex Reverse	AGC GAC CAC AGC TCC AGT G
HLA-A	ex Forward	AGA CCA GGC CTG CAG GG
HLA-B	ex Reverse	GTC CTC GTT CAG GGC GAT G
HLA-B	ex Forward	CGT GGA TAG AGC AGG AGG GG
HLA-C	ex Reverse	ATG GGG ATG GTG GGC TG
HLA-C	ex Forward	ACC ATG AGG CCA CCC TG
β <sub>2</sub> M	ex Reverse	CAA AGT AGA ATT ATA AAG AAG ATC ATG TCC AT
β <sub>2</sub> M	ex Forward	GAC TTA CTG AAG AAT GGA GAG AGA ATT GA

**Tab. 2.5:** Oligonukleotide für die Amplifikation der zu klonierenden Sequenzabschnitte

### 2.2.3 Herstellung der RNA-Eichreihen

Zur Quantifizierung der RNA wurden serielle Verdünnungen *in vitro* transkribierter RNA verwendet. Dazu wurden die entsprechenden Sequenzabschnitte aus revers transkribierter cDNA aus Epstein-Barr-Virus-infizierten Raji-Zellen (MHC-Klasse-I bzw. MHC-Klasse-II) bzw. pHBV991 (virale Transkripte) mittels konventioneller PCR amplifiziert (vgl. *Primer* Tab. 2.2, 2.3, und 2.5). Alle Reagenzien für die Reverse Transkription und die sich anschließende konventionelle PCR wurden von Applied Biosystems (Foster City; USA) bezogen.

Die Reverse Transkription erfolgte für 30 Minuten bei 42°C in einem Reaktionsgemisch aus 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 × PCR-Puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3), je 4 mM dNTPs, 1,0 U/μl RNase Inhibitor, 1,0 U/μl Reverser Transkriptase und 270 nM *Primer Reverse*. Abschließend folgte ein 10-minütiger Hitzeschritt bei 94°C. Die anschließende konventionelle PCR zur Amplifikation der zu klonierenden Sequenzabschnitte erfolgte in einem Reaktionsgemisch aus 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 × PCR-Puffer, je 4 mM dNTPs, je 270 nM *Primer Reverse* bzw. *Forward* und 1,5 U/μl AmpliTaq® DNA Polymerase. Die *Annealing*-Temperatur für die konventionelle PCR wurde für jedes System in Vorversuchen optimiert (Tab. 2.6).

System	Annealing-Temperatur
C-HBV	63°C
S-HBV	56°C
HLA-A	57°C
HLA-B	61°C
HLA-C	55°C
β <sub>2</sub> M	57°C
CD40	55°C
HLA-DRα	58°C
CHTA	60°C

**Tab. 2.6:** *Annealing*-Temperaturen für die konventionelle PCR

Im Temperaturprofil der durchgeführten konventionellen PCR folgten einem initialen Denaturierungsschritt (5 Minuten bei 95°C) 40 Zyklen mit jeweils 30 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei der entsprechenden *Annealing*-Temperatur und 30 Sekunden bei 72°C. Eine 10-minütige Inkubation bei 72°C schloss die Amplifikation ab.

Die Amplifikate wurden auf einem 1 %-Agarose-Gel (LE-Agarose; Biozym; Hessisch Oldendorf) aufgetrennt und gemäß dem *QIAquick gel-extraction Kit* (Qiagen; Hilden) aus der Gelmatrix aufgereinigt. Da die Amplifikation mit der verwendeten *Taq*-Polymerase zu einem einzelnen Adenosin-Überhang am 3'-Ende der Amplifikate führt, konnten diese direkt mit dem *pcrII-TOPO*-Vektor ligiert werden, der über einen 5'-Thymidin-Überhang verfügt. Die Ligation und anschließende Transformation in chemisch kompetente *E. coli* erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (*TOPO TA Cloning Kit Dual Promoter* von Invitrogen;

Karlsruhe). Die transformierten Bakterien wurden auf mit 1,6 mg X-Gal (Roche; Mannheim) beschichteten LB<sub>Amp</sub>-Platten ausgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Dabei wurde mittels der vom Vektor vermittelten Ampicillin-Resistenz und über die Blaufärbung von Kolonien, die den intakten Vektor ohne das gewünschte Insert enthalten, auf Kolonien selektioniert, die den Vektor mit integriertem Insert aufgenommen hatten und sich als weiße Kolonien identifizieren ließen. Mit einigen weißen Kolonien wurden mehrere 5 ml LB<sub>Amp</sub>-Kulturen angeimpft und nach Inkubation über Nacht Plasmid-DNA (*QIAprep Spin Miniprep Kit* von Qiagen; Hilden) isoliert. Mittels PCR wurde die Vollständigkeit des Inserts überprüft und anschließend 100 ml LB<sub>Amp</sub>-Kulturen beimpft. Aus diesen Kulturen konnte mit dem *QIAfilter Plasmid Midi Kit* (Qiagen; Hilden) eine größere Menge an Plasmid-DNA gewonnen werden, deren Konzentration anhand der Absorption bei 260 nm photometrisch quantifiziert wurde. Eine Sequenzierung des Inserts sowie der angrenzenden Bereiche des Vektors, die von der Firma *GENEART* (Regensburg) durchgeführt wurde, gab Aufschluss über die Orientierung des Inserts im Vektor.

Ca. 50 µg der DNA wurden mittels Restriktionsverdau innerhalb der Vektorsequenz hinter dem Insert linearisiert (C-HBV, S-HBV, HLA-A, HLA-C,  $\beta_2$ M, HLA-DR- $\alpha$ : BamHI; HLA-B, CD40, CIITA: EcoRV; Roche; Mannheim), über ein Agarose-Gel aufgetrennt und aus der Gelmatrix aufgereinigt. Die *in vitro* Transkription wurde mit dem *RiboMax large scale RNA production system SP6* bzw. *T7* (Promega; Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Grundlage hierfür ist das Vorhandensein je eines Promotors für die SP6- und die T7-Polymerase im verwendeten Vektor, so dass je nach Orientierung des Inserts im Vektor die RNA transkribiert werden kann. Vor der photometrischen Konzentrationsbestimmung der RNA anhand der Absorption bei 260 nm musste die Vektor-DNA entfernt werden. Hierfür wurde die RNA-Präparation einem RNase-freien DNA-Verdau unterzogen, anschließend über *RNeasy*-Säulchen aufgereinigt und mittels *TaqMan*-PCR die Reinheit der RNA überprüft.

Da die Länge der einzelnen Transkripte (Insert mit Vektoranteil (bp): C-HBV 514, S-HBV 444, HLA-A 352, HLA-B 358, HLA-C 399,  $\beta_2$ M 489, CD40 521, HLA-DR $\alpha$  270, CIITA 212) bekannt ist, konnte aus der Konzentration der präparierten RNA über folgende Formeln auch die Anzahl der Transkripte berechnet werden.

$$\text{pmol of ssRNA} = \mu\text{g (of ssRNA)} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{1 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ pmol}}{340 \text{ pg}} \times \frac{1}{N_b} = \frac{\mu\text{g (of ssRNA)} \times 2941}{N_b}$$

$$\frac{\text{mol}}{\text{ml}} \times N_A = \text{Kopien pro ml} \quad N_A = 6,022 \times 10^{23} \text{ Kopien pro mol}$$

ssRNA = einzelsträngige RNA;  $N_A$  = Avogadro-Konstante

Die Transkripte wurden in RNase-freiem Wasser mit 10 µg/ml transferRNA (tRNA; Sigma Aldrich; Taufkirchen) seriell von  $10^9$  -  $10^0$  Transkripte / 1,5 µl / Ansatz verdünnt.

## 2.3 Nachweissysteme

### 2.3.1 Nachweis der HLA-RNA und Hepatitis-B-Virus-RNA

#### Isolierung der RNA

Die zelluläre und virale RNA wurde aus den Hepatom-Zell-Linien und *in vitro* HBV-infizierten primären humanen Hepatozyten präpariert. Nach einem Waschschrift und Abtrypsinierung der adhärennten Hepatom-Zellen konnte die entsprechende Zellmenge für die RNA-Isolierung eingesetzt werden. Die primären Hepatozyten, die auf einer Kollagenmatrix adhärennten, wurden nach einem Waschschrift direkt in der Kulturschale lysiert. Die Präparation der RNA erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Mini Kit* (Qiagen; Hilden).

Die Lyse der Zellen erfolgte durch den Lysepuffer *RLT* mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma Aldrich; Taufkirchen), gefolgt von der Homogenisierung des Zelllysats mittels *QiaShredder*-Säulchen bei einer zweiminütigen Zentrifugation bei  $20.000 \times g_e$  und Raumtemperatur (RT). Zu dem homogenisierten Lysat wurden 350  $\mu$ l 70 %iger Ethanol gegeben und die Mischung wurde auf eine *RNeasy Mini*-Säule überführt. Bei der sich anschließenden Zentrifugation ( $8.000 \times g_e$ ; 1 min; RT) erfolgte eine quantitative Adsorption der RNA an die Silica-Gel-Membran in den Säulchen. Mit jeweils 80  $\mu$ l DNase-Lösung des *RNase-free DNase Set* (Qiagen; Hilden) wurde in einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur kontaminierende DNA auf der Säule abgebaut. Nach zweimaligem Waschen der gebundenen RNA mit je 500  $\mu$ l des Puffers *RPE* und Zentrifugation ( $8.000 \times g_e$ ; 1 min; RT) wurde die RNA mit 60  $\mu$ l RNase-freiem Wasser eluiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### Quantifizierung der RNA

Für die Quantifizierung der 3,5-kb C-HBV RNA sowie der 2,4-kb S-HBV RNA wurden die in Tabelle 2.1 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Die Quantifizierung von MHC-Klasse-I erfolgte mit den in Tabelle 2.4 gelisteten Oligonukleotiden und für die Quantifizierung von MHC-Klasse-II wurden die in Tabelle 2.3 beschriebenen Oligonukleotide eingesetzt.

Vor der spezifischen Quantifizierung dieser RNAs wurde zur vollständigen Beseitigung von kontaminierender DNA in den RNA-Präparationen zunächst ein zweiter Verdau der DNA durchgeführt. Dieser erfolgte im gleichen Reaktionsansatz wie die Reverse Transkription (vgl. S. 31). Hierfür wurde isolierte RNA mit den oben beschriebenen Reaktionskomponenten, jedoch ohne Reverse Transkriptase, mit 1,0 U DNase (Roche; Mannheim) gemischt und 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Eine folgende Hitzedenaturation für 5 Minuten bei  $94^\circ\text{C}$  eliminierte die Aktivität der DNase. Nach Abschluss der DNase-Behandlung wurden dem Reaktionsgemisch 1,0 U RNase-Inhibitor und 1,0 U Reverse Transkriptase zugegeben. Die Reverse Transkription wurde wie auf Seite 31 beschrieben durchgeführt. Unmittelbar nach dem Umschreiben der RNA in cDNA wurde diese zur Quantifizierung in die *TaqMan*-PCR eingesetzt.

Bei der experimentellen Optimierung der einzelnen Komponenten der PCR-Systeme zeigte sich hinsichtlich der Konzentrationen von  $\text{MgCl}_2$ , *Primer* und Sonden, dass alle Systeme parallel standardisiert werden konnten. Für die Quantifizierung der RNA wurde folgender Reaktionsansatz (*TaqMan*-Puffer,  $\text{MgCl}_2$ , dNTPs und Polymerase von Applied Biosystems; Foster City; USA) in einem Gesamtvolumen von 40  $\mu\text{l}$  gemischt (Tab. 2.7):

Reagens	Konzentration
$\text{H}_2\text{O}$ 0,1 % DEPC (Carl Roth; Karlsruhe)	
1 x <i>TaqMan</i> Puffer	
$\text{MgCl}_2$	7 mM
dNTPs	je 4 mM
Primer Reverse	300 nM
Primer Forward	300 nM
Sonde	200 nM
AmpliTa <sup>®</sup> Gold <sup>TM</sup> Polymerase	1,0 U

**Tab. 2.7:** *TaqMan*-Reaktionskomponenten für die Quantifizierung der Hepatitis-B-Virus-RNAs und der MHC-RNAs

Zu diesem Ansatz wurden 10  $\mu\text{l}$  cDNA pipettiert. Nach kurzem Abzentrifugieren der Reaktionsansätze wurde die *TaqMan*-PCR gestartet, wobei für eine optimale Aktivierung der *Taq*-Polymerase eine *Hot Start*-PCR gewählt wurde. Die cDNA wurde mit dem in Tabelle 2.8 beschriebenen zweistufigem Programm amplifiziert.

<b>Stufe 1</b>	1 Zyklus			
	Schritt 1:	Denaturierung	95°C	10 min
<b>Stufe 2</b>	45 Zyklen			
	Schritt 1:	Denaturierung	95°C	15 sec
	Schritt 2:	Primer Annealing und Primer Extension	60°C	1 min

**Tab. 2.8:** Temperaturschema der *TaqMan*-PCR für die Quantifizierung der Hepatitis-B-Virus-RNAs und der MHC-RNAs

Die Auswertung der RNA-Konzentration in unbekannten Proben erfolgte durch Vergleich mit der seriellen Verdünnung *in vitro* transkribierter RNA.

### 2.3.2 Nachweis der Hepatitis-B-Virus-DNA

#### Isolierung der viralen DNA

Der quantitative Nachweis der viralen DNA in Kopien/ml wurde aus den verwendeten Seren, den Zellüberständen der Hepatom-Zell-Linien und nach *in vitro* Infektion der primären humanen Hepatozyten vorgenommen. Die Isolierung der viralen Nukleinsäure erfolgte standardgemäß mit Hilfe des *QIAamp Blood and Tissue Kit* (Qiagen; Hilden).

Die Präparation der viralen DNA wurde aus 200 µl einer 1 : 10-Verdünnung der zu testenden Proben in PBS durchgeführt. Zur Freisetzung der Nukleinsäure aus den Viruspartikeln wurde das Material in Anwesenheit von 200 µl Lysepuffer *AL* und 25 µl Protease bei 56°C 10 Minuten inkubiert. Die folgende Zugabe von 200 µl 96 %igem EtOH bewirkte bei der sich anschließenden Zentrifugation (6.000×g<sub>e</sub>; 1 min; RT) eine quantitative Adsorption der viralen DNA an eine Silica-Gel-Membran in den sog. *spin columns*. Die gebundene DNA wurde zweimal mit je 500 µl des ethanolhaltigen Waschpuffers *AW1* bzw. *AW2* gewaschen. Die abschließende Elution der viralen DNA erfolgte mit 100 µl des Elutionspuffers *AE* durch Zentrifugation (6.000×g<sub>e</sub>; 1 min; RT).

### Quantifizierung der viralen DNA

Die quantitative Bestimmung der viralen DNA erfolgte ebenfalls am *ABI PRISM 7000 Sequence Detection System* (Perkin Elmer; Applied Biosystems; Foster City; USA) mittels *TaqMan*-PCR.

Die für die Amplifikation der Hepatitis-B-Virus-DNA verwendeten und von Weinberger et al., 2000, beschriebenen Oligonukleotide sind in Tabelle 2.9 gelistet.

Oligonukleotid		Sequenz (5' - 3')
<b>HBV</b>	Primer Reverse	ATA TGA TAA AAC GCC GCA GAC AC
<b>HBV</b>	Primer Forward	CAA CCT CCA ATC ACT CAC CAA C
<b>HBV</b>	Sonde	<i>FAM</i> - TCC TCC AAT TTG TCC TGG TTA TCG CT - <i>TAMRA</i>

**Tab. 2.9:** Oligonukleotide für den spezifischen Nachweis der Hepatitis-B-Virus-DNA

Die Komponenten für die Amplifikation der viralen DNA, die in Tabelle 2.10 aufgeführt sind, wurden zu einem Gesamtvolumen von 50 µl zusammenpipettiert.

Reaktionskomponenten
H <sub>2</sub> O 0,1 % DEPC (Carl Roth; Karlsruhe)
2 x <i>TaqMan PCR Universal Mastermix</i> :
dNTPs
Taq-Polymerase
MgCl <sub>2</sub> (5 mM)
(Applied Biosystems; Foster City; USA)
Primer Reverse 300 nM
Primer Forward 300 nM
Sonde 200 nM
virale DNA-Matrize

**Tab. 2.10:** *TaqMan*-Reaktionskomponenten für die Quantifizierung der Hepatitis-B-Virus-DNA



Nach kurzem Abzentrifugieren der Reaktionsansätze wurde das zweistufige Programm für die Amplifikation gestartet (Tabelle 2.11).

<b>Stufe 1</b>	1 Zyklus			
	Schritt 1:	Denaturierung	95°C	10 min
<b>Stufe 2</b>	45 Zyklen			
	Schritt 1:	Denaturierung	95°C	15 sec
	Schritt 2:	Primer Annealing und Primer Extension	60°C	1 min

**Tab. 2.11:** Temperaturschema der *TaqMan*-PCR für die Quantifizierung der Hepatitis-B-Virus-DNA

Die Auswertung der Quantität der viralen DNA erfolgte durch Vergleich mit einer achtstufigen Verdünnungsreihe des Plasmids pHBV991 ( $10^0$  -  $10^7$  Kopien/Ansatz) in 10 mM Tris (Metabion; Planegg-Martinsried) und 0,01 mg tRNA/ml (Sigma Aldrich; Taufkirchen).

### 2.3.3 Quantifizierung von Hepatitis-B-Virus-Antigen

#### Konzentrationsbestimmung des HBsAg

Der Nachweis von HBsAg wurde aus den Zellkulturüberständen der HBV-infizierten Hepatozyten unter Verwendung des *AXM HBsAg (V2)* von Abbott Laboratories (Wiesbaden) vorgenommen.

Zur Bestimmung von HBsAg wurden monoklonale anti-HBs beschichtete Mikropartikel verwendet. 200 µl der zu testenden Probe wurden in einer Inkubationskammer mit Primärantikörper-beschichteten Mikropartikeln und Biotin-markiertem Sekundär-Antikörper vermischt. Durch Bindung von vorhandenem HBsAg an die mit anti-HBs-beschichteten Mikropartikel sowie an das Biotin-markierte anti-HBs bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe. Ein Teil dieser Komplexe adsorbiert an eine Glasfibrermatrix, an die die Mikropartikel irreversibel binden. Der nun zupipettierte anti-Biotin-alkalische Phosphatase-konjugierte Antikörper bindet an die Komplexe. Nach Zugabe von 4-Methylumbelliferyl-Phosphat, dem Substrat der alkalischen Phosphatase, wird die Bildung des fluoreszierenden Produkts optisch detektiert. Der Nachweis von HBsAg erfolgt durch den Vergleich der Bildungsrate des fluoreszierenden Reaktionsprodukts mit dem aus der Reaktionsgeschwindigkeit des Kalibrators ermittelten Grenzwert. Ist der Probenwert größer oder gleich dem Grenzwert, gilt die Probe als reaktiv für HBsAg.

Die photometrischen Werte der HBsAg-Quantifizierung werden als „*Signal to Noise*“-Ratio (S/N) angegeben, der Grenzwert beträgt 2 S/N.

#### Konzentrationsbestimmung des HBeAg

Der Nachweis von HBeAg wurde ebenfalls aus den Zellkulturüberständen der HBV-infizierten Hepatozyten vorgenommen. Hierfür wurde *AXM HBe (2.0)* von Abbott Laboratories (Wies-

baden) verwendet.

Diese Messung läuft analog der Messung des HBsAg und verwendet das Prinzip der direkten Bindung des vorhandenen HBeAg in der Probe an die mit anti-HBe (Maus, monoklonal) beschichteten Mikropartikel. Der Nachweis des gebundenen HBeAg erfolgt durch das anti-HBe-Alkalische Phosphatase-Konjugat. Die Probe gilt als reaktiv für HBeAg, wenn der Wert des fluoreszierenden Produkts in der Probe größer oder gleich dem zuvor automatisch ermittelten Grenzwert ist.

Die photometrischen Werte der HBeAg-Quantifizierung werden als „*Signal to Cut-off*“-Ratio (S/CO) angegeben, der Grenzwert beträgt 1 S/CO.

### 2.3.4 *Elispot-Assay*

Stimulation mit spezifischen Antigenen induziert bei T-Lymphozyten die Sekretion bestimmter Zytokine. Mit dem *enzym-linked-immunospot-assay* (*Elispot*) können spezifisch Zytokin-sezernierende Zellen auf Einzelzell-Niveau detektiert werden. Dadurch kann die Zahl spezifischer T-Zellen quantifiziert werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten *Elispots* hatten zum Ziel, die reaktiven T-Zellantworten von HBV-spezifischen PBL und HBV-naiven Kontroll-PBL auf HBsAg als T<sub>H</sub>-Typ1- oder T<sub>H</sub>-Typ2-Antworten zu charakterisieren. Zunächst wurde die reaktive Antwort der Immunzellen geimpfter und ungeimpfter Spender auf rekombinantes HBsAg, der immunogenen Determinante des Impfstoff-Antigens, charakterisiert. Zudem wurden mittels *Elispot* Immunzellen getestet, die in Kokultur mit HBV-infizierten Hepatozyten gehalten und durch die in der Kultur gebildeten viralen Produkte stimuliert wurden. Nach Beendigung der Kokultur wurden die PBL direkt in den *Elispot-Assay* eingesetzt und das Zytokin-Profil sowie die Zahl der Zytokin-sezernierenden Zellen bestimmt.

Zunächst wurden die 96-*well*-Nitrozellulose-Mikrotiter-Platten (MAHAN45 von Millipore; Schwalbach) mit monoklonalen Primär-Antikörper-Lösungen (Anti-human IL-2, Anti-human IL-4, Anti-human IL-10, Anti-human IL-5, Anti-human IFN- $\gamma$  und Anti-human TNF- $\alpha$ ; alle von MABTECH AB; Nacka Strand; Schweden) in einer Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  in PBS beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Entfernen der Antikörper-Lösung wurden zur Absättigung bzw. Blockierung unspezifischer Bindungsstellen die Platten zwei Stunden bei Raumtemperatur mit je 200  $\mu\text{l}$  *RPMI* mit 10 % FCS inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Platten mit PBS (200  $\mu\text{l/well}$ ) wurden  $2 \times 10^5$  PBL in einem Volumen von 150  $\mu\text{l/well}$  ausgegeben und 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Während dieser 24-stündigen Inkubation bindet gebildetes und sezerniertes Zytokin an den entsprechenden Antikörper. Nach 24 Stunden wurde die Zellsuspensionen durch viermaliges Spülen mit Waschpuffer (PBS mit 0,05 % Tween; Merck; Darmstadt; 200  $\mu\text{l/well}$ ) und abschließendem dreimaligen Waschen mit PBS (200  $\mu\text{l/well}$ ) entfernt. Danach folgte die Zugabe der entsprechenden biotinylierten Sekundär-Antikörper-Lösungen (Anti-human IL-2 Biotin,

Anti-human IL-4 Biotin, Anti-human IL-10 Biotin-12G8, Anti-human IL-5 Biotin-5A10, Anti-human IFN- $\gamma$  Biotin-7-B6-1 und Anti-human TNF- $\alpha$  Biotin-II; 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS; alle von MABTECH AB; Nacka Strand; Schweden) und eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Zur Entfernung ungebundener Sekundär-Antikörper erfolgten nach dieser Phase drei Waschschrte mit PBS (200  $\mu\text{l}/\text{well}$ ). Nun wurden die Platten zwei Stunden bei Raumtemperatur mit 200  $\mu\text{l}/\text{well}$  eines Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugats (MABTECH AB; Nacka Strand; Schweden; 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS) inkubiert. Durch abschließende Zugabe des Enzymsubstrates NBT/BCIP-Lösung (Roche; Mannheim; 1 : 50 in Färbepuffer (0,1 M Tris; 0,05 M  $\text{MgCl}_2$ ; 0,1 M NaCl) verdünnt) erfolgte die Detektion der Zytokin-*Spots*. Nach einigen Minuten wurde die kolorimetrische Reaktion durch Abspülen der Platten mit Leitungswasser gestoppt und die Platten bei Raumtemperatur getrocknet. Die quantitative Auswertung der Zytokin-*Spots* erfolgte an einem *Bioreader 2000* (BioSys; Karben). Als Grenzwert wurde der zweifache Hintergrund der Negativ-Kontrolle (Stimulation der Immunzellen mit *DMEM*-Medium) bestimmt.

## 2.4 Computer-Programme

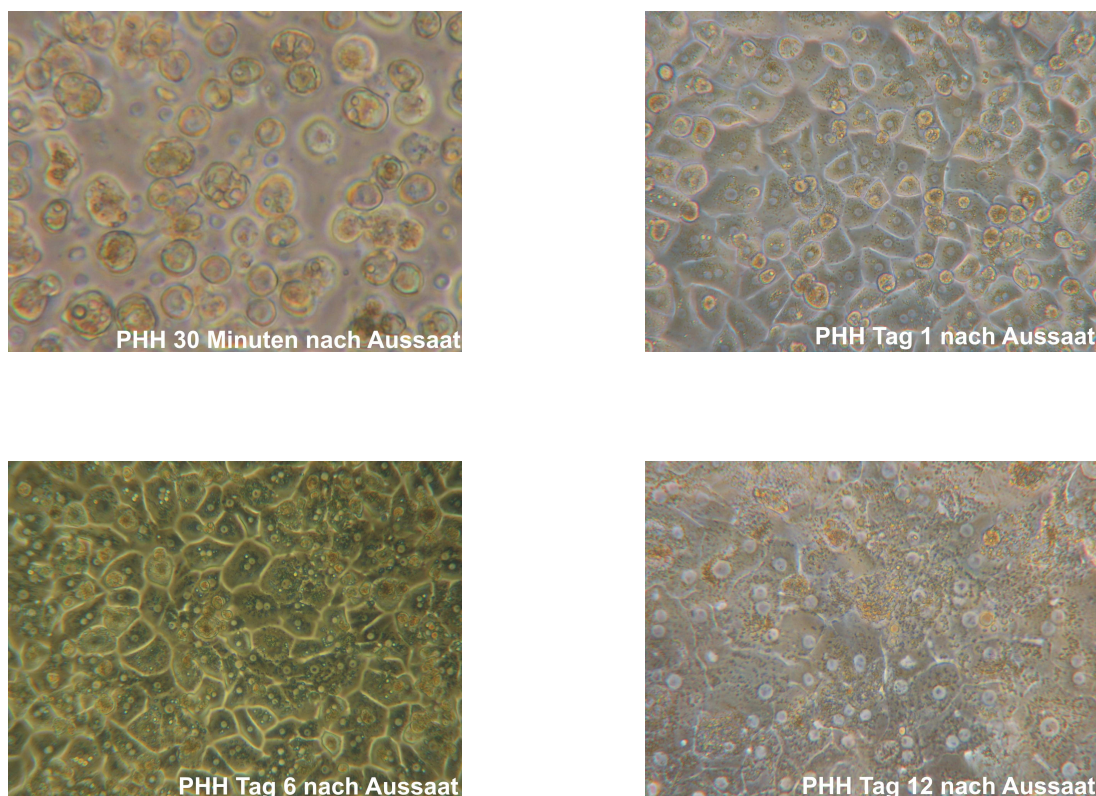
Diese Dissertation wurde mit *LyX Version 1.5.5-Win-32* verfasst. Die Statistik wurde mit *SPSS* für Windows anhand des *Mann-Whitney-Tests* durchgeführt. Die Literaturrecherche erfolgte mit Hilfe der *Medline Datenbank*. Zur Verwaltung der Literatur diente *Bibliographix Release 7*. Abbildungen und Diagramme wurden mit *SigmaPlot 8.0*, *CorelDRAW 12* und *Microsoft Excel 2003* erstellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Hepatitis-B-Virus-Infektionsmodell

#### 3.1.1 Primäre humane Hepatozyten als Modell für die Infektion

Die primären humanen Hepatozyten (PHH) wurden aus Leberteilresektaten unterschiedlicher Patienten gewonnen. Die Vitalität der durch die Zwei-Schritt-Kollagenase-Perfusionstechnik isolierten und gereinigten Zellen betrug dabei zwischen 76 und 86 %. Unmittelbar nach der Isolierung wurden die PHH in einer Konzentration von 1,6 Mio/*well* in mit Kollagen-I beschichteten 6-*well*-Kulturplatten ausgesät und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Abbildung 3.1 zeigt die morphologischen Veränderungen und die Differenzierung der Hepatozyten beginnend als noch abgerundete Zellen nach der Isolierung und im weiteren Verlauf der *in vitro* Kultur.



**Abb. 3.1:** Morphologische Veränderungen primärer humaner Hepatozyten nach Isolierung und Aussaat im Zeitverlauf

### 3.1.2 Untersuchung der HBV-Infektion primärer humaner Hepatozyten

Die Infektion der primären humanen Hepatozyten mit Hepatitis-B-Virus (HBV) erfolgte nach Ausdifferenzierung der Zellen (Tag 6 bis 8 nach Aussaat). Dafür wurden die Hepatozyten initial mit virushaltigem, infektiösem Serum chronischer Hepatitis-B-Virus-Träger inkubiert, wobei eine Viruskonzentration von  $1 \times 10^7$  virale DNA-Kopien pro Infektionsansatz eingesetzt wurde. Zur Beurteilung der Effizienz der HBV-Infektion wurde die *in vitro* Synthese der viralen Produkte (HBeAg, HBsAg und virale DNA) durch Quantifizierung aus dem Zellkulturüberstand in einem Zeitrahmen von 14 Tagen verfolgt.

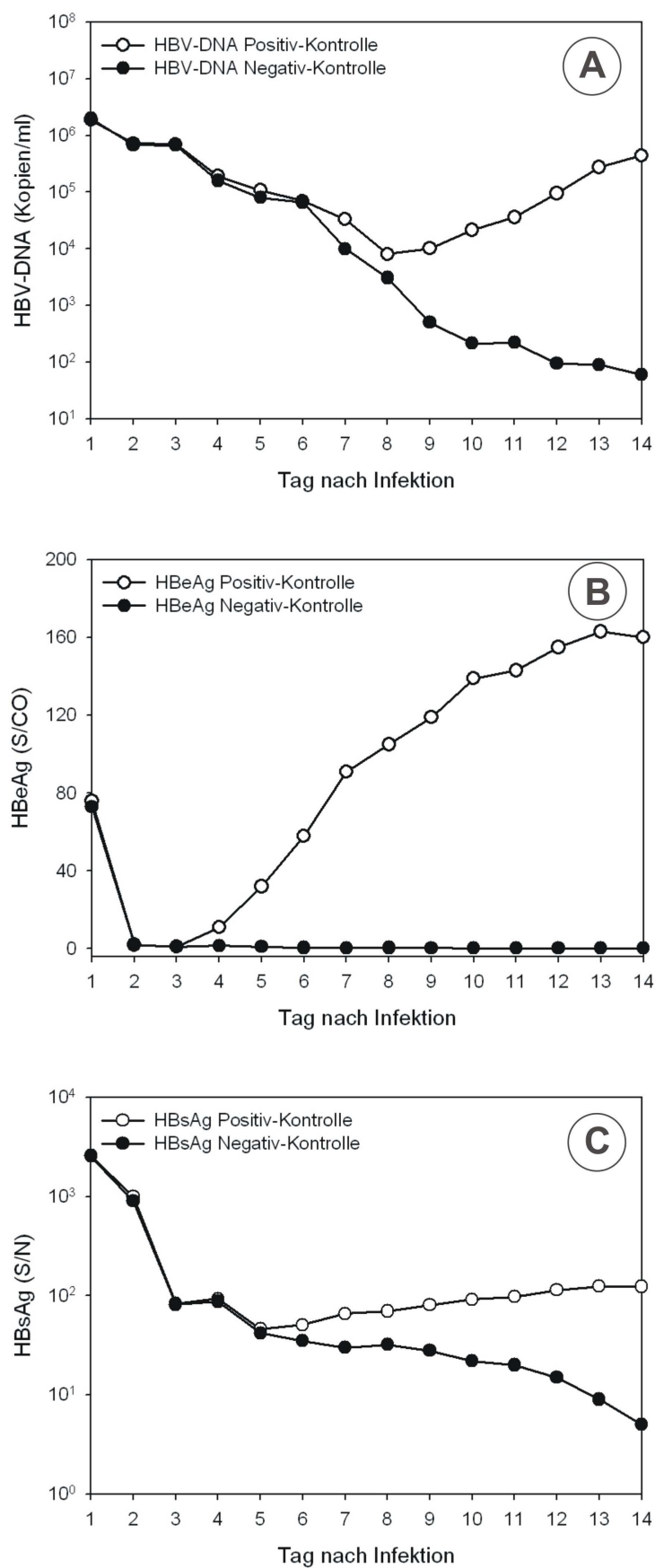
#### Quantifizierung viraler Antigene und viraler DNA nach *in vitro* Infektion

Um eine Neusynthese der viralen Produkte im Infektionsverlauf zu bestimmen, mussten zunächst die mit dem Inokulum eingebrachten Antigene und die DNA an Tag 1 nach Infektion durch fünf Waschschriffe entfernt werden. Abbildung 3.2 zeigt den Verlauf einer *in vitro* HBV-Infektion von PHH. Für die Negativ-Kontrolle wurden die Zellen eines Ansatzes vor Infektionsbeginn mit 70 % EtOH abgetötet.

Die virale DNA-Konzentration (Abb. 3.2; A) fiel nach Abnahme des viralen Inokulums (an Tag 1 nach Infektion) durch die initialen Waschschriffe sowohl bei der Positiv- als auch bei der Negativ-Kontrolle bis zum Tag 8 nach Infektion deutlich ab. Bei der Positiv-Kontrolle war ab Tag 8 eine *de novo* Replikation mit einem Anstieg der DNA-Konzentrationen bis zu  $4,5 \times 10^5$  Kopien/ml an Tag 14 zu verzeichnen. Bei der Negativ-Kontrolle hingegen war eine weitere Abnahme der DNA-Konzentration und keine Neusynthese der DNA messbar.

Abbildung 3.2 Teil B) zeigt die im Zellkulturüberstand messbare Konzentration an HBeAg. Die HBeAg-Konzentration nahm in beiden Ansätzen zunächst ab. In der Positiv-Kontrolle war ab Tag 3 nach Infektion eine Neuproduktion des HBeAg mit einem starken Anstieg der Antigen-Konzentration zu verzeichnen, die Werte bis zu 163 S/CO an Tag 13 erreichte. Bei der Negativ-Kontrolle erfolgte nach den initialen Waschschriffen keine Zunahme der HBeAg-Konzentration im Kulturüberstand.

Abbildung 3.2 Teil C) zeigt den Verlauf der HBsAg-Konzentrationen, die im Kulturüberstand nachweisbar waren. Einer – waschbedingten – Abnahme der Konzentration bis Tag 5 von  $2,6 \times 10^3$  S/N auf 46 S/N folgte bei der Positiv-Kontrolle ein Anstieg der HBsAg-Produktion bis zu einer Konzentration von 123 S/N an Tag 14. Bei der Negativ-Kontrolle war eine weitere Abnahme der HBsAg-Konzentration und keine Neusynthese des HBsAg zu verzeichnen.

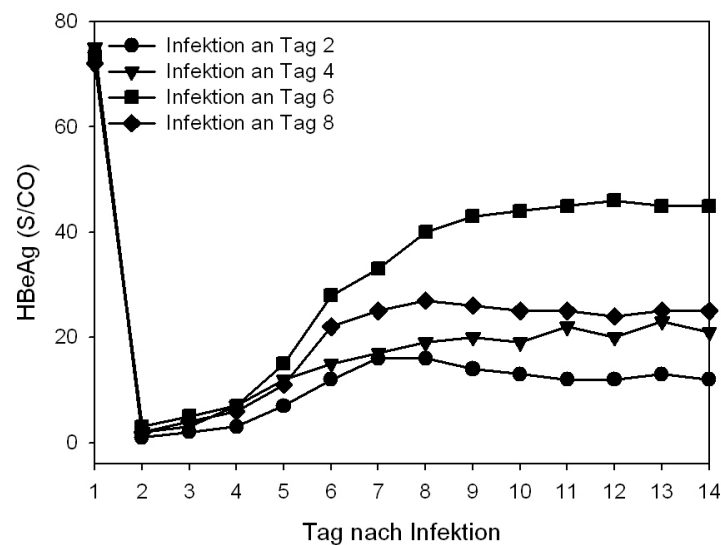


**Abb. 3.2:** Kinetik der im Zellkulturüberstand nachweisbaren Konzentrationen an viraler DNA (A), HBeAg (B) und HBsAg (C) nach *in vitro* Infektion der primären humanen Hepatozyten mit Hepatitis-B-Virus

Die Beurteilung der *in vitro* Infektionen der vorliegenden Arbeit erfolgte anhand der HBeAg-Expression. Da aktive HBeAg-Expression mit der Synthese der viralen DNA einhergeht, kann die HBeAg-Produktion als Korrelat zur Virusreplikation angesehen werden. HBeAg liegt im Serum in viel geringerer Konzentration vor als HBsAg oder die virale DNA. Dadurch lässt sich das mit dem Inokulum zugeführte HBeAg rasch ausverdünnen. Zudem wird HBeAg im Verlauf der Infektion als frühes Antigen gebildet und die Konzentration steigt bei erfolgreicher Infektion sehr schnell – etwa ab dem dritten Tag nach Infektion – an. Die Verwendung von HBeAg als frühem Infektionsmarker ermöglicht, eine Beeinflussung der Infektion über einen größeren Zeitraum zu verfolgen (Tag 3 bis 14). Anhand der *de novo* Replikation der DNA lassen sich Beeinflussungen der Infektion hingegen erst ab Tag 8 verfolgen. Die mit dem Inokulum eingebrachten hohen Konzentrationen an viraler DNA und HBsAg lassen sich durch die Waschschrte langsamer und schlechter ausverdünnen. Dadurch wird ein früher Beginn der Virusreplikation und der Synthese des HBsAg unter Umständen überdeckt und ist zunächst nicht identifizierbar. So ist ein Anstieg der viralen Replikation und der HBsAg-Synthese erst zu einem späteren Zeitpunkt messbar.

## Zeitpunkt der Infektion

Je nach Ausgangsmaterial zeigten primäre humane Hepatozyten etwa ab dem dritten Tag nach Aussaat Hepatozyten-spezifische Morphologie. Da die Lebensspanne kultivierter Hepatozyten begrenzt ist und diese Zellen in Kultur nicht proliferieren, ergibt sich nur ein kurzes Zeitfenster für eine *in vitro* Infektion. Um den optimalen Zeitpunkt für die Infektion der Zellen festzulegen, wurden die Hepatozyten an vier verschiedenen Zeitpunkten nach Aussaat (Tag 2, 4, 6 und 8) infiziert. In der Abbildung 3.3 ist die Kinetik der HBeAg-Produktion in Abhängigkeit vom Infektionszeitpunkt dargestellt.



**Abb. 3.3:** Kinetik der viralen HBeAg-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Hepatitis-B-Virus-Infektion der primären humanen Hepatozyten an Tag 2, 4, 6 und 8 nach Aussaat

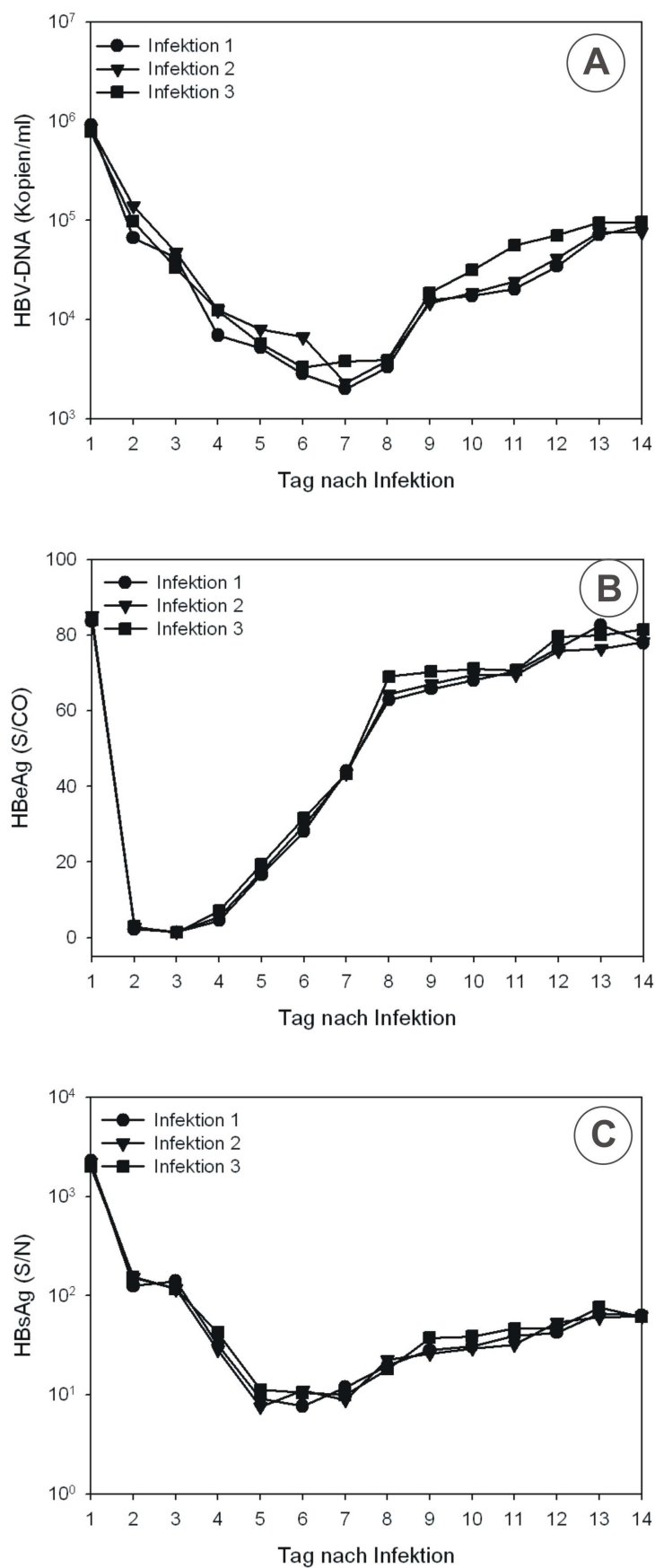
In den zu verschiedenen Zeitpunkten infizierten Hepatozytenkulturen wurden deutlich unterschiedliche HBeAg-Kinetiken gemessen. Die maximale HBeAg-Konzentration dieser Versuchsreihe wurde in Hepatozyten erreicht, die an Tag 6 nach Aussaat infiziert wurden (HBeAg<sub>max</sub> [S/CO]: Infektion an Tag 2: 16; Infektion an Tag 4: 23; Infektion an Tag 6: 46 und Infektion an Tag 8: 27). Ausgehend von diesem Ergebnis, das sich in einem Wiederholungsversuch bestätigen ließ, wurden alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Infektionen zwischen dem sechsten und achten Tag nach Inkulturnahme gestartet.



### Intraexperimentelle Reproduzierbarkeit

Um die Schwankungsbreite der Infektionsergebnisse innerhalb einer Versuchsreihe zu testen, wurden drei verschiedene Kulturschalen einer Hepatozytenpräparation mit Hepatitis-B-Virus infiziert. Abbildung 3.4 zeigt die Replikation der DNA und die Produktion der viralen Antigene in den drei Parallelansätzen.

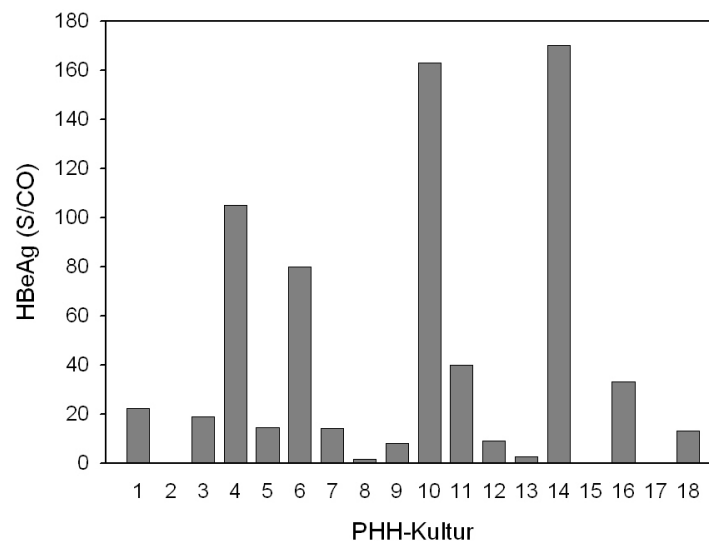
Die in den drei Parallelinfektionen quantifizierten Konzentrationen der viralen DNA (A) zeigten im Verlauf der Infektion untereinander geringfügige Schwankungen, während die Messung der HBeAg-Produktion (B) und der HBsAg-Produktion (C) der Infektionen 1, 2 und 3 nahezu identische Ergebnisse lieferte. Das Ergebnis dieser Versuchsreihen zeigt, dass innerhalb einer Hepatozytenpräparation eine Experimentreihe mit unterschiedlichen Fragestellungen reproduzierbar durchgeführt und mit HBeAg als viralem Marker zuverlässig ausgewertet werden kann.



**Abb. 3.4:** Kinetik der im Zellkulturüberstand nachweisbaren Konzentrationen an viraler DNA (A), HBeAg (B) und HBsAg (C) in drei Parallelansätzen einer HBV-infizierten Hepatozytenkultur

### Interexperimentelle Reproduzierbarkeit

Im Laufe dieser Arbeit kristallisierten sich – trotz intraexperimenteller Reproduzierbarkeit – Schwankungen der Effizienz der Infektion in verschiedenen Zellpräparationen heraus. Abbildung 3.5 gibt einen Überblick über die maximale Infektionseffizienz von 18 verschiedenen Hepatozytenkulturen, die mit dem gleichen virushaltigen Serum infiziert wurden. Die Infektionseffizienz wurde anhand der maximalen HBeAg-Konzentration nach beginnender Antigen-Neuproduktion beurteilt.



**Abb. 3.5:** Maximale HBeAg-Konzentration in 18 verschiedenen Hepatozytenkulturen nach Infektion mit dem gleichen HBV-haltigen Serum

In den Kulturen 2, 15 und 17 konnte keine Produktion von HBeAg gemessen werden (Nachweisgrenze bei 1 S/CO). In drei der infizierten Hepatozytenkulturen hingegen konnten HBeAg-Konzentrationen von mehr als 100 S/CO gemessen werden ( $\text{HBeAg}_{\text{max}}$  [S/CO]: Kultur 4: 105; Kultur 10: 163; Kultur 14: 170). Durch das virushaltige Serum konnte offenbar nicht in jeder der verwendeten Zellpräparationen eine effiziente Infektion initiiert werden.

Für diese unterschiedlichen Ergebnisse der *in vitro* Infektionen ist zum einen die generelle Variabilität von humanem primärem Zellmaterial verantwortlich. Trotz hoher Vitalität, identischer Zellzahl bei der Inkulturnahme und konfluenter Zell-Monolayer zu Beginn der Infektion dedifferenzieren Zellen mit zunehmender Kulturdauer. Des Weiteren ist es denkbar, dass für eine effiziente Infektion eine entsprechende – z. B. Rezeptor-bedingte – Kompatibilität zwischen Virus und Wirtszelle entscheidend ist.

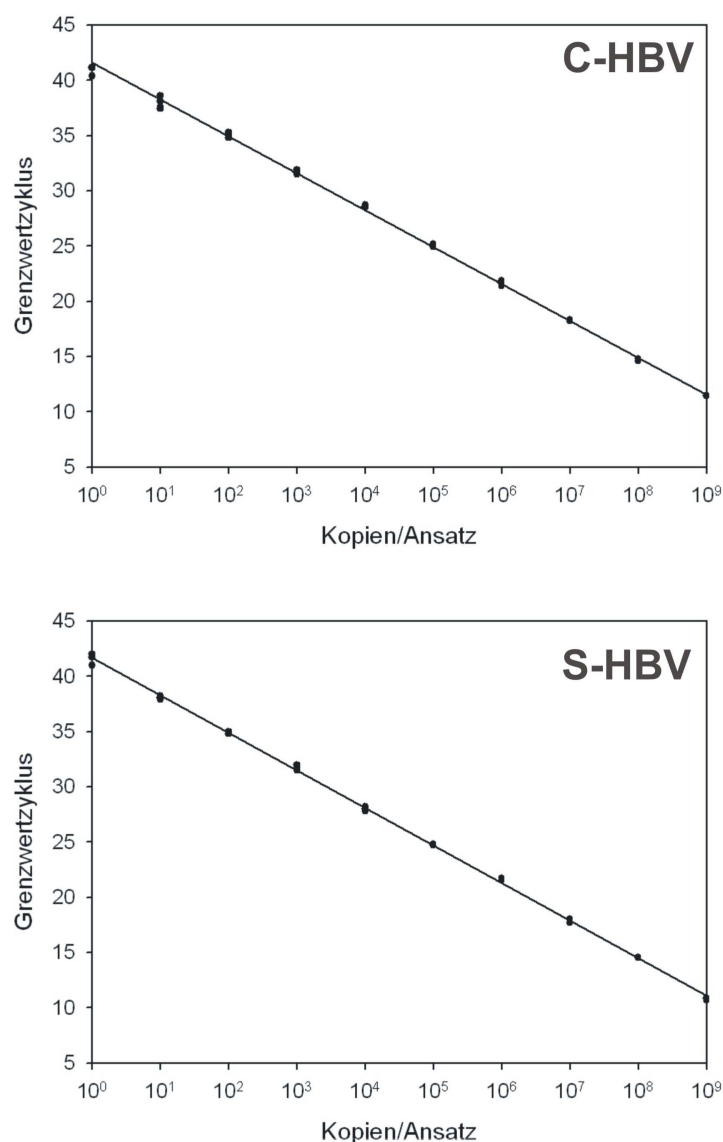
## Nachweis der Hepatitis-B-Virus RNA

Die Messung der *in vitro* produzierten viralen Antigene und der DNA aus dem Zellkulturüberstand ermöglicht eine Charakterisierung des Infektionsverlaufs, die über einen längeren Zeitraum aus einem Infektionsansatz durchgeführt werden kann. Die Messung der viralen RNA als Marker der Transkription hingegen erlaubt einen definierten Nachweis der Infektion, wodurch der Beginn der Virusreplikation festgestellt werden kann. Zudem ermöglicht der parallele Nachweis der Transkription und der Proteinexpression Aussagen über den Angriffspunkt und Wirkmechanismus antiviraler Strategien.

### Etablierung der quantitativen RT-PCR-Systeme

Um die HBV-Infektion der Hepatozyten auf RNA-Ebene zu charakterisieren, wurden Nachweissysteme für die 3,5-kb RNA (C-HBV) und die 2,4-kb RNA (S-HBV) entwickelt. Die 3,5-kb RNA umspannt die gesamte Sequenz des Genoms und dient als mRNA für die Translation des HBcAg und der Polymerase, zusätzlich dient sie als prägenomische RNA für den ersten Schritt der Virusreplikation. Von der 2,4-kb RNA werden je nach Transkriptionsstart die große, die mittlere oder die kleine Form des HBsAg gebildet.

Nach Klonierung der gewünschten Sequenzabschnitte und *in vitro* Transkription wurden die Transkripte von  $10^9$  bis  $10^0$  Kopien/Ansatz seriell verdünnt und zur Erstellung einer Eichgeraden für die Quantifizierung der viralen RNAs mittels quantitativer Reverser Transkriptase *TaqMan*-PCR (qRT-PCR) verwendet. Abbildung 3.6 zeigt die zwei RNA-Eichgeraden C-HBV und S-HBV in den Verdünnungsstufen  $10^9$  bis  $10^0$  Kopien/Ansatz.



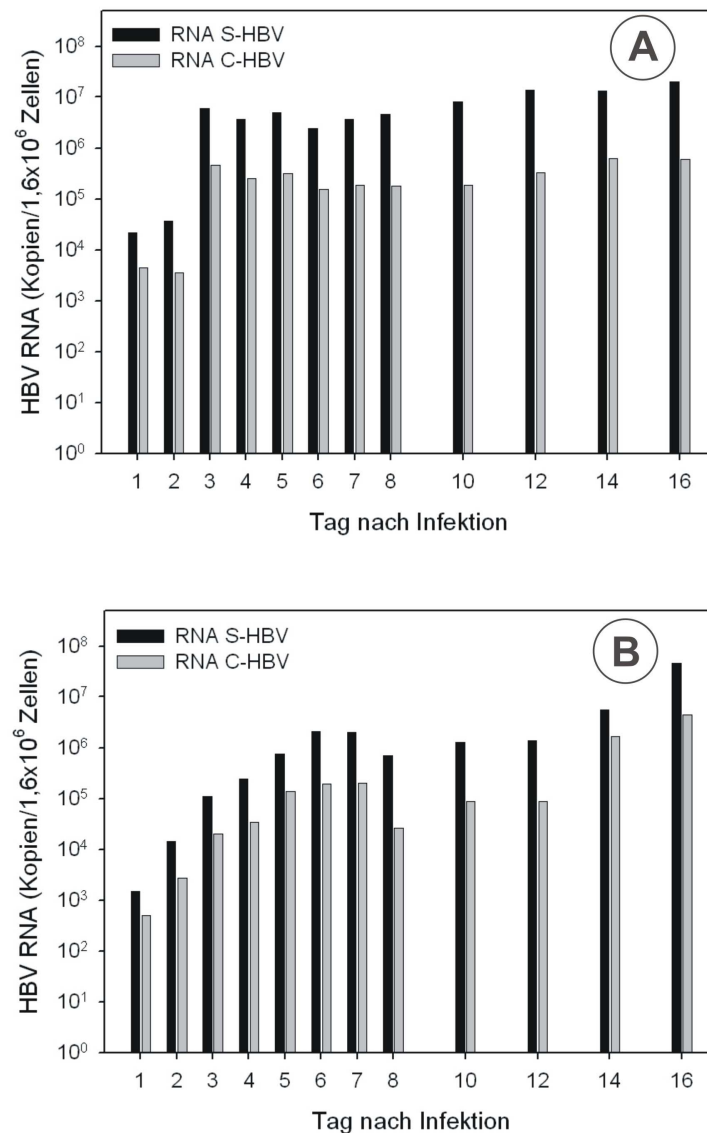
**Abb. 3.6:** RNA-Eichreihen zum quantitativen Nachweis der 3,5-kb C-HBV RNA sowie der 2,4-kb S-HBV RNA; dargestellt sind Dreifach-Werte je Verdünnungsstufe

### Quantifizierung viraler RNA

Für die quantitative Bestimmung der HBV-spezifischen RNAs im Verlauf einer Infektion wurden Parallelinfektionen einer Hepatozytenkultur angesetzt. Für jeden Messpunkt wurden die Hepatozyten einer Kulturschale gewaschen, lysiert und aus der präparierten RNA wurde mittels qRT-PCR die Konzentrationen der S-HBV RNA sowie der C-HBV RNA bestimmt.

Im Folgenden sind anhand zweier *in vitro* Infektionen einer Hepatozytenpräparation mit zwei viralen Inokula (Serum 1 bzw. Serum 2) die Produktion der viralen RNA (Abb. 3.7) sowie zugehörige HBeAg- und DNA-Ergebnisse (Abb. 3.8) dargestellt. Für einen Messpunkt wurde die virale RNA aus  $1,6 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Bei der quantitativen Bestimmung der RNA im Verlauf der Infektion ist zu beachten, dass mit jedem Messpunkt die virale Transkription eines unterschiedlichen Infektionsansatzes erfasst wird. Die zuvor gezeigte geringe

intraexperimentelle Variabilität erlaubt jedoch die Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der RNA-Produktion.



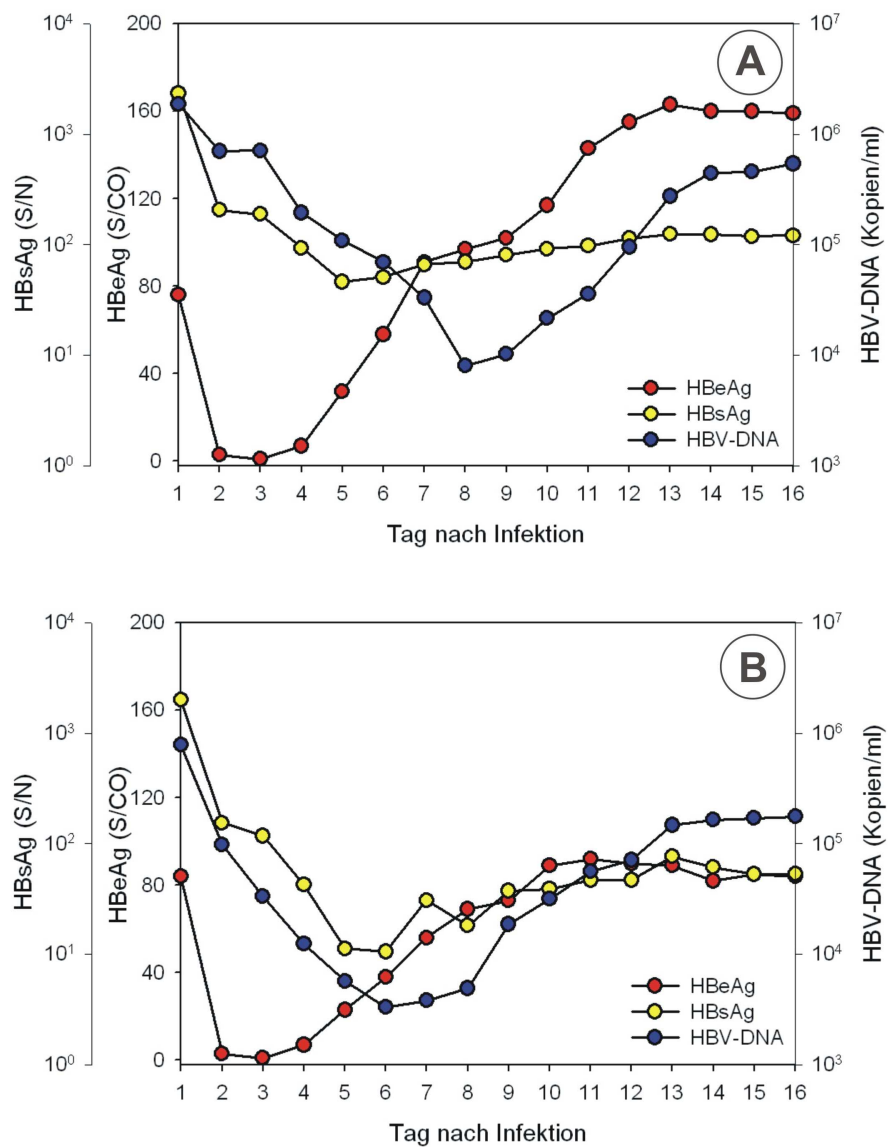
**Abb. 3.7:** Konzentration der S-HBV RNA sowie der C-HBV RNA im Verlauf von 16 Tagen nach *in vitro* Infektion primärer humaner Hepatozyten eines Spenders mit unterschiedlichen Inokula; (A) Serum 1 und (B) Serum 2

In beiden Versuchsreihen konnte bereits 24 Stunden nach Beginn der Infektion HBV-spezifische RNA mit einem kontinuierlichen Anstieg der viralen Transkription nachgewiesen werden. Nach Infektion mit Serum 1 (Abb. 3.7; A) erreichte die Transkription maximale RNA-Konzentrationen von  $2,0 \times 10^7$  S-HBV Kopien/ $1,6 \times 10^6$  Zellen und  $6,0 \times 10^5$  Kopien (C-HBV). Nach Infektion mit Serum 2 (Abb. 3.7; B) konnten maximale RNA-Mengen von ca.  $4,6 \times 10^7$  (S-HBV) und  $4,5 \times 10^6$  (C-HBV) gemessen werden.

Hier ist anzumerken, dass mit den gewählten Oligonukleotiden für den Nachweis der S-HBV RNA auch die C-HBV RNA erfasst wird. Daher ergibt sich die effektive Konzentration

der S-HBV RNA aus der Differenz beider RNAs. Aus dieser Differenz – gemessen an der maximalen RNA-Konzentration nach Infektion an Tag 16 – resultiert eine Konzentration der S-HBV RNA von  $1,9 \times 10^7$  Kopien (Serum 1) bzw.  $4,2 \times 10^7$  (Serum 2). Verglichen mit der maximalen Konzentration der C-HBV RNA zeigt sich, dass die S-HBV RNA in deutlich höherer Konzentration gebildet wird.

Der Vergleich der RNA-Synthese mit aus dem Zellkulturüberstand gemessenen Antigenen und der DNA (Abb. 3.8) zeigte, dass die virale RNA in beiden Infektionen bereits 48 Stunden produziert wurde, ehe ein Anstieg des HBeAg (ab Tag 3 nach Infektion) detektierbar war. Ein Anstieg der HBsAg-Produktion wurde ab Tag 5 (Serum 1; A) bzw. Tag 6 (Serum 2; B) festgestellt. Eine Zunahme der DNA-Konzentrationen konnte ab Tag 8 (Serum 1; A) bzw. Tag 6 (Serum 2; B) gemessen werden.



**Abb. 3.8:** Kinetik der im Zellkulturüberstand nachweisbaren Konzentrationen von HBeAg, HBsAg und DNA im Verlauf von 16 Tagen nach *in vitro* Infektion primärer humaner Hepatozyten eines Spenders mit unterschiedlichen Inokula; (A) Serum 1 und (B) Serum 2

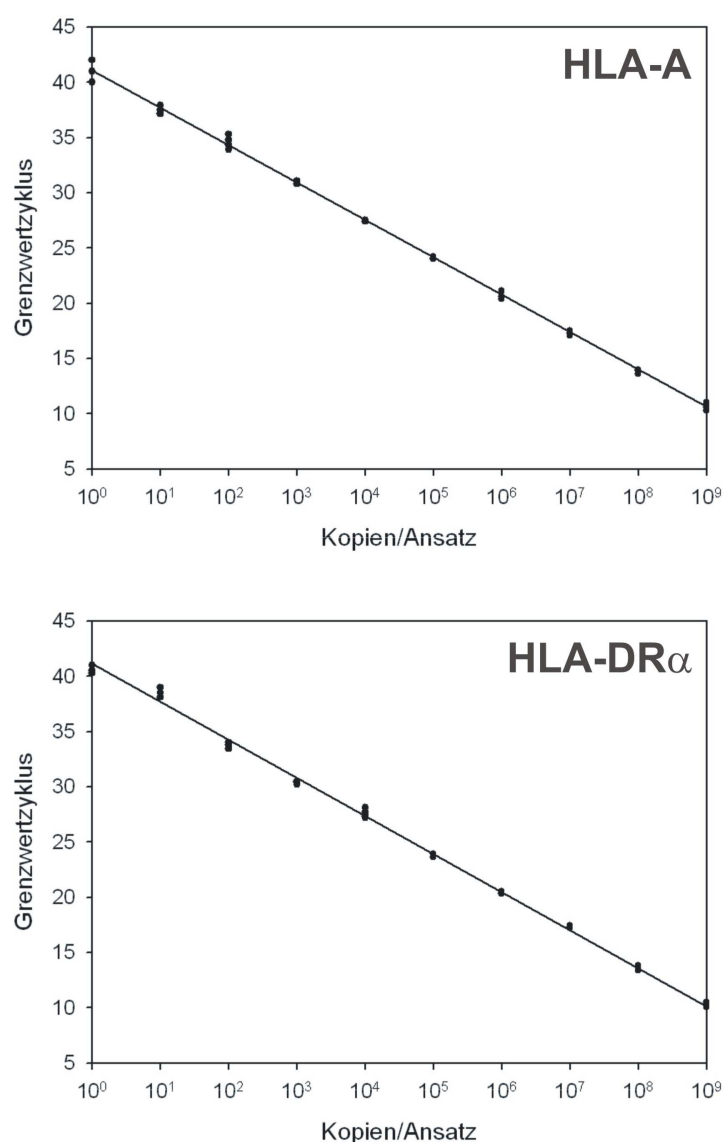
## Nachweis der MHC-Genexpression

Immunologische Voraussetzung und Grundlage für eine funktionelle Interaktion HBV-spezifischer Immunzellen mit virusinfizierten Hepatozyten ist die Expression der Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*Major Histocompatibility Complex; MHC*). HLA-Klasse-I-Moleküle werden konstitutiv von allen kernhaltigen Zellen exprimiert, während HLA-Klasse-II-Moleküle nur von Zellen der Immunabwehr (z. B. Monozyten, Makrophagen, B-Zellen) gebildet werden. Demnach sollten Hepatozyten keine HLA-Klasse-II-Moleküle exprimieren. Allerdings gibt es in der Literatur Hinweise für eine HLA-Klasse-II-Expression durch Hepatozyten. Um eine Expression der HLA-Klasse-II-Moleküle durch primäre Hepatozyten festzustellen und zu überprüfen, ob durch Zellen dieser Kultur eine Antigenpräsentation gegenüber  $CD4^+$ T-Zellen erfolgen kann, wurde ein Nachweissystem für MHC-Klasse-II mittels quantitativer Reverser Transkriptase PCR (qRT-PCR) entwickelt. Für Kontrolluntersuchungen wurden zusätzlich Systeme zum Nachweis von MHC-Klasse-I etabliert.



### Etablierung der qRT-PCR-Systeme MHC-Klasse-I und Klasse-II

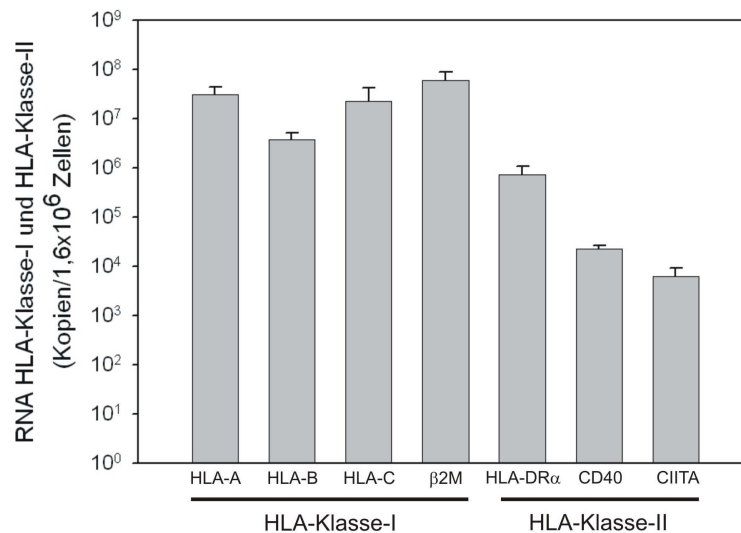
Für den Nachweis von MHC-Klasse-II wurden die Loci HLA-DR $\alpha$ , CD40 und der Klasse-II-Transaktivator CIITA gewählt. Zum Nachweis von MHC-Klasse-I wurden die Loci HLA-A, HLA-B, HLA-C und beta<sub>2</sub>-Mikroglobulin ( $\beta_2$ M) gewählt. Nach Klonierung der entsprechenden Sequenzabschnitte und anschließender *in vitro* Transkription wurden die Transkripte von  $10^9$  bis  $10^0$  Kopien/Ansatz seriell verdünnt. Abbildung 3.9 zeigt exemplarisch die Eichgeraden der Systeme HLA-A und HLA-DR $\alpha$  in den Verdünnungsstufen  $10^9$  bis  $10^0$  Kopien/Ansatz. Anhand der erstellten RNA-Standardreihen wurde die HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Expression durch primäre humane Hepatozyten mittels *TaqMan*-PCR quantifiziert.



**Abb. 3.9:** RNA-Eichreihen zum Nachweis der Expression von MHC-Klasse-I (HLA-A) und MHC-Klasse-II (HLA-DR $\alpha$ ); dargestellt sind Vierfach-Werte je Verdünnungsstufe

### Quantifizierung der Expression von MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II

Um die Expression von MHC-Klasse-I und Klasse-II in primären Hepatozytenkulturen zu untersuchen, wurde die RNA aus  $1,6 \times 10^6$  Zellen gewonnen und zur Quantifizierung von HLA-A, HLA-B, HLA-C,  $\beta_2$ M sowie HLA-DR $\alpha$ , CD40 und CIITA in die qRT-PCR eingesetzt (Abb. 3.10).

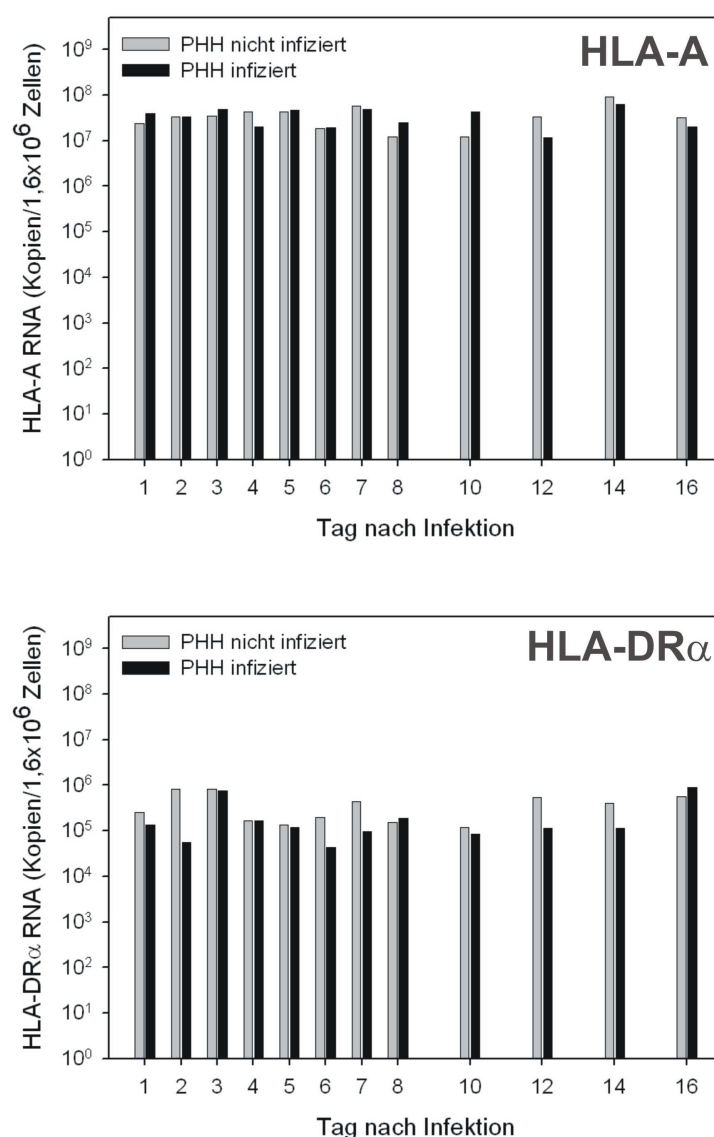


**Abb. 3.10:** Expression von MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II durch kultivierte primäre humane Hepatozyten; dargestellt sind Mittelwerte aus je drei Hepatozytenpräparationen

Die gemittelten Konzentrationen der Transkripte [RNA-Kopien/ $1,6 \times 10^6$  Zellen] von MHC-Klasse-I betrugen für HLA-A  $3,1 \times 10^7$ , für HLA-B  $3,7 \times 10^6$ , für HLA-C  $2,2 \times 10^7$  und für  $\beta_2$ M  $6,1 \times 10^7$ . Die MHC-Klasse-II-Transkripte lagen für HLA-DR $\alpha$  in einer Konzentration von  $7,4 \times 10^5$  Kopien vor, für CD40 wurden  $2,3 \times 10^4$  Kopien und für CIITA  $6,1 \times 10^3$  Kopien gemessen.

Zunächst schien der quantitative Nachweis der MHC-Klasse-II-Expression durch humane Hepatozyten das in der Literatur beschriebene Auftreten von MHC-Klasse-II in Lebergewebe zu bestätigen. Der Literatur zu Folge enthalten aber isolierte Kulturen 10 bis 20 % nichtparenchymatöse Zellen, die für eine effiziente Differenzierung und Kultivierung der primären Hepatozyten nötig sind. Dabei handelt es sich hauptsächlich um lebersinusoidale Endothelzellen und Kupffer-Zellen, die MHC-Klasse-II exprimieren. Der Nachweis von MHC-Klasse-II zeigt, dass, wenn in Lebergewebe die MHC-Klasse-II exprimierenden Zellen HBsAg aufnehmen, eine Antigenpräsentation für CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten erfolgen kann.

Um die Kinetik der Expression von MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II im Kulturverlauf und gleichzeitig den Effekt der Virusinfektion darauf zu untersuchen, wurden 12 Hepatozyten-Kulturschalen unter Standard-Bedingungen kultiviert und parallel wurden 12 Kulturschalen mit HBV infiziert. An 12 Zeitpunkten wurde die Gesamt-RNA jeweils einer nicht infizierten und einer infizierten Kultur gewonnen. Die Abbildung 3.11 zeigt am Beispiel der Expression von HLA-A und HLA-DR $\alpha$  die Kinetik der MHC-Transkripte im 16-tägigen Kulturverlauf.



**Abb. 3.11:** Expression von HLA-A und HLA-DR $\alpha$  durch unter Standard-Bedingungen kultivierte und HBV-infizierte primäre humane Hepatozyten im Verlauf von 16 Tagen

Die Expression von HLA-A und HLA-DR $\alpha$  im Verlauf einer 16-tägigen Kulturphase nach Versuchsbeginn zeigte an den einzelnen Messwerten lediglich geringfügige Schwankungen, die sowohl in der uninfizierten, als auch in der infizierten Hepatozytenkultur auftraten. Die MHC-Transkription nahm weder kontinuierlich zu noch ab, auch in der Expression der (hier nicht gezeigten) überprüften Systeme HLA-B, HLA-C,  $\beta_2$ M, CD40 und CIITA konnte kein

spezifischer Trend festgestellt werden.

Anders als zum Teil in der Literatur beschrieben, bewirkte eine HBV-Infektion der Hepatozyten keinen messbaren Effekt auf die MHC-Transkription. Hierbei ist anzumerken, dass in diesem *in vitro* Infektionsmodell nur ein geringer Prozentsatz (circa 10 %) der Hepatozyten mit Hepatitis-B-Virus infiziert ist, wie mittels Färbung der *core*-Partikel festgestellt wurde (Tausch, 2005).

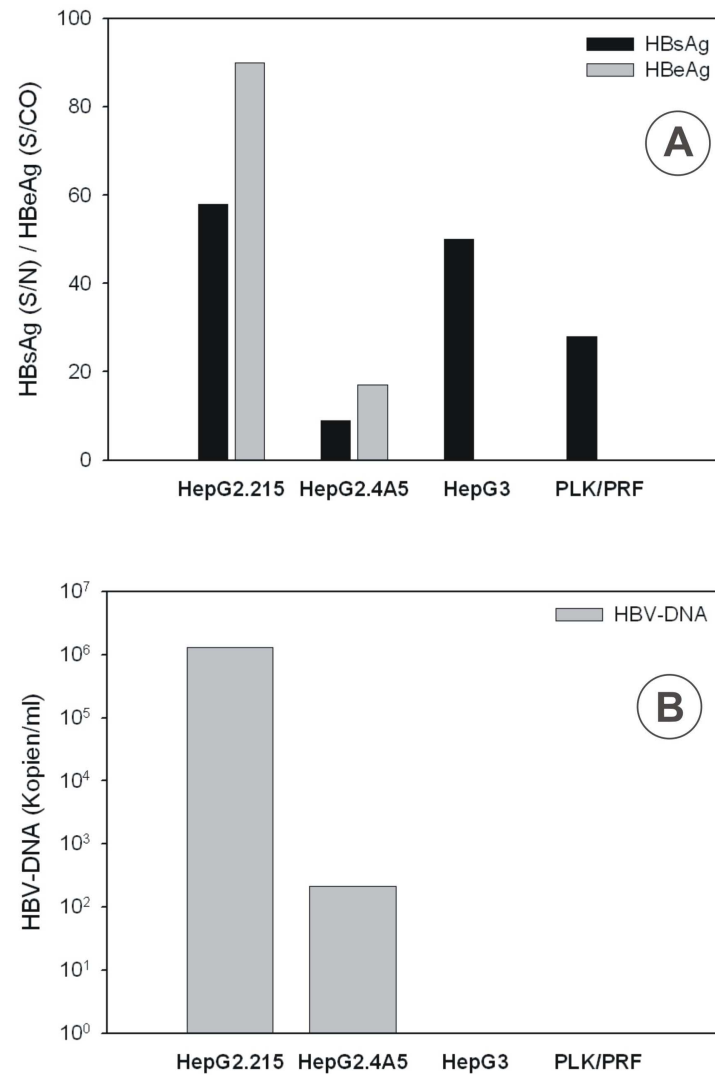
### 3.1.3 Untersuchung der HBV-Infektion humaner Hepatom-Zell-Linien

Parallel zu dem *in vitro* HBV-Infektionsmodell der primären humanen Hepatozyten wurden auch humane Hepatom-Zell-Linien eingesetzt. Die Linien HepG2.215 und HepG2.4A5 produzieren konstitutiv HBV-DNA, HBsAg und HBeAg und repräsentieren somit den Status einer chronischen HBV-Infektion. Die Zell-Linien HepG3 und PLK/PRF exprimieren und sezernieren ausschließlich HBsAg.

Die HBV-infizierten Hepatom-Zell-Linien dienten als weiteres Modellsystem für die Untersuchung antiviraler Eigenschaften HBsAg-spezifischer CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten.

#### Quantifizierung viraler Antigene und viraler DNA

Die Abbildung 3.12 zeigt die *in vitro* Produktion von HBeAg und HBsAg sowie die Replikation der viralen DNA der Zell-Linien HepG2.215, HepG2.4A5, HepG3 und PLK/PRF (gemessen aus dem Überstand konfluenter Kulturen mit ca.  $1,6 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>).

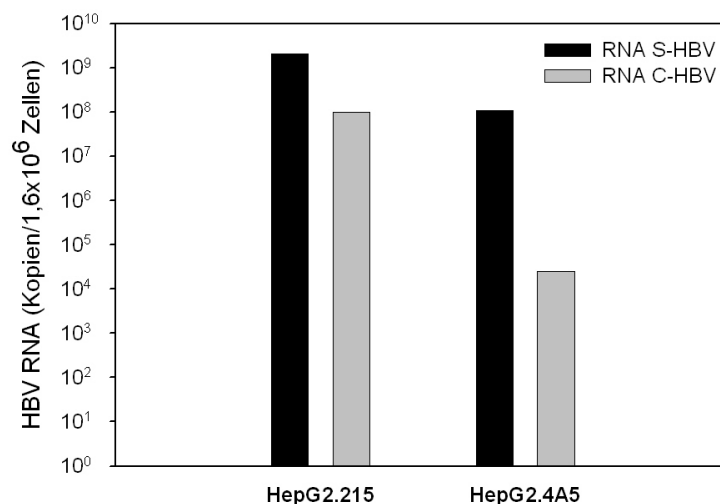


**Abb. 3.12:** Im Kulturüberstand der Hepatom-Zell-Linien HepG2.215, HepG2.4A5, HepG3 und PLK/PRF nachweisbare Konzentrationen von HBsAg und HBeAg (A) sowie viraler DNA (B)

Die Linien HepG2.215 und HepG2.4A5 produzierten neben HBsAg auch HBeAg sowie virale DNA. Dabei übersteigt die Virus- und Antigen-Produktion der HepG2.215-Zellen die der HepG2.4A5-Zellen um ein Vielfaches. Die HepG3-Zellen und die PLK/PRF-Zellen exprimierten ausschließlich HBsAg.

### Quantifizierung viraler RNA

Zur Quantifizierung der 3,5-kb RNA (C-HBV) und der 2,4-kb RNA (S-HBV) in den Hepatom-Linien HepG2.215 und HepG2.4A5 wurde die RNA aus  $1,6 \times 10^6$  Zellen isoliert und in die qRT-PCR eingesetzt (Abb. 3.13).



**Abb. 3.13:** Konzentration der 2,4-kb S-HBV RNA sowie der 3,5-kb C-HBV RNA in den Hepatom-Zell-Linien HepG2.215 und HepG2.4A5

In beiden Hepatom-Zell-Linien wurde die S-HBV RNA in deutlich höherer Konzentration gemessen als die C-HBV RNA. In HepG2.215-Zellen wurden  $2,1 \times 10^9$  S-HBV RNA-Kopien/ $1,6 \times 10^6$  Zellen gemessen, während in HepG2.4A5-Zellen  $1,1 \times 10^8$  S-HBV Kopien gemessen wurden. Die C-HBV RNA wurde bei HepG2.215-Zellen in einer Konzentration von  $1,0 \times 10^8$  Kopien und bei HepG2.4A5-Zellen in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^4$  Kopien gemessen.

Aus der Differenz beider RNAs zeigt sich, dass auch in den Hepatom-Zellen die Konzentration der S-HBV RNA tatsächlich überwiegt. Somit ergibt sich für die in HepG2.215-Zellen nachgewiesene S-HBV RNA eine effektive Konzentration von  $2,0 \times 10^9$  Kopien, während die S-HBV RNA Konzentration der HepG2.4A5-Zellen  $1,0 \times 10^8$  Kopien beträgt.

Im Vergleich zu HepG2.215-Zellen weisen HepG2.4A5-Zellen sowohl eine geringere Transkriptionsrate, als auch eine schwächere Synthese der viralen Antigene und schwächere Virusreplikation auf. Für einen Vergleich der Virusreplikation der Hepatom-Zellen mit der Primärinfektion der Hepatozyten ist anzumerken, dass bei den Hepatom-Zellen jede Zelle mit Virus infiziert ist. Zudem kann im Gegensatz zu den infizierten primären Hepatozyten in den Hepatomzellen mehr HBeAg als HBsAg gebildet werden.

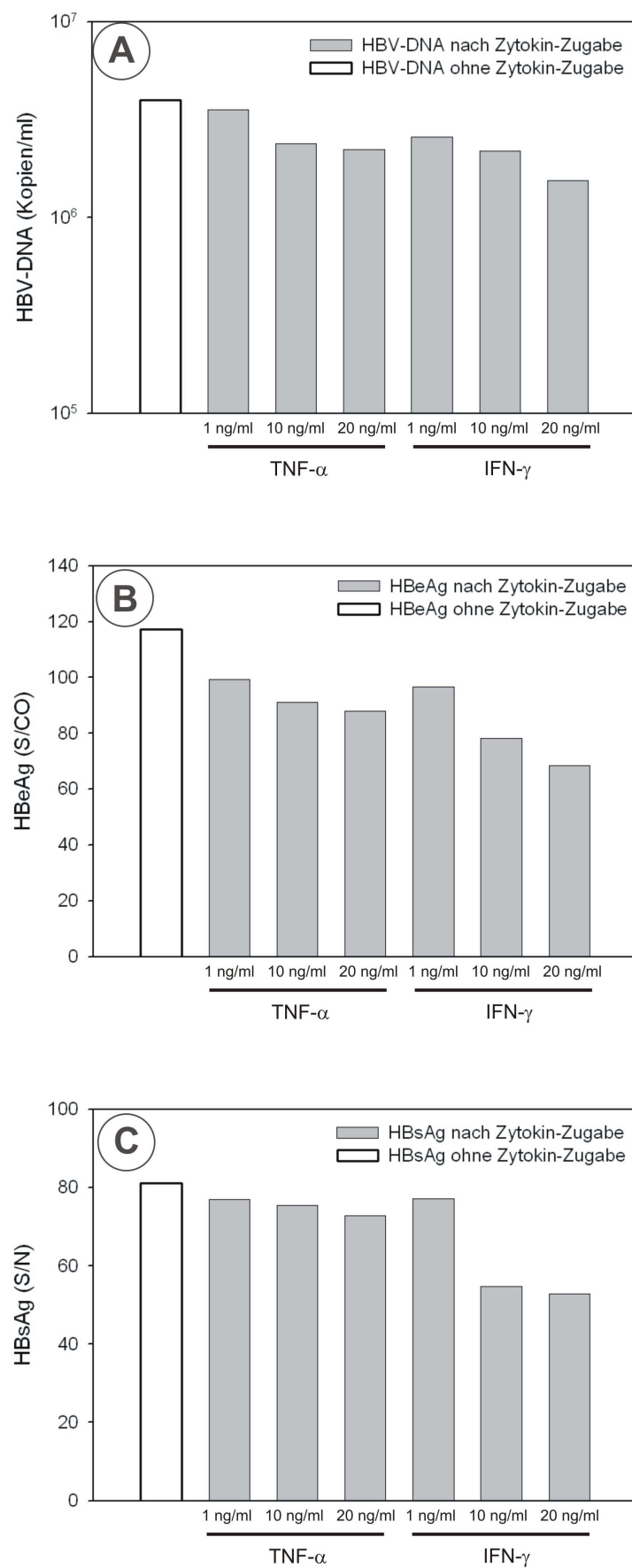
## 3.2 Einfluss der $T_H$ -Typ1-Zytokine $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$ auf die HBV-Infektion

Eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus hat im Zuge der Immunantwort die Bildung der inflammatorischen Zytokine  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha$  durch die Immunzellen zur Folge. Diese Zytokine werden von  $CD4^+$ T-Helferzellen-Typ1 sezerniert und als  $T_H$ -Typ1-Zytokine bezeichnet. Auch die durch Impfung induzierten  $CD4^+$ T-Zellen sezernieren nach Kontakt mit HBsAg  $T_H$ -Typ1-Zytokine. In verschiedenen nicht-humanen Modellsystemen wie dem HBV-transgenen Mausmodell oder dem Enten-HBV-Modell konnte durch exogene Zugabe von rekombinantem  $IFN-\gamma$  und bzw. oder  $TNF-\alpha$  ein hemmender Einfluss auf die Virusreplikation beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt dieser  $T_H$ -Typ1-Zytokine auf die Hepatitis-B-Virusinfektion humaner Hepatom-Zellen und auf die akute Infektion primärer Hepatozyten untersucht. Die Beeinflussung der Virusreplikation wurde sowohl auf Translations- als auch auf Transkriptionsebene überprüft.

### Einfluss von $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$ auf die HBV-Replikation humaner Hepatom-Zellen

Mit Hilfe der konstitutiv HBV-exprimierenden Zell-Linie HepG2.215 wurde zunächst der dosisabhängige Effekt von  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha$  auf die Virusreplikation untersucht. Hierfür wurden die Hepatom-Zellen 48 Stunden mit Medium kultiviert, dem rekombinantes  $IFN-\gamma$  oder  $TNF-\alpha$  in den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml und 20 ng/ml zugesetzt war.

In den Hepatom-Zellen wurde nach Kultur mit zytokinhaltigem Medium eine im Vergleich zur Kontrollkultur reduzierte Konzentration der Virus-DNA sowie der Antigene HBeAg und HBsAg gemessen. Das Ausmaß der Inhibition nahm mit steigender Zytokin-Konzentration zu, dabei wurde durch  $IFN-\gamma$  eine stärkere Reduktion der viralen Aktivität vermittelt als durch  $TNF-\alpha$  (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14:** Produktion von HBV-DNA (A), HBeAg (B) und HBsAg (C) in HepG2.215-Zellen nach Zugabe von rekombinantem TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  in unterschiedlichen Konzentrationen



Die Synthese der viralen DNA (Abb. 3.14; A) wies unter Zytokin-Zugabe deutliche Konzentrationsunterschiede und eine Inhibition der Virusreplikation im Vergleich zur Kontrollkultur auf (HBV-DNA [Kopien/ml]: Kontrolle ohne Zytokin-Zugabe:  $4,0 \times 10^6$ ; 1 ng/ml TNF- $\alpha$ :  $3,6 \times 10^6$ ; 10 ng/ml TNF- $\alpha$ :  $2,4 \times 10^6$ ; 20 ng/ml TNF- $\alpha$ :  $2,2 \times 10^6$ ; 1 ng/ml IFN- $\gamma$ :  $2,6 \times 10^6$ ; 10 ng/ml IFN- $\gamma$ :  $2,2 \times 10^6$ ; 20 ng/ml IFN- $\gamma$ :  $1,5 \times 10^6$ ).

Die Produktion von HBeAg (Abb. 3.14; B) wurde durch die Zytokine im Vergleich zur Kontrollkultur ebenfalls deutlich reduziert (HBeAg [S/CO]: Kontrolle ohne Zytokin-Zugabe: 117; 1 ng/ml TNF- $\alpha$ : 99; 10 ng/ml TNF- $\alpha$ : 91; 20 ng/ml TNF- $\alpha$ : 88; 1 ng/ml IFN- $\gamma$ : 96; 10 ng/ml IFN- $\gamma$ : 78; 20 ng/ml IFN- $\gamma$ : 68).

Auch die Expression des HBsAg (Abb. 3.14; C) zeigte in Kulturen mit Zytokin-Zugabe verminderte Antigen-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollkultur (HBsAg [S/N]: Kontrolle ohne Zytokin-Zugabe: 81; 1 ng/ml TNF- $\alpha$ : 77; 10 ng/ml TNF- $\alpha$ : 75; 20 ng/ml TNF- $\alpha$ : 73; 1 ng/ml IFN- $\gamma$ : 77; 10 ng/ml IFN- $\gamma$ : 54; 20 ng/ml IFN- $\gamma$ : 52).

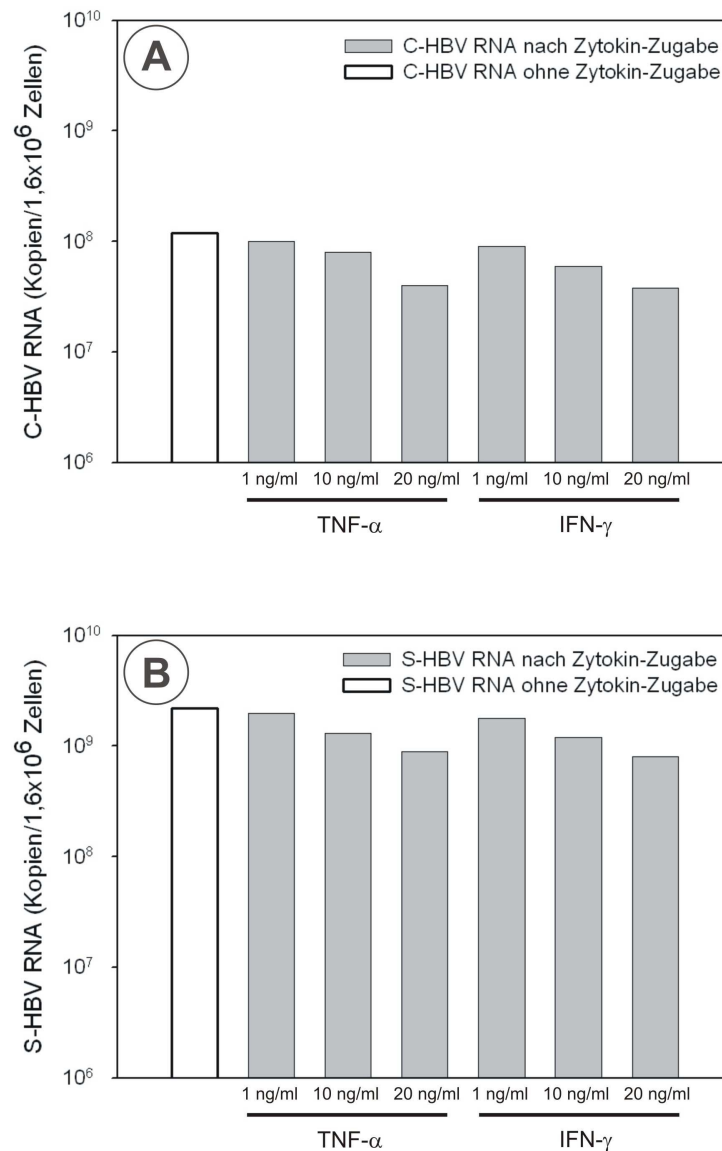
Die deutliche TNF- $\alpha$ - bzw. IFN- $\gamma$ -vermittelte Reduktion der DNA-Synthese und der Antigen-Produktion scheint sowohl dosisabhängig als auch zytokinabhängig zu sein (Tab. 3.1).

Reduktion durch TNF- $\alpha$	1 ng/ml	10 ng/ml	20 ng/ml
HBV-DNA	10 %	40 %	45 %
HBeAg	15 %	22 %	25 %
HBsAg	5 %	7 %	10 %

Reduktion durch IFN- $\gamma$	1 ng/ml	10 ng/ml	20 ng/ml
HBV-DNA	35 %	45 %	63 %
HBeAg	18 %	33 %	42 %
HBsAg	5 %	33 %	36 %

**Tab. 3.1:** Reduktion der viralen DNA-Synthese und Antigen-Produktion in HepG2.215-Zellen durch TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$

Aus der Abbildung 3.15 ist ersichtlich, dass  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IFN-}\gamma$  auch eine Beeinflussung der viralen Transkription bewirkten.



**Abb. 3.15:** Synthese der 3,5-kb C-HBV RNA (A) sowie der 2,4-kb S-HBV RNA (B) in HepG2.215-Zellen nach Zugabe von rekombinantem  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IFN-}\gamma$  in unterschiedlichen Konzentrationen

In der Kultur ohne Zytokin-Zugabe wurde eine Konzentration der C-HBV RNA (Abb. 3.15; A) von  $1,2 \times 10^8$  Kopien/ $1,6 \times 10^6$  Zellen gemessen.  $\text{TNF-}\alpha$  verminderte die C-HBV RNA-Synthese auf  $1,0 \times 10^8$  Kopien (1 ng/ml),  $8,0 \times 10^7$  Kopien (10 ng/ml) bzw.  $4,1 \times 10^7$  Kopien (20 ng/ml).  $\text{IFN-}\gamma$  reduzierte die C-HBV RNA-Synthese auf  $9,0 \times 10^7$  Kopien (1 ng/ml),  $6,0 \times 10^7$  Kopien (10 ng/ml) bzw.  $3,8 \times 10^7$  Kopien (20 ng/ml).

Die S-HBV RNA (Abb. 3.15; B) konnte in der Kultur ohne Zytokin-Zugabe in  $2,2 \times 10^9$  Kopien quantifiziert werden.  $\text{TNF-}\alpha$  inhibierte die S-HBV RNA Synthese auf  $2,0 \times 10^9$  Kopien (1 ng/ml),  $1,3 \times 10^9$  Kopien (10 ng/ml) bzw.  $9,0 \times 10^8$  Kopien (20 ng/ml).  $\text{IFN-}\gamma$

verminderte die Synthese der S-HBV RNA auf  $1,8 \times 10^9$  Kopien (1 ng/ml),  $1,2 \times 10^9$  Kopien (10 ng/ml) bzw.  $8,1 \times 10^8$  Kopien (20 ng/ml).

Der zytokinabhängige Effekt auf die RNA-Synthese scheint ebenfalls in Abhängigkeit der einwirkenden Konzentration zu stehen (Tab. 3.2).

Reduktion durch TNF- $\alpha$	1 ng/ml	10 ng/ml	20 ng/ml
C-HBV RNA	17 %	33 %	66 %
S-HBV RNA	9 %	41 %	59 %

Reduktion durch IFN- $\gamma$	1 ng/ml	10 ng/ml	20 ng/ml
C-HBV RNA	25 %	50 %	68 %
S-HBV RNA	18 %	46 %	63 %

**Tab. 3.2:** Reduktion der viralen Transkription in HepG2.215-Zellen durch TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$

Für die Untersuchung der antiviralen Wirkung der Zytokine in der bzw. auf die Frühphase einer Infektion und um zusätzlich einen längeren Verlauf dieser zytokinabhängigen Beeinflussung der Infektion verfolgen zu können, wurden weitere Versuchsreihen an *in vitro* infizierten primären humanen Hepatozyten durchgeführt.

## Einfluss von $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ auf die HBV-Replikation in *in vitro* infizierten primären humanen Hepatozyten

Aufbauend auf den Versuchen mit der Hepatom-Linie HepG2.215 wurde nach einer Infektion der PHH ab Tag 1 täglich 10 ng/ml rekombinantes  $\text{TNF-}\alpha$  und in einem Parallelansatz 10 ng/ml rekombinantes  $\text{IFN-}\gamma$  zum Kulturmedium gegeben. Eine Beeinflussung der Infektion durch die Zytokine wurde auf Protein- und RNA-Ebene überprüft.

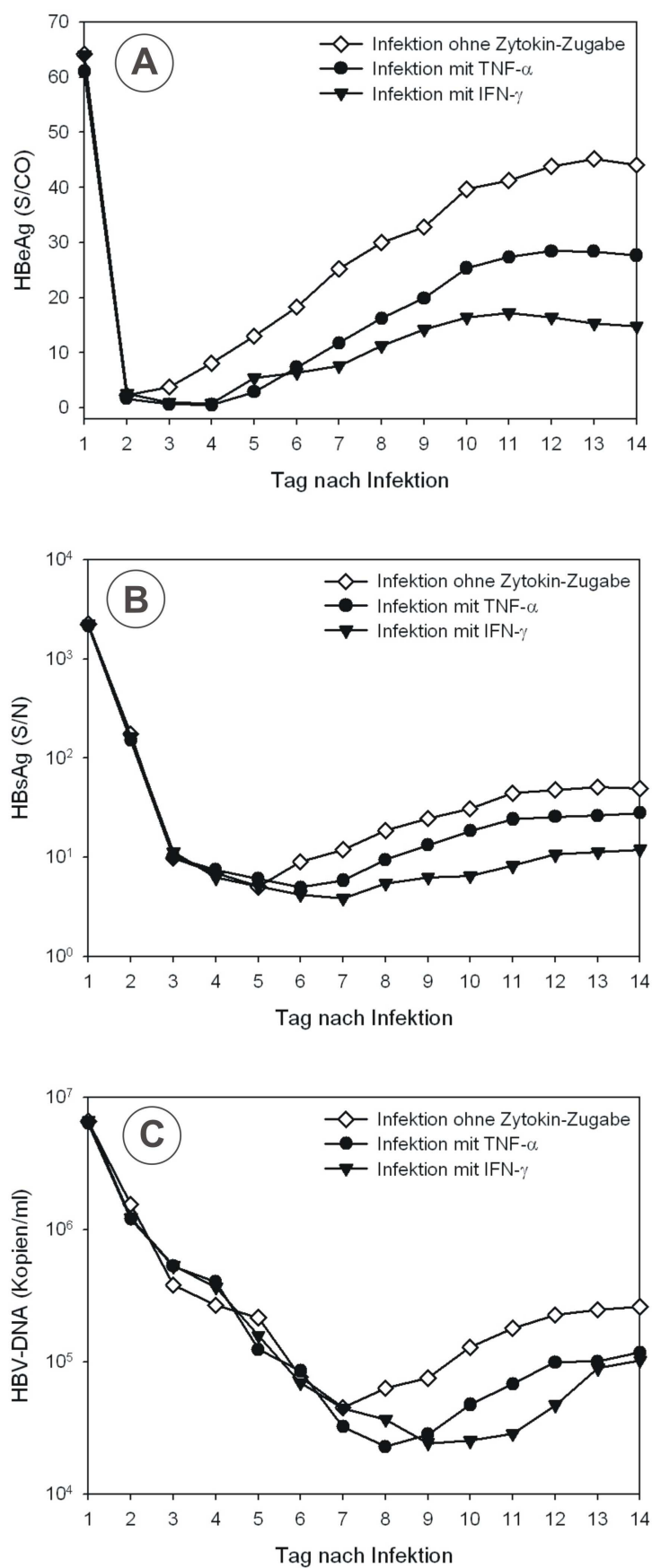
Aus Abbildung 3.16 A) ist ersichtlich, dass bereits 24 Stunden nach Zugabe der Zytokine  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IFN-}\gamma$  eine Reduktion der HBeAg-Expression messbar war. Im Gegensatz zu der an Tag 2 beginnenden Produktion von HBeAg in der Standardinfektion (Infektion ohne Zytokin-Zugabe) setzte in den mit Zytokinen kultivierten Ansätzen die Neusynthese des HBeAg zunächst verzögert an Tag 4 ein. Im weiteren Verlauf der Infektion war die HBeAg-Expression im Vergleich zur Standardinfektion deutlich reduziert ( $\text{HBeAg}_{\text{max}}$  [S/CO]: Infektion ohne Zytokin-Zugabe: 45; mit  $\text{TNF-}\alpha$ : 28; mit  $\text{IFN-}\gamma$ : 17).

Auch der Beginn der HBsAg-Expression sowie der DNA-Neusynthese (Abb. 3.16; B/C) war im Vergleich zur beginnenden HBsAg-Produktion und Virusreplikation der Standardinfektion 48 Stunden später messbar. Im Vergleich zur Standardinfektion wurden in den mit  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IFN-}\gamma$  kultivierten Infektionsansätzen deutlich verminderte Maximalkonzentrationen der HBs-Antigene ( $\text{HBsAg}_{\text{max}}$  [S/N]: Infektion ohne Zytokin-Zugabe: 51; mit  $\text{TNF-}\alpha$ : 28; mit  $\text{IFN-}\gamma$ : 12) und der Virus-DNA ( $\text{HBV-DNA}_{\text{max}}$  [Kopien/ml]: Infektion ohne Zytokin-Zugabe:  $2,6 \times 10^5$ ; mit  $\text{TNF-}\alpha$ :  $1,1 \times 10^5$ ; mit  $\text{IFN-}\gamma$ :  $1,0 \times 10^5$ ) erreicht.

Durch  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IFN-}\gamma$  wurde somit auch die Primärinfektion inhibitorisch beeinflusst. Es erfolgte eine deutliche Reduktion der viralen DNA-Synthese und der Antigen-Produktion (Tab. 3.3).

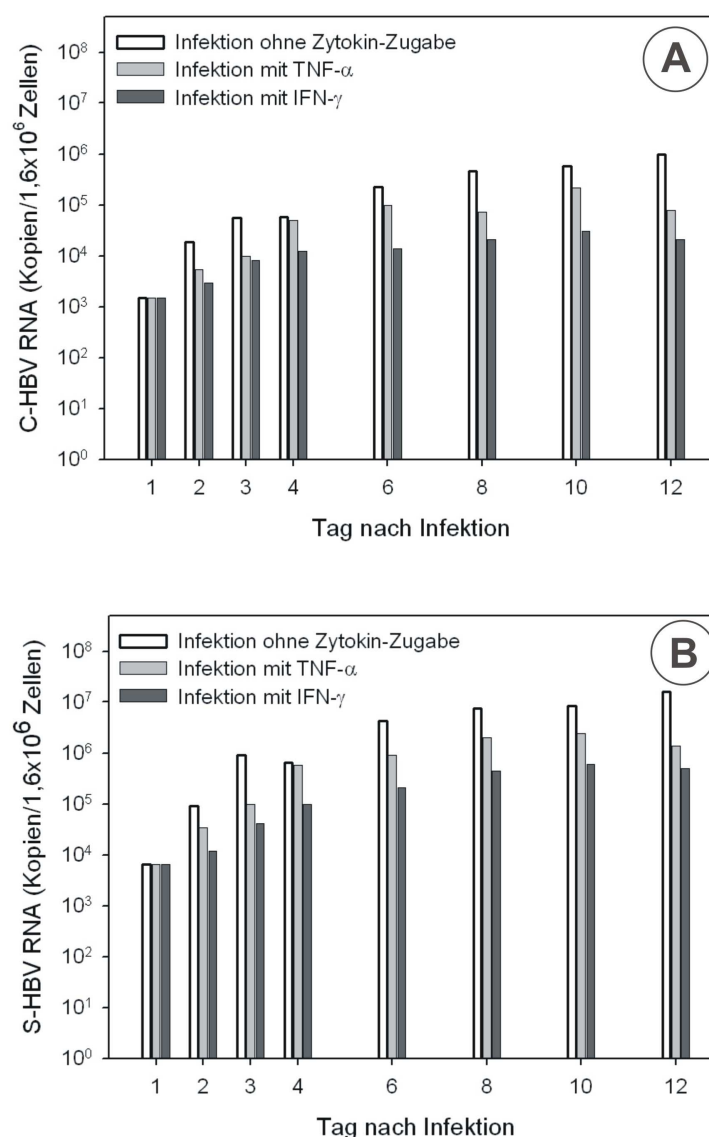
	Reduktion durch $\text{TNF-}\alpha$	Reduktion durch $\text{IFN-}\gamma$
<b>HBV-DNA</b>	58 %	62 %
<b>HBeAg</b>	38 %	62 %
<b>HBsAg</b>	45 %	77 %

**Tab. 3.3:** Reduktion der viralen DNA-Synthese und der Antigen-Produktion in HBV-infizierten primären humanen Hepatozyten durch  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IFN-}\gamma$



**Abb. 3.16:** Kinetik von HBeAg (A), HBsAg (B) und viraler DNA (C) in *in vitro* HBV-infizierten primären humanen Hepatozyten unter Einfluss von rekombinantem  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IFN-}\gamma$

Auch auf RNA-Ebene zeigte sich bereits 24 Stunden nach erstmaliger Zugabe der Zytokine eine Suppression der Virusaktivität (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17:** Konzentration der C-HBV RNA (A) und S-HBV RNA (B) in *in vitro* HBV-infizierten primären humanen Hepatozyten unter Einfluss von rekombinantem TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$

An Tag 12 lag in der Kultur ohne Zytokin-Zugabe eine C-HBV RNA-Konzentration von  $9,8 \times 10^5$  Kopien/ $1,6 \times 10^6$  Zellen vor, während TNF- $\alpha$  zu einer C-HBV Konzentration von  $8,0 \times 10^4$  Kopien und IFN- $\gamma$  zu  $2,1 \times 10^4$  Kopien führte. Die S-HBV RNA konnte in der Kontrollkultur in einer Konzentration von  $1,6 \times 10^7$  Kopien gemessen werden, während nach Kultur mit TNF- $\alpha$   $1,4 \times 10^6$  Kopien und nach Kultur mit IFN- $\gamma$   $4,9 \times 10^5$  Kopien gemessen wurden.

Wie auf Proteinebene übte IFN- $\gamma$  auch auf Transkriptionsebene eine stärkere inhibitorische Wirkung aus als TNF- $\alpha$  (Tab. 3.4).

	Reduktion durch TNF- $\alpha$	Reduktion durch IFN- $\gamma$
<b>C-HBV-RNA</b>	92 %	98 %
<b>S-HBV-RNA</b>	91 %	97 %

**Tab. 3.4:** Reduktion der viralen Transkription in HBV-infizierten primären humanen Hepatozyten durch TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$

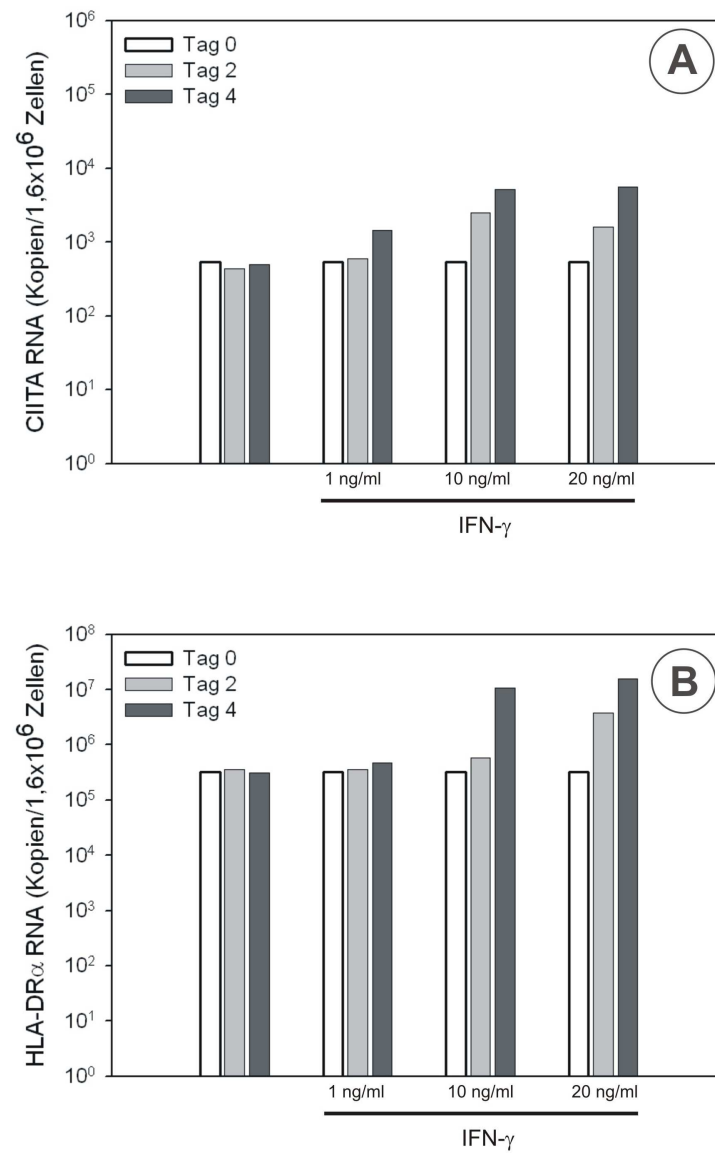
Analog zu den Vorversuchen mit den konstitutiv HBV-exprimierenden Hepatom-Zellen zeigte sich hier durch die Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  ein inhibitorischer Effekt auf die Virusreplikation in der Frühphase der Infektion. Somit konnte gezeigt werden, dass der antivirale Effekt die Synthese viraler Produkte sowohl in der Frühphase einer Infektion als auch in einer etablierten Infektion unterdrücken kann, wobei IFN- $\gamma$  stärker inhibierend wirkt als TNF- $\alpha$ .

## **Einfluss von Interferon- $\gamma$ auf die MHC-Klasse-II-Expression**

Es ist bekannt, dass IFN- $\alpha$  oder IFN- $\beta$  zu einer Steigerung der Transkription von MHC-Klasse-I führt, während IFN- $\gamma$  über Induktion des Klasse-II-Kotransaktivators (CIITA) die Expression von MHC-Klasse-II steuert. Da auch CD4<sup>+</sup>T-Zellen IFN- $\gamma$  sezernieren, könnte dies durch gesteigerte MHC-Klasse-II-Expression zu einer erhöhten Antigenpräsentation führen.

Daher wurde getestet, ob IFN- $\gamma$  auch in den primären Hepatozytenkulturen eine Steigerung der MHC-Klasse-II-Expression bewirkt. Hierfür wurden PHH für einen Zeitraum von vier Tagen unter Zugabe unterschiedlicher IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (1 ng/ml, 10 ng/ml und 20 ng/ml) kultiviert. Aus Abbildung 3.18 Teil A) ist ersichtlich, dass, durch 10 ng/ml IFN- $\gamma$  – ausgehend von  $5,4 \times 10^2$  CIITA-RNA Kopien/ $1,6 \times 10^6$  Zellen – bis Tag 4 eine 9,4-fach erhöhte CIITA-Expression auf  $5,1 \times 10^3$  Kopien erfolgte. Die Expression von HLA-DR $\alpha$  (Abb. 3.18; B) wurde durch 10 ng/ml IFN- $\gamma$  von  $3,2 \times 10^5$  Kopien/ $1,6 \times 10^6$  Zellen bis Tag 4 auf  $1,0 \times 10^7$  Kopien 31,2-fach erhöht.





**Abb. 3.18:** Expression von CIITA (A) sowie HLA-DR $\alpha$  (B) durch primäre humane Hepatozyten im Verlauf von 4 Tagen nach Zugabe von rekombinantem IFN- $\gamma$  in unterschiedlichen Konzentrationen

## **Zusammenfassung:**

### **Antivirale Wirkung der T<sub>H</sub>-Typ1-Zytokine auf die Virusreplikation HBV-infizierter humaner Hepatozyten**

Die rekombinanten T<sub>H</sub>-Typ1-Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  führten in HBV-infizierten humanen Hepatozyten zu einer Inhibition der viralen Aktivität.

- Der supprimierende Effekt auf die Infektion zeigte sich auf RNA- und Proteinebene sowie in der Replikation der viralen DNA.
- Die HBeAg-Produktion der humanen Hepatom-Zellen wurde durch TNF- $\alpha$  um bis zu 25 % und durch IFN- $\gamma$  um 42 % reduziert.
- Die HBeAg-Produktion der primären humanen Hepatozyten wurde durch TNF- $\alpha$  um 38 % und durch IFN- $\gamma$  um 62 % reduziert.
- Der Zytokin-vermittelte antivirale Effekt war bereits innerhalb von 24 Stunden messbar.
- Der antivirale Effekt war sowohl zytokin- als auch dosisabhängig.

Zudem bewirkte IFN- $\gamma$  in humanen Hepatozyten eine erhöhte MHC-Klasse-II-Expression.

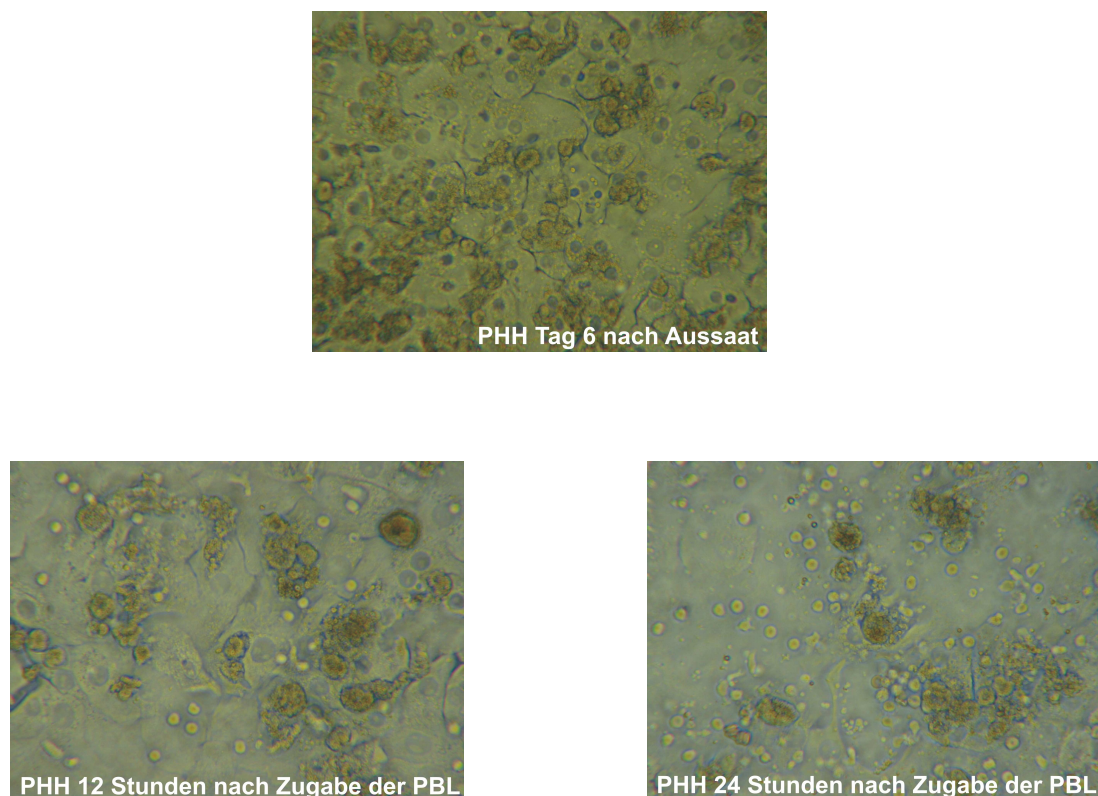
### 3.3 Kokultur HBV-infizierter humaner Hepatozyten mit HBV-spezifischen peripheren Blut-Lymphozyten

#### 3.3.1 Etablierung des Kokultur-Modells

Um eine Beeinflussung der Hepatitis-B-Virusinfektion durch HBV-spezifische Immunzellen im eigentlich funktionellen Kontext untersuchen zu können, sollten durch Kokultivierung infizierter Zielzelle (Hepatozyten) und reaktiver Effektorzelle (Immunzellen, periphere Blut-Lymphozyten, PBL) *in vivo* Bedingungen simuliert werden.

#### Alloreaktivität von Immunzellen und Hepatozyten unterschiedlicher HLA-Restriktion

Um eine Alloreaktivität von Immunzellen mit Hepatozyten zu überprüfen, wurden isolierte heterologe PBL mit direktem Kontakt zu PHH in eine Kulturschale gegeben. Wie in der Abbildung 3.19 ersichtlich, waren bereits nach 12-stündigem Zell-Zell-Kontakt morphologische Veränderungen der Hepatozyten erkennbar. Innerhalb von 24 Stunden nach Zugabe der PBL traten ausgedehnte zytotoxische Effekte auf, die schließlich zum Absterben der Hepatozytenkultur führten.



**Abb. 3.19:** Morphologische Veränderungen primärer humaner Hepatozyten nach direktem Zell-Zell-Kontakt mit heterologen peripheren Blut-Lymphozyten

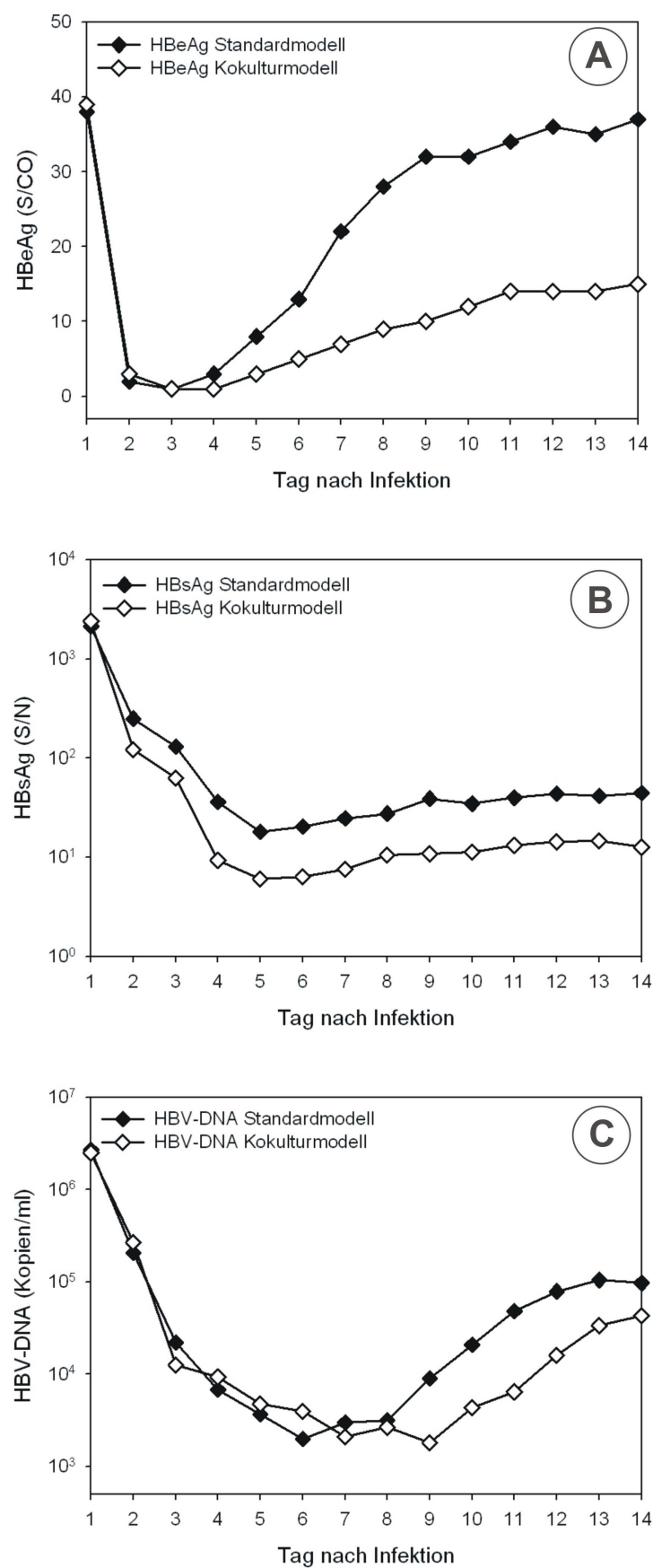
Für die Untersuchungen der Interaktionen der Immunzellen mit virusinfizierten Hepatozyten wurde deshalb ein Kulturmodell entwickelt, das eine Kokultivierung heterologer Lymphozyten mit Hepatozyten erlaubt. Dabei wurde durch Unterbinden eines direkten Zell-Zell-Kontaktes die Alloreaktivität der HLA-unterschiedlichen Zellen verhindert.

### ***Trans-well-System***

Zur Vermeidung direkter Zell-Zell-Kontakte wurden für die Durchführung der Kokultur von Hepatozyten mit PBL spezielle Zellsiebe verwendet. Die Membran dieser Siebe besitzt Poren mit einem Durchmesser von 0,4 µm und sollte daher ausschließlich für lösliche Faktoren, z.B. Zytokine oder virale Partikel und Antigene permeabel sein. Der Einsatz der Zellsiebe auf die Hepatozytenkultur erforderte zunächst eine Abwandlung bzw. Anpassung der Kulturbedingungen des Standard-Infektionsmodells.

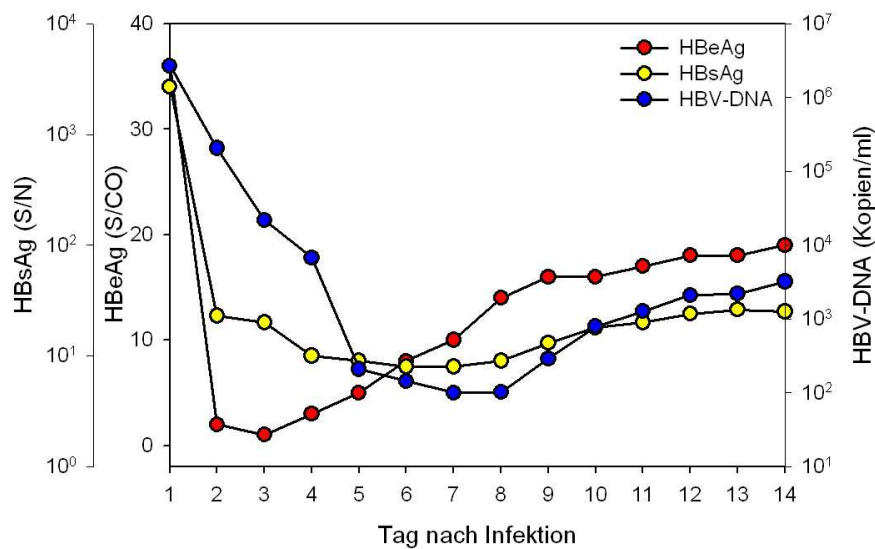
Durch das Einsetzen des Zellsiebes war es nötig, das Kulturvolumen auf 3 ml zu erhöhen. Deshalb wurde getestet, ob der Aufsatz des Zellsiebes und die Erhöhung des Kulturvolumens eine negative Beeinflussung der Infektion (z. B. Auswirkungen eines eventuell veränderten Sauerstoffpartialdrucks auf die Vitalität der Zellen und damit Änderung der HBeAg-Kinetik) zur Folge haben. Im Vergleich zu einer Standardinfektion (1 ml Kulturvolumen) wurde eine Infektion mit Siebeinsatz und 3 ml Kulturvolumen (Kokulturmodell) durchgeführt. Im Kokulturmodell wurde an Tag 2 (24 Stunden nach Infektion) das Zellsieb eingesetzt und die Volumina auf je 1,5 ml im Hepatozyten-*well* sowie im Zellsieb angepasst. Die Abbildung 3.20 zeigt den Verlauf der Synthese von HBeAg, HBsAg und viraler DNA in den beiden unterschiedlichen Infektionsmodellen.

Da die im Kokulturmodell produzierten Antigene und die DNA im Vergleich zum Standardmodell im Überstand 1 : 3 verdünnt vorlagen, war die maximal gemessene Konzentration der Antigene und der viralen DNA im Kokulturmodell erniedrigt. Jedoch war in allen Ansätzen – sowohl im Standardmodell als auch im Kokulturmodell – eine Zunahme der messbaren Antigen- und DNA-Konzentrationen zu verzeichnen. Das erhöhte Kulturvolumen und der Einsatz des Zellsiebes hatten somit keine negative Beeinflussung der Antigen-Produktion und der Virusreplikation zur Folge.



**Abb. 3.20:** Kinetik der im Zellkulturüberstand nachweisbaren Konzentrationen von HBeAg (A), HBsAg (B) und DNA (C) nach *in vitro* HBV-Infektion und Kultivierung der primären humanen Hepatozyten im Standardmodell (1 ml Kulturvolumen) und im Kokulturmodell mit Siebeinsatz (3 ml Kulturvolumen)

Zur Testung der Permeabilität der Siebmembran für die *in vitro* synthetisierten viralen Produkte wurden Hepatozyten infiziert und mit eingesetztem Zellsieb kultiviert. Antigen- und DNA-Konzentrationen wurden täglich im Zelleinsatz bestimmt. Die Abbildung 3.21 zeigt den Verlauf der im Zellsieb nachweisbaren Konzentrationen der HBeAg- und HBsAg-Produktion sowie der Synthese von viraler DNA. Im Zellsieb konnte sowohl eine kontinuierliche Konzentrationszunahme der Antigene als auch der Viruspartikel gemessen werden.

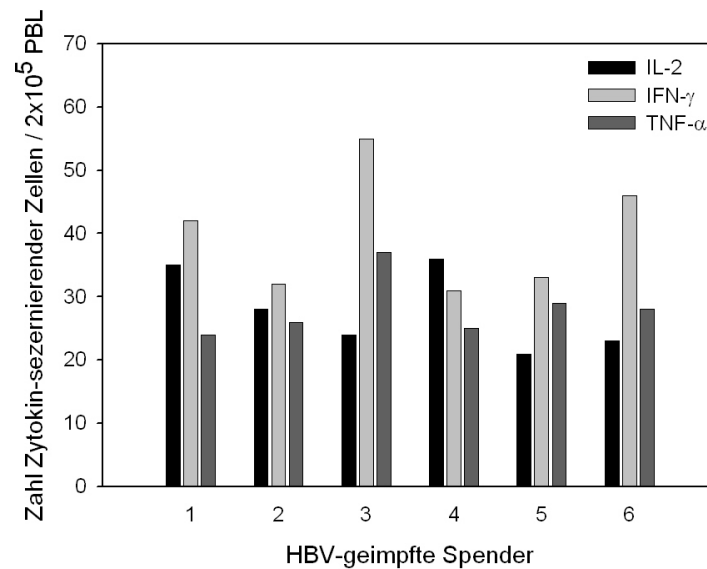


**Abb. 3.21:** Kinetik der im Zellsieb nachweisbaren Konzentrationen von HBeAg, HBsAg sowie viraler DNA nach *in vitro* HBV-Infektion und Kultivierung der primären humanen Hepatozyten mit dem Zelleinsatz

Dieses Ergebnis bestätigte das zu erwartende Diffusionsgleichgewicht zwischen Hepatozytenschale und Zelleinsatz. Die von Hepatozyten produzierten löslichen Antigene und die Viruspartikel passieren die Siebmembran; damit kann davon ausgegangen werden, dass im Gegenzug die von Immunzellen sezernierten löslichen Produkte (Zytokine) durch die Membran diffundieren.

### Modellsystem zur Kokultivierung HBV-spezifischer Immunzellen mit HBV-infizierten humanen Hepatozyten

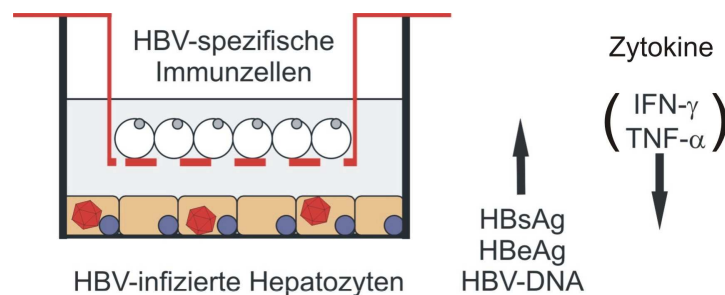
Mittels des Kokulturmodells wurden nun die Interaktionen HBV-spezifischer Immunzellen (PBL) mit HBV-infizierten Hepatozyten untersucht. Die HBV-spezifischen PBL wurden von Spendern gewonnen, die gegen Hepatitis-B-Virus geimpft worden waren. Der für die Vakzination verwendete Impfstoff enthält als immunogene Determinante das HBsAg. Die Reaktivität der Zellen gegen HBsAg (Impfstoff-Antigen) wurde im *Elispot* getestet. Das Zytokinprofil zeigt mit der Sekretion von IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  eine eindeutige T<sub>H</sub>-Typ1-Antwort (Abb. 3.22).



**Abb. 3.22:** Zytokinprofil HBV-spezifischer Immunzellen HBV-geimpfter Personen; gemessen mittels *Elispot*

Als Kontrollen wurden HBV-naive PBL von ungeimpften Spendern eingesetzt, die im *Elispot* keine Reaktivität auf das Impfstoff-Antigen zeigten.

Zur Untersuchung der Rolle der impfinduzierten HBsAg-spezifischen  $CD4^+$ T-Lymphozyten bei der HBV-Infektion wurden infizierte Hepatozyten mit PBL, die bei Geimpften die spezifischen  $CD4^+$ T-Zellen beinhalten, kokultiviert. Die Abbildung 3.23 zeigt schematisch das Kokultursystem, mit dem die im Folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt wurden. Die grundlegende Idee war, dass die von HBV-infizierten Hepatozyten sezernierten viralen Produkte eine Stimulation der HBV-spezifischen Immunzellen bewirken, die als reaktive Antwort die Bildung antiviral wirkender Zytokine zur Folge haben könnte bzw. sollte. Aufgrund des sich einstellenden Diffusionsgleichgewichts zwischen Hepatozyten-*well* und Zellsieb sollten trotz fehlendem Zell-Zell-Kontakt Interaktionen zwischen Ziel- und Effektorzellen stattfinden können, die über lösliche Faktoren vermittelt werden.



**Abb. 3.23:** *Trans-Well*-System zur Durchführung der Kokultivierungsversuche von HBV-spezifischen Immunzellen mit HBV-infizierten humanen Hepatozyten

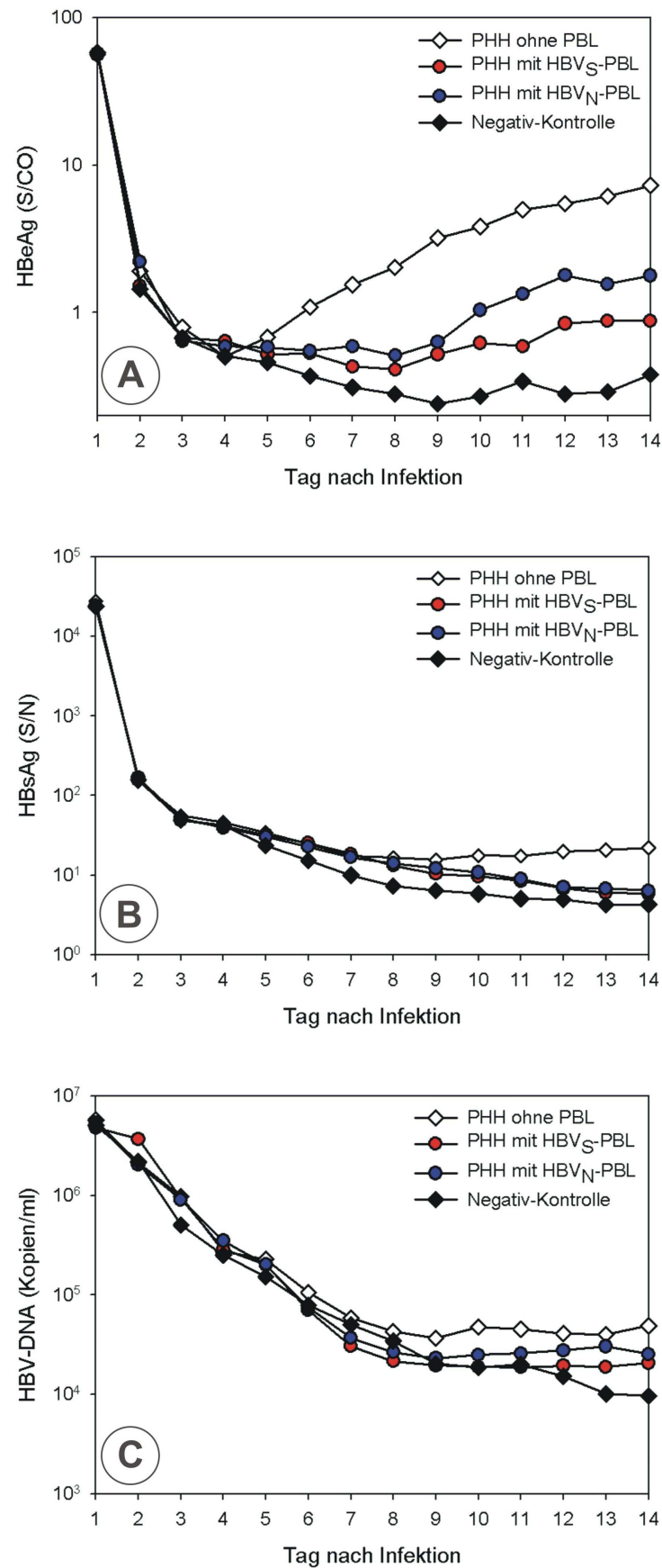
Zur Beurteilung der Infektionseffizienz der PHH/PBL-Kokulturen wurde die Kinetik der HBeAg-Produktion bestimmt.



### 3.3.2 Wirkung HBV-spezifischer Immunzellen auf die akute HBV-Infektion primärer humaner Hepatozyten

#### Wirkung HBV-spezifischer PBL auf die Initiation der Hepatitis-B-Virusinfektion

Zunächst wurde die Wirkung von HBV-spezifischen PBL geimpfter Spender auf die Initiation einer *in vitro* HBV-Infektion der PHH untersucht. Parallel dazu wurden als Kontrollen Kokulturen mit HBV-naiven PBL ungeimpfter Spender durchgeführt. Der Beginn der Kokulturen erfolgte 24 Stunden nach der Infektion durch Zugabe von  $5 \times 10^6$  isolierter PBL zu HBV-infizierten Hepatozyten. Abbildung 3.24 zeigt die HBeAg- und HBsAg-Synthese und die Replikation der viralen DNA in PHH/PBL-Kokulturen mit HBV-spezifischen (HBV<sub>S</sub>) und HBV-naiven (HBV<sub>N</sub>) PBL.



**Abb. 3.24:** Kinetik der im Zellkulturüberstand nachweisbaren Konzentrationen von HBeAg (A), HBsAg (B) und viraler DNA (C) nach *in vitro* HBV-Infektion der primären humanen Hepatozyten und Koinokultur mit HBV-spezifischen PBL eines geimpften Spenders und HBV-naiven PBL eines ungeimpften Spenders

Die Kontrollinfektion (PHH ohne PBL) zeigte ab Tag 4 nach Infektion einen kontinuierlichen Anstieg der HBeAg-Produktion (Abb. 3.24; A), die ein Maximum an Tag 14 (HBeAg [S/CO]: 7,3) erreichte. Im Gegensatz dazu konnte in der PHH/HBV-spezifischen-PBL-Kultur keine effektive Antigen-Neuproduktion gemessen werden ( $< 1$  S/CO; Nachweisgrenze: 1 S/CO). Überraschenderweise wurde im Vergleich zur Kontrollinfektion auch in der PHH/HBV-naiven-PBL-Kultur eine deutlich verminderte HBeAg-Konzentration (1,8 S/CO) gemessen.

Die Messung der HBsAg-Expression (Abb. 3.24; B) zeigte in der Kontrollinfektion ab Tag 9 einen leichten Anstieg. An Kulturende war die HBsAg-Konzentration (HBsAg [S/N]) sowohl in der PHH/HBV-spezifischen-PBL-Kultur (5,7 S/N) als auch der PHH/HBV-naiven-PBL-Kultur (6,4 S/N) im Vergleich zur Kontrollinfektion (22,1 S/N) deutlich reduziert.

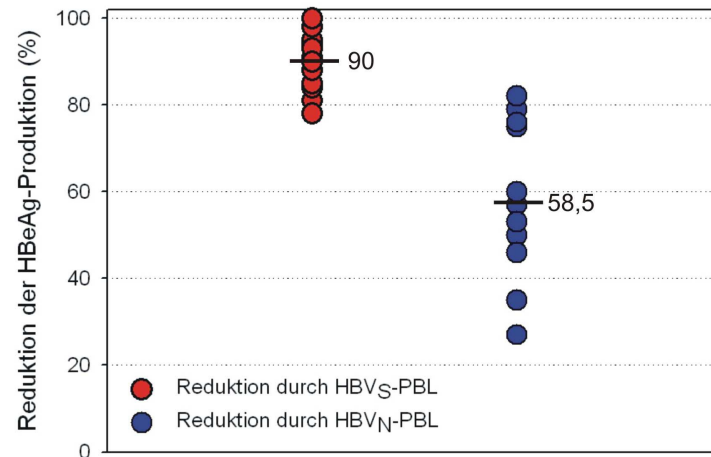
Die Konzentrationsbestimmung der HBV-DNA (Abb. 3.24; C) zeigte in der Kontrollinfektion ebenfalls ab Tag 9 einen leichten Anstieg der Virusreplikation mit einer Maximalkonzentration von  $4,9 \times 10^4$  Kopien/ml. An Tag 14 wiesen sowohl die PHH/HBV-spezifische-PBL-Kultur ( $2,1 \times 10^4$  Kopien/ml) als auch die PHH/HBV-naive-PBL-Kultur ( $2,5 \times 10^4$  Kopien/ml) eine verminderte DNA-Synthese auf.

In Kokultur der HBV-infizierten Hepatozyten mit HBV-spezifischen und HBV-naiven Immunzellen war ein antiviraler Effekt zu verzeichnen, der zu einer deutlichen Reduktion der HBeAg-Produktion, der HBsAg-Expression sowie der Synthese der viralen DNA führte (Tab. 3.5).

	Reduktion durch HBV-spezifische PBL	Reduktion durch HBV-naive PBL
<b>HBeAg</b>	100 %	75 %
<b>HBsAg</b>	74 %	71 %
<b>HBV-DNA</b>	57 %	49 %

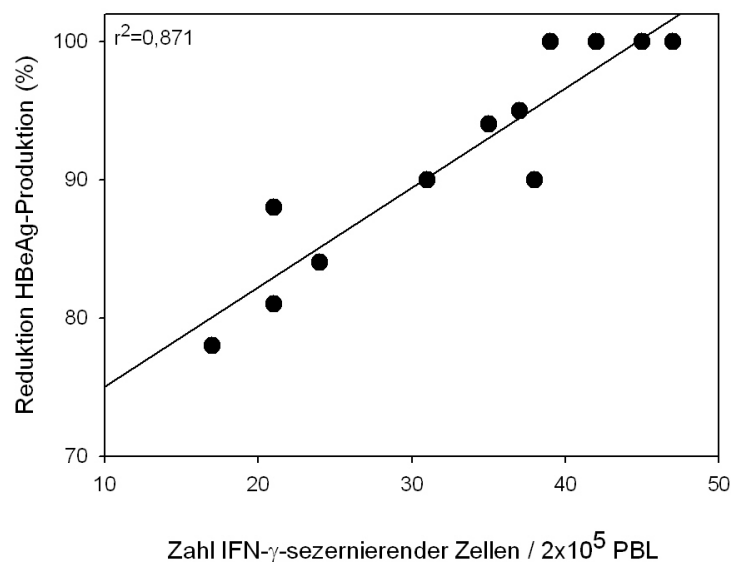
**Tab. 3.5:** Reduktion der Antigen-Produktion und der viralen DNA-Synthese in HBV-infizierten primären humanen Hepatozyten durch HBV-spezifische PBL eines geimpften Spenders und HBV-naive PBL eines ungeimpften Spenders

Die durch HBV-spezifische PBL vermittelte antivirale Wirkung auf die HBeAg-Produktion wurde in einem Kollektiv von 17 geimpften Spendern überprüft. HBV-spezifische PBL supprimierten die HBeAg-Produktion Zellspender-abhängig bis zur Vollständigkeit (um 78 bis 100 %) (Abb. 3.25). Die Effekte HBV-naiver PBL auf die HBV-Infektion wurden in einem Kollektiv von 12 ungeimpften Spendern getestet. Dabei wurde eine Reduktion der HBeAg-Produktion von 27 bis 82 % erreicht.



**Abb. 3.25:** Reduktion der HBeAg-Produktion in *in vitro* HBV-infizierten primären humanen Hepatozyten durch HBV-spezifische PBL (n=17; Median 90 Prozent) und durch HBV-naive PBL (n=12; Median 58,5 Prozent) verschiedener Spender

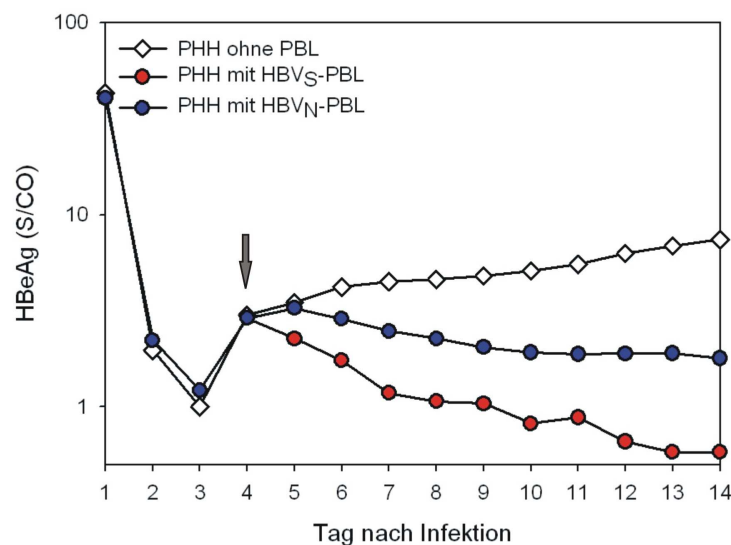
Die HBV-spezifischen PBL führten zu einer signifikant ( $p < 0,05$ ) stärkeren Suppression der HBeAg-Produktion verglichen mit HBV-naiven PBL. Dabei zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Reduktion der HBeAg-Produktion und der Zahl reaktiver (IFN- $\gamma$ -sezernierender) T-Zellen (gemessen im *Elispot*) (Abb. 3.26).



**Abb. 3.26:** Korrelation der Zahl IFN- $\gamma$ -sezernierender Zellen verschiedener HBV-geimpfter Spender mit der Reduktion der HBeAg-Produktion in *in vitro* HBV-infizierten primären humanen Hepatozyten

## Wirkung HBV-spezifischer und HBV-naiver PBL auf die bestehende Hepatitis-B-Virusinfektion

Nachfolgend wurde untersucht, ob der PBL-vermittelte antivirale Effekt auch bereits bestehende Infektionen beeinflussen kann. Hierfür erfolgte die Zugabe der PBL an Tag 4 nach Beginn der Infektion. Die Abbildung 3.27 zeigt anhand eines repräsentativen Beispiels die Kinetik der bereits aktiven HBeAg-Produktion nach Zugabe von HBV-spezifischen und HBV-naiven PBL an Tag 4 (↓).



**Abb. 3.27:** Kinetik der HBeAg-Produktion nach *in vitro* HBV-Infektion der primären humanen Hepatozyten und Zugabe HBV-spezifischer und HBV-naiver PBL an Tag 4 nach Beginn der Infektion

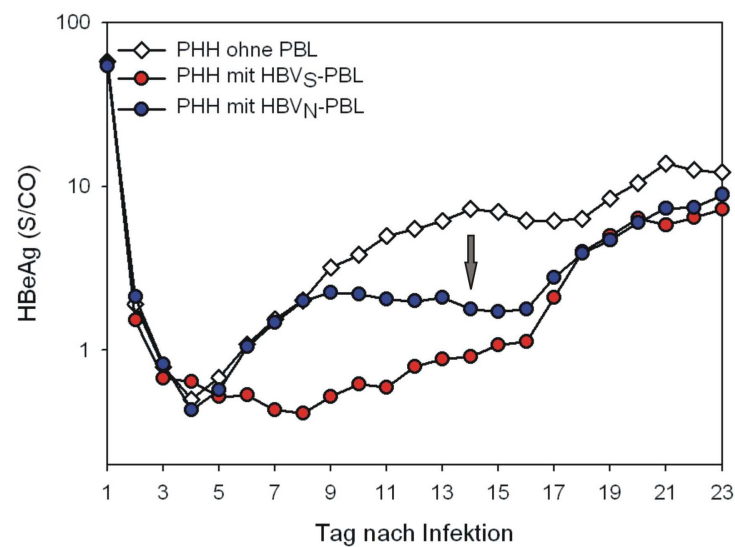
In allen Kulturen war zunächst ab Tag 3 nach Infektion ein Anstieg der HBeAg-Produktion zu verzeichnen. An Tag 4 war in allen Ansätzen eine vergleichbare HBeAg-Konzentration zu messen (HBeAg [S/CO]: 3,0; 2,9; 2,9). Die Zugabe HBV-spezifischer und HBV-naiver PBL jedoch bewirkte eine starke Inhibition der Antigen-Produktion in den Kokulturan-sätzen, während die HBeAg-Produktion in der Kontrollinfektion ohne PBL bis Tag 14 eine Konzentration von 7,4 S/CO erreichte. Die HBeAg-Konzentration in der PHH/HBV-spezifischen-PBL-Kultur sank auf < 1,0 S/CO. Auch in Kultur mit HBV-naiven PBL wurde die HBeAg-Produktion deutlich reduziert (1,8 S/CO). HBV-spezifische PBL reduzierten die HBeAg-Produktion vollständig, während HBV-naive PBL eine Inhibition der Infektion um 76 % bewirkten.

Die Versuche zur Zeitabhängigkeit der antiviralen Wirkung von PBL auf die Primärinfektion der Hepatozyten ergaben, dass neben der Initiation einer Infektion auch eine bereits etablierte HBV-Infektion durch HBV-spezifische und HBV-naive PBL dauerhaft beeinflusst werden kann.

## Die durch HBV-spezifische und HBV-naive PBL vermittelte antivirale Wirkung ist reversibel

Da gezeigt werden konnte, dass durch Zugabe von HBV-spezifischen sowie HBV-naiven PBL eine bereits bestehende Virusinfektion der Hepatozyten beeinflusst werden kann, wurde untersucht, ob es sich dabei um einen reversiblen Effekt handelt. Hierfür wurden nach 14-tägiger Kokultur die PBL entfernt und die HBeAg-Konzentration im Überstand der infizierten Hepatozyten eine weitere Woche verfolgt.

An einem repräsentativen Beispiel ist in Abbildung 3.28 der Verlauf der HBeAg-Produktion während und nach der Kokultur mit HBV-spezifischen bzw. HBV-naiven PBL (↓) dargestellt.



**Abb. 3.28:** HBeAg-Kinetik nach *in vitro* HBV-Infektion der primären humanen Hepatozyten und Kokultur mit HBV-spezifischen und HBV-naiven PBL (bis Tag 14) und nach Entfernen der PBL (ab Tag 14)

Bis Tag 14 erreichte die HBeAg-Produktion in der Kultur ohne PBL eine Konzentration von 7,3 S/CO, während in der PHH/HBV-spezifischen-PBL-Kultur 1,0 S/CO und in der PHH/HBV-naiven-PBL-Kultur 2,1 S/CO gemessen wurden. Nach Entfernen der PBL an Tag 14 stieg sowohl in der PHH/HBV-spezifischen-PBL-Kultur als auch in der PHH/HBV-naiven-PBL-Kultur die HBeAg-Konzentration bereits nach 48 Stunden an. Im weiteren Verlauf folgte eine Zunahme der HBeAg-Produktion, die sich an Antigen-Konzentrationen der Kontrollkultur annäherte (HBeAg an Tag 23: PHH ohne PBL: 12,2 S/CO; PHH mit HBV-spezifischen PBL: 7,2 S/CO; PHH mit HBV-naiven PBL: 8,9 S/CO).

Die Messung der HBeAg-Kinetik als Marker für die Virusreplikation zeigt somit, dass der antivirale Effekt von HBV-spezifischen und HBV-naiven PBL auf die *in vitro* Primärinfektion der Hepatozyten reversibel ist.

**Zusammenfassung:****Beeinflussung der Virusreplikation HBV-infizierter primärer humaner Hepatozyten durch HBV-spezifische und HBV-naive Immunzellen**

- Durch HBV-spezifische PBL erfolgte eine signifikante Reduktion der HBeAg-Produktion (78 bis 100 %).
- Die Reduktion der HBeAg-Produktion korrelierte mit der Zahl IFN- $\gamma$ -sezernierender Zellen der jeweiligen PBL-Spender.
- Der supprimierende Effekt der HBV-spezifischen PBL war reversibel.

Obwohl HBV-naive PBL im *Elispot* nach Stimulation mit rekombinantem HBsAg (Impfstoff-Antigen) – im Gegensatz zu HBV-spezifischen PBL – keine Reaktivität zeigen, vermitteln sie im Kulturmodell der primären humanen Hepatozyten eine inhibitorische Wirkung auf die HBV-Infektion (27 bis 82 %). Auch die inhibitorische Wirkung der HBV-naiven PBL war reversibel.

Allerdings reduzierten HBV-naive PBL die HBeAg-Produktion signifikant weniger als HBV-spezifische PBL (Median 58,5 % versus 90,0 %).

Der inhibierende Effekt der HBV-naiven PBL dürfte Ausdruck der angeborenen Immunität sein. Die Kokulturversuche wurden mit der Gesamtheit der PBL-Zellpopulation durchgeführt, die auch Komponenten und Zellen der angeborenen Immunität wie Monozyten, Makrophagen, Dendriten oder Natürliche Killer-Zellen beinhaltet. Zudem sezernieren die infizierten Hepatozyten neben HBsAg auch HBeAg sowie virale DNA. Anders als im klassischen *Elispot* erfolgt daher in diesem Modell eine Stimulation der Immunzellen nicht ausschließlich durch HBsAg.

Aufbauend auf diesen grundlegenden Erkenntnissen über die antivirale Wirkung HBV-spezifischer und -naiver Immunzellen auf die Hepatitis-B-Virusinfektion wurden weitere Versuchsreihen zur näheren Charakterisierung dieser Effekte mit den humanen Hepatom-Zell-Linien durchgeführt.

### 3.3.3 Wirkung HBV-spezifischer und HBV-naiver Immunzellen auf die Virusreplikation in HBV-infizierten humanen Hepatom-Zellen

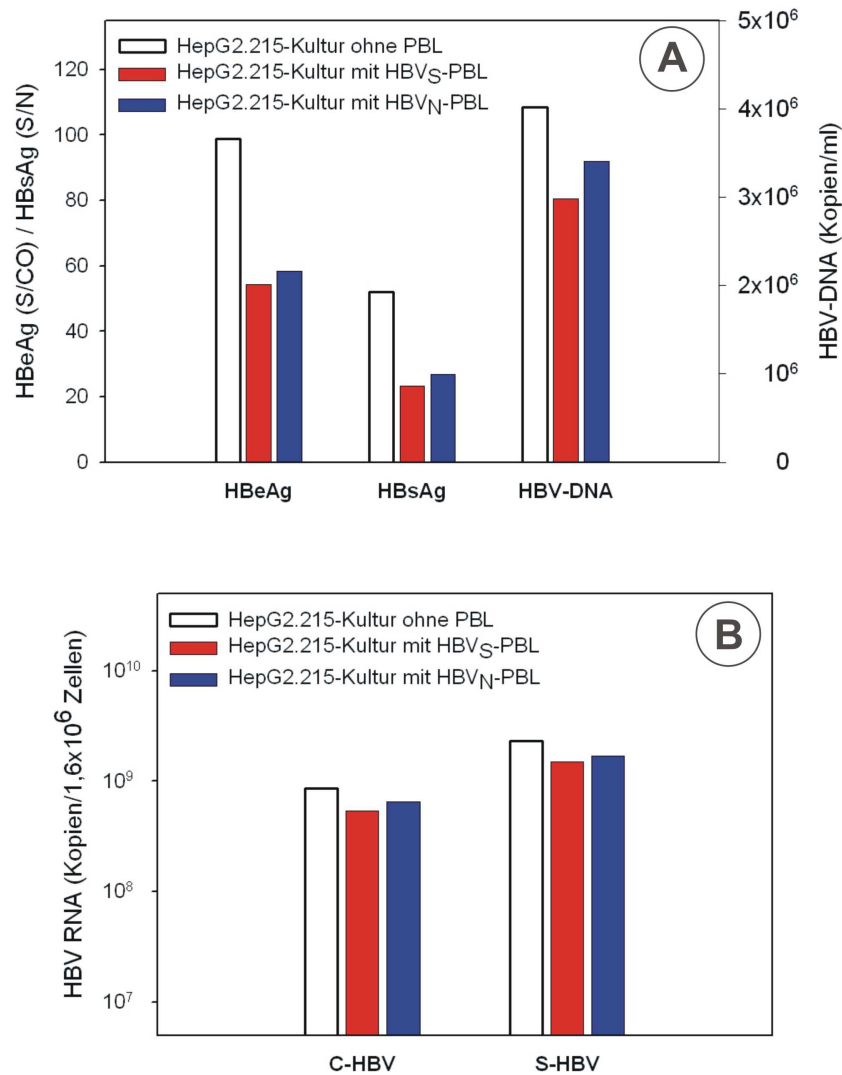
Weitere Untersuchungen der beschriebenen antiviralen Effekte der HBV-spezifischen und HBV-naiven PBL auf die Hepatitis-B-Virusinfektion wurden an humanen Hepatom-Zell-Linien durchgeführt. Die humanen Zell-Linien HepG2.215 und HepG2.4A5 exprimieren konstitutiv HBsAg, HBeAg sowie virale DNA und dienen als Modell einer chronischen HBV-Infektion. Aus der hohen Proliferationsrate dieser Zell-Linien ergibt sich allerdings die experimentelle Schwierigkeit, dass die Untersuchung der antiviralen Effekte nur über einen kurzen Zeitraum (bis zu 48 Stunden) durchgeführt werden kann. Aus den Kokultur-Experimenten mit den primären Hepatozyten ist jedoch bekannt, dass der antivirale Effekt der PBL bereits in der Frühphase einer Infektion die HBeAg-Produktion signifikant beeinflussen kann und dieser inhibitorische Effekt in Langzeitversuchen dauerhaft anhielt. Des Weiteren war dieser inhibitorische Effekt auf die HBeAg-Produktion bereits innerhalb von 24 Stunden nach Beginn der Kokultur messbar. Somit sollten sich PBL-vermittelte Effekte auch innerhalb von Zell-Passagen der Hepatom-Linien äußern, die – je nach Kulturgröße – meist nach 48 bis 72 Stunden durchgeführt werden.

#### Wirkung HBV-spezifischer und HBV-naiver Immunzellen auf die virale Transkription und Translation

Zunächst sollte geklärt werden, in wie weit der durch PBL vermittelte antivirale Effekt auch die Antigen-Produktion und Virusreplikation in den HBV-infizierten Hepatom-Zellen beeinflusst. Hierfür wurden HepG2.215-Zellen in 6-*well*-Platten ausgesät, HBV-spezifische bzw. HBV-naive PBL in Zellsieben auf die Kulturen transferiert und 48 Stunden kokultiviert.

Abbildung 3.29 zeigt die innerhalb von 48 Stunden produzierte Gesamtkonzentration der viralen Antigene HBeAg und HBsAg und der DNA sowie der HBV-RNAs in der HepG2.215/PBL-Kokultur.





**Abb. 3.29:** Produktion von HBeAg, HBsAg und viraler DNA (A) in HepG2.215-Zellen sowie zugehörige HBV-RNA-Konzentrationen (B) in Kokultur mit HBV-spezifischen und HBV-naiven PBL

Im Gegensatz zur HBeAg-Konzentration (Abb. 3.29; A) der HepG2.215-Kultur ohne PBL (98 S/CO) wurde durch HBV-spezifische PBL die HBeAg-Produktion auf 55 S/CO und durch HBV-naive PBL auf 59 S/CO reduziert. Die HBsAg-Konzentration wurde von 52 S/N in der Kontrollkultur auf 22 S/N (durch HBV-spezifische PBL) bzw. 26 S/N (durch HBV-naive PBL) vermindert. Die DNA-Synthese in den Kokulturen war im Vergleich zur Kontrollkultur ( $4,1 \times 10^6$  Kopien/ml) durch HBV-spezifische PBL auf  $2,9 \times 10^6$  Kopien/ml und durch HBV-naive PBL auf  $3,3 \times 10^6$  Kopien/ml vermindert.

Auch auf Transkriptionsebene wurde eine inhibitorische Wirkung der PBL festgestellt (Abb. 3.29; B). Ausgehend von  $8,6 \times 10^8$  C-HBV RNA-Kopien/ $1,6 \times 10^6$  Zellen wurden in der HepG2.215/HBV-spezifischen-PBL-Kultur  $5,3 \times 10^8$  C-HBV Kopien und in der HepG2.215/HBV-naiven-PBL-Kultur  $6,5 \times 10^8$  C-HBV Kopien quantifiziert. Für die S-HBV RNA wurden in der Kontrollkultur  $2,3 \times 10^9$  Kopien gemessen. In Kultur mit HBV-spezifischen PBL lagen  $1,5 \times 10^9$  S-HBV Kopien vor und in Kultur mit HBV-naiven PBL wurden  $1,7 \times 10^9$

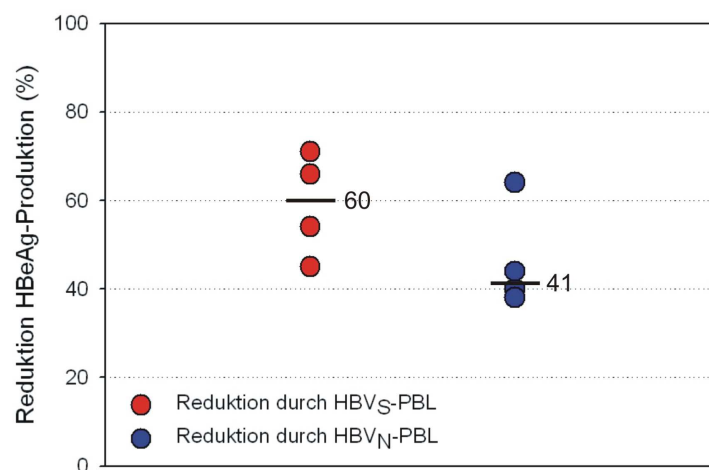
S-HBV Kopien gemessen.

Analog zu den Ergebnissen der Kokultursversuche mit *in vitro* infizierten primären Hepatozyten wurde auch im Modell mit den humanen Hepatom-Zellen ein PBL-vermittelter antiviraler Effekt erzielt (Tab. 3.6).

	Reduktion durch HBV-spezifische PBL	Reduktion durch HBV-naive PBL
<b>HBeAg</b>	44 %	40 %
<b>HBsAg</b>	58 %	50 %
<b>HBV-DNA</b>	30 %	20 %
<b>C-HBV-RNA</b>	38 %	25 %
<b>S-HBV-RNA</b>	35 %	26 %

**Tab. 3.6:** Reduktion der Antigen-Produktion, der viralen DNA-Synthese und der viralen Transkription in HepG2.215-Zellen durch HBV-spezifische und -naive PBL

In Wiederholungsversuchen mit Immunzellen verschiedener Spender zeigte sich, dass der inhibitorische Effekt der HBV-spezifischen und HBV-naiven PBL auf die Virusreplikation der Hepatom-Zellen schwächer ausgeprägt ist als auf die der primären Hepatozyten. Des Weiteren war der Unterschied der Antigen-Reduktion durch HBV-spezifische und HBV-naive PBL geringer als im Modell der primären Hepatozyten. Dennoch reduzierten HBV-spezifische PBL die Infektion der HepG2.215-Zellen deutlich stärker als HBV-naive PBL (Abb. 3.30).



**Abb. 3.30:** Reduktion der HBeAg-Produktion in HepG2.215-Zellen durch HBV-spezifische (n=4; Median 60 Prozent) und HBV-naive PBL (n=4; Median 41 Prozent) verschiedener Spender

**Zusammenfassung:****Beeinflussung der Virusreplikation HBV-infizierter humaner Hepatom-Zellen durch HBV-spezifische und HBV-naive Immunzellen**

- Durch sowohl HBV-spezifische als auch HBV-naive PBL erfolgte eine signifikante Reduktion der HBeAg-Produktion.
- HBV-spezifische PBL reduzierten die HBeAg-Produktion der Hepatom-Zellen um 45 bis 71 % (Median 60%).
- HBV-naive PBL bewirkten eine Inhibition der HBeAg-Produktion um 38 bis 64 % (Median 41 %).
- Der PBL-vermittelte antivirale Effekt war auch auf Transkriptionsebene messbar.

Somit konnte gezeigt werden, dass HBV-spezifische PBL – ebenso wie HBV-naive PBL – inhibitorisch sowohl auf die akute HBV-Infektion der primären Hepatozyten als auch auf die chronische Infektion der Hepatom-Zellen wirken. Die infektionssupprimierende Wirkung der spezifischen PBL, die u. a. auch impfinduzierte HBsAg-spezifische CD4<sup>+</sup>T-Zellen beinhalten, war deutlich stärker als die der naiven Immunzellen.

### 3.3.4 Charakterisierung der die Virusreplikation hemmenden Effektorzellen

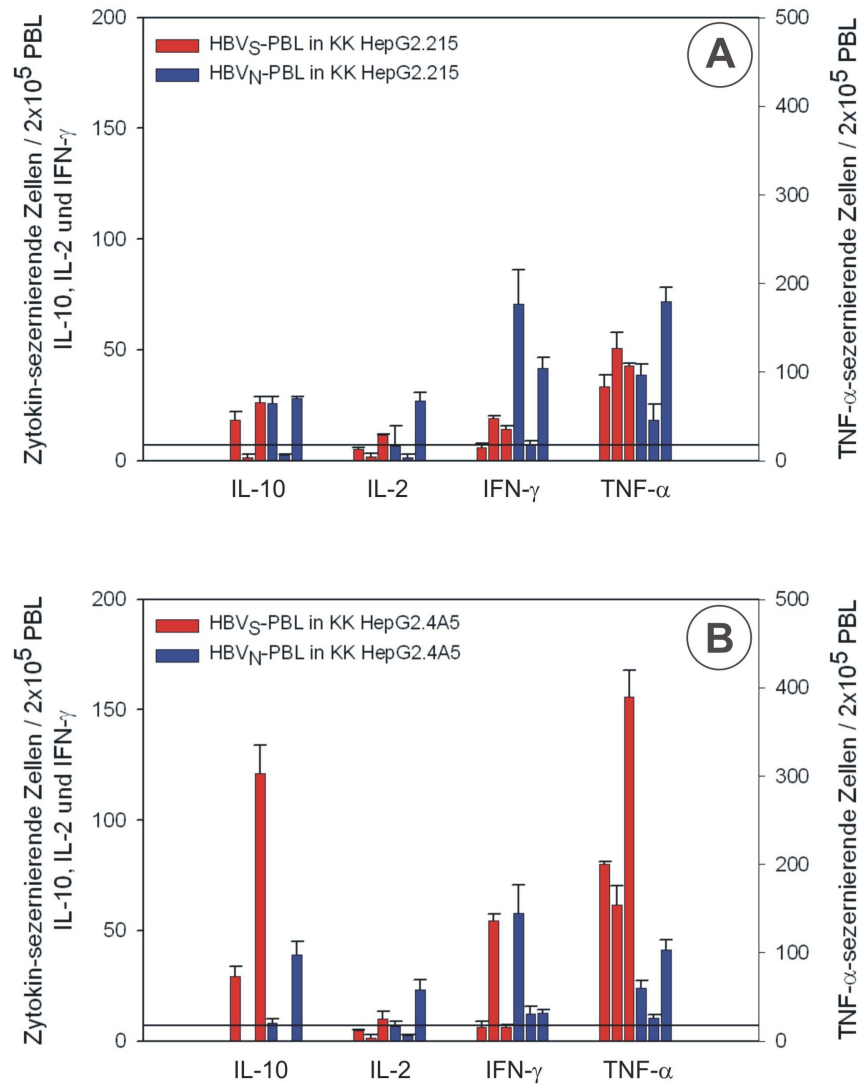
Die Immunzellen zeigten in Kokulturversuchen antivirale Wirkung und führten zu einer effektiven Suppression der viralen Aktivität. Aufgrund des fehlenden Zell-Zell-Kontaktes zwischen Ziel- (Hepatozyten) und Effektorzellen (PBL) konnten für diesen supprimierenden Effekt nur lösliche Faktoren (Zytokine) verantwortlich sein. HBV-spezifische Immunzellen sezernieren nach *in vitro* Stimulation mit rekombinantem HBsAg (Impfstoff-Antigen) die T<sub>H</sub>-Typ1-Zytokine IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (s. Abb. 3.22). Die HBV-naiven PBL ungeimpfter Spender zeigten nach *in vitro* Stimulation mit rekombinantem HBsAg – wie erwartet – keine Reaktivität. Im *Elispot* wurden jedoch ausschließlich impfinduzierte, HBsAg-spezifische T-Zell-Antworten untersucht. Im Gegensatz dazu erfolgte die Stimulation der PBL in den Kokulturen auch durch andere virale Antigene sowie durch die neu gebildeten infektiösen Virionen.

Da sowohl die Kokultur mit PBL HBV-geimpfter als auch HBV-naiver Spender eine Inhibition der viralen Aktivität zur Folge hatte, lag die Vermutung nahe, dass die antivirale Zytokinantwort nicht ausschließlich HBsAg-vermittelt ist. Es ist denkbar, dass Komponenten bzw. Zellen der angeborenen Immunität für die antivirale Wirkung der HBV-naiven PBL verantwortlich sind.

Zunächst wurde untersucht, welche Zytokine nach Stimulation der PBL in der Kokultur durch Zellen HBV-geimpfter bzw. HBV-naiver Spender sezerniert werden.

#### Zytokinprofil der antiviral wirkenden Effektorzellen

Der quantitative Nachweis Zytokin-sezernierender Zellen erfolgte im *Elispot* durch Detektion der Sekretion von IL-4, IL-5, IL-10, IL-2, sowie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Hierfür wurden PBL von drei HBV-geimpften bzw. HBV-ungeimpften Spendern 24 Stunden mit HepG2.215-Zellen bzw. HepG2.4A5-Zellen kokultiviert und die Zytokinproduktion anschließend im *Elispot* bestimmt. Aus Abbildung 3.31 geht hervor, dass die Kokultur von virusinfizierten Hepatozyten und PBL sowohl bei HBV-geimpften als auch bei HBV-ungeimpften Spendern die Ausschüttung der Zytokine IL-10, IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  induziert.



**Abb. 3.31:** Zytokinprofil und Zahl der Zytokin-sezernierenden Zellen der HBV-spezifischen PBL dreier geimpfter und der HBV-naiven PBL dreier ungeimpfter Spender nach Kokultivierung mit HepG2.215-Zellen (A) und HepG2.4A5-Zellen (B)

Neben den  $T_H$ -Typ1-Zytokinen IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , für die in dieser Arbeit eine hemmende Wirkung auf die Antigenexpression und die Virusreplikation HBV-infizierter humaner Hepatozyten gezeigt wurde (s. Abschnitt 3.2), produzierten die PBL auch IL-10 und IL-2.

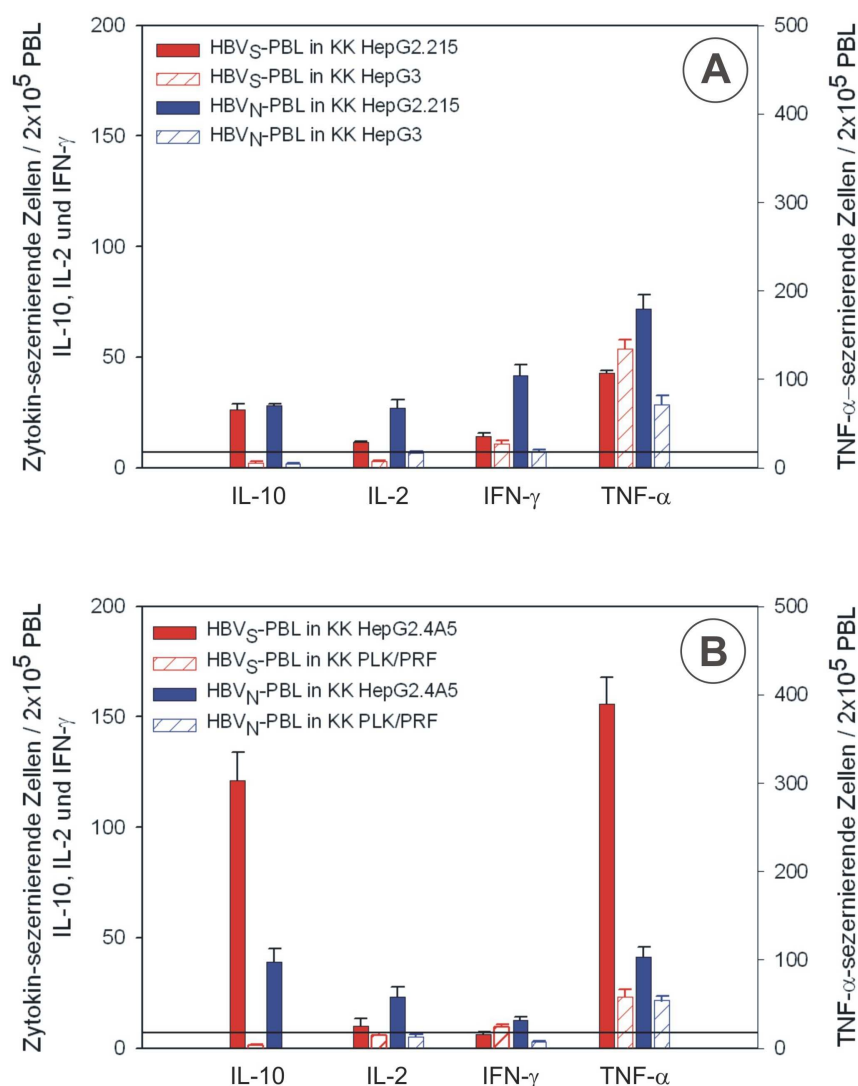
Die PBL HBV-geimpfter Spender zeigten nach Kokultur mit virusproduzierenden Hepatozyten das gleiche Zytokinmuster wie nach Stimulation mit rekombinantem HBsAg. Zusätzlich sezernierten sie IL-10. Obwohl das Impfstoff-Antigen (HBsAg) im klassischen *Elispot* keine Reaktivität HBV-naiver PBL auslöste, sezernierten diese nach Kokultur mit den virusproduzierenden Zellen IL-10, IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ .

### Selektive Stimulation der Effektorzellen durch virale Produkte

Mithilfe der unterschiedlichen humanen Hepatom-Zell-Linien konnte im weiteren Verlauf selektiv untersucht werden, welche viralen Faktoren in diesem Kultursystem für die Stimulation der Immunzellen verantwortlich sind und welche Reaktivität das *in vitro* synthetisierte HBsAg bei den Immunzellen auslöst. Zur antigenspezifischen Stimulation der Immunzellen dienten in diesen Versuchsreihen die ausschließlich HBsAg-exprimierenden Linien HepG3 und PLK/PRF. Die HBsAg-Produktion der HepG3-Zellen ist mit der der HepG2.215-Zellen vergleichbar, während die HBsAg-Produktion der PLK/PRF-Zellen ähnliche Konzentrationen liefert wie die der HepG2.4A5-Zellen. Zur Klärung der Frage, welche Reaktivität der Immunzellen das in der Kultur gebildete HBsAg auslöst, wurden PBL eines geimpften und eines ungeimpften Spenders mit HepG3-Zellen im Vergleich zu HepG2.215-Zellen kokultiviert. Ebenso wurden die PBL dieser Spender mit PLK/PRF-Zellen im Vergleich zu HepG2.4A5-Zellen kultiviert. Nach 24-stündiger Kokultivierung mit den Hepatom-Zellen im *Trans-well*-System wurden die PBL direkt im *Elispot* getestet.

Die Abbildung 3.32 zeigt die Zahl der Zytokin-sezernierenden Zellen und das Zytokinmuster der PBL eines geimpften bzw. eines ungeimpften Spenders nach der Kokultur. Zellen beider Spender sezernierten nach Stimulation in der Kokultur die Zytokine IL-10, IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Jedoch gab es deutliche Unterschiede hinsichtlich der Zahl reaktiver Zellen.

Sowohl die PBL des geimpften als auch des ungeimpften Spenders zeigten nach Kokultivierung mit den HepG2.215-Zellen bzw. HepG2.4A5-Zellen eine signifikant stärkere Zytokinsekretion als nach Kokultivierung mit HepG3-Zellen bzw. PLK/PRF-Zellen. Daraus resultierend wurden durch Stimulation mit HBsAg als einzig viralem Faktor weniger Zellen zur Zytokinproduktion angeregt als durch Stimulation mit den im Überstand enthaltenen löslichen (HBsAg, HBeAg) und partikulären viralen Produkten.



**Abb. 3.32:** Zahl der Zytokin-sezernierenden Zellen HBV-spezifischer PBL eines geimpften und HBV-naiver PBL eines ungeimpften Spenders nach Kokultivierung mit HepG2.215-Zellen und ausschließlich HBsAg-exprimierenden HepG3-Zellen (A) bzw. HepG2.4A5-Zellen und PLK/PRF-Zellen (B)

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die Stimulation mit der Gesamtheit der viralen Produkte (HBeAg, HBsAg und Virionen) mehr Zellen zur Zytokinsekretion induzierte als die Stimulation mit HBsAg. Somit liefert dieses Ergebnis Hinweise, dass die Reaktion der Immunzellen in diesem Kulturmodell nicht ausschließlich durch HBsAg ausgelöst wird.

Zudem löste auch das in Kultur gebildete HBsAg eine reaktive Antwort der HBV-naiven PBL aus, die nach Stimulation mit dem Impfstoff-Antigen (HBsAg) im klassischen *Elispot* keine Reaktivität zeigen.

**Zusammenfassung:****Kokulturbedingte Induktion der Effektorzellen zur Zytokinsekretion**

- Nach Kokultur mit den virusinfizierten HepG2.215- und HepG2.4A5-Zellen sezernierten sowohl HBV-spezifische als auch HBV-naive PBL die T<sub>H</sub>-Typ1-Zytokine IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sowie IL-10.
- Dieses Zytokinprofil zeigten die Immunzellen auch nach Kokultur mit den ausschließlich HBsAg-exprimierenden HepG3- und PLK/PRF-Zellen.
- Die Kokultur mit HBV-exprimierenden Hepatom-Zellen induzierte jedoch deutlich mehr Zytokin-sezernierende Zellen als die Kokultur mit den ausschließlich HBsAg-exprimierenden Hepatom-Zellen.

Eine effektive Zytokinsekretion und Reaktivität der Immunzellen erfolgte in diesem Kulturmodell somit nach Stimulation mit der Gesamtheit der löslichen viralen Antigene sowie der Viruspartikel.



### 3.3.5 Zusammenfassende Darstellung antiviraler Effekte HBV-spezifischer und HBV-naiver Immunzellen

Anhand zweier unterschiedlicher humaner Modellsysteme wurden die Effekte der impfinduzierten HBsAg-spezifischen  $CD4^+$ T-Zellen auf die Hepatitis-B-Virusinfektion untersucht. Durch verschiedene Kokultorexperimente, bei denen die Hepatozyten und die Immunzellen durch ein Zellsieb voneinander getrennt waren, wurden folgende Ergebnisse gewonnen:

- Sowohl durch HBV-spezifische als auch durch HBV-naive PBL erfolgte eine signifikante Reduktion der viralen Transkription, der Antigen-Produktion sowie der DNA-Synthese.
- Allerdings reduzierten HBV-naive PBL die Virusreplikation statistisch signifikant weniger als HBV-spezifische PBL.
- Dabei war die Inhibition der Virusreplikation durch die Immunzellen reversibel.
- Sowohl die Primärinfektion der Hepatozyten als auch die Infektion und konstitutive Virusexpression der Hepatom-Zellen wurde durch die Immunzellen negativ beeinflusst.
- Die Stimulation der HBV-spezifischen und HBV-naiven Immunzellen durch die in Kultur gebildeten viralen Produkte induzierte die Sekretion von IL-10, IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ .
- Aufgrund des fehlenden Zell-Zell-Kontaktes zwischen Hepatozyten und Effektorzellen wurde die Inhibition der Hepatitis-B-Virusinfektion durch die HBV-spezifischen und HBV-naiven Immunzellen somit höchstwahrscheinlich über die Sekretion antiviral wirkender Zytokine vermittelt.

Der antivirale Effekt HBV-spezifischer PBL auf die Hepatitis-B-Virusinfektion wurde offenbar in Kombination sowohl der adaptiven Immunantwort durch impfinduzierte HBsAg-spezifische  $CD4^+$ T-Zellen als auch durch Komponenten bzw. Zellen der angeborenen Immunität induziert. Die antivirale Wirkung HBV-naiver PBL auf die Hepatitis-B-Virusinfektion scheint Ausdruck der angeborenen Immunität zu sein, die letztlich ebenfalls durch die  $T_H$ -Typ1-Zytokine die Inhibition der HBV-Infektion bewirkt haben könnte.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der impfinduzierten HBsAg-spezifischen  $CD4^+$ T-Zellen bei der Hepatitis-B-Virus-Infektion untersucht. Die anhand humaner Infektionsmodelle gewonnenen Daten zeigen, dass impfinduzierte HBsAg-spezifische  $CD4^+$ T-Zellen die Virusreplikation, die Antigen-Produktion und die virale Transkription HBV-infizierter Zellen signifikant und reversibel reduzieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch die Immunzellen ungeimpfter Spender ähnlich inhibitorisch auf die Virusreplikation, die Antigen-Produktion und die virale Transkription wirkten.

In der folgenden Diskussion werden zunächst die verwendeten Kulturmodelle und die HBV-Infektion der primären humanen Hepatozyten sowie der Hepatom-Zellen erörtert. Im Anschluss folgt eine Darstellung der Untersuchung der MHC-Expression durch die Hepatozytenkulturen, die als Voraussetzung für Interaktionen von  $CD4^+$ T-Zellen und virusinfizierten Hepatozyten zu sehen ist. Dem folgend werden die Versuche und Ergebnisse zur antiviralen Wirkung der  $T_H$ -Typ1-Zytokine  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha$  auf die Virusreplikation erörtert. Einleitend zur Diskussion der Interaktionen von  $CD4^+$ T-Zellen mit virusinfizierten Hepatozyten werden zunächst die T-Zellreaktivität der PBL-Spender sowie die Etablierung des Kokulturmodells dargestellt. Abschließend folgt die Darstellung und Interpretation der verschiedenen Experimente sowie der gewonnenen Daten zur Untersuchung der Rolle der impfinduzierten HBsAg-spezifischen  $CD4^+$ T-Zellen bei der Hepatitis-B-Virus-Infektion.

## 4.1 Humane Infektionsmodelle für das Hepatitis-B-Virus

### Primäre humane Hepatozyten

Diese Arbeit befasste sich mit der Beeinflussung der Hepatitis-B-Virus-Infektion humaner Hepatozyten durch impfinduzierte HBsAg-spezifische CD4<sup>+</sup>T-Zellen. Primäre humane Hepatozyten stellen aufgrund der Speziespezifität und des Hepatotropismus des HBV ein adäquates Modellsystem zur Untersuchung der HBV-Infektion dar. Denn obwohl z. B. das *duck hepatitis B virus* (DHBV) oder das *woodchuck hepatitis virus* (WHV) wichtige Erkenntnisse zum Replikationszyklus des HBV lieferten, weisen die tierischen Vertreter der *Hepadnaviridae* einige signifikante Unterschiede zum humanpathogenen HBV auf. So berichteten *Sprengel et al.*, dass das Genom der Avihepadnaviren kein HBx-Protein kodiert, während *Di et al.* grundlegende Unterschiede in der viralen Transkription zwischen dem WHV und dem humanen Virus beobachteten (Sprengel et al., 1985; Di et al., 1997).

Die Aussaat der isolierten Hepatozyten erfolgte auf einer Kollagen-I-Matrix, da Kollagen sowohl eine gleichmäßige Adhärenz als auch die Differenzierung der Zellen fördert. Da primäre Hepatozyten *in vitro* nicht proliferieren, ist bei Kulturbeginn zudem die Konzentration der ausgesäten Zellen von entscheidender Bedeutung. Wie von *Schulze-Bergkamen et al.* gezeigt wurde, führte die Aussaat sowohl einer zu niedrigen als auch zu hohen Hepatozytenkonzentration nach der Adhärenz zu einer raschen Ablösung der Zellen. Für eine funktionelle Kultur ist der Zell-Zell-Kontakt der Hepatozyten entscheidend (Schulze-Bergkamen et al., 2003). Um eine konfluente Kultur zu erhalten, wurden die Hepatozyten in dieser Arbeit in einer Konzentration von  $1,6 \times 10^5$  Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgegeben. Die Zellen einer konfluenten Hepatozytenkultur weisen – mikroskopisch betrachtet – einen höheren Differenzierungsgrad sowie eine verminderte Dedifferenzierung im Laufe der Kultur auf. Ebenfalls entscheidend für eine funktionelle Hepatozytenkultivierung und Differenzierung der Zellen ist das Vorhandensein nichtparenchymaler Zellen. Wie von *Bhatia et al.* beschrieben, bewahren isolierte und kultivierte Hepatozyten in Anwesenheit nichtparenchymatöser Zellen ihre stereotypische polyklonale Morphologie, strukturstarke Zell-Zell-Grenzen sowie leberspezifische Funktionen für bis zu fünf Wochen (Bhatia et al., 1999). Im Vorfeld dieser Arbeit wurde anhand durchflusszytometrischer Tests bestimmt, dass in den hier zur Verfügung stehenden Hepatozytenkulturen ein Anteil an nichtparenchymalen Zellen von bis zu 15 % vorliegt. Damit übereinstimmend fanden auch *Schulze-Bergkamen et al.* in isolierten Hepatozytenpräparationen bis zu 15 % nichtparenchymatöse Zellen (Schulze-Bergkamen et al., 2003). Auch wenn mit zusätzlichen Gradienten-Zentrifugationen ein höherer Reinheitsgrad der Hepatozyten von bis zu 99 % erreicht werden kann (Schroeder et al., 1994), entspricht das Vorhandensein nichtparenchymaler Zellen dem physiologischen Gewebeverband und fördert über möglichen zellulären Austausch auch intrazellulären Metabolismus.

Nach Bildung eines konfluenten Hepatozytenrasens sind die Kulturbedingungen für den Erhalt der funktionellen und morphologischen Stabilität der Zellen entscheidend. Neben Wachs-

tumsfaktoren wie Insulin und Glukagon ist das Agens Dimethylsulfoxid für eine Langzeitkultivierung der Hepatozyten von Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Hepatozyten ab dem zweiten Tag nach Inkulturnahme mit 1 % Dimethylsulfoxid im Medium kultiviert, da Dimethylsulfoxid neben einer Induktion und Erhaltung der Differenzierung der primären Zellen auch die Effizienz einer *in vitro* Infektion mit Hepatitis-B-Virus fördert (Gripon et al., 1988).

Die geschilderten Bedingungen erlaubten die Aufrechterhaltung der morphologischen und funktionellen Integrität der Hepatozyten. In Abhängigkeit des Spendermaterials konnte daher eine erfolgreiche Kultivierung der humanen Hepatozyten für die Dauer von bis zu vier Wochen erreicht werden.

### Die *in vitro* HBV-Infektion primärer humaner Hepatozyten

Die *in vitro* Infektion der primären humanen Hepatozyten erfolgt durch Inkubation der Leberzellen mit einer von chronischen Hepatitis-B-Virus-Trägern gewonnenen Serumprobe, in der eine ausreichend hohe Menge an infektiösen Viruspartikeln enthalten ist. Um dabei die Effizienz der *in vitro* Infektionen zu steigern, wurde dem viralen Inokulum 5 % Polyethylenglykol zugegeben, das aufgrund seiner fusogenen Eigenschaften sowohl die Adsorption als auch die Penetration der Viruspartikel erhöht (Gripon et al., 1993). Die Infektionseffizienz und aktive Virusreplikation wurden mittels etablierter quantitativer Messsysteme für die viralen Proteine HBsAg und HBeAg sowie für die virale DNA nachgewiesen.

Eine erfolgreiche *in vitro* Infektion der Hepatozyten mit dem Hepatitis-B-Virus ist gekennzeichnet durch eine *de novo* Synthese und Freisetzung von Virionen und der viralen Antigene in den Zellkulturüberstand. Dabei zeigt die Kinetik der Syntheserate der drei viralen Produkte einen unterschiedlichen Verlauf. HBeAg ist im Serum in signifikant geringerer Konzentration enthalten als HBsAg und virale DNA. Daher wird das mit dem Inokulum eingebrachte HBeAg durch die initialen Waschschrte rascher entfernt als HBsAg oder die Virus-DNA. Entgegen dem HBeAg, dessen Neuproduktion ungefähr ab dem dritten Tag nach Infektion der Hepatozyten nachweisbar wird, ist eine Neusynthese der viralen DNA sowie des HBsAg zeitlich verzögert messbar. Wie u. a. auch von *Rijntjes et al.* beschrieben, lassen sich die virale DNA und HBsAg, das im viralen Inokulum zusätzlich in Form der subviralen Partikel im Überschuss vorliegt, trotz mehrfacher intensiver Waschschrte nach Abnahme des Inokulums nicht vollständig entfernen (Rijntjes et al., 1988). Es ist denkbar, dass ein Teil der im Inokulum enthaltenen Virionen und Hüllproteine an die Wände der Kulturschale adsorbiert oder – jedoch ohne zu penetrieren – auch an die Hepatozyten, um sich anschließend nach und nach zu lösen und dadurch täglich mit dem Überstand abgenommen zu werden. Wie in der Literatur beschrieben, treten Maximalkonzentrationen der viralen Antigene ungefähr ab dem neunten Tag nach Infektion auf, wonach sich eine gleich bleibende Syntheserate der viralen Produkte einstellt (Galle et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit wird die HBeAg-Produktion als Marker für die Virusreplikation verwendet. HBeAg wird als frühes Antigen

gebildet und erlaubt somit, eine Beeinflussung der Infektion über einen längeren Zeitraum zu verfolgen.

Neben der Untersuchung der Hepatitis-B-Virusinfektion auf Proteinebene sollte in dieser Arbeit der Infektionsverlauf auch auf Transkriptionsebene verfolgt werden. Um die Synthese HBV-spezifischer RNAs zu analysieren, wurden *real-time* PCR-Systeme für den Nachweis der 3,5-kb RNA sowie der 2,4-kb RNA etabliert. Die Synthese der 3,5-kb langen prägenomischen RNA ist ein entscheidendes Ereignis während des viralen Replikationszyklus, da dieses RNA-Transkript für die virale Polymerase und das Kapsidprotein sowie für das HBeAg kodiert. Die 2,4-kb RNA dient als Matrize für die Translation der großen Hüllproteine, die Bestandteil von Virionen und subviralen Partikeln sind (Moolla et al., 2002). Anhand erstellter Eichreihen wurden die innerhalb von 24 Stunden im Verlauf der Infektion gebildeten Transkripte der 3,5-kb RNA sowie der 2,4-kb RNA quantitativ bestimmt. Reproduzierbar wurde bereits 24 Stunden nach Infektionsbeginn die Synthese sowohl der 3,5-kb RNA als auch der 2,4-kb RNA nachgewiesen. Gripon et al. hingegen konnten mittels *Northern-Blot* unmittelbar nach der Infektion zunächst eine nur geringe RNA-Synthese mit alleinigem Nachweis der 2,4-kb RNA detektieren, gefolgt von einem starken Anstieg der Synthese der 2,4-kb und der 3,5-kb RNA bis Tag 5 nach Infektion (Gripon et al., 1988). In allen hier durchgeführten Messungen wurde für die 2,4-kb S-HBV RNA eine deutlich höhere Konzentration verzeichnet als für die C-HBV RNA. Theoretisch erklärbar wäre die Dominanz der 2,4-kb RNA aufgrund der – *in vivo* – im Überschuss gebildeten Hüllproteine. Die virale Transkription konnte in der vorliegenden Arbeit 48 Stunden vor einem Anstieg der HBeAg-Produktion nachgewiesen werden. Somit erlaubt der sensitive und quantitative Nachweis der viralen RNA-Synthese einen Einblick in die Initiations- und Frühphase der Infektion.

In Versuchen zur Standardisierung der *in vitro* Infektion für diese Arbeit wurde ein definierter Zeitrahmen für den Beginn der Infektion festgelegt. Obwohl je nach Ausgangsmaterial die Vitalität und morphologische Differenzierung humaner Hepatozyten variiert, wurde u. a. von Miyazaki et al. festgestellt, dass erst ab dem dritten Tag nach der Isolierung der Zellen eine aktive Synthese und Sekretion leberspezifischer Proteine (wie Albumin) erfolgt (Miyazaki et al., 1981). Nach Katsura et al. steigt die Albuminsynthese bis etwa zum vierzehnten Tag nach der Isolierung an und nimmt in der Folge wieder stark ab (Katsura et al., 2002). Da in den Infektionsversuchen ein mindestens 14-tägiger Verlauf untersucht werden sollte, war ein früher Start der Infektionsexperimente – vor Einsetzen der zellulären Dedifferenzierungsprozesse – notwendig. Anders als von Rijntjes et al. beschrieben, führten in der vorliegenden Arbeit *in vitro* Infektionen an verschiedenen Zeitpunkten nach der Aussaat der Hepatozyten zu unterschiedlichem Erfolg der jeweiligen Infektion (Rijntjes et al., 1988). Die höchste Infektionseffizienz ließ sich mit beginnender Infektion am Tag sechs nach Inkulturnahme der Zellen erreichen, während ein zu früh gewählter Zeitpunkt in einer deutlich schwächeren HBeAg-Produktion resultierte. Somit scheint unter den gewählten Infektionsbedingungen eine erfolgreiche *in vitro* Infektion der humanen Hepatozyten nur nach Differenzierung der Zellen und Aufnahme der leberspezifischen Funktionen möglich zu sein.

In Versuchsreihen mit humanem Zellmaterial, das natürlicherweise vielen Schwankungen unterworfen ist, kann die biologische Variabilität die Ergebnisse beeinflussen. Jedoch sollte die Durchführung von Experimenten innerhalb einer Zellpräparation vergleichbare Ergebnisse liefern. Die Überprüfung der intraexperimentellen Variabilität der Virusreplikation und der Antigen-Synthese mehrerer Parallelansätze zeigte, dass sowohl die virale DNA, als auch die viralen Proteine HBsAg und HBeAg im Verlauf der Infektion annähernd identische Konzentrationen aufwiesen. Diese Versuchsreihen bestätigen, dass innerhalb einer Zellpräparation Infektionsversuche mit unterschiedlichen Fragestellungen durchgeführt werden können. Da im Rahmen dieser Arbeit wechselnde Hepatozytenpräparationen verschiedener Spender zur Verfügung standen, konnte auch die interexperimentelle Reproduzierbarkeit untersucht werden. Deren Analyse bestätigte die Beobachtungen von *Gripon et al.*, die in Infektionsexperimenten mit Hepatozyten von 39 verschiedenen Zellspendern deutliche Unterschiede in der Infektionseffizienz fanden (Gripon et al., 1988). In der vorliegenden Arbeit konnte am Beispiel von 18 Hepatozytenpräparationen verschiedener Leberzellspender gezeigt werden, dass trotz identischer Versuchsbedingungen die *in vitro* Infektion – mit derselben HBV-haltigen Serumprobe sowie identischer Konzentration an viraler DNA – zu extremen Unterschieden in der HBeAg-Produktion führte. Diese unterschiedliche Infektiösität der Viruspartikel derselben Serumprobe, die von einer sehr starken HBeAg-Produktion bis hin zu keiner nachweisbaren HBeAg-Produktion führte, kann verschiedene Ursachen haben. Generell bestimmen sowohl virale Determinanten als auch die Kulturbedingungen und wirtsspezifische Faktoren die Infektion. Das infektiöse Serum enthält neben den viralen Antigenen und Virionen noch eine Vielzahl weiterer Faktoren, die theoretisch mit Plasmamembran Komponenten der Hepatozyten einiger Spender interagieren und so die Anlagerung der Viruspartikel stören könnten (Gripon et al., 1988). Daneben liegen in HBV-haltigem Serum hohe Konzentrationen der subviralen Partikel vor, die ebenfalls um die Rezeptorbindstellen für die Viruspartikel konkurrieren (Kock et al., 2001). Trotz Verwendung von Polyethylenglykol, das erwiesenermaßen die Adsorption und Penetration des Virus fördert, scheint die Viruspenetration in die Zielzellen unterschiedlich effektiv zu sein. Auf Seite des Wirts scheint die Empfänglichkeit der Hepatozyten verschiedener Individuen für die *in vitro* HBV-Infektion unterschiedlich zu sein. Dies kann genetisch bedingt sein und in Assoziation mit den Polymorphismen der Haupthistokompatibilitätskomplexe stehen, die *in vivo* den Verlauf einer HBV-Infektion entscheidend beeinflussen (Thursz, 2001). Bekanntlich ist jedoch die Qualität humanen Materials Schwankungen unterworfen. Die Variabilität bedingt sich durch Alter, Geschlecht und genetische Unterschiede der Leberzellspender, Grunderkrankung und Vortherapie sowie prä- und intraoperative Schädigung der Leberzellen. Auch die Vitalität sowie die morphologische und funktionelle Differenzierung der Zellen können die Infektion nachteilig beeinflussen. Nach *Mitry et al.* stehen Zellausbeute, Vitalität sowie Qualität der isolierten Zellen in Abhängigkeit der Zellschädigungen, die während dem Isolationsprozess eintreten können. Die Zellschädigungen sind bedingt durch die Dauer der Ischämie, Zusammensetzung der Perfusionsreagenzien sowie durch die Kollagenasebehandlung zum Gewebeverdau (Mitry et al.,

2002). Auch morphologisch nicht erkennbare Effekte des Isolationsprozesses könnten nachteilige Wirkungen auf die intrazelluläre, funktionelle Aktivität der Hepatozyten haben (Elaut et al., 2006). Zudem wäre auch eine Schädigung der hepatozellulären Oberflächenproteine bzw. unzureichende Regeneration der zellulären Bindestellen für die Viruspartikel nach dem Isolationsprozess möglich. Der Vergleich der Infektionsergebnisse von Hepatozytenpräparationen unterschiedlicher Spender erfolgte anhand der jeweils maximal gemessenen Konzentration der HBeAg-Produktion.

Die Charakterisierung der Hepatitis-B-Virusreplikation zeigt, dass das humane *in vitro* Infektionsmodell unter Wahl entsprechender und optimierter Versuchsbedingungen für eine zuverlässige und reproduzierbare Untersuchung der HBV-Infektion geeignet ist. Dieses Modellsystem erlaubt entsprechend der Speziespezifität des Hepatitis-B-Virus und der Verwendung nativer Virionen für die *in vitro* Infektion Untersuchungen nahe den *in vivo* Verhältnissen von Virus und Wirt.

## Die Virusreplikation HBV-infizierter humaner Hepatom-Zellen

Neben der Primärinfektion humaner Hepatozyten diente in der vorliegenden Arbeit auch die Infektion humaner Hepatom-Zell-Linien als Modell zur Untersuchung der Rolle impfinduzierter HBsAg-spezifischer CD4<sup>+</sup>T-Zellen bei der HBV-Infektion. Verschiedene konstitutiv virusexprimierende Zell-Linien wurden durch Transfektion von Hepatitis-B-Virus-DNA in humane Hepatozyten entwickelt. In dieser Arbeit wurde die von Sells et al. etablierte und konstitutiv virusexprimierende Linie HepG2.215 sowie die von Weiss et al. etablierte Hepatom-Linie HepG2.4A5 verwendet (Sells et al., 1987; Weiss et al., 1996).

Die Analyse der viralen Aktivität der HBV-infizierten Hepatozyten erfolgte anhand der im Rahmen dieser Arbeit etablierten RNA-Nachweissysteme sowie der Messung der Antigene und der viralen DNA. Die Bestimmung der 3,5-kb sowie der 2,4-kb viralen RNA zeigte hohe Konzentrationen der beiden RNA-Spezies. Wie in den *in vitro* infizierten primären humanen Hepatozyten wurde im Vergleich zur C-HBV RNA die 2,4-kb S-HBV RNA in deutlich höherer Konzentration gebildet. Sowohl die HepG2.215-Zellen als auch die HepG2.4A5-Zellen produzieren neben viraler DNA auch HBsAg und HBeAg. Dabei zeigte sich, dass in HepG2.215-Zellen die HBeAg-Produktion die HBsAg-Produktion übersteigen kann. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit der Literatur (Sells et al., 1988; Liu et al., 2004) und nach Glebe et al. scheinen für diese variable Effizienz der Antigen-Produktion die Kulturbedingungen entscheidend zu sein (Glebe et al., 2001). Generell ist die Syntheserate der viralen Proteine sowie der DNA der HepG2.4A5-Zellen um ein Vielfaches geringer als bei HepG2.215-Zellen. Dies beruht nach Weiss et al. auf der Tatsache, dass in HepG2.4A5-Zellen das virale Genom in einzelner Ausführung sowie unter Kontrolle eines HBV-eigenen Promotors vorliegt, während HepG2.215-Zellen ein dimeres HBV-Genom unter Kontrolle heterologer Promotoren besitzen (Weiss et al., 1996).

Der Vergleich der Infektion und der Virusreplikation der HepG2.215-Zellen mit der *in vitro* Infektion der primären Hepatozyten zeigt, dass die virale Transkription, die Antigen-Expression und die DNA-Synthese in beiden Infektionsmodellen ähnliche Konzentrationen der viralen Produkte liefert. Nach *in vitro* Infektion primärer Hepatozyten sind jedoch nur ca. 10 % der Zellen infiziert (Tausch, 2005). Im Gegensatz dazu sollte in der Hepatom-Kultur jede Zelle mit dem Virus infiziert sein. Aufgrund dieser Tatsache würde man in den Hepatom-Zellen eine höhere virale Aktivität als in *in vitro* infizierten primären Hepatozyten erwarten. Die primären Hepatozyten stammen von gesundem Lebergewebe und sind als naive Zellen anzusehen, während die Hepatom-Zellen aus einer Tumor-Linie entwickelt wurden. Tumorbedingte Veränderungen des Zellstoffwechsels und eine starke Dedifferenzierung der Hepatom-Zellen könnten sich nachteilig auf die virale Aktivität auswirken. So sind diese Zellen z. B. mit nativem Virus nicht mehr infizierbar (Sells et al., 1988).

Inwieweit die von heterologen Promotoren regulierte Virusreplikation der HepG2.215-Zellen repräsentativ für den viralen Lebenszyklus bei einer natürlichen *in vivo* Infektion ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Sells et al., 1988; Weiss et al., 1996). Dennoch wird die Zell-Linie HepG2.215 neben der HepG2.4A5-Linie zur Untersuchung von z. B. antiviral-wirkenden Substanzen verwendet. In der vorliegenden Arbeit dienten beide Hepatom-Linien aufgrund ihrer konstitutiven Virusexpression als Modellsystem zur Untersuchung der Virusreplikation einer chronischen Infektion.

## Expression der Haupthistokompatibilitätskomplexe durch primäre Hepatozytenkulturen

In der vorliegenden Arbeit sollten die Effekte HBsAg-spezifischer CD4<sup>+</sup>T-Zellen auf die HBV-Infektion humaner Hepatozyten untersucht werden. Voraussetzung einer funktionellen Interaktion der CD4<sup>+</sup>T-Zellen mit infizierten Hepatozyten ist jedoch die Aktivierung der T-Lymphozyten über Antigenpräsentation. *Franco et al.* zeigten an einem murinen *in vitro* Modell, dass hepatische nichtparenchymatöse Zellen für die Antigenpräsentation HBV-spezifischer T<sub>H</sub>1-Lymphozyten verantwortlich sind (Franco et al., 1997). Weitere Daten führten jedoch zu der Hypothese, dass Hepatozyten selbst als spezialisierte Antigenpräsentierende Zellen fungieren und in der Folge CD8<sup>+</sup>- bzw. CD4<sup>+</sup>T-Zellen aktivieren können (Herkel et al., 2003). Zudem wurden in mehreren Untersuchungen infiltrierende CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten in der Leber nachgewiesen (Bertoletti et al., 1997; Walewska-Zielecka et al., 2008).

Um festzustellen, ob in primären Hepatozytenkulturen eine Antigenpräsentation für CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten erfolgen kann, sollte in der vorliegenden Arbeit die MHC-Expression untersucht werden. Hierfür wurden *real-time* RT-PCR-Systeme für den Nachweis von HLA-DR $\alpha$ , CD40 und CIITA sowie HLA-A, HLA-B, HLA-C und  $\beta_2$ M erstellt. Die Überprüfung der MHC-Expression durch die primären Hepatozyten zeigte, dass MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II sowohl in nicht infizierten als auch in HBV-infizierten Kulturen exprimiert



werden. Dies bestätigt Daten aus der Literatur, wonach eine MHC-Expression in adulten und fötalen Hepatozyten nachgewiesen wurde (Lobo-Yeo et al., 1990; Chiu et al., 1997; Chen et al., 2005a). Jedoch war in der vorliegenden Arbeit davon auszugehen, dass die MHC-Expression primär durch die in der Kultur vorhandenen nichtparenchymalen Zellen erfolgte. Nach *Daar et al.* wird MHC-Klasse-I in Lebergewebe durch Gallengangsepithelzellen, vasculäre Endothelzellen und die sinusoidalen Endothelzellen sowie Kupffer-Zellen exprimiert (Daar et al., 1984a). MHC-Klasse-II hingegen wird in der Leber primär durch Kupffer-Zellen exprimiert (Daar et al., 1984b). Tatsächlich ergaben durchflusszytometrische Tests einen Anteil von bis zu 15 % nichtparenchymaler Zellen in den primären Hepatozytenkulturen. Analysen zeigten, dass sich darunter 1 bis 3 % Kupffer-Zellen und 2 bis 12 % lebersinusoidale Endothelzellen befinden (Schulze-Bergkamen et al., 2003). Konsens herrscht jedoch über die MHC-Expression durch HBV-infizierte Hepatozyten. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden HLA-Klasse-I- sowie -Klasse-II-Moleküle auf der Oberfläche von Hepatozyten chronischer Virusträger detektiert (Barbatis et al., 1981; van den Oord et al., 1986; Franco et al., 1988; Chiu et al., 1997). Allerdings führte die *in vitro* Infektion der primären Hepatozyten mit dem Hepatitis-B-Virus – anders als zum Teil in der Literatur beschrieben – in den Zellkulturen zu keiner Änderung der MHC-Expression. Andere Arbeiten hingegen beobachteten eine durch HBV signifikant reduzierte MHC-Klasse-I-Expression bei HepG2.215-Zellen und primären Hepatozyten eines HBV-transgenen Mausmodells (Chen et al., 2006). Dass die *in vitro* Infektion der primären humanen Hepatozyten keine signifikanten Änderungen der MHC-Expression zur Folge hatte, könnte dadurch bedingt sein, dass nur ca. 10 % der Zellen in diesem Modell tatsächlich infiziert sind.

Die Expression von HLA-Klasse-I und HLA-Klasse-II in den Hepatozytenkulturen zeigt, dass eine HLA-restringierte Antigenpräsentation durch *in vitro* infizierte primäre Hepatozyten erfolgen kann. Zudem konnte in den primären humanen Hepatozytenkulturen eine IFN- $\gamma$ -induzierte Erhöhung der Expression von CIITA und HLA-DR $\alpha$  bewirkt werden. Die Steigerung der HLA-Klasse-II scheint dabei in Abhängigkeit der einwirkenden IFN- $\gamma$ -Konzentration zu stehen. Promotorstudien zeigten, dass die Expression von CIITA durch IFN- $\gamma$  kontrolliert und reguliert wird. Zudem ist ein funktionelles CIITA-Gen für die Induktion der Klasse-II-Expression notwendig (Steimle et al., 1994). Dies ist bedeutend, wenn man bedenkt, dass impfinduzierte HBsAg-spezifische CD4<sup>+</sup>T-Zellen *in vivo* und *in vitro* nach Antigen-Erkennung mit Sekretion der T<sub>H</sub>-Typ1-Zytokine reagieren (Bocher et al., 1999; Bauer et al., 2002; Ren et al., 2003). Wie z. B. von *Franco et al.* gezeigt, induziert *in vitro* produziertes IFN- $\gamma$  tatsächlich die Expression von sowohl HLA-Klasse-I- als auch -Klasse-II-Molekülen (Franco et al., 1988). Das sezernierte IFN- $\gamma$  kann somit über die Erhöhung von HLA-Klasse-II zu gesteigerter Antigenpräsentation führen, was wiederum in effektiver und optimierter Aktivierung der CD4<sup>+</sup>T-Zellen und antiviraler Abwehr resultieren kann.

## 4.2 Einfluss der T<sub>H</sub>-Typ1-Zytokine auf die Kultur und Virusreplikation der Hepatozyten

Die zelluläre Immunität nach der HBV-Impfung wird durch T<sub>H</sub>-Typ1-Zellen vermittelt, die die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$  sezernieren (Bauer et al., 2002). In verschiedenen *in vitro* Modellsystemen wurde die Wirkung von Zytokinen auf die HBV-Infektion untersucht. Es wurden antivirale Effekte von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 in HBV-transgenen Mäusen und im *DHBV*-System beschrieben (Gilles et al., 1992; Guilhot et al., 1993; Lavine und Ganem, 1993; Schultz und Chisari, 1999). Nach *Wieland et al.* aktiviert IFN- $\gamma$  – ebenso wie die Typ-I-Interferone IFN- $\alpha/\beta$  – hepatozelluläre Mechanismen, die die Formation und Reifung replikationskompetenter Viruskapside verhindern und letztlich die virale Replikation inhibieren (Wieland et al., 2005). TNF- $\alpha$  inhibiert die virale Replikation ebenfalls über Destabilisierung viraler Nukleokapside, wobei die antivirale Wirkung von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B abhängig ist (Biermer et al., 2003).

Um im humanen System einen direkten Effekt der T<sub>H</sub>-Typ1-Zytokine auf die Virusreplikation zu untersuchen, wurden HBV-infizierte Hepatozyten mit rekombinantem TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  kultiviert. TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  bewirkten innerhalb von 24 Stunden nach erstmaliger Zugabe eine deutliche und nachhaltige Verminderung der viralen Genexpression sowie eine Reduktion der viralen DNA und der Proteine. Durch IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  wurde sowohl die Virusreplikation der *in vitro* infizierten primären Hepatozyten als auch die Virusreplikation der HBV-infizierten Hepatom-Zellen negativ beeinflusst. Der infektionsinhibierende Effekt der Zytokine äußerte sich in der Reduktion der Antigene HBeAg und HBsAg sowie der viralen DNA-Synthese. Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Wirkung der Zytokine. Mit steigender Zytokinkonzentration erhöhte sich die Reduktion der Virusreplikation. Ähnlich zu diesen Ergebnissen beschreiben *Parvez et al.* für das Modell der transfizierten HepG2-Zellen eine signifikante Reduktion der HBsAg-Produktion nach IFN- $\gamma$ -Behandlung. Für die Reduktion der viralen DNA-Synthese wurde jedoch eine höhere IFN- $\gamma$ -Konzentration benötigt (Parvez et al., 2006). *Suri et al.* zeigten anhand von 15 Hepatozytenpräparationen HBV-infizierter Spender mit unterschiedlicher Viruslast, dass rekombinantes IFN- $\gamma$  die Replikation der viralen DNA reduzierte. Jedoch konnte in den Hepatozytenkulturen mit der höchsten Viruslast kein Effekt auf die Virusreplikation festgestellt werden (Suri et al., 2001). Im *DHBV*-Modell wurde neben der Konzentrationsabhängigkeit auch eine zeitliche Abhängigkeit für die Effizienz der IFN- $\gamma$ -vermittelten Inhibition der Infektion beschrieben. Eine maximale Reduktion der viralen DNA wurde erreicht, wenn IFN- $\gamma$  bereits vor der oder parallel zur Infektion zum Kulturmedium gegeben wurde (Schultz und Chisari, 1999). In der vorliegenden Arbeit bewirkten TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  eine deutlich stärkere Reduktion der HBeAg-Produktion bei der Primärinfektion der Hepatozyten als in den infizierten Hepatom-Zellen. Zu den primären Hepatozyten wurden die Zytokine bereits zu Beginn der Infektion zugegeben, während in den Hepatom-Zellen eine konstitutive Virusexpression vorliegt. Die TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -vermittelte Reduktion der viralen Transkription war in den primären

Hepatozyten bereits 24 Stunden nach erstmaliger Zytokingabe messbar. Ähnlich diesem Ergebnis detektierten *Suri et al.* bereits 18 Stunden nach Zytokingabe eine IFN- $\gamma$ -vermittelte Reduktion der viralen RNA in infizierten primären humanen Hepatozyten (Suri et al., 2001). Auch im Modell der HBV-transgenen Mäuse erfolgte bereits 16 Stunden nach Injektion von rekombinantem murinem TNF- $\alpha$  eine signifikante Reduktion der viralen RNA (Gilles et al., 1992). In der vorliegenden Arbeit wurden die Einzeleffekte von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  auf die HBV-Infektion untersucht. Ein synergistischer Effekt beider Zytokine könnte jedoch zu einer stärkeren Reduktion der Transkription und der Virusreplikation führen. *Pasquetto et al.* bestätigen einen synergistischen Effekt der Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  und beschreiben anhand einer immortalisierten Maus-Linie, dass, obwohl die Synthese der viralen DNA effizient durch IFN- $\gamma$  inhibiert wird, eine effektive Hemmung der Transkription nur in Kombination der beiden Zytokine erreicht wurde (Pasquetto et al., 2002).

Zusammenfassend führten die Experimente zur antiviralen Wirkung von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  auf die HBV-Infektion humaner Hepatozyten zu Ergebnissen, die mit – anhand anderer Modellsysteme gewonnenen – Daten aus der Literatur übereinstimmen.

### 4.3 Effekte HBV-spezifischer und HBV-naiver Immunzellen auf die Virusreplikation HBV-infizierter humaner Hepatozyten

Bereits frühe Arbeiten mit Untersuchungen an HBV-infizierten Patienten und verschiedenen Modellsystemen zeigten, dass HBsAg-spezifische CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten HBV-spezifische Hüllproteine erkennen und an der Elimination virusinfizierter Zellen beteiligt sind (Ferrari et al., 1990; Penna et al., 1992). Nach Transfer HBsAg-spezifischer CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten in HBV-transgene Mäuse sezernierten die Lymphozyten nach Antigenerkennung die T<sub>H</sub>1-Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , die letztlich die Suppression der viralen Replikation vermittelten (Franco et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte untersucht, die impfinduzierte HBV-spezifische Immunzellen auf die Hepatitis-B-Virusreplikation humaner Hepatozyten ausüben. Daher wurde zunächst die Immunantwort charakterisiert, die spezifische Immunzellen nach *in vitro* Stimulation mit rekombinantem HBsAg zeigen. Wie von *Bauer et al.* beschrieben, wurde dafür die HBsAg-spezifische T-Zellantwort peripherer Blut-Lymphozyten (PBL) *ex vivo* mittels *Elispot* bestimmt (Bauer et al., 2002; Bauer und Jilg, 2006). Bei allen hier überprüften Spendern, die eine aktive HBV-Immunisierung erhielten, konnte eine Reaktivität gegen das Impfstoff-Antigen (rekombinantes HBsAg) gemessen werden. Die PBL sezernierten IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$ . Aufgrund des Zytokinprofils – Sekretion von IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$  – wurde die zelluläre Immunantwort der geimpften Spender als T<sub>H</sub>-Typ1-Antwort charakterisiert. Bei den überprüften Spendern konnten z. T. unterschiedliche Frequenzen der T<sub>H</sub>-Typ1-Zytokine detektiert werden. Der Literatur zufolge steht die Zahl der Zytokin-sezernierenden Zellen jedoch meist nicht in Korrelation zum impfinduzierten Antikörper-Titer (Vingerhoets et al., 1994; Bocher et al., 1999). Bei den HBV-naiven PBL der ungeimpften Kontrollprobanden war keine Reaktivität auf das Impfstoff-Antigen zu verzeichnen. Verschiedene weitere Arbeitsgruppen konnten in ähnlichen Untersuchungen ebenso keinerlei Reaktivität HBV-naiver Immunzellen feststellen (Vingerhoets et al., 1994; Larsen et al., 2000). Demgegenüber steht eine aktuelle Studie, in der mittels *Elispot* bei zehn von insgesamt zwölf ungeimpften PBL-Spendern nach Stimulation mit rekombinantem HBsAg die Sekretion von IFN- $\gamma$  detektiert wurde (Weihrauch et al., 2008). Nach *Weihrauch et al.* könnte dafür eine Kreuzreaktivität verantwortlich sein, bei der Antigen-präsentierende Zellen Proteine präsentieren, die Teilen des HBsAg strukturell ähnlich sind.

Die Untersuchungen der Effekte impfinduzierter HBsAg-spezifischer Immunzellen auf die HBV-Infektion humaner Hepatozyten wurden mit Effektor- und Zielzellen unterschiedlicher HLA-Restriktion durchgeführt. In Kulturen HLA-unterschiedlicher Lymphozyten mit direktem Zell-Zell-Kontakt zu Hepatozyten traten alloreaktive, zytotoxische Effekte auf. Aufgrund der Alloreaktivität der HLA-inkompatiblen Zellen wurde ein Kulturmodell entwickelt, das durch Trennung der beiden Zellpopulationen zytotoxische Effekte verhindert. Die Trennung

erfolgte durch ein Zellsieb, das auf die Hepatozytenkultur aufgesetzt wurde. Der Einsatz des Zellsiebes machte es jedoch nötig, das Volumen des Mediums in der Kultur zu verdreifachen. Es wäre denkbar gewesen, dass sich das erhöhte Volumen über Änderung des Sauerstoffpartialdrucks auf die Infektion der Zellen auswirkt. Aufgrund der Ergebnisse aus den Untersuchungen konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass der Einsatz des Zellsiebes und die Erhöhung des Kulturvolumens die Kinetik und Dynamik der HBV-Infektion der primären Hepatozyten nachteilig beeinflussten. Um trotz der Trennung der beiden Zellpopulationen Interaktionen über einen Austausch von löslichen Faktoren zwischen den Zellen zu ermöglichen, sollte die Membran der Zellsiebe für sezernierte Produkte der infizierten Hepatozyten sowie der Immunzellen permeabel sein. Die Versuche zur Überprüfung der Permeabilität bestätigten, dass die *in vitro* synthetisierten viralen Produkte HBsAg, HBeAg und die virale DNA die Membran passieren. Aufgrund der Diffusion der viralen Produkte durch die Siebmembran konnte davon ausgegangen werden, dass Antigen-präsentierende Zellen der PBL-Suspension die viralen Produkte aufnehmen, prozessieren und den T-Lymphozyten präsentieren. Die Aktivierung der T-Lymphozyten sollte die Sekretion antiviral wirkender Zytokine induzieren, die ebenfalls durch die Siebmembran diffundieren und so Einfluss auf die HBV-Infektion der Hepatozyten ausüben können.

In dieser Arbeit wurde der Verlauf der HBV-Infektion humaner Hepatozyten untersucht, die mit humanen Immunzellen (PBL) kokultiviert wurden. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen zeigen erstmals die Effekte *in vivo* impfinduzierter HBV-spezifischer PBL auf infizierte humane Hepatozyten. Die PBL beinhalten dabei die impfinduzierten HBsAg-spezifischen CD4<sup>+</sup>T-Zellen. Daher ist anzunehmen, dass reaktive Antworten auf die Stimulation mit viralen Produkten ursächlich CD4<sup>+</sup>T-Zell-vermittelt sind. Aufgrund der Trennung der Immunzellen von den Hepatozyten durch ein Zellsieb wurden die beobachteten Effekte ausschließlich durch lösliche Faktoren vermittelt.

Die gewonnenen Daten aus den Kokulturexperimenten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass durch HBV-spezifische PBL die Antigen-Produktion in infizierten primären humanen Hepatozyten sowie den konstitutiv HBV-exprimierenden Hepatom-Zellen signifikant und z. T. vollständig reduziert wurde. Auch die Synthese der viralen DNA und die virale Transkription wurden von den PBL negativ beeinflusst. Die unterschiedliche, im *Elispot* gemessene T-Zell-Reaktivität einzelner PBL-Spender äußerte sich in den Versuchen in unterschiedlich starker Inhibition der Antigen-Produktion (78 % bis 100 %). Dabei war eine enge Korrelation zwischen der Reduktion der Antigen-Produktion mit der Zahl IFN- $\gamma$ -sezernierender Zellen zu beobachten.

Den Zusammenhang zwischen der IFN- $\gamma$ -Produktion und der Reduktion der Virusreplikation beobachteten auch *Suri et al.* in Kokulturen virusinfizierter Hepatozyten mit PBL chronischer Virusträger (*Suri et al.*, 2001). Eine weitere Arbeit berichtet von der Verminderung der viralen Replikation HBV-infizierter Patienten, die ebenfalls in Zusammenhang mit einer zunehmenden IFN- $\gamma$ -Produktion durch HBsAg-spezifische CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten steht (*Ren et al.*, 2003). Auch für das *Woodchuck*-Hepatitis-Modell wurde die Korrelation der

antiviralen Wirkung und der Konzentration von IFN- $\gamma$  beschrieben. Nach *Guo et al.* sind die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in der Leber bei effektiver viraler Elimination signifikant höher als in chronisch infizierten Tieren (Guo et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit bewirkten HBV-spezifische PBL in Kokultur mit den HBV-infizierten humanen Hepatozyten eine eindeutige Inhibition der viralen Antigen-Produktion, der DNA-Replikation und der RNA-Transkription. Die Stärke der antiviralen Wirkung der HBV-spezifischen PBL zeigte sich in den Versuchen zur Zeitabhängigkeit in den primären Hepatozyten. Obwohl an Tag vier nach Versuchsbeginn eine aktive Virusreplikation vorliegt, konnte die virale Aktivität der Infektion – gemessen an der HBeAg-Produktion – durch Einwirken der PBL reduziert und auch vollständig inhibiert werden. Auch die konstitutive Virusreplikation der Hepatom-Zellen wurde durch die PBL signifikant reduziert. Eine entscheidende Erkenntnis dieser Versuchsreihen ergibt sich aus der Beobachtung, dass die antiviralen Effekte unmittelbar (24 bis 48 Stunden) nach Beginn der Kokulturen messbar und zudem reversibel waren. Durch Entfernen der PBL nach 14-tägiger Kokultivierung mit den infizierten Hepatozyten wurde der antivirale Effekt aufgehoben und es erfolgte innerhalb von 48 Stunden eine Neuproduktion von HBeAg. Diese schnelle Wirkung antiviraler Effekte konnte in dieser Arbeit auch durch rekombinantes IFN- $\gamma$  bzw. TNF- $\alpha$  gezeigt werden.

Überraschenderweise traten die beschriebenen Effekte der HBV-spezifischen PBL auch in Kokulturen mit HBV-naiven PBL auf. Die PBL ungeimpfter Spender inhibierten ebenfalls die Antigen-Produktion in *in vitro* infizierten primären humanen Hepatozyten sowie in konstitutiv HBV-exprimierenden Hepatom-Zellen. Jedoch war die Reduktion der Virusreplikation im Vergleich zu HBV-spezifischen PBL deutlich geringer. HBV-spezifische PBL bewirkten in primären Hepatozyten eine Inhibition der Antigen-Produktion um 90 %, während HBV-naive PBL eine Reduktion um 58,5 % bewirkten. In Abhängigkeit des HBV-naiven PBL-Spenders variierte dabei die Suppression der viralen Aktivität von 27 % bis 82 %. Die Virusreplikation der humanen Hepatom-Zellen wurde durch die HBV-naiven PBL um 41 % reduziert. Wie die Effekte der HBV-spezifischen PBL war die antivirale Wirkung der HBV-naiven PBL innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach Beginn der Kokultur messbar. Ebenso wurde durch Entfernen der PBL der antivirale Effekt aufgehoben, was eine starke Neuproduktion von HBeAg bewirkte. Primär lag die Vermutung nahe, dass die Effekte der HBV-naiven PBL von Komponenten und Zellen der angeborenen Immunität vermittelt wurden. Die Kokultursversuche wurden mit PBL durchgeführt, die neben T-Lymphozyten auch Makrophagen, Monozyten, Dendriten, Natürliche Killer-Zellen sowie B-Lymphozyten enthalten. Es könnten also neben CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>T-Zellen verschiedene weitere Zellen an der antiviralen Reaktion der PBL auf die HBV-Infektion beteiligt sein.

Die antivirale Wirkung der PBL hatte auf die Virusreplikation der Primärinfektion einen stärkeren Einfluss als auf die Virusreplikation der Hepatom-Zellen. Durch HBV-spezifische PBL erfolgte in primären Hepatozyten eine Reduktion der HBeAg-Produktion um 90 %, während in den Hepatom-Zellen eine Inhibition um 60 % erfolgte. HBV-naive PBL reduzierten die HBeAg-Produktion der infizierten primären Hepatozyten um 58,5 % und die der

Hepatom-Zellen um 41 %. Gründe hierfür könnten sein, dass aufgrund der hohen Proliferationsrate der Hepatom-Zellen diese nur 48 Stunden mit den Immunzellen kokultiviert werden konnten, während die primären Hepatozyten 14 Tage mit den PBL kokultiviert wurden. Des Weiteren ist die Konzentration der gebildeten viralen Produkte der Virusreplikation der Primärinfektion mit der der HepG2.215-Zellen vergleichbar, obwohl im Gegensatz zu den Hepatom-Zellen nur ca. 10 % der primären Zellen infiziert sind. Die dadurch offenbar höhere virale Aktivität könnte eine stärkere Stimulation und Reaktivität der PBL bewirkt haben. Denn obwohl in beiden Kulturmodellen die infizierten Hepatozyten mit  $5 \times 10^6$  PBL kokultiviert wurden, wurde die Virusreplikation der Primärinfektion stärker beeinflusst als die der Hepatom-Zellen.

Sowohl HBV-spezifische als auch HBV-naive PBL konnten trotz fehlendem Zell-Zell-Kontakt und der räumlichen Distanz zu den HBV-infizierten Zielzellen die Virusreplikation deutlich inhibieren. In der Annahme, dass tatsächlich Zytokine als Mediatoren dieser antiviralen Wirkung fungieren, wurde mittels *Elispot* die durch die Kokultur induzierte Reaktivität der PBL getestet. Dabei stellten sich auch die Fragen, durch welche Faktoren die PBL HBV-naiver Spender zu einer derart starken Reaktion angeregt werden und ob bzw. welche Zytokine die Inhibition der viralen Aktivität bewirken könnten. Es war bekannt, dass rekombinantes HBsAg im *Elispot* keine Reaktivität HBV-naiver Zellen induziert. Im Gegensatz dazu könnte die Stimulation der PBL in der Kokultur neben partikulärem HBsAg auch durch sezerniertes HBeAg sowie virale DNA und Viruspartikel erfolgt sein. Um die löslichen Faktoren zu identifizieren, wurden HBV-spezifische und HBV-naive PBL, die zunächst mit infizierten Hepatozyten kokultiviert wurden, im *Elispot* untersucht. Die Zellen geimpfter und ungeimpfter Spender sezernierten nach Antigen-Stimulation – wie vermutet – IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , sowie IL-2 und IL-10. In Anlehnung an *Valitutti et al.* zeigt dieses Ergebnis die individuelle, spenderabhängige Sensitivität der Immunzellen (Valitutti et al., 1996). Zudem spiegelt dieses Ergebnis auch die angeborene sowie die erworbene Reaktivität der Immunzellen nach Stimulation mit viralen Antigenen und der Viruspartikel wider. Außer von T-Lymphozyten werden diese Zytokine noch von einer Reihe weiterer Zellen produziert. IFN- $\gamma$  wird zusätzlich von Makrophagen gebildet, ebenso TNF- $\alpha$ , das zudem noch von Natürlichen Killer-Zellen sezerniert wird, während IL-10 ein Produkt von T-Zellen, Monozyten und B-Zellen ist. Um Hinweise zu gewinnen, welche Reaktivität HBsAg-spezifische CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten und die PBL HBV-naiver Spender nach Stimulation durch das in Kultur sezernierte HBsAg zeigen, wurden PBL mit HBsAg-exprimierenden sowie HBV-exprimierenden Zellen kokultiviert und dann im *Elispot* getestet. Trotz vergleichbarer HBsAg-Konzentrationen in beiden Kulturen wurden durch die viralen Produkte der HBV-exprimierenden Hepatozyten deutlich mehr Zellen zur Zytokin-Sekretion angeregt als durch HBsAg. Neben HBsAg sind offenbar die virale DNA, HBcAg und HBeAg an der Induktion einer reaktiven Immunantwort beteiligt. Dieses Ergebnis könnte ein weiterer Hinweis für die vermutete Beteiligung der angeborenen natürlichen Immunität in diesem Kulturmodell sein. *Milich et al.* beobachteten in transgenen Mäusen, dass HBcAg primär T<sub>H</sub>1-Zellen induziert, während HBeAg T<sub>H</sub>0- und T<sub>H</sub>1-Zellen

induziert. Da HBcAg und HBeAg Kreuzreaktivität bei der Antigenpräsentation zeigen, können sich T-Helferzellen in Abhängigkeit des Immunogens in verschiedene Effektorzellgruppen entwickeln (Milich et al., 1997). Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich jedoch auch schließen, dass auch HBsAg bei HBV-naiven PBL ungeimpfter Spender eine Stimulation bewirkt. Das in Kultur produzierte HBsAg löste – anders als das rekombinante HBsAg des Impfstoffes – bei naiven PBL die Sekretion antiviral wirkender Zytokine aus. Partikuläres HBsAg wird aus einzelnen, in Lipidmembranen eingelagerten Proteinen gebildet. Daher könnten Unterschiede in der Struktur der *in vitro* gebildeten HBsAg-Partikel und der nicht glykosylierten Impfstoff-Antigene zur Erkennung durch verschiedene Antigen-präsentierende Zellen und spezialisierter Antigen-Bindung führen (Ren et al., 2003), wodurch sich die Stimulation der HBV-naiven PBL erklären ließe.

Die gewonnenen Daten zeigen, dass HBV-spezifische und HBV-naive PBL die HBV-Infektion in diesem humanen Modell offenbar über Sekretion von  $T_H$ -Typ1-Zytokinen kontrollieren können. Die ersten Demonstrationen der Zytokin-vermittelten Inhibition der viralen Replikation wurden in HBV-transgenen Mäusen erbracht (Guidotti et al., 1994; Chisari, 1996; Guidotti et al., 1996; McClary et al., 2000). Wie in der vorliegenden Arbeit waren für die antiviralen Effekte hauptsächlich die Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  verantwortlich. In den transgenen Mäusen führten die Zytokine dazu, dass innerhalb von 24 Stunden virale Nukleokapside und die replizierende DNA in der Leber eliminiert und die Transkription der viralen RNA supprimiert wurde (Guidotti et al., 1996). Auch im Schimpansen-Modell wurde die Effektivität der nichtzytotoxischen Inhibition der viralen DNA-Synthese während der akuten Infektion durch T-Lymphozyten gezeigt. Nach *Guidotti et al.* waren ungefähr 90 % der viralen DNA der Leber eliminiert, bevor in den infizierten Tieren entzündliche Leberveränderungen auftraten (Guidotti und Chisari, 1999).

Da die PBL geimpfter Spender, die impfinduzierte HBsAg-spezifische  $CD4^+$ T-Lymphozyten enthalten, eine – im Vergleich zu den HBV-naiven PBL ungeimpfter Spender – statistisch signifikant stärkere Suppression der Virusreplikation bewirkten, ist die antivirale Wirkung der HBV-spezifischen PBL tatsächlich HBsAg-vermittelt. Es zeigte sich jedoch auch, dass der antivirale Effekt auf die Infektion synergistisch aus der angeborenen sowie der spezifischen, impfinduzierten Immunität resultiert. Für eine additive Wirkung spricht die signifikant stärkere inhibitorische Wirkung der PBL geimpfter Spender im Vergleich zu den HBV-naiven PBL. Daher scheinen  $CD4^+$ T-Lymphozyten eine direkte antivirale Antwort auf die HBV-Infektion humaner Hepatozyten nach Stimulation durch *in vitro* produzierte virale Partikel zu vermitteln. Dies bestätigen Daten aus der Literatur, wonach sowohl für das transgene Mausmodell als auch für das Schimpansenmodell eine direkte,  $T_H$ -Typ1-Zytokin-abhängige antivirale Rolle der  $CD4^+$ T-Lymphozyten gezeigt wurde (Franco et al., 1997; Guidotti et al., 1999; Guidotti und Chisari, 2001).

Tatsächlich gibt es aber in der Literatur auch Hinweise für eine Inhibition der HBV-Replikation durch Zellen und Mediatoren der angeborenen Immunität. An der antiviralen Wirkung der HBV-naiven PBL könnten *Toll-like* Rezeptoren (*TLR*) ursächlich beteiligt sein. *TLR* sind



integrale Membranproteine, die Rezeptoren für die Erkennung spezifischer Muster (*pattern recognition receptors*; *PRRs*) bilden. Über Erkennung pathogen-assoziierten konservierter Bereiche (*pathogen associated molecular patterns*, *PAMPs*) aktivieren sie Zellen der angeborenen Immunität und repräsentieren eine direkte Verknüpfung der angeborenen mit der adaptiven Immunität (Kawai und Akira, 2007). *TLR* binden verschiedene antigene Komponenten wie Lipopeptide, doppelsträngige RNA, Lipopolysaccharide oder einzelsträngige RNA. Eine entscheidende Rolle spielen *TLR* bei der Erkennung bakterieller oder Pilz-Pathogene, während die Bedeutung der *TLR* in der antiviralen Abwehr weniger bekannt ist. Zunächst ging man davon aus, dass doppelsträngige RNA – ein replikatives Intermediat vieler Viren – das einzig virale stimulierende Signal zur Aktivierung der angeborenen Immunität sei. Doppelsträngige RNA induziert über einen Transkriptionsfaktor (IFR 3, Interferon-regulierender Faktor 3) aktiv die Synthese verschiedener antiviral wirkender Faktoren. Mittlerweile wurde klar demonstriert, dass *TLR* Hüllproteine verschiedener Viren erkennen und dadurch eine infektionsinhibierende Signalkaskade in Gang setzen. Es wurde gezeigt, dass das Fusions-Protein des Pneumovirus RSV (*Respiratory syncytial virus*) und das Hämagglutinin des Masernvirus durch Interaktion mit verschiedenen *TLR* monozytäre Zellen aktiviert (Haynes et al., 2001; Bieback et al., 2002). In *TLR4*-defizienten Mäusen zeigte das Virus eine höhere Replikationsrate und längere Persistenz als in Wildtyp-Mäusen (Kurt-Jones et al., 2000). Ein murines Retrovirus (*mammary tumour virus*; *MMTV*) aktiviert durch Interaktion mit *TLR4* Dendriten und B-Zellen (Burzyn et al., 2004). Das humane Cytomegalievirus (CMV) löst nach Interaktion des Virions mit *TLR2* bei mononukleären Zellen die Sekretion inflammatorischer Zytokine aus (Compton et al., 2003). Auch in der Erforschung der Hepatitis-B-Virusinfektion mehren sich die Hinweise für die bedeutende Beteiligung der *TLRs* an der antiviralen Abwehr. Isogawa et al. berichten von der Inhibition der HBV-Replikation in transgenen Mäusen durch Injektion spezifischer Liganden für *TLR3*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR7* und *TLR9*. Innerhalb von 24 Stunden wurde der inhibitorische Effekt durch Typ-I-Interferone nicht zytopathogen vermittelt (Isogawa et al., 2005). Riordan et al. beschreiben in einem Kollektiv chronischer Virusträger Interaktionen des Virus mit *TLR2*. In HBeAg-positiven Patienten findet sich eine stark reduzierte Expression von *TLR2* sowie verminderte TNF- $\alpha$ -Konzentration. Demnach könnte eine reduzierte *TLR2*-Expression an der Entstehung einer persistierenden Infektion beteiligt sein (Riordan et al., 2006). Eine weitere Arbeit aus dem Mausmodell berichtet, dass intrahepatische nichtparenchymale Zellen durch *TLR3* und *TLR4* aktiviert werden können. In der Folge kommt es durch die unterschiedlichen Zelltypen zu einer Freisetzung verschiedener Mediatoren, die letztlich in der Inhibition der viralen Replikation resultieren (Wu et al., 2007). Eine bedeutende Funktion in der Abwehr des Hepatitis-B-Virus wird Natürlichen Killer-Zellen (NKZ) zugesprochen. NKZ repräsentieren eine lymphoide Zellpopulation, die unabhängig von der HLA-Restriktion eine erste Barriere und zelluläre Antwort auf eine Virusinfektion stellen (Chen et al., 2005b). NKZ produzieren eine Reihe inflammatorischer Zytokine mit direkter antiviraler Aktivität wie z. B. IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  und können durch Zell-Zell-Kontakt direkt zytolytisch wir-

ken (Guidotti und Chisari, 2001). Des Weiteren können NKZ durch aktivierte Lymphozyten selbst aktiviert werden, wie z. B. durch Natürliche Killer-T-Zellen (NKTZ). NKTZ gelten als spezialisierte Zellen der Immunabwehr, die sowohl T-Zell-Marker als auch Marker der NKZ tragen. Eine Arbeit aus einem HBV-transgenen Mausmodell berichtet, dass die virale Replikation direkt durch NKTZ via Sekretion von IFN- $\gamma$  und IFN- $\alpha/\beta$  und durch Rekrutierung von NKZ inhibiert wurde (Kakimi et al., 2000). Eine Beteiligung der NKZ an der antiviralen Wirkung wurde auch im Schimpansen-Modell demonstriert (Guidotti et al., 1999). Der Literatur nach könnte die Aktivierung der NKTZ durch verschiedene Elemente erfolgen, wie z. B. durch virale Glykolipide und Phospholipide oder HBV-induzierte Zytokine (Bendelac et al., 1997; Biron et al., 1999; Kakimi et al., 2000). Aus dem Mausmodell ist bekannt, dass HBV-exprimierende Hepatozyten eine direkte *in vivo* Aktivierung der NKTZ während der akuten Infektion bewirken (Baron et al., 2002). Des Weiteren ist die von aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen und Dendritischen Zellen ausgehende Inhibition der HBV-Replikation in HBV-transgenen Mäusen hauptsächlich IFN- $\gamma$ -vermittelt (Kimura et al., 2002a).

Es wäre durchaus denkbar, dass die in dieser Arbeit beobachtete antivirale Wirkung der HBV-naiven PBL und die effektive Inhibition der Virusreplikation eine erste starke Reaktion oben genannter Mechanismen darstellt. Antiviral und immunmodulatorisch wirkende Zytokine werden von verschiedenen Zellen wie CD4<sup>+</sup>T-Zellen, CD8<sup>+</sup>T-Zellen, NKZ, NKTZ, Dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen produziert (Vierling, 2007). Außer den T<sub>H</sub>-Typ1-Zytokinen besitzen eine Reihe weiterer sezernierter Faktoren antivirales Potential. Allen voran die Typ-1-Interferone IFN- $\alpha/\beta$  (Wieland et al., 2000; Anderson et al., 2005). IFN- $\alpha$  wird erfolgreich in der Therapie der chronischen Hepatitis-B eingesetzt. In Kombinationstherapien mit z. B. Ribavirin wird eine signifikante Reduktion der Virämie bei gleichzeitiger Proliferation von CD4<sup>+</sup>T-Zellen sowie konzentrierter T<sub>H</sub>-Typ1-Zytokine beobachtet (Hultgren et al., 1998; Rico et al., 2001). Des Weiteren wurden auch IL-12 oder IL-18 in der Literatur als mögliche Inhibitoren der Hepatitis-B-Virusreplikation beschrieben (Cavanaugh et al., 1997; Kimura et al., 2002b). *In vivo* könnte die Beteiligung der Zellen der angeborenen Immunität mitverantwortlich dafür sein, dass die akute HBV-Infektion in bis zu 95 % der immunkompetenten Erwachsenen einen selbst-limitierenden Verlauf zeigt. Nach Vakzinierung benötigt die adaptive Immunantwort ungefähr sieben bis zehn Tage, bevor sie aktiv das antivirale Geschehen bestimmen kann (Ganem und Schneider, 2001). Somit scheinen während der Aktivierungsphase der impfinduzierten HBsAg-spezifischen CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten zunächst offenbar Zellen und Komponenten der angeborenen Immunität einen ersten Schutz zu vermitteln (Rehermann, 2007).

Die gewonnenen Erkenntnisse der antiviralen Wirkung impfinduzierter, HBsAg-spezifischer CD4<sup>+</sup>T-Zellen und der HBV-naiven Immunzellen werfen jedoch weitere Fragen auf. Auf den Daten der vorliegenden Arbeit aufbauend, sollten daher weitere Projekte die Identifizierung der für die inhibitorische Wirkung auf die HBV-Infektion verantwortlichen Zellen und der antiviral wirkenden Mediatoren verfolgen. Wie in der Literatur angedacht, könnte zudem die

therapeutische Aktivierung von *TLR*, NKTZ oder weiterer Zellen der angeborenen Immunität potentiell die HBV-Replikation während der natürlichen Infektion kontrollieren (Baron et al., 2002; Chen et al., 2005b). Darüber hinaus könnten die gewonnenen Daten jedoch auch Bedeutung für die zelluläre Immunität der Impflinge haben, die auf die aktive Immunisierung nicht ansprechen. Ca. 80 % dieser Personengruppe können trotz fehlender bzw. schwacher humoraler Immunität eine zelluläre Immunität aufbauen, deren Bedeutung noch nicht eindeutig geklärt ist (Jarrosso et al., 2004; Bauer und Jilg, 2006).

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen zur Interaktion impfinduzierter HBsAg-spezifischer  $CD4^+$ T-Zellen mit HBV-infizierten humanen Hepatozyten, dass HBsAg-spezifische  $CD4^+$ T-Zellen eine eindeutige antivirale Effektorfunktion ausüben. Die HBV-spezifischen PBL bewirkten eine signifikante Reduktion und z. T. vollständige Suppression der Virusreplikation. Zudem sezernierten die HBV-spezifischen PBL  $T_H$ -Typ1-Zytokine, die für die antivirale Wirkung verantwortlich sein könnten. Entgegen der Erwartung erfolgte auch durch HBV-naive PBL eine Reduktion der HBV-Infektion sowie die Sekretion von  $T_H$ -Typ1-Zytokinen. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Immunzellen durch die in Kultur gebildeten viralen Produkte stimuliert wurden und dadurch die Sekretion antiviral-wirkender Zytokine induziert wurde. Sowohl die HBV-spezifischen als auch die HBV-naiven Immunzellen konnten offenbar über die Sekretion der Zytokine die HBV-Infektion kontrollieren und inhibieren. An dieser Stelle ist nochmals hervorzuheben, dass die antivirale Wirkung trotz fehlendem Zell-Zell-Kontakt auch über die räumliche Entfernung zu einer signifikanten Beeinflussung der Virusreplikation führte. Es wurde weiterhin gezeigt, dass die anhand der hier verwendeten humanen Infektionsmodelle gewonnenen Ergebnisse mit Daten diverser anderer Modelle aus der Literatur übereinstimmen. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten weisen der impfinduzierten, HBsAg-spezifischen zellulären Immunität bzw. den HBsAg-spezifischen  $CD4^+$ T-Zellen eine entscheidende antivirale Bedeutung bei der Hepatitis-B-Virusinfektion zu.

# Sequenzen

## HLA-A

NM\_002116; eingesehen 2006

```
atggccgtca tggcgccccg aaccctcctc ctgctactct cggggggccct ggccctgacc cagacctggg
cgggctccca ctccatgagg tatttcttca catccgtgtc ccggcccggc cgcgggggagc cccgcttcat
cgccgtgggc tacgtggacg acacgcagtt cgtgcggttc gacagcgacg ccgcgagcca gaggatggag
ccgcgggcgc cgtggataga gcaggagggg ccggagtatt gggaccagga gacacggaat gtgaaggccc
agtcacagac tgaccgagtg gacctgggga ccctgcgcgg ctactacaac cagagcgagg ccggttctca
caccatccag ataatgtatg gctgcgacgt ggggtcggac gggcgcttcc tccgcgggta ccggcaggac
gcctacgacg gcaaggatta catcgccctg aacgaggacc tgcgctcttg gaccgcggcg gacatggcgg
ctcagatcac caagcgcaag tgggaggcgg cccatgaggc ggagcagttg agagcctacc tggatggcac
gtgcgtggag tggctccgca gatacttga gaacgggaag gagacgctgc agcgcacgga ccccccaag
acacatatga cccaccacc catctctgac catgaggcca ccctgagggtg ctgggcccctg ggcttctacc
ctgcggagat cacactgacc tggcagcggg atggggagga ccagaccag gacacggagc tcgtggagac
caggcctgca ggggatggaa cttccagaa gtgggcggct gtggtggtgc cttctggaga ggagcagaga
tacacctgcc atgtgcagca tgagggtctg cccaagcccc tcacctgag atgggagctg tcttccagc
ccaccatccc catcgtgggc atcattgctg gcctggttct cttggagct gtgatcactg gagctgtggt
cgctgccgtg atgtggagga ggaagagctc agatagaaaa ggagggagtt aactcaggc tgcaagcagt
gacagtgcgc agggctctga tgtgtccctc acagcttgta aagtgtgaga cagctgcctt gtgtgggact
gagaggcaag agttgttcct gcccttcctt ttgtgacttg aagaaccctg actttgtttc tgcaaaggca
cctgcatgtg tctgtgttcg tgtaggcata atgtgaggag gtggggagac caccaccac ccattgtccac
catgaccctc ttcccacgt gacctgtgct cctcccca tcatctttcc tgttccagag aggtggggct
gaggtgtctc catctctgtc tcaacttcat ggtgcactga gctgtaactt cttccttccc tattaaaatt
agaaccttag tataaattha ctttctcaa ttcttgccat gagaggttga tgagttaatt aaaggagaag
attcctaaaa tttgagagac aaaataaatg gaacacatga gaaccttcca aaaaaaaaaa aaaaaaaa
```

## HLA-B

NM\_005514; eingesehen 2006

```
atgctggtca tggcgccccg aaccgtcctc ctgctgctct cggcggccct ggccctgacc gagacctggg
ccggctccca ctccatgagg tatttctaca cctccgtgtc ccggcccggc cgcggggagc cccgcttcat
ctcagtgggc tacgtggacg acaccagtt cgtgaggttc gacagcgacg ccgcgagtcc gagagaggag
ccgcggggcg cgtggataga gcaggagggg ccggagtatt gggaccggaa cacacagatc tacaaggccc
aggcacagac tgaccgagag agcctgcgga acctgctggg ctactacaac cagagcgagg ccgggtctca
caccctccag agcatgtacg gctgcgacgt ggggcccggc gggcgccctc tccgcgggca tgaccagtac
gcctacgacg gcaaggatta catcgccctg aacgaggacc tgcgctcctg gaccgccgcg gacacggcgg
ctcagatcac ccagcgcaag tgggaggcgg cccgtgaggc ggagcagcgg agagcctacc tggaggggcga
gtgcgtggag tggctccgca gatacctgga gaacgggaag gacaagctgg agcgcgctga cccccaaag
acacacgtga cccaccacc catctctgac catgaggcca ccctgagggtg ctgggccctg ggtttctacc
ctgcgggagat cacactgacc tggcagcggg atggcgagga ccaaactcag gacactgagc ttgtggagac
cagaccagca ggagatagaa cttccagaa gtgggcagct gtggtggtgc cttctggaga agagcagaga
tacacatgcc atgtacagca tgaggggctg ccgaagcccc tcaccctgag atgggagccg tcttcccagt
ccaccgtccc catcgtgggc attgttctgt gcctggctgt cctagcagtt gtggtcatcg gagctgtggt
cgctgctgtg atgtgtagga ggaagagttc aggtggaaaa ggagggagct actctcaggc tgcgtgcagc
gacagtgcc agggctctga tgtgtctctc acagcttgaa aagcctgaga cagctgtctt gtgagggact
gagatgcagg atttcttcac gcctcccctt tgtgacttca agagcctctg gcatctcttt ctgcaaaggc
acctgaatgt gtctgcgtcc ctgttagcat aatgtgagga ggtggagaga cagcccacc ttgtgtccac
tgtgaccct gttcccatgc tgacctgtgt ttctcccca gtcactttt ttgttcaga gaggtggggc
tgatgtctc catctctgtc tcaactttac gtgcactgag ctgcaacttc ttacttcct actgaaaata
agaatctgaa tataaatttg ttttctcaa tatttgctat gagaggttga tggattaatt aaataagtca
attcctggaa ttgaaagag caaataaaga cctgagaacc ttccagaaaa aaaaaaaaaaaa
```

## HLA-C

NM\_002117; eingesehen 2006

```
ggccgagatg cgggtcatgg cgccccgagc cctcctcctg ctgctctcgg gaggcctggc cctgaccgag
acctgggcct gctcccactc catgaggat ttcgacaccg ccgtgtcccg gcccggccgc ggagagcccc
gcttcatctc agtgggctac gtggacgaca cgcagttcgt gcggttcgac agcgacgccg cgagtccgag
aggggagccg cgggcgccgt ggggtggagca ggagggggccg gagtattggg accgggagac acagaagtac
aagcgccagg cacaggctga ccgagtgagc ctgcggaacc tgcgcggcta ctacaaccag agcgaggacg
ggtctcacac cctccagagg atgtctggct gcgacctggg gcccgacggg cgcctcctcc gcgggtatga
ccagtccgcc tacgacggca aggattacat cgccctgaac gaggacctgc gctcctggac cgccgcggac
accgcggctc agatcaccca gcgcaagttg gaggcggccc gtgcggcgga gcagctgaga gcctacctgg
agggcacgtg cgtggagtggt ctccgcagat acctggagaa cgggaaggag acgctgcagc gcgcagaacc
cccaaagaca cacgtgacct accaccccct ctctgacct gaggccacct tgaggtgctg ggccctgggc
ttctaccctg cggagatcac actgacctgg cagcgggatg gggaggacca gaccaggac accgagcttg
tggagaccag gccagcagga gatggaacct tccagaagtg ggcagctgtg gtggtgcctt ctggacaaga
gcagagatac acgtgccata tgcagcacga ggggctgcaa gagcccctca ccctgagctg ggagccatct
tcccagccca ccattcccat catgggcatc gttgctggcc tggctgtcct ggttgtccta gctgtccttg
gagctgtggt caccgctatg atgtgtagga ggaagagctc aggtggaaaa ggaggagct gctctcaggc
tgcgtgcagc aacagtgcgc agggctctga tgagtctctc atcacttgta aagcctgaga cagctgcctg
tgtgggactg agatgcagga tttcttcaca cctctccttt gtgacttcaa gaggcctctg catctctttc
tgcaaaggca cctgaatgtg tctgcgttcc tgttagcata atgtgaggag gtggagagac agcccacccc
cgtgtccacc gtgacctctg tccccacact gacctgtgtt ccctccccga tcattcttcc tgttccagag
aggtggggct ggatgtctcc atctctgtct caaattcatg gtgcactgag ctgcaacttc ttacttcctt
aatgaagtta agaacctgaa tataaatttg tgttctcaa tatttgctat gaagcgttga tggattaatt
aaataagtca attcctagaa gttgagagag caaataaaga cctgagaacc ttcaaaaaa aaaaaaaaaa
```

## $\beta_2$ -Mikroglobulin

NM\_004048; eingesehen 2006

```
aatataagtg gaggcgtcgc gctggcgggc attcctgaag ctgacagcat tcgggccgag atgtctcgct
ccgtggcctt agctgtgctc gcgctactct ctctttctgg cctggaggct atccagcgta ctccaaagat
tcaggtttac tcacgtcatc cagcagagaa tggaaagtca aatttcctga attgctatgt gtctgggttt
catccatccg acattgaagt tgacttactg aagaatggag agagaattga aaaagtggag cattcagact
tgtctttcag caaggactgg tctttctatc tcttgtacta cactgaattc acccccactg aaaaagatga
gtatgcctgc cgtgtgaacc atgtgacttt gtcacagccc aagatagtta agtgggatcg agacatgtaa
gcagcatcat ggaggtttga agatgccgca tttggattgg atgaattcca aattctgctt gcttgctttt
taatattgat atgcttatac acttacactt tatgcacaaa atgtagggtt ataataatgt taacatggac
atgatcttct ttataattct actttgagtg ctgtctccat gtttgatgta tctgagcagg ttgctccaca
ggtagctcta ggagggctgg caacttagag gtggggagca gagaattctc ttatccaaca tcaacatctt
ggtcagattt gaactcttca atctcttgca ctcaaagctt gttaagatag ttaagcgtgc ataagttaac
ttccaattta catactctgc ttagaatttg ggggaaaatt tagaaatata attgacagga ttattggaaa
tttgttataa tgaatgaaac attttgtcat ataagattca tatttacttc ttatacattt gataaagtaa
ggcatgggtg tggttaatct ggtttatttt tgttccacaa gttaaataaa tcataaaact tgatgtgtta
tctctta
```

## CD40

NM\_001250; eingesehen 2006

```
gccaaggctg gggcagggga gtcagcagag gcctcgctcg ggcgcccagt ggtcctgccg cctgggtctca
cctcgctatg gttcgtctgc ctctgcagtg cgtcctctgg ggctgcttgc tgaccgctgt ccatccagaa
ccacccactg catgcagaga aaaacagtac ctaataaaca gtcagtgtctg ttctttgtgc cagccaggac
agaaactggg gagtgactgc acagagttca ctgaaacgga atgccttcct tgcggtgaaa gcgaattcct
agacacctgg aacagagaga cacttgcca ccagcacaaa tactgcgacc ccaacctagg gcttcgggtc
cagcagaagg gcacctcaga aacagacacc atctgcacct gtgaagaagg ctggcactgt acgagtagg
cctgtgagag ctgtgtcctg caccgctcat gctcgccgg ctttggggtc aagcagattg ctacaggggt
ttctgatacc atctgcgagc cctgcccagt cggcttcttc tccaatgtgt catctgcttt cgaaaaatgt
cacccttgga caagctgtga gaccaaagac ctggttgtgc aacaggcagg cacaacaag actgatgttg
tctgtgggtcc ccaggatcgg ctgagagccc tgggtggtgat ccccatcatc ttcgggatcc tgtttgccat
cctcttgggtg ctggtcttta tcaaaaagggt ggccaagaag ccaaccaata agggccccc a cccaagcag
gaacccagg agatcaattt tcccgcgat cttcctggct ccaacactgc tgctccagtg caggagactt
tacatggatg ccaaccggtc acccaggagg atggcaaaga gagtgcacac tcagtgcagg agagacagtg
aggctgcacc caccaggag tgtggccacg tgggcaaaca ggcagttggc cagagagcct ggtgctgctg
ctgctgtggc gtgaggggtga ggggctggca ctgactgggc atagctcccc gcttctgcct gcacccctgc
agtttgagac aggagacctg gcaactggat cagaaacagt tcaccttgaa gaacctctca cttcacctg
gagcccatcc agtctcccaa cttgtattaa agacagaggc agaagtttgg tgggtggtggt gttgggggtat
ggttttagtaa tatccaccag accttcgat ccagcagttt ggtgcccaga gaggcacatc ggtggcttcc
ctgcgcccag gaagccatat acacagatgc ccattgcagc attgtttgtg atagtgaaca actggaagct
gcttaactgt ccatcagcag gagactggct aaataaaatt agaatatatt tataaacag aatctcaaaa
acactgttga gtaaggaaaa aaaggcatgc tgctgaatga tgggtatgga actttttaaa aaagtacatg
cttttatgta tgtatattgc ctatggatat atgtataaat acaatatgca tcatatattg atataacaag
ggttctggaa ggggtacacag aaaaccaca gctcgaagag tggtgacgtc tgggggtgggg aagaagggtc
tggggg
```



HLA-DR $\alpha$ 

XM\_042473; eingesehen 2005

```
attcttgtct gttctgcctc actcccgagc tctactgact cccaacagag cgcccaagaa gaaaatggcc
ataagtggag tccctgtgct aggatttttc atcatagctg tgctgatgag cgctcaggaa tcatgggcta
tcaaagaaga acatgtgata atccaggccg agttctatct gaatcctgac caatcaggcg agtttatgtt
tgactttgat ggtgatgaga ttttccatgt ggatatggca aagaaggaga cggctctggcg gcttgaagaa
tttggacgat ttgccagctt tgaggctcaa ggtgcattgg ccaacatagc tgtggacaaa gccaacctgg
aatcatgac aaagcgtcc aactatactc cgatcaccaa tgtacctcca gaggtaactg tgctcacaaa
cagccctgtg gaactgagag agcccaacgt cctcatctgt ttcatagaca agttcacccc accagtggtc
aatgtcacgt ggcttcgaaa tggaaaacct gtcaccacag gagtgtcaga gacagtcttc ctgccagggg
aagaccacct tttccgcaag ttccactatc tccccttcct gccctcaact gaggacgttt acgactgcag
ggtggagcac tggggcttgg atgagcctct tctcaagcac tgggagtttg atgtccaag ccctctcca
gagactacag agaacgtggg gtgtgccctg ggcctgactg tgggtctggg gggcatcatt attgggacca
tcttcatcat caagggattg cgcaaaagca atgcagcaga acgcaggggg cctctgtaag gcacatggag
gtgatgggtg ttcttagaga gaagatcact gaagaaactt ctgctttaat ggctttacaa agctggcaat
attacaatcc ttgacctcag tgaaagcagt catcttcagc attttccagc cctatagcca cccaagtgt
ggatatgcct cttcgattgc tccgtactct aacatctagc tggcttcct gtctattgcc ttttcctgta
tctattttcc tctatttcct atcattttat tatcaccatg caatgcctct ggaataaaac atacaggagt
ctgtctctgc tatggaatgc ccatggggc atctcttggt tacttattgt ttaaggtttc ctcaaactgt
gatttttctg aacacaataa actattttga tgatcttggg tggaa
```

## CIITA

AY084055; eingesehen 2005

ctggtttagtg atgaggctgt gtgcttctga gctgggcatc cgaaggcatc cttggggaag ctgagggcac  
gaggaggggc tgccagactc cgggagctgc tgcctggctg ggattcctac acaatgcgtt gcctggctcc  
acgccctgct gggtcctacc tgtcagagcc ccaaggcagc tcacagtgtg ccaccatgga gttggggccc  
ctagaagggtg gctacctgga gcttcttaac agcgatgctg accccctgtg cctctaccac ttctatgacc  
agatggacct ggctggagaa gaagagattg agctctactc agaaccgac acagacacca tcaactgcga  
ccagttcagc aggctgttgt gtgacatgga aggtggtgaa gagaccaggg aggcttatgc caatatcgcg  
gaactggacc agtatgtctt ccaggactcc cagctggagg gcctgagcaa ggacattttc aagcacatag  
gaccagatga agtgatcggg gagagtatgg agatgccagc agaagttggg cagaaaagtc agaaaagacc  
cttcccagag gagcttccgg cagacctgaa gcaactggaag ccagctgagc cccccactgt ggtgactggc  
agtctcctag tgggaccagt gagcgactgc tccaccctgc cctgcctgcc actgcctgcg ctgttcaacc  
aggagccagc ctccggccag atgcgcctgg agaaaaccga ccagattccc atgcctttct ccagttcctc  
gttgagctgc ctgaatctcc ctgagggacc catccagttt gtccccacca tctccactct gccccatggg  
ctctggcaaa tctctgaggc tggaacaggg gtctccagta tattcatcta ccatggtgag gtgcccagg  
ccagccaagt accccctccc agtggattca ctgtccacgg cctccaaca tctccagacc ggccaggctc  
caccagcccc ttgctccat cagccactga cctgcccagc atgcctgaac ctgccctgac ctcccagtg  
gctgggactg cgggcacccg ccatcatgtc tggctaattt ttcatttttg gtagagacag ggttttgccg  
tggt

## HBV pHBV991 (adw2)

X\_51970; eingesehen 2007

```
ttccactgcc ttccaccaag ctctgcaaga ccccagagtc aggggtctgt attttcctgc tgggtggctcc
agttcaggaa cagtaaacc tgctccgaat attgcctctc acatctcgtc aatctccgcg aggaccgggg
accctgtgac gaacatggag aacatcacat caggattcct aggaccctg cccgtgttac aggcgggggtt
tttcttggtg acaagaatcc tcacaatacc gcagagtcta gactcgtggt ggacttctct caattttcta
gggggatcac ccgtgtgtct tggccaaaat tcgcgatccc caacctcaa tcactacca acctcctgtc
ctccaatttg tcttggttat cgctggatgt gtctgcggcg ttttatcata ttctcttca tcctgctgct
atgcctcatc ttcttattgg ttcttctgga ttatcaagggt atgttgcccg tttgtcctct aattctagga
tcaacaacaa ccagtacggg accatgcaaa acctgcacga ctctgctca aggcaactct atgtttccct
catgttgctg tacaaaacct acggatggaa attgcacctg tattcccac ccatcgtctt gggttttcgc
aaaataccta tgggagtggg cctcagtccg tttctcttgg ctcagtttac tagtgccatt tgttcagtgg
ttcgtagggc tttccccac tgtttggctt tcagctatat ggatgatgtg gtattggggg ccaagtctgt
acagcatcgt gagttccttt ataccgctgt taccaatttt cttttgtctc tgggtataca tttaaacct
aacaaaacaa aaagatgggg ttattcccta aacttcatgg gttatgtaat tggaagtgg cacaggatca
tattgtacaa aaaatcaaac actgttttag aaaacttctt gttaacaggc ctattgattg gaaagtatgt
caaagaattg tgggtctttt gggctttgct gctcctttta cacaatgtgg atatcctgcc ttaatgccct
tgtatgcatg tatacaagct aaacaggctt tcactttctc gccaaactac aaggcctttc taagtaacaa
gtacatgaac ctttaccctg ttgctcggca acggcctggt ctgtgccaaag tatttgctga tgcaaccccc
actggctggg gcttggccat aggccatcag cgcatgcgcg gaacctttgt ggctcctctg ccgatccata
ctgcggaact cctagccgct tgttttgctc gcagccggtc tggagcgaaa ctcatcggaa ctgacaattc
tgtcgtcctc tcgcggaaat atacctcgtt tccatggcta ctaggctgtg ctgccaactg gatccttcgc
gggacgtcct ttgtttacgt cccgtcggcg ctgaatcccg cggacgacct ctctcggggc cgcttgggac
tctctcgtcc ccttctccgt ctgccgttcc agccgaccac ggggcgcacc tctctttacg cggctctccc
gtctgtgcct tctcatctgc cggtcctgtg gcacttctgc tcacctctgc acgttgcatg gagaccaccg
tgaacgcca tcagatcctg cccaaggctt tacataagag gactcttgga ctcccagcaa tgtcaacgac
cgaccttgag gcctacttca aagactgtgt gtttaaggac tgggaggagc tgggggagga gattagggtta
aaggcttttg tattaggagg ctgtaggcat aaattggctc gcgcaccagc accatgcaac tttttcacct
ctgcctaata atctcttgta catgtcccac tgttcaagcc tccaagctgt gccttgggtg gctttggggc
atggacattg acccttataa agaatttgga gctactgtgg agttactctc gtttttgctt tctgacttct
ttccttccgt cagagatctc ctagacaccg cctcggctct gtatcgggaa gccttagagt ctctgagca
ttgctcacct caccataccg cactcaggca agccattctc tgctgggggg aattgatgac tctagctacc
tgggtgggta ataatttgga agatccagca tccagggatc tagtagtcaa ttatgttaat actaacatgg
gattaaagat caggcaactc ttgtggtttc atatctcttg ccttactttt ggaagagaaa ctgtacttga
atatttggtc tctttcggag tgtggattcg cactcctcca gcctatagac caccaaatgc ccctatctta
tcaacacttc cggaaactac tgttgttaga cgacgggacc gaggcaggtc ccctagaaga agaactccct
cgcctcgcag acgcagatct caatcgccgc gtcgcagaag atctcaatct cgggaatctc aatgttagta
ttccttggac tcataaggtg ggaaacttca ctgggcttta ttctctaca gcacctatct ttaatcctga
atggcaaaact ccttcctttc ctaaaattca tttacaagag gacattatta ataggtgtca acaatttgtg
ggccctctca ctgtaaataa aaagagaaga ttgaaattaa ttatgcctgc tagattctat cctaccaca
ctaaatattt gcccttagac aaaggaatta aaccttatta tccagatcag gtagttaatc attacttcca
aaccagacat tatttacata ctcttggaa ggcgggtatt ctatataaga gagaaaccac acgtagcgca
tcattttgcg ggtcaccata ttcttgggaa caagagctac agcatgggag gttggtcatc aaaacctcgc
aaaggcatgg ggacgaatct ttctgttccc aaccctctgg gattctttcc cgatcatcag ttggaccctg
tattcggagc caactcaaac aatccagatt gggacttcaa ccccatcaag gaccactggc cagcagccaa
ccaggtagga gtgggagcat tcggccagg gtacaccct cccacaggcg gtgttttggg gtggagccct
caggctcagg gcatgttgac ccagtgctca acaattcctc ctctgcctc cgccaatcgg cagttaggaa
ggcagcctac tcccatctct ccacctctaa gagacagtca tcctcaggcc atgcagtgga a
```

# Literaturverzeichnis

ALPINI, G., PHILLIPS, J. O., VROMAN, B., LARUSSO, N. F. (1994). Recent advances in the isolation of liver cells. *Hepatology*, 20(2): 494-514.

ANDERSON, A. L., BANKS, K. E., PONTOGLIO, M., YANIV, M., MCLACHLAN, A. (2005). Alpha/beta interferon differentially modulates the clearance of cytoplasmic encapsidated replication intermediates and nuclear covalently closed circular hepatitis B virus (HBV) DNA from the livers of hepatocyte nuclear factor 1alpha-null HBV transgenic. *J Virol*, 79(17): 11045-52.

BALSANO, C., ALISI, A. (2008). Viral hepatitis B: established and emerging therapies. *Curr Med Chem*, 15(9): 930-9.

BARBATIS, C., WOODS, J., MORTON, J. A., FLEMING, K. A., MCMICHAEL, A., MCGEE, J. O. (1981). Immunohistochemical analysis of HLA (A, B, C) antigens in liver disease using a monoclonal antibody. *Gut*, 22(12): 985-91.

BARNABA, V., FRANCO, A., PAROLI, M., BENVENUTO, R., DE PETRILLO, G., BURGIO, V. L., SANTILIO, I., BALSANO, C., BONAVITA, M. S., CAPPELLI, G. (1994). Selective expansion of cytotoxic T lymphocytes with a CD4+CD56+ surface phenotype and a T helper type 1 profile of cytokine secretion in the liver of patients chronically infected with Hepatitis B virus. *J Immunol*, 152(6): 3074-87.

BARON, J. L., GARDINER, L., NISHIMURA, S., SHINKAI, K., LOCKSLEY, R., GANEM, D. (2002). Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. *Immunity*, 16(4): 583-94.

BARTENSCHLAGER, R., JUNKER-NIEPMANN, M., SCHALLER, H. (1990). The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *J Virol*, 64(11): 5324-32.

BAUER, T., JILG, W. (2006). Hepatitis B surface antigen-specific T and B cell memory in individuals who had lost protective antibodies after hepatitis B vaccination. *Vaccine*, 24(5): 572-7.

BAUER, T., WEINBERGER, K., JILG, W. (2002). Variants of two major T cell epitopes within the hepatitis B surface antigen are not recognized by specific T helper cells of vaccinated individuals. *Hepatology*, 35(2): 455-65.

BENDELAC, A., RIVERA, M. N., PARK, S. H., ROARK, J. H. (1997). Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol*, 15: 535-62.

BERTOLETTI, A., D'ELIOS, M. M., BONI, C., DE CARLI, M., ZIGNEGO, A. L., DURAZZO, M., MISSALE, G., PENNA, A., FIACCADORI, F., DEL PRETE, G., FERRARI, C. (1997). Different

cytokine profiles of intraphepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Gastroenterology*, 112(1): 193-9.

BERTOLETTI, A., FERRARI, C., FIACCADORI, F., PENNA, A., MARGOLSKEE, R., SCHLICHT, H. J., FOWLER, P., GUILHOT, S., CHISARI, F. V. (1991). HLA class I-restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(23): 10445-9.

BERTOLETTI, A., GEHRING, A. J. (2006). The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol*, 87(Pt 6): 1439-49.

BHATIA, S. N., BALIS, U. J., YARMUSH, M. L., TONER, M. (1999). Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J*, 13(14): 1883-900.

BIEBACK, K., LIEN, E., KLAGGE, I. M., AVOTA, E., SCHNEIDER-SCHAULIES, J., DUPREX, W. P., WAGNER, H., KIRSCHNING, C. J., TER MEULEN, V., SCHNEIDER-SCHAULIES, S. (2002). Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol*, 76(17): 8729-36.

BIERMER, M., PURO, R., SCHNEIDER, R. J. (2003). Tumor necrosis factor alpha inhibition of hepatitis B virus replication involves disruption of capsid Integrity through activation of NF-kappaB. *J Virol*, 77(7): 4033-42.

BIRON, C. A., NGUYEN, K. B., PIEN, G. C., COUSENS, L. P., SALAZAR-MATHER, T. P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*, 17: 189-220.

BLUMBERG, B. S., ALTER, H. J., VISNICH, S. (1965). A 'new' antigen in leukemia sera. *The Journal of the American Medical Association*, 191: 541-6.

BLUMBERG, B. S., GERSTLEY, B. J., HUNGERFORD, D. A., LONDON, W. T., SUTNICK, A. I. (1967). A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med*, 66(5): 924-31.

BOCHER, W. O., HERZOG-HAUFF, S., HERR, W., HEERMANN, K., GERKEN, G., MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H., LOHR, H. F. (1996). Regulation of the neutralizing anti-hepatitis B surface (HBs) antibody response in vitro in HBs vaccine recipients and patients with acute or chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Clin Exp Immunol*, 105(1): 52-8.

BOCHER, W. O., HERZOG-HAUFF, S., SCHLAAK, J., MEYER ZUM BUSCHENFELD, K. H., LOHR, H. F. (1999). Kinetics of hepatitis B surface antigen-specific immune responses in acute and chronic hepatitis B or after HBs vaccination: stimulation of the in vitro antibody response by interferon gamma. *Hepatology*, 29(1): 238-44.

BOEHM, S., THASLER, W. E., WEISS, T., JILG, W. (2005). Primary human hepatocytes as an in vitro model for Hepatitis B virus infection. In: M. Roggendorf (Ed.), *Monographs in Virology - Models of viral hepatitis*, vol. 25: 119-134, Basel: Karger.

BRECHOT, C. (2004). Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology*, 127(5 Suppl 1): S56-61.

- BRUSS, V. (2007). Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol*, 13(1): 65-73.
- BURZYN, D., RASSA, J. C., KIM, D., NEPOMNASCHY, I., ROSS, S. R., PIAZZON, I. (2004). Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by a retrovirus. *J Virol*, 78(2): 576-84.
- CAO, J., YANG, E., SU, J., LI, Y., CHOW, P. (2003). The tree shrews: adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research. *J Med Primatol*, 32(3): 123-30.
- CARUNTU, F. A., MOLAGIC, V. (2005). CccDNA persistence during natural evolution of chronic VHB infection. *Rom J Gastroenterol*, 14(4): 373-7.
- CAVANAUGH, V. J., GUIDOTTI, L. G., CHISARI, F. V. (1997). Interleukin-12 inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol*, 71(4): 3236-43.
- CELIS, E., OU, D., OTVOS, L. J. (1988). Recognition of hepatitis B surface antigen by human T lymphocytes. Proliferative and cytotoxic responses to a major antigenic determinant defined by synthetic peptides. *J Immunol*, 140(6): 1808-15.
- CHAI, N., CHANG, H. E., NICOLAS, E., HAN, Z., JARNIK, M., TAYLOR, J. (2008). Properties of subviral particles of hepatitis B virus. *J Virol*, 82(16): 7812-7.
- CHEN, M., TABACZEWSKI, P., TRUSCOTT, S. M., VAN KAER, L., STROYNOWSKI, I. (2005a). Hepatocytes express abundant surface class I MHC and efficiently use transporter associated with antigen processing, tapasin, and low molecular weight polypeptide proteasome subunit components of antigen processing and presentation pathway. *J Immunol*, 175(2): 1047-55.
- CHEN, Y., CHENG, M., TIAN, Z. (2006). Hepatitis B virus down-regulates expressions of MHC class I molecules on hepatoplastoma cell line. *Cell Mol Immunol*, 3(5): 373-8.
- CHEN, Y., WEI, H., GAO, B., HU, Z., ZHENG, S., TIAN, Z. (2005b). Activation and function of hepatic NK cells in hepatitis B infection: an underinvestigated innate immune response. *J Viral Hepat*, 12(1): 38-45.
- CHISARI, F. V. (1996). Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 206: 149-73.
- CHIU, J. H., LUI, W. Y., CHANG, H. M., LOONG, C. C., WU, L. H., KAO, H. L., WU, C. W. (1997). Class I and class II major histocompatibility complex antigens expression on human hepatocytes and hepatoma cells: an approach with high sensitivity and specificity. *Cytometry*, 30(6): 317-23.
- COMPTON, T., KURT-JONES, E. A., BOEHME, K. W., BELKO, J., LATZ, E., GOLENBOCK, D. T., FINBERG, R. W. (2003). Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol*, 77(8): 4588-96.
- COOPER, A., TAL, G., LIDER, O., SHAUL, Y. (2005). Cytokine induction by the hepatitis B virus capsid in macrophages is facilitated by membrane heparan sulfate and involves TLR2. *J Immunol*, 175(5): 3165-76.
- CORNBERG, M., PROTZER, U., DOLLINGER, M. M., PETERSEN, J., WEDEMAYER, H., BERG, T., JILG, W., ERHARDT, A., WIRTH, S., SCHIRMACHER, P., FLEIG, W. E., MANNS, M. P.

- (2007). Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virus-(HBV-)Infektion - 'Upgrade' der Leitlinie, AWMF-Register-Nr.: 021/011. *Z Gastroenterol*, 45(6): 525-74.
- CROWTHER, R. A., KISELEV, N. A., BOTTCHER, B., BERRIMAN, J. A., BORISOVA, G. P., OSE, V., PUMPENS, P. (1994). Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell*, 77(6): 943-50.
- DAAR, A. S., FUGGLE, S. V., FABRE, J. W., TING, A., MORRIS, P. J. (1984a). The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transplantation*, 38(3): 287-92.
- DAAR, A. S., FUGGLE, S. V., FABRE, J. W., TING, A., MORRIS, P. J. (1984b). The detailed distribution of MHC Class II antigens in normal human organs. *Transplantation*, 38(3): 293-8.
- DAEMER, R. J., FEINSTONE, S. M., ALEXANDER, J. J., TULLY, J. G., LONDON, W. T., WONG, D. C., PURCELL, R. H. (1980). PLC/PRF/5 (Alexander) hepatoma cell line: further characterization and studies of infectivity. *Infect Immun*, 30(2): 607-11.
- DANDRI, M., LUTGEHETMANN, M., VOLZ, T., PETERSEN, J. (2006). Small animal model systems for studying hepatitis B virus replication and pathogenesis. *Semin Liver Dis*, 26(2): 181-91.
- DANE, D. S., CAMERON, C. H., BRIGGS, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, 1(7649): 695-8.
- DE MEYER, S., GONG, Z. J., SUWANDHI, W., VAN PELT, J., SOUMILLION, A., YAP, S. H. (1997). Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection: a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes. *J Viral Hepat*, 4(3): 145-53.
- DELVES, P. J., ROITT, I. M. (2000a). The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*, 343(1): 37-49.
- DELVES, P. J., ROITT, I. M. (2000b). The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*, 343(2): 108-17.
- DI, Q., SUMMERS, J., BURCH, J. B., MASON, W. S. (1997). Major differences between WHV and HBV in the regulation of transcription. *Virology*, 229(1): 25-35.
- DIAO, J., GARCES, R., RICHARDSON, C. D. (2001). X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 12(2-3): 189-205.
- ECHEVARRIA, J. M., AVELLON, A. (2006). Hepatitis B virus genetic diversity. *J Med Virol*, 78 Suppl 1: S36-42.
- ELAUT, G., HENKENS, T., PAPELEU, P., SNYKERS, S., VINKEN, M., VANHAECKE, T., ROGIERS, V. (2006). Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Curr Drug Metab*, 7(6): 629-60.
- ENOMOTO, K., NISHIKAWA, Y., OMORI, Y., TOKAIRIN, T., YOSHIDA, M., OHI, N., NISHIMURA, T., YAMAMOTO, Y., LI, Q. (2004). Cell biology and pathology of liver sinusoidal endothelial cells.

*Med Electron Microsc*, 37(4): 208-15.

FERIR, G., KAPTEIN, S., NEYTS, J., DE CLERCQ, E. (2008). Antiviral treatment of chronic hepatitis B virus infections: the past, the present and the future. *Rev Med Virol*, 18(1): 19-34.

FERRARI, C., PENNA, A., BERTOLETTI, A., VALLI, A., ANTONI, A. D., GIUBERTI, T., CAVALLI, A., PETIT, M. A., FIACCADORI, F. (1990). Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol*, 145(10): 3442-9.

FRANCO, A., BARNABA, V., NATALI, P., BALSANO, C., MUSCA, A., BALSANO, F. (1988). Expression of class I and class II major histocompatibility complex antigens on human hepatocytes. *Hepatology*, 8(3): 449-54.

FRANCO, A., GUIDOTTI, L. G., HOBBS, M. V., PASQUETTO, V., CHISARI, F. V. (1997). Pathogenetic effector function of CD4-positive T helper 1 cells in hepatitis B virus transgenic mice. *J Immunol*, 159(4): 2001-8.

FUNK, A., MHAMDI, M., WILL, H., SIRMA, H. (2007). Avian hepatitis B viruses: molecular and cellular biology, phylogenesis, and host tropism. *World J Gastroenterol*, 13(1): 91-103.

GALLE, P. R., HAGELSTEIN, J., KOMMERELL, B., VOLKMANN, M., SCHRANZ, P., ZENTGRAF, H. (1994). In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus. *Gastroenterology*, 106(3): 664-73.

GANEM, D. (1996). Hepadnaviridae and their replication. In: Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Chanock, R. M., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B., Strauss, S. E. (Ed.), *Fields Virology*: 2703-2737, Philadelphia: Lipincott-Raven Publishers.

GANEM, D., PRINCE, A. M. (2004). Hepatitis B virus infection - Natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*, 350(11): 1118-29.

GANEM, D., SCHNEIDER, R. J. (2001). The molecular biology of hepatitis B viruses. In: Knipe, D., Howley, P. (Ed.), *Fields Virology*: vol.2, New York: 4th ed.

GILLES, P. N., FEY, G., CHISARI, F. V. (1992). Tumor necrosis factor alpha negatively regulates hepatitis B virus gene expression in transgenic mice. *J Virol*, 66(6): 3955-60.

GLEBE, D., BERTING, A., BROEHL, S., NAUMANN, H., SCHUSTER, R., FIEDLER, N., TOLLE, T. K., NITSCHKE, S., SEIFER, M., GERLICH, W. H., SCHAEFER, S. (2001). Optimised conditions for the production of hepatitis B virus from cell culture. *Intervirology*, 44(6): 370-8.

GRIPON, P., DIOT, C., GUGUEN-GUILLOUZO, C. (1993). Reproducible high level infection of cultured adult human hepatocytes by hepatitis B virus: effect of polyethylene glycol on adsorption and penetration. *Virology*, 192(2): 534-40.

GRIPON, P., DIOT, C., THEZE, N., FOUREL, I., LOREAL, O., BRECHOT, C., GUGUEN-GUILLOUZO, C. (1988). Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Virol*, 62(11): 4136-43.

GUHA, C., MOHAN, S., ROY-CHOWDHURY, N., ROY-CHOWDHURY, J. (2004). Cell culture and animal models of viral hepatitis. Part I: hepatitis B. *Lab Anim (NY)*, 33(7): 37-46.



- GUIDOTTI, L. G., ANDO, K., HOBBS, M. V., ISHIKAWA, T., RUNKEL, L., SCHREIBER, R. D., CHISARI, F. V. (1994b). Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(9): 3764-8.
- GUIDOTTI, L. G., CHISARI, F. V. (1999). Cytokine-induced viral purging—role in viral pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 2(4): 388-91.
- GUIDOTTI, L. G., CHISARI, F. V. (2000). Cytokine-mediated control of viral infections. *Virology*, 273(2): 221-7.
- GUIDOTTI, L. G., CHISARI, F. V. (2001). Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol*, 19: 65-91.
- GUIDOTTI, L. G., GUILHOT, S., CHISARI, F. V. (1994a). Interleukin-2 and alpha/beta interferon down-regulate hepatitis B virus gene expression in vivo by tumor necrosis factor-dependent and -independent pathways. *J Virol*, 68(3): 1265-70.
- GUIDOTTI, L. G., ISHIKAWA, T., HOBBS, M. V., MATZKE, B., SCHREIBER, R., CHISARI, F. V. (1996). Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*, 4(1): 25-36.
- GUIDOTTI, L. G., MORRIS, A., MENDEZ, H., KOCH, R., SILVERMAN, R. H., WILLIAMS, B. R. G., CHISARI, F. V. (2002). Interferon-regulated pathways that control hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol*, 76(6): 2617-21.
- GUIDOTTI, L. G., ROCHFORD, R., CHUNG, J., SHAPIRO, M., PURCELL, R., CHISARI, F. V. (1999). Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science*, 284(5415): 825-9.
- GUILHOT, S., GUIDOTTI, L. G., CHISARI, F. V. (1993). Interleukin-2 downregulates hepatitis B virus gene expression in transgenic mice by a posttranscriptional mechanism. *J Virol*, 67(12): 7444-9.
- GUO, J. T., ZHOU, H., LIU, C., ALDRICH, C., SAPUTELLI, J., WHITAKER, T., BARRASA, M. I., MASON, W. S., SEEGER, C. (2000). Apoptosis and regeneration of hepatocytes during recovery from transient hepadnavirus infections. *J Virol*, 74(3): 1495-505.
- HATZAKIS, A., MAGIORKINIS, E., HAIDA, C. (2006). HBV virological assessment. *J Hepatol*, 44(1 Suppl): S71-6.
- HAYNES, L. M., MOORE, D. D., KURT-JONES, E. A., FINBERG, R. W., ANDERSON, L. J., TRIPP, R. A. (2001). Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol*, 75(22): 10730-7.
- HERBEIN, G., O'BRIEN, W. A. (2000). Tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors in viral pathogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med*, 223(3): 241-57.
- HERKEL, J., JAGEMANN, B., WIEGARD, C., LAZARO, J. F. G., LUETH, S., KANZLER, S., BLESSING, M., SCHMITT, E., LOHSE, A. W. (2003). MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes. *Hepatology*, 37(5): 1079-85.

- HOFSCHEIDER, P. H., ZASLAVSKY, V., DEINHARDT, F., FROSNER, G. G., ALEXANDER, J. J. (1979). Labeling of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) synthesized in a HBsAg-producing hepatoma cell line. *J Med Virol*, 4(3): 171-5.
- HOLLINGER, F. B. (1996). Hepatitis B virus. In: Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Chanock, R. M., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B., Strauss, S. E. (Ed.), *Fields Virology*: 2790-2806, Philadelphia: Lipincott-Raven Publishers.
- HOLLINGER, F. B., BELL, B., LEVY-BRUHL, D., SHOUVAL, D., WIERSMA, S., VAN DAMME, P. (2007). Hepatitis A and B vaccination and public health. *J Viral Hepat*, 14 Suppl 1: 1-5.
- HOLLINGER, F. B. (2007). Hepatitis B virus genetic diversity and its impact on diagnostic assays. *J Viral Hepat*, 14 Suppl 1: 11-5.
- HRUSKA, J. F., ROBINSON, W. S. (1977). The proteins of hepatitis B Dane particle cores. *J Med Virol*, 1(2): 119-31.
- HUANG, C., LIN, S., HO, Y., CHEN, F., YANG, C. (2006). The immune response induced by hepatitis B virus principal antigens. *Cell Mol Immunol*, 3(2): 97-106.
- HULTGREN, C., MILICH, D. R., WEILAND, O., SALLBERG, M. (1998). The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th) 1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. *J Gen Virol*, 79 ( Pt 10): 2381-91.
- HWANG, Y. K., KIM, N. K., PARK, J. M., LEE, K. Y., HAN, W. K., KIM, H. I., CHEONG, H. S. (2002). HLA-A2 1 restricted peptides from the HBx antigen induce specific CTL responses in vitro and in vivo. *Vaccine*, 20(31-32): 3770-7.
- INCHAUSPE, G., MICHEL, M. L. (2007). Vaccines and immunotherapies against hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Viral Hepat*, 14 Suppl 1: 97-103.
- INOUE, M., KAKUMU, S., YOSHIOKA, K., TSUTSUMI, Y., WAKITA, T., ARAO, M. (1989). Hepatitis B core antigen-specific IFN-gamma production of peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol*, 142(11): 4006-11.
- ISOGAWA, M., ROBEK, M. D., FURUICHI, Y., CHISARI, F. V. (2005). Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Virol*, 79(11): 7269-72.
- JARROSSON, L., KOLOPP-SARDA, M. N., AGUILAR, P., BENE, M. C., LEPORI, M. L., VIGNAUD, M. C., FAURE, G. C., KOHLER, C. (2004). Most humoral non-responders to hepatitis B vaccines develop HBV-specific cellular immune responses. *Vaccine*, 22(27-28): 3789-96.
- JIN, Y., SHIH, W. K., BERKOWER, I. (1988). Human T cell response to the surface antigen of hepatitis B virus (HBsAg). Endosomal and nonendosomal processing pathways are accessible to both endogenous and exogenous antigen. *J Exp Med*, 168(1): 293-306.
- JUNKER-NIEPMANN, M., BARTENSCHLAGER, R., SCHALLER, H. (1990). A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J*, 9(10): 3389-96.

- KAKIMI, K., GUIDOTTI, L. G., KOEZUKA, Y., CHISARI, F. V. (2000). Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med*, 192(7): 921-30.
- KAKUMU, S., ISHIKAWA, T., WAKITA, T., YOSHIOKA, K., TAKAYANAGI, M., TAHARA, H., KUSAKABE, A. (1994). Interferon-gamma production specific for hepatitis B virus antigen by intrahepatic T lymphocytes in patients with acute and chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol*, 89(1): 92-6.
- KANN, M., GERLICH, W. (1998). Hepadnaviridae: structure and molecular virology. In: Zuckerman, A., Thomas, H. (Ed.), *Viral hepatitis*: 77-105, London: Churchill Livingstone.
- KATSURA, N., IKAI, I., MITAKA, T., SHIOTANI, T., YAMANOKUCHI, S., SUGIMOTO, S., KANAZAWA, A., TERAJIMA, H., MOCHIZUKI, Y., YAMAOKA, Y. (2002). Long-term culture of primary human hepatocytes with preservation of proliferative capacity and differentiated functions. *J Surg Res*, 106(1): 115-23.
- KAWAI, T., AKIRA, S. (2007). TLR signaling. *Semin Immunol*, 19(1): 24-32.
- KIMURA, K., KAKIMI, K., WIELAND, S., GUIDOTTI, L. G., CHISARI, F. V. (2002a). Activated intrahepatic antigen-presenting cells inhibit hepatitis B virus replication in the liver of transgenic mice. *J Immunol*, 169(9): 5188-95.
- KIMURA, K., KAKIMI, K., WIELAND, S., GUIDOTTI, L. G., CHISARI, F. V. (2002b). Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Virol*, 76(21): 10702-7.
- KNOLLE, P. A., GERKEN, G. (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev*, 174: 21-34.
- KNOLLE, P. A., LIMMER, A. (2003). Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells. *Swiss Med Wkly*, 133(37-38): 501-6.
- KOCK, J., NASSAL, M., MACNELLY, S., BAUMERT, T. F., BLUM, H. E., VON WEIZSACKER, F. (2001). Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. *J Virol*, 75(11): 5084-9.
- KRAMVIS, A., KEW, M. C. (1999). The core promoter of hepatitis B virus. *J Viral Hepat*, 6(6): 415-27.
- KRUGMAN, S., GILES, J. P., HAMMOND, J. (1971). Viral hepatitis, type B (MS-2 strain) prevention with specific hepatitis B immune serum globulin. *JAMA*, 218(11): 1665-70.
- KRUGMAN, S. (1975). Viral hepatitis type B: prospects for active immunization. *Dev Biol Stand*, 30: 363-7.
- KURT-JONES, E. A., POPOVA, L., KWINN, L., HAYNES, L. M., JONES, L. P., TRIPP, R. A., WALSH, E. E., FREEMAN, M. W., GOLENBOCK, D. T., ANDERSON, L. J., FINBERG, R. W. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol*, 1(5): 398-401.
- LANDER, J. J., GILES, J. P., PURCELL, R. H., KRUGMAN, S. (1971). Viral hepatitis, type B (MS-2 strain). Detection of antibody after primary infection. *N Engl J Med*, 285(6): 303-7.
- LANDERS, T. A., GREENBERG, H. B., ROBINSON, W. S. (1977). Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *J Virol*, 23(2): 368-76.

- LARSEN, C. E., XU, J., LEE, S., DUBEY, D. P., UKO, G., YUNIS, E. J., ALPER, C. A. (2000). Complex cytokine responses to hepatitis B surface antigen and tetanus toxoid in responders, non-responders and subjects naive to hepatitis B surface antigen. *Vaccine*, 18(26): 3021-30.
- LAVINE, J. E., GANEM, D. (1993). Inhibition of duck hepatitis B virus replication by interferon-gamma. *J Med Virol*, 40(1): 59-64.
- LEE, C., GONG, Y., BROK, J., BOXALL, E. H., GLUUD, C. (2006). Effect of hepatitis B immunisation in newborn infants of mothers positive for hepatitis B surface antigen: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 332(7537): 328-36.
- LEE, M., CHOI, Y., SHIN, E., KANG, H., KIM, Y., JEONG, S., SEONG, J. K., YU, D., CHO, H., PARK, J. H., KIM, S. J. (2002). Hepatitis B virus X protein induced expression of interleukin 18 (IL-18): a potential mechanism for liver injury caused by hepatitis B virus (HBV) infection. *J Hepatol*, 37(3): 380-6.
- LIU, M., YU, M., ZHANG, N., GONG, W., WANG, Y., PIAO, W., WANG, Q., WANG, G. (2004). Dynamic analysis of hepatitis B virus DNA and its antigens in 2.2.15 cells. *J Viral Hepat*, 11(2): 124-9.
- LOBO-YEO, A., SENALDI, G., PORTMANN, B., MOWAT, A. P., MIELI-VERGANI, G., VERGANI, D. (1990). Class I and class II major histocompatibility complex antigen expression on hepatocytes: a study in children with liver disease. *Hepatology*, 12(2): 224-32.
- LOTT, L., BEAMES, B., NOTVALL, L., LANFORD, R. E. (2000). Interaction between hepatitis B virus core protein and reverse transcriptase. *J Virol*, 74(24): 11479-89.
- LU, X., BLOCK, T. (2004). Study of the early steps of the Hepatitis B Virus life cycle. *Int J Med Sci*, 1(1): 21-33.
- LUERMAN, A. (1885). Eine icterus epidemic. *Berlin Klin Wochenschr*, 22: 20-23.
- MACCALLUM, F. O., MCFARLAN, A. M., MILES, J. A. R., POLLOCK, M. R., WILSON, C. (1951). Infective hepatitis; studies in East Anglia during the period 1943-47. *Spec Rep Ser Med Res Counc (G B)*, 273: 1-144.
- MACCALLUM, F. O. (1953). Hepatitis. *Br Med Bull*, 9(3): 221-5.
- MAGNER, W. J., KAZIM, A. L., STEWART, C., ROMANO, M. A., CATALANO, G., GRANDE, C., KEISER, N., SANTANIELLO, F., TOMASI, T. B. (2000). Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors. *J Immunol*, 165(12): 7017-24.
- MANCINI, M., HADCHOUEL, M., TIOLLAIS, P., MICHEL, M. L. (1998). Regulation of hepatitis B virus mRNA expression in a hepatitis B surface antigen transgenic mouse model by IFN-gamma-secreting T cells after DNA-based immunization. *J Immunol*, 161(10): 5564-70.
- MANIGOLD, T., RACANELLI, V. (2007). T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *Lancet Infect Dis*, 7(12): 804-13.
- MASON, W. S., SEAL, G., SUMMERS, J. (1980). Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol*, 36(3): 829-36.

- McALEER, W. J., BUYNACK, E. B., MAIGETTER, R. Z., WAMPLER, D. E., MILLER, W. J., HILLEMANN, M. R. (1984). Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature*, 307(5947): 178-80.
- McCLARY, H., KOCH, R., CHISARI, F. V., GUIDOTTI, L. G. (2000). Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines. *J Virol*, 74(5): 2255-64.
- MENNE, S., COTE, P. J. (2007). The woodchuck as an animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, 13(1): 104-24.
- MILICH, D. R., SCHODEL, F., HUGHES, J. L., JONES, J. E., PETERSON, D. L. (1997). The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. *J Virol*, 71(3): 2192-201.
- MITRY, R. R., HUGHES, R. D., DHAWAN, A. (2002). Progress in human hepatocytes: isolation, culture cryopreservation. *Semin Cell Dev Biol*, 13(6): 463-7.
- MIYAZAKI, K., TAKAKI, R., NAKAYAMA, F., YAMAUCHI, S., KOGA, A., TODO, S. (1981). Isolation and primary culture of adult human hepatocytes. Ultrastructural and functional studies. *Cell Tissue Res*, 218(1): 13-21.
- MIZUKOSHI, E., SIDNEY, J., LIVINGSTON, B., GHANY, M., HOOFNAGLE, J. H., SETTE, A., REHERMANN, B. (2004). Cellular immune responses to the hepatitis B virus polymerase. *J Immunol*, 173(9): 5863-71.
- MODROW, S., FALKE, D., TRUYEN, U. (2003). *Molekulare Virologie*, 2. Auflage, Heidelberg - Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- MOOLLA, N., KEW, M., ARBUTHNOT, P. (2002). Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. *J Viral Hepat*, 9(5): 323-31.
- MUCHMORE, E. A. (2001). Chimpanzee models for human disease and immunobiology. *Immunol Rev*, 183: 86-93.
- MURAKAMI, S. (2001). Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol*, 36(10): 651-60.
- NAITO, M., HASEGAWA, G., EBE, Y., YAMAMOTO, T. (2004). Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc*, 37(1): 16-28.
- NASSAL, M. (2008). Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res*, 134(1-2): 235-49.
- NAYERSINA, R., FOWLER, P., GUILHOT, S., MISSALE, G., CERNY, A., SCHLICHT, H. J., VITIELLO, A., CHESNUT, R., PERSON, J. L., REDEKER, A. G., CHISARI, F. V. (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.
- NORDER, H., COUROUCE, A., COURSAGET, P., ECHEVARRIA, J. M., LEE, S., MUSHAHWAR, I. K., ROBERTSON, B. H., LOCARNINI, S., MAGNIUS, L. O. (2004). Genetic diversity of hepatitis

B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*, 47(6): 289-309.

NTHU (NATIONAL TSING HUA UNIVERSITY) (2004). <http://life.nthu.edu.tw/~b831626/HTML1.html> (09.10.2008).

OKOCHI, K., MURAKAMI, S. (1993). Observations on Australia antigen in Japanese. *Vox Sang*, 65(1): 75.

OU, J. H. (1997). Molecular biology of hepatitis B virus e antigen. *J Gastroenterol Hepatol*, 12(9-10): S178-87.

PARVEZ, M., SEHGAL, D., SARIN, S., BASIR, S., JAMEEL, S. (2006). Inhibition of hepatitis B virus DNA replicative intermediate forms by recombinant interferon-gamma. *World J Gastroenterol*, 12(19): 3006-14.

PASQUETTO, V., WIELAND, S. F., UPRICHARD, S. L., TRIPODI, M., CHISARI, F. V. (2002). Cytokine-sensitive replication of hepatitis B virus in immortalized mouse hepatocyte cultures. *J Virol*, 76(11): 5646-53.

PENNA, A., CHISARI, F. V., BERTOLETTI, A., MISSALE, G., FOWLER, P., GIUBERTI, T., FIACCADORI, F., FERRARI, C. (1991). Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Exp Med*, 174(6): 1565-70.

PENNA, A., FOWLER, P., BERTOLETTI, A., GUILHOT, S., MOSS, B., MARGOLSKEE, R. F., CAVALLI, A., VALLI, A., FIACCADORI, F., CHISARI, F. V. (1992). Hepatitis B virus (HBV)-specific cytotoxic T-cell (CTL) response in humans: characterization of HLA class II-restricted CTLs that recognize endogenously synthesized HBV envelope antigens. *J Virol*, 66(2): 1193-8.

PERZ, J. F., ARMSTRONG, G. L., FARRINGTON, L. A., HUTIN, Y. J. F., BELL, B. P. (2006). The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*, 45(4): 529-38.

POLLACK, J. R., GANEM, D. (1994). Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis. *J Virol*, 68(9): 5579-87.

PRINCE, A. M., BROTMAN, B. (2001). Perspectives on hepatitis B studies with chimpanzees. *ILAR J*, 42(2): 85-8.

PRINCE, A. M. (1968a). An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 60(3): 814-21.

PRINCE, A. M. (1968b). Relation of Australia and SH antigens. *Lancet*, 2(7565): 462-3.

PROTZER, U., SCHALLER, H. (2000). Immune escape by hepatitis B viruses. *Virus Genes*, 21(1-2): 27-37.

RAGAZZINI, F., VIERUCCI, A. (1970). Antigene Australia ed epatite virale. *Folia Allergol (Roma)*, 17(1): 1-9.

- RANDALL, R. E., GOODBOURN, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol*, 89(Pt 1): 1-47.
- REHERMANN, B., NASCIMBENI, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*, 5(3): 215-29.
- REHERMANN, B. (2007). Chronic infections with hepatotropic viruses: mechanisms of impairment of cellular immune responses. *Semin Liver Dis*, 27(2): 152-60.
- REN, F., HINO, K., YAMAGUCHI, Y., FUNATSUKI, K., HAYASHI, A., ISHIKO, H., FURUTANI, M., YAMASAKI, T., KORENAGA, K., YAMASHITA, S., KONISHI, T., OKITA, K. (2003). Cytokine-dependent anti-viral role of CD4-positive T cells in therapeutic vaccination against chronic hepatitis B viral infection. *J Med Virol*, 71(3): 376-84.
- RICO, M. A., QUIROGA, J. A., SUBIRA, D., CASTANON, S., ESTEBAN, J. M., PARDO, M., CARRENO, V. (2001). Hepatitis B virus-specific T-cell proliferation and cytokine secretion in chronic hepatitis B e antibody-positive patients treated with ribavirin and interferon alpha. *Hepatology*, 33(1): 295-300.
- RIJNTJES, P. J., MOSHAGE, H. J., YAP, S. H. (1988). In vitro infection of primary cultures of cryopreserved adult human hepatocytes with hepatitis B virus. *Virus Res*, 10(1): 95-109.
- RIORDAN, S. M., SKINNER, N., KURTOVIC, J., LOCARNINI, S., VISVANATHAN, K. (2006). Reduced expression of toll-like receptor 2 on peripheral monocytes in patients with chronic hepatitis B. *Clin Vaccine Immunol*, 13(8): 972-4.
- ROBERT KOCH-INSTITUT (2006). Zur Situation wichtiger Infektionskrankheiten in Deutschland: Virushepatitis B, C und D im Jahr 2005. *Epidem Bull*, 46.
- RYAN, C. M., CARTER, E. A., JENKINS, R. L., STERLING, L. M., YARMUSH, M. L., MALT, R. A., TOMPKINS, R. G. (1993). Isolation and long-term culture of human hepatocytes. *Surgery*, 113(1): 48-54.
- SAKAGUCHI, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*, 6(4): 345-52.
- SCHROEDER, A. J., BLAHETA, R. A., SCHOLZ, M., ENCKE, A., MARKUS, B. H. (1994). Isolation und Separation humaner adulter Hepatozyten aus Leberresektaten: Zellausbeute und Reinheit bei Anwendung verschiedener Methoden. *Zentralbl Chir*, 119(2): 127-38.
- SCHULTZ, U., CHISARI, F. V. (1999). Recombinant duck interferon gamma inhibits duck hepatitis B virus replication in primary hepatocytes. *J Virol*, 73(4): 3162-8.
- SCHULTZ, U., GRGACIC, E., NASSAL, M. (2004). Duck hepatitis B virus: an invaluable model system for HBV infection. *Adv Virus Res*, 63: 1-70.
- SCHULZE-BERGMANN, H., UNTERGASSER, A., DAX, A., VOGEL, H., BUCHLER, P., KLAR, E., LEHNERT, T., FRIESS, H., BUCHLER, M. W., KIRSCHFINK, M., STREMMEL, W., KRAMMER, P. H., MULLER, M., PROTZER, U. (2003). Primary human hepatocytes—a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 38(6): 736-44.

- SELLS, M. A., CHEN, M. L., ACS, G. (1987). Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(4): 1005-9.
- SELLS, M. A., ZELENT, A. Z., SHVARTSMAN, M., ACS, G. (1988). Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. *J Virol*, 62(8): 2836-44.
- SERVOSS, J. C., FRIEDMAN, L. S. (2004). Serologic and molecular diagnosis of hepatitis B virus. *Clin Liver Dis*, 8(2): 267-81.
- SPRENGEL, R., KUHN, C., WILL, H., SCHALLER, H. (1985). Comparative sequence analysis of duck and human hepatitis B virus genomes. *J Med Virol*, 15(4): 323-33.
- STEIMLE, V., SIEGRIST, C. A., MOTTET, A., LISOWSKA-GROSPIERRE, B., MACH, B. (1994). Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science*, 265(5168): 106-9.
- SU, F., SCHNEIDER, R. J. (1997). Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(16): 8744-9.
- SUMMERS, J., SMOLEC, J. M., SNYDER, R. (1978). A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(9): 4533-7.
- SUN, D., NASSAL, M. (2006). Stable HepG2- and Huh7-based human hepatoma cell lines for efficient regulated expression of infectious hepatitis B virus. *J Hepatol*, 45(5): 636-45.
- SURI, D., SCHILLING, R., LOPES, A. R., MULLEROVA, I., COLUCCI, G., WILLIAMS, R., NAUMOV, N. V. (2001). Non-cytolytic inhibition of hepatitis B virus replication in human hepatocytes. *J Hepatol*, 35(6): 790-7.
- SZABO, E., PASKA, C., KAPOSI NOVAK, P., SCHAFF, Z., KISS, A. (2004). Similarities and differences in hepatitis B and C virus induced hepatocarcinogenesis. *Pathol Oncol Res*, 10(1): 5-11.
- SZMUNESS, W., STEVENS, C. E., HARLEY, E. J., ZANG, E. A., OLESZKO, W. R., WILLIAM, D. C., SADOVSKY, R., MORRISON, J. M., KELLNER, A. (1980). Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States. *N Engl J Med*, 303(15): 833-41.
- TANG, H., OISHI, N., KANEKO, S., MURAKAMI, S. (2006). Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Sci*, 97(10): 977-83.
- TAUSCH, U. (2005). *Etablierung eines Modellsystems zur Infektion primärer humaner Hepatozyten mit dem Hepatitis B-Virus*. Regensburg.
- THIMME, R., WIELAND, S., STEIGER, C., GHRAYEB, J., REIMANN, K. A., PURCELL, R. H., CHISARI, F. V. (2003). CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol*, 77(1): 68-76.
- THURSZ, M. (2001). Genetic susceptibility in chronic viral hepatitis. *Antiviral Res*, 52(2): 113-6.
- TIOLLAIS, P., POURCEL, C., DEJEAN, A. (1985). The hepatitis B virus. *Nature*, 317(6037): 489-95.
- VALENZUELA, P., MEDINA, A., RUTTER, W. J., AMMERER, G., HALL, B. D. (1982). Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*, 298(5872): 347-50.



- VALITUTTI, S., MULLER, S., DESSING, M., LANZAVECCHIA, A. (1996). Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J Exp Med*, 183(4): 1917-21.
- VALSAMAKIS, A. (2007). Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Clin Microbiol Rev*, 20(3): 426-39, table of contents.
- VAN DEN OORD, J. J., DE VOS, R., DESMET, V. J. (1986). In situ distribution of major histocompatibility complex products and viral antigens in chronic hepatitis B virus infection: evidence that HBc-containing hepatocytes may express HLA-DR antigens. *Hepatology*, 6(5): 981-9.
- VIERLING, J. M. (2007). The immunology of hepatitis B. *Clin Liver Dis*, 11(4): 727-59, vii-viii.
- VINGERHOETS, J., VANHAM, G., KESTENS, L., PENNE, G., LEROUX-ROELS, G., GIGASE, P. (1994). Deficient T-cell responses in non-responders to hepatitis B vaccination: absence of TH1 cytokine production. *Immunol Lett*, 39(2): 163-8.
- WALEWSKA-ZIELECKA, B., MADALINSKI, K., JABLONSKA, J., GODZIK, P., CIELECKA-KUSZYK, J., LITWINSKA, B. (2008). Composition of inflammatory infiltrate and its correlation with HBV/HCV antigen expression. *World J Gastroenterol*, 14(25): 4040-6.
- WALTER, E., KEIST, R., NIEDEROST, B., PULT, I., BLUM, H. E. (1996). Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology*, 24(1): 1-5.
- WALTER, J., RADUN, D., CLAUS, H., HAMOUDA, O., STARK, K. (2005). Risikofaktoren der Hepatitis B und C in Deutschland—Ergebnisse der bundesweiten Surveillance. *Gesundheitswesen*, 67(7): 441-7.
- WATERS, J. A., O'ROURKE, S. M., RICHARDSON, S. C., PAPAEVANGELOU, G., THOMAS, H. C. (1987). Qualitative analysis of the humoral immune response to the 'a' determinant of HBs antigen after inoculation with plasma-derived or recombinant vaccine. *J Med Virol*, 21(2): 155-60.
- WEIHRAUCH, M., VON BERGWELT-BAILDON, M., KANDIC, M., WESKOTT, M., KLAMP, W., ROSLER, J., SCHULTZE, J. (2008). T cell responses to hepatitis B surface antigen are detectable in non-vaccinated individuals. *World J Gastroenterol*, 14(16): 2529-33.
- WEINBERGER, K. M., WIEDENMANN, E., BOHM, S., JILG, W. (2000). Sensitive and accurate quantitation of hepatitis B virus DNA using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR). *J Virol Methods*, 85(1-2): 75-82.
- WEISS, L., KEKULE, A. S., JAKUBOWSKI, U., BURGELT, E., HOFSCHEIDER, P. H. (1996). The HBV-producing cell line HepG2-4A5: a new in vitro system for studying the regulation of HBV replication and for screening anti-hepatitis B virus drugs. *Virology*, 216(1): 214-8.
- WIELAND, S. F., CHISARI, F. V. (2005). Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Virol*, 79(15): 9369-80.
- WIELAND, S. F., EUSTAQUIO, A., WHITTEN-BAUER, C., BOYD, B., CHISARI, F. V. (2005). Interferon prevents formation of replication-competent hepatitis B virus RNA-containing nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(28): 9913-7.

WIELAND, S. F., GUIDOTTI, L. G., CHISARI, F. V. (2000). Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol*, 74(9): 4165-73.

WU, J., LU, M., MENG, Z., TRIPPLER, M., BROERING, R., SZCZEPONEK, A., KRUX, F., DITTMER, U., ROGGENDORF, M., GERKEN, G., SCHLAAK, J. F. (2007). Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice. *Hepatology*, 46(6): 1769-78.

XU, D., FU, J., JIN, L., ZHANG, H., ZHOU, C., ZOU, Z., ZHAO, J., ZHANG, B., SHI, M., DING, X., TANG, Z., FU, Y., WANG, F. (2006). Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol*, 177(1): 739-47.

YANG, G., LIU, A., XIE, Q., GUO, T. B., WAN, B., ZHOU, B., ZHANG, J. Z. (2007). Association of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells with chronic activity and viral clearance in patients with hepatitis B. *Int Immunol*, 19(2): 133-40.

ZUCKERMAN, A. J. (2000). Effect of hepatitis B virus mutants on efficacy of vaccination. *Lancet*, 355(9213): 1382-4.

ZUCKERMAN, J. N. (2007). Review: hepatitis B immune globulin for prevention of hepatitis B infection. *J Med Virol*, 79(7): 919-21.

# Publikationen

## Vortrag

Roehrl E., Bauer T., Boehm S., Weiss T. S., Schlitt H. J., Jilg W.: Impact of vaccine-induced HBsAg-specific CD4<sup>+</sup>-T-cells on Hepatitis B-virus infection, GfV Jahrestagung, München 2006

## Poster

Roehrl E., Bauer T., Weiss T. S., Schlitt H. J., Jilg W.: HBV-infected human hepatocytes as a model to study antiviral effects of immune effector cells, 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Washington 2009

Roehrl E., Bauer T., Weiss T. S., Schlitt H. J., Jilg W.: In vitro HBV-infection of primary human hepatocytes: antiviral effect of HBsAg-specific immune effector cells, GfV Jahrestagung, Heidelberg 2008

Roehrl E., Messner A., Bauer T., Weiss T., Schlitt H., Jilg W.: Production of viral RNA-transcripts and viral proteins after hepatitis B virus (HBV) infection of primary human hepatocytes, 3rd European Congress of Virology, Nürnberg 2007

Roehrl E., Bauer T., Weiss T. S., Schlitt H. J., Jilg W.: Use of an in vitro infection model for HBV to study the antiviral effect of immune effector cells, International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Rom 2007

Roehrl E., Bauer T., Boehm S., Weiss T. S., Schlitt H. J., Jilg W.: Impact of vaccine-induced HBsAg-specific CD4<sup>+</sup>-T-cells on in vitro hepatitis B-virus infection of primary human hepatocytes, 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Paris 2006

## Posterbeiträge

Boehm S., Roehrl E., Tausch U., Schlitt H. J., Weiss T., Jilg W.: The neutralising activity of polyclonal antibodies against hepatitis B surface antigen is significantly reduced by interactions with subviral particles, GfV Jahrestagung, Hannover 2005

Boehm S., Tausch U., Roehrl E., Thasler W. E., Schlitt H. J., Weiss T., Jilg W.: In vitro replication of a lamivudine-resistant hepatitis B virus isolate with mutations within the core-promoter region, 3rd European Conference on Viral Diseases (ConVir), Regensburg 2004

Boehm S., Tausch U., Roehrl E., Thasler W. E., Schlitt H. J., Weiss T. Jilg W.: In vitro replication and phenotypic reversion of HBeAg-negative hepatitis B virus variants after infection of primary human hepatocytes, GfV Jahrestagung, Tübingen 2004

Boehm S., Tausch U., Roehrl E., Thasler W. E., Weiss T. Jilg W.: Primary human hepatocyte cultures as a tool for determination of neutralizing activity of antibodies against different hepatitis B virus isolates, Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL), Freiburg 2004

Boehm S., Tausch U., Roehrl E., Thasler W. E., Schlitt H. J., Weiss T. Jilg W.: High in vitro replicative activity of lamivudine-resistant hepatitis B virus isolate after infection of primary human hepatocytes, International HBV Meeting, The Molecular Biology of Hepatitis B Virus, Bergamo 2003

Tausch U., Bauer T., Boehm S., Roehrl E., Thasler W. E., Schlitt H. J., Weiss T. Jilg W.: Cytokine-mediated non-cytolytic inhibition of in vitro hepatitis B virus infection of primary human hepatocytes, International HBV Meeting, The Molecular Biology of Hepatitis B Virus, Bergamo 2003