

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG
Professor Dr. Dr. André Gessner
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Der Einfluss von Zytokinen, Anti-HBs-spezifischen T-Zellen
und Anti-HBs auf Hepatitis B produzierende Zellen:
Beobachtungen an einem Zellkultursystem als Model der chronischen Hepatitis B**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefan Keilhammer

2016

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG
Professor Dr Dr. André Gessner
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Der Einfluss von Zytokinen, Anti-HBs-spezifischen T-Zellen
und Anti-HBs auf Hepatitis B produzierende Zellen:
Beobachtungen an einem Zellkultursystem als Model der chronischen Hepatitis B**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefan Keilhammer

2016

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang Jilg
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernd Salzberger
Tag der mündlichen Prüfung:	02.02.2016

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1. Einleitung	1
1.1 <u>Historisches</u>	1
1.2 <u>Das Hepatitis-B-Virus</u>	2
1.2.1 Taxonomie	2
1.2.2 Molekularbiologische Aspekte	3
1.3 <u>Hepatitis B in der Klinik</u>	6
1.3.1 Epidemiologie	6
1.3.2 Klinik	8
1.3.3 Diagnostik	12
1.3.4 Therapie	14
1.3.5 Immunprophylaxe	15
1.4 <u>Ziel der Arbeit</u>	17
2. Material	21
2.1 <u>Geräte</u>	21
2.2 <u>Verbrauchsmaterialien</u>	21
2.3 <u>Chemikalien, Medien, Reagenzien</u>	22
2.4 <u>Kits</u>	23
2.5 <u>Enzyme</u>	23
2.6 <u>Oligonukleotide</u>	24
2.7 <u>Plasmide</u>	24
2.8 <u>Antikörper</u>	24
2.9 <u>Zelllinien</u>	24
2.10 <u>Software und Internet</u>	25
3. Methoden	26
3.1 <u>Zellkultur</u>	26
3.1.1 Zelllinien	26
3.1.2 Zellkulturbedingungen	26
3.1.3 Kryokonservierung und Inkulturnahme	26
3.1.4 Handhabung der Zellkultur	27

3.2	<u>Bestimmung von HBsAg, HBeAg und HBV-DNA</u>	28
3.2.1	HBsAg-Bestimmung	28
3.2.2	HBeAg-Bestimmung	28
3.2.3	HBV-DNA-Bestimmung	29
3.2.3.1	Nukleinsäureisolation	29
3.2.3.2	Prinzip der Real-time PCR	29
3.2.3.3	Durchführung der Real-time PCR in der Praxis	31
3.3	<u>Inhibitionsversuche mit IFN γ und TNF α</u>	33
3.3.1	HBsAg-, HBeAg- und HBV-DNA-Produktion	33
3.3.2	Vorbereitung der Zytokine	33
3.3.3	Aussaat der Zellen in 6-Well-Platten	34
3.3.4	Bestimmung der Lebendzellzahl	34
3.3.5	Einfluss von Zytokinen auf die HBV-Produktion	34
3.3.5.1	Ausgangsbedingungen	35
3.3.5.2	Modifizierte Versuchsbedingungen	35
3.4	<u>Einfluss HBV-un/geimpfter Spender-PBMC auf die Zellkultur</u>	35
3.5	<u>Humanes IgG, poly- und monoklonales Anti-HBs und Zellkultur</u>	36
3.5.1	Überblick über verwendete Reagenzien	36
3.5.1.1	Humanes IgG	36
3.5.1.2	Polyklonales Anti-HBs	36
3.5.1.3	Monoklonales Anti-HBs	36
3.5.2	Versuchsdurchführung	37
4.	Ergebnisse	38
4.1	<u>Charakterisierung der verwendeten Hepatomzellen</u>	38
4.2	<u>Einfluss HBsAg-spezifischer T-Zellen auf Virusreplikation und Virusproteinsynthese der Hepatomzellen Hep G 2.2.15</u>	41
4.2.1	Einfluss von Zytokinen auf Virusreplikation und Proteinsynthese	41
4.2.2	Kokultivierung von T-Zellen Geimpfter und Hep G 2.2.15-Zellen: Beeinflussung von Virusreplikation und Proteinsynthese	51
4.3	<u>Einfluss von Anti-HBs auf Virusreplikation und Proteinsynthese</u>	54
5.	Diskussion	56
5.1	<u>Sekretion der HBV-Komponenten</u>	56
5.2	<u>Inhibitionsversuche mit TNF α und INF γ</u>	57

5.3 <u>Einfluss von Spender-PBMC auf die Hep G 2.2.15 – Zellkultur</u>	59
5.4 <u>Einfluss von Immunglobulinen auf die Hep G 2.2.15 – Zellen</u>	60
5.5 <u>Fazit</u>	61
6. Zusammenfassung	62
7. Literaturverzeichnis	64
Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
Ak	Antikörper
Anti-HBc	Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-Kapsid-Antigen
Anti-HBe	Antikörper gegen das frühe, lösliche Hepatitis B-Virus-Antigen
Anti-HBs	Antikörper gegen das Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigen
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Elispot	<i>enzyme-linked immunospot-assay</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FRET	<i>Fluoreszenz Resonance Energy Transfer</i>
g	Erdbeschleunigung
HB	Hepatitis B
HBcAg	Hepatitis B-Virus-Kapsid-Antigen (<i>hepatitis B core antigen</i>)
HBIG	Hepatitis B-Immunglobulin
HBeAg	frühes, lösliches Hepatitis B-Virus-Antigen (<i>hepatitis B virus early antigen</i>)
HBsAg	Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigen (<i>hepatitis B surface antigen</i>)
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom (<i>hepatocellular carcinoma</i>)
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IU	internationale Einheiten (<i>international units</i>)
NBT/BCIP	4-Nitro-blau-tetrazoliumchlorid/5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphat
nm	Nanometer
MACS	<i>Magnetic Cell Separation</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
µl	Mikroliter
NaN ₃	Natriumazid
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
rh	<i>recombinant human</i>
rpm	Umdrehungen in der Minuten (<i>rounds per minute</i>)
S/CO	<i>Sample/Cut-Off Wert</i>
SVP	subvirale Partikel
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TNF	Tumornekrosefaktor

Der Einfluss von Zytokinen, Anti-HBs-spezifischen T-Zellen und Anti-HBs auf Hepatitis B produzierende Zellen: Beobachtungen an einem Zellkultursystem als Model der chronischen Hepatitis B

Einleitung

1.1. Historisches

„Denn der König von Babel steht an der Wegscheide, an der Gabelung der zwei Wege, und lässt das Orakel entscheiden: er schüttelt die Pfeile, befragt die Götterbilder und hält Leberschau.“

(Die ganze Heilige Schrift des Alten und Neuen Testamentes 1975, S. 961)

Doch auch schon in vorbiblischen Zeiten erfolgte eine ausgiebige Beschäftigung mit der Leber. Nicht nur medizinisches Interesse weckte sie dabei, sondern, wie man an obigem Bibelzitat ablesen kann, spielte die Leber auch im religiös-mystischen Bereich eine wichtige Rolle. Bereits die Priester und Seher der Babylonier und Assyrer bedienten sich zum Vorhersagen der Zukunft der Leberschau, die sich von Mesopotamien aus weiter nach Griechenland bis ins Römische Reich verbreitete und zum Teil auch politische Entscheidungen beeinflusste. Zudem wurde die Leber bei verschiedenen Völkern als Sitz der Emotionen, sogar der Seele, angesehen, die, so Platon, das Gegenstück zum „rationalen Kopf“ darstellen würde. Selbst die erstaunliche Regenerationsfähigkeit dieses Organes muss, wie man aus der griechischen Sage um Prometheus herleiten kann, bereits bekannt gewesen sein. Erst mit Hippokrates und seiner Vier-Säfte-Lehre um 500 vor Christus war die Beschäftigung mit der Medizin eine eher naturwissenschaftlich als religiös geprägte Angelegenheit, was durch Galen, einem bedeutenden griechischen Arzt, fortgeführt wurde. Auch die Gelbsucht war bereits früh bekannt: so empfahl Celsus, ein römischer Mediziner (ca. 30 v. Chr.), zur Genesung Betruhe und eine strenge diätetische Behandlung. Die konnten sich aber nur die Wohlhabenden leisten, weshalb er diese Erkrankung auch „morbus regius“ nannte (Nikolaus Mani 1959; Kuntz und Kuntz 2008). Im 16. Jahrhundert beschäftigte sich Theophrastus von Hohenheim, besser bekannt als Paracelsus, mit dieser Lebererkrankung und verfasste ein „Buch über die Gelbsuchten“ (Paracelsus und

Aschner 1993). Lürmann beschrieb 1885 „Eine Ikterusepidemie“ von Werftarbeitern in Bremen, nachdem diese einen mit menschlicher Lymphe versehenen Pockenimpfstoff erhalten hatten und er erkannte die infektiöse Natur dieser Erkrankung (Lürmann A. 1885). Nach heutigem Kenntnisstand handelte es sich dabei wohl um einen Ausbruch der Hepatitis B. Später erfolgte, basierend auf Beobachtungen, die Unterteilung der Hepatitis in eine endemische Hepatitis und eine Serumhepatitis. Erstere wurde dabei von MacCallum als Hepatitis A bezeichnet, zweitere als Hepatitis B (Anonymous Serum Hepatitis 1947). Krugman lieferte durch Untersuchungen letztlich den Beweis dafür, dass die serologische Hepatitis durch einen anderen Erreger verursacht wird als die endemische Erkrankung (Krugman et al. 1967). Es ging einen großen Schritt vorwärts in der Erforschung des HB-Virus, als es Blumberg et al. gelang, ein bis dato unbekanntes 20 nm großes Antigen bei Leukämie-Patienten und australischen Ureinwohnern, deshalb auch Australia-Antigen genannt, zu beschreiben. Dieses konnte, nachdem ursprünglich angenommen wurde es handle sich um das HB-Virion, als HBsAg-Oberflächenprotein charakterisiert werden (Blumberg und Alter 1965; Blumberg et al. 1967). Das Virion selbst wurde aber nur kurze Zeit darauf mit Hilfe des Elektronenmikroskops entdeckt (Dane et al. 1970).

1.2. Das Hepatitis B-Virus

1.2.1. Taxonomie

Das Hepatitis-B-Virus stellt den Mustertyp der Virenfamilie der Hepadnaviridae dar (Gust et al. 1986). Der Name „Hepadnaviridae“ setzt sich aus den Begriffen „hepar“, lateinisch für Leber, und DNA, also „desoxyribonucleicacid“, was dem Genom entspricht, zusammen. Diese Familie wird in 2 Gattungen unterteilt: zum einen in die Familie des Orthohepadnavirus mit dem menschlichen Hepatitis B-Virus als Vertreter und zum anderen in die Gattung des Avihepadnavirus (Schaefer 2007). Das humane HB-Virus lässt sich noch weiter unterteilen, nämlich in Genotypen und Subgenotypen. Es sind 8 Genotypen (Okamoto et al. 1988; Norder et al. 1994; Arauz-Ruiz et al. 2002; Stuyver et al. 2000), jeweils bezeichnet mit einem der ersten acht Buchstaben des Alphabetes (also von A – H), bekannt. Sie weisen eine bestimmte geographische Verteilung auf (Kramvis et al. 2005) und unterscheiden sich geringfügig in der Länge

ihres Genoms, die zwischen 3182 bp (Genotyp D) und 3248 bp (Genotyp G) variiert. Das „klassische“ HB-Virus scheint ein 3215 bp langes Genom zu besitzen (Genotyp B, C, F, H) (Schaefer 2007).

Überdies wird die klinische Konsequenz aus der Existenz dieser Genotypen diskutiert. Denn offenbar lassen sich in Abhängigkeit vom Genotyp prognostische Aussagen als auch eine Vorhersage über das Ansprechen der Therapie ableiten. Das hat zur Folge, dass das Wissen um den Genotyp vor Therapiebeginn an Wichtigkeit gewinnt (Kramvis und Kew 2005).



Abb.1: Geographische Verteilung der HBV Genotypen und Subgenotypen
(modifiziert nach: Schäfer, 2007, Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes)

1.2.2. Molekularbiologische Aspekte

Das HB-Virus ist eines der kleinsten bekannten humanpathogenen DNA-Viren und zeigt sowohl einen ausgeprägten Zell- als auch Speziestropismus. Es ist ein behülltes, 42 nm großes Virus, das 3 verschiedene Oberflächenproteine (HBsAg) in seiner Hülle tragen kann, welche sich in ihrer Länge am N-Terminus unterscheiden: das kleine S-Protein, mit 226 AS, das mittlere M-Protein (PräS2-Protein), das das S-Protein in seiner Länge um 55 AS übertrifft, und das große L-Protein (PräS1-Protein), das neben der PräS2-Sequenz des M-Proteins zusätzlich die 108-119 AS lange PräS1-Sequenz aufweist. Diese 3 Proteine werden von einem der vier vorhandenen Open Reading

Frames (ORF) abgelesen, dem ORF-E. Dieser Leserahmen besteht in Abhängigkeit vom Genotyp aus 389 oder 400 Codons und beinhaltet dementsprechend 3 verschiedene Startsignale für die Bildung dieser Hüllproteine, aber nur ein Stoppcodon. Für die Bildung und Infektiosität der nachfolgenden Virusgeneration sind jedoch nur das S- und L-Protein relevant. Die Bedeutung des M-Proteins ist noch nicht geklärt (Patient et al. 2009). In der Virushülle befindet sich ein ikosaedrisches Nukleokapsid, aufgebaut aus einer bestimmten Anzahl von HBcAg-Proteinen. Dieses HBc-Protein besteht, abhängig vom Genotyp, aus 183 oder 185 AS. Die Anordnung zum Kapsid der zu Homodimeren zusammengelagerten HBc-Proteine vollzieht sich spontan über die Bildung von Disulfidbrücken (Bruss 2004). Dabei ist die Entstehung von zwei unterschiedlichen Varianten des Viruskapsids möglich: eine kleinere Variante mit 30 nm Durchmesser bestehend aus 90 Dimeren und einer weitaus häufiger auftretenden Variante (Roseman 2005) mit 34 nm und 120 Dimeren (Crowther et al. 1994). Wynne et al. konnten 1999 zeigen, dass das Kapsid Fenestrations in der Größe von 12 – 15 Å besitzt (Wynne et al. 1999).

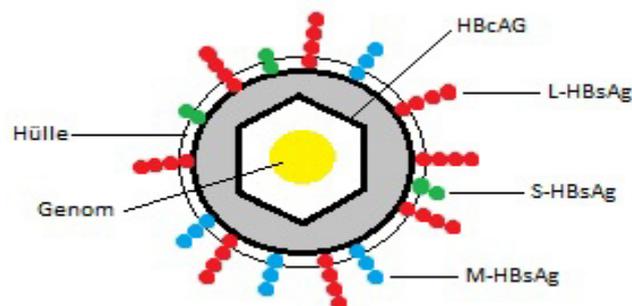


Abb. 2: Aufbau eines infektiösen Hepatitis-B-Virus, eines sog. Dane Partikels \approx 42 nm (modifiziert nach Molekulare Virologie, S. 464, Modrow et al. 2010)

Im Inneren des Kapsids befindet sich, bestehend aus einer partiell doppelsträngig und zirkulär vorliegenden DNA, das Genom des Virus. Der Minusstrang des Genoms umfasst ca. 3200 Basenpaare und besitzt, kovalent gebunden am 5'Ende, eine virale Polymerase (Hoofnagle und Liang 2009). Der Plusstrang dahingegen weist lediglich eine Länge von 40 – 85% des Minusstranges auf (Landers et al. 1977). Das Genom des Hepatitis B-Virus kodiert, wie bereits kurz erwähnt, für vier offene, sich teilweise

überlappende, Leserahmen. Ein Leserahmen kodiert für die 3 unterschiedlichen Formen des HBsAg. Aus einem weiteren Leserahmen entstehen das HBc- und HBe-Antigen, die sich strukturell stark gleichen. Ein Leserahmen ist für die Kodierung des P-Proteins verantwortlich. Der letzte der 4 ORFs ist für das X-Protein zuständig (Tiollais et al. 1985). Im Serum HBV-Infizierter finden sich jedoch nicht nur infektiöse Virionen, die nach ihrem Entdecker auch Dane-Partikel genannt werden, sondern auch die sogenannten subviralen Partikel, kurz SVP. Sie sind im Serum weitaus zahlreicher als das Dane-Partikel und zwar in einer Relation von einem Dane-Partikel zu 1000 – 10000 SVP. Diese Partikel können sowohl kugelförmig als auch filamentös sein und besitzen einen Durchmesser von 22 nm. Die filamentösen Teilchen können unterschiedliche Längen aufweisen. Sowohl die sphärischen als auch die filamentösen Partikel besitzen weder ein Nukleokapsid noch ein virales Genom und sind somit nicht infektiös (Bruss 2004). Die sphärischen Partikel bestehen aus etwa 100 HBsAg-Proteinketten und haben nur einen geringen Anteil an L-Protein, wohingegen die Anzahl an L-Proteinen in den filamentösen Partikeln höher und in der Virionhülle am höchsten ist (Heermann KH 1984).

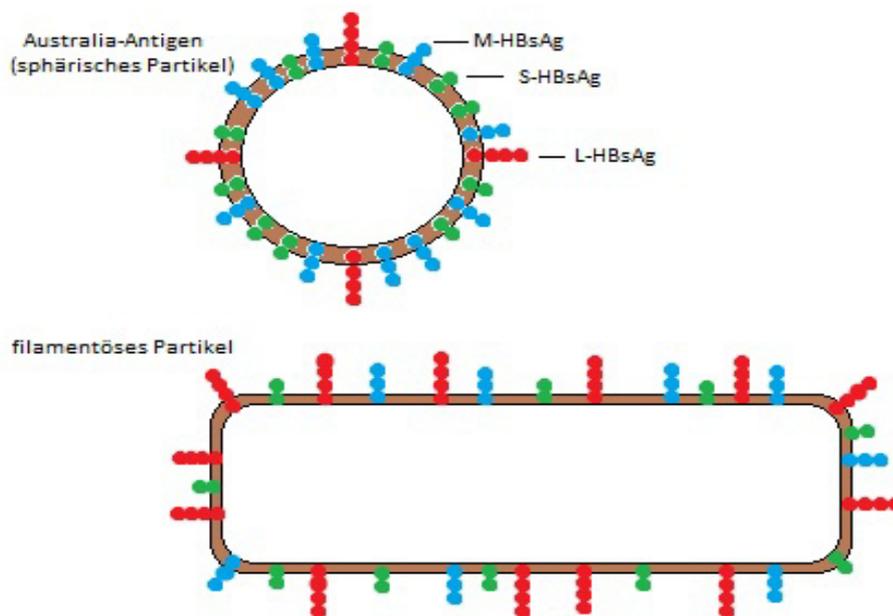


Abb. 3: Nichtinfektiöse 22nm Partikel des Hepatitis B-Virus
(modifiziert nach Molekulare Virologie, Seite 464, Modrow et al., 2010)

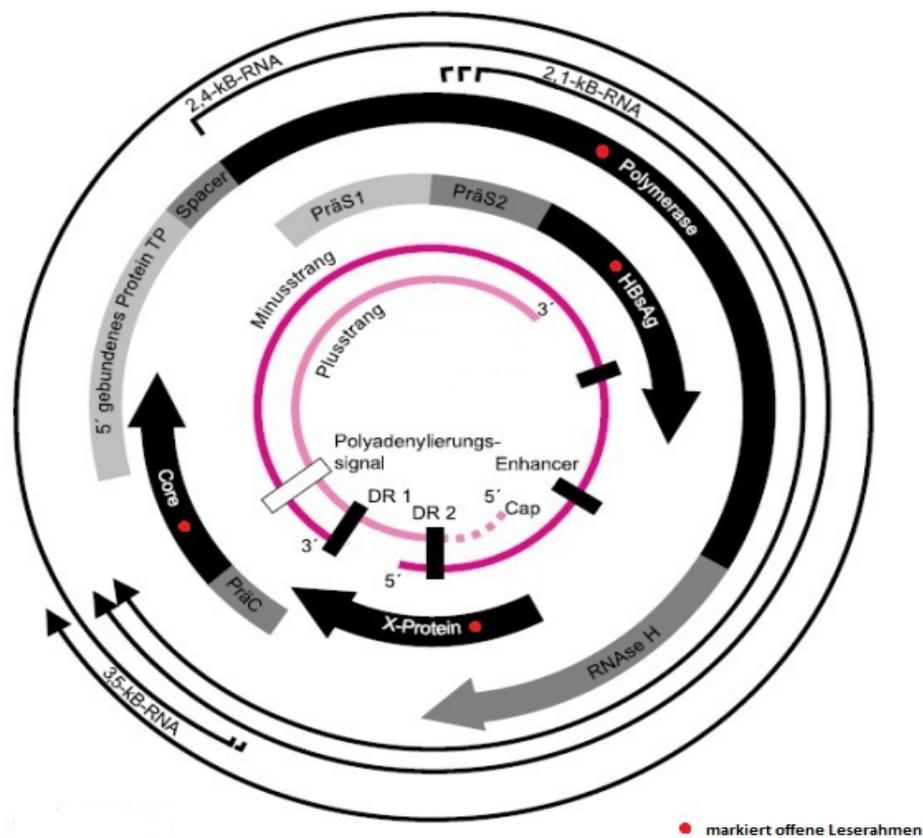


Abb. 4: Darstellung des HBV-Genoms
(modifiziert nach Molekulare Virologie, Seite 465, Modrow et al., 2010)

1.3. Hepatitis B in der Klinik

1.3.1. Epidemiologie

Auch in der heutigen Zeit ist die Hepatitis B nach wie vor eine der häufigsten Infektionskrankheiten. Schätzungen der WHO zufolge haben weltweit wohl ca. 2 Milliarden Menschen eine Hepatitis B durchgemacht, was etwa einem Drittel der Weltbevölkerung entspricht. Darüber hinaus gibt es ungefähr 350 Millionen chronische Träger dieses Virus. Jährlich versterben etwa 600000 Menschen an den akuten oder chronischen Folgen einer Hepatitis B (World Health Organization).

Hauptübertragungswege sind die Infektionen von Neugeborenen durch die meist chronisch infizierten Mütter und ungeschützter Sexualkontakt. Daneben spielen nach wie vor kontaminierte Injektionsutensilien und Mehrfachbenutzung von Spritzen als

Ansteckungswege eine Rolle. Die Zahl der dadurch im Jahr 2000 infizierten Menschen wird auf 21 Millionen geschätzt (Hauri et al. 2004).

Bezüglich der Ausbreitung gibt es große regionale Unterschiede.

Was Deutschland angeht, so sind aufgrund von § 6 und § 7 des seit 2001 geltenden Infektionsschutzgesetzes (IfSG), das das Bundesseuchengesetz ablöste, gute epidemiologische Daten zur Hepatitis B vorhanden. Diese beiden Paragraphen regeln die Meldepflicht der Hepatitis B für Ärzte und Laborleiter (Bales et al. 2003). Die Inzidenz wird für Deutschland mit 0,8/100000 Einwohner angegeben, wobei diese für Männer mit 1,1/100000 Einwohner (Häufigkeitsgipfel 20 – 29 Jahre) höher liegt als für Frauen mit 0,6 /100000 (Häufigkeitsgipfel 30 – 39 Jahre).

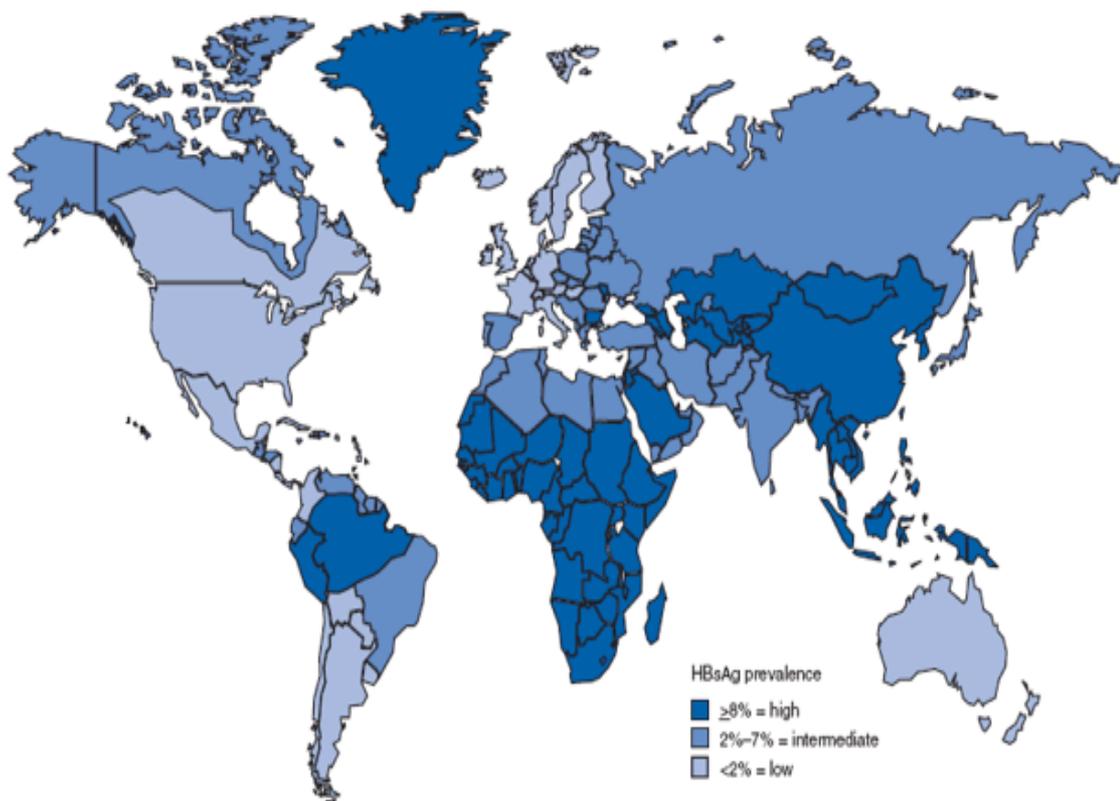


Abb. 5: Geographische Verteilung der chronischen Hepatitis B-Virus-Infektion, weltweit 2006
(Quelle: Centers for Disease Control and Prevention)

Die gesamte Anzahl der Fallmeldungen im Jahr 2013 betrug 1947. Die Fälle, die der Referenzdefinition entsprachen, nahmen gegenüber dem Vorjahr von 676 auf 691 Fälle zu. Über die letzten 12 Jahre sank allerdings die Zahl der jährlichen Neuinfektionen (RKI 2015). 2013 ergaben Untersuchungen zur Seroprävalenz in Deutschland, dass 5 % positiv für Anti-HBc waren, einem Marker für eine stattgefundene oder aktuelle Infektion. Für das HBsAg, das eine aktuelle Infektion anzeigt, waren lediglich 0,3% positiv. Somit zählt Deutschland zu den Niedrig-Prävalenz-Ländern (Poethko-Müller et al. 2013). Die Übertragung erfolgt in diesen Ländern hauptsächlich über sexuelle Kontakte und i.v. Drogenkonsum (RKI 2015). Einen Großteil der chronischen Virusträger scheinen mit 40% Menschen mit Migrationshintergrund aus Ländern mit hoher Prävalenz für die Hepatitis B auszumachen (Marschall et al. 2005). Fischer et al. untersuchten in Zusammenarbeit mit 74 deutschen hepatologischen Schwerpunktpraxen und Krankenhausambulanzen die Epidemiologie und Klinik von 1535 chronischen HB-Virus-Trägern in Deutschland und ermittelten einen Anteil von 63,1% an Patienten mit Migrationshintergrund. Die zahlenmäßig größten Gruppen bildeten dabei Menschen aus den folgenden Ländern: Türkei (22,4%), ehemalige Sowjetunion (11,2%) und Südost-Asien (10,3%) (Fischer et al. 2012).

1.3.2. Klinik

In Abhängigkeit von Alter und Immunstatus kann es zu unterschiedlichen Ausprägungen der Infektion mit dem Hepatitis B-Virus kommen. Zu einer ersten groben Einteilung dient die Unterscheidung in akute und chronische Infektion. Davon ausgehend eröffnen sich wiederum mehrere Möglichkeiten, wie die Hepatitis B-Infektion verlaufen kann. Diese sollen hier im Anschluss kurz betrachtet werden.

Die akute Erkrankung kann sich in einem anikterischen, einem ikterischen, oder auch in einem fulminanten Verlauf äußern, wobei die in 2/3 der Fälle symptomlose Ausheilung der Erkrankung, ohne Anzeichen einer Gelbsucht (anikterisch), überwiegt. Bei Kindern kann ein ikterischer Verlauf sogar in nur etwa 10% der Fälle beobachtet werden (McMahon et al. 1985). Die Klinik der akuten ikterischen Hepatitis B präsentiert sich, nach einer Inkubationszeit von 2 Wochen bis 4 Monaten, in einem Prodromalstadium, einhergehend mit Appetitlosigkeit, Krankheitsgefühl, Muskel- und Gelenkbeschwerden

sowie Fieber, Übelkeit und Erbrechen mit einer Dauer von 2–7 Tagen und einem sich anschließenden Akutstadium (4-8 Wochen). Hier können zusätzlich mitunter ein entfärbter Stuhl, dunkler Urin, Leber- und/oder eine Milzvergrößerung konstatiert werden. Auch rechtsseitige Oberbauchbeschwerden sind möglich. Laborchemisch kann es zum Anstieg der Transaminasen, des Bilirubins und der Alkalischen Phosphatase kommen. Bei ausreichender Erhöhung des Serumbilirubins kann zuerst ein Sklerenikterus beobachtet werden, bevor, bei weiterem Anstieg dieses Laborwertes, auch eine Gelbfärbung der Haut erkennbar wird. Nur selten kommt es zu einer fulminanten Hepatitis mit letalem Ausgang (Elgouhari et al. 2008).

95% der akuten Fälle heilen ohne Konsequenzen aus, weshalb die akute Hepatitis B als selbstlimitierende Erkrankung angesehen wird, die bei immunkompetenten Patienten nur in seltenen Fällen, wohl weniger als 1%, in eine chronische Infektion übergeht (Tassopoulos et al. 1987). Trotz Genesung scheint nach einer akuten Hepatitis B das Virus weiterhin über Monate bis Jahre im menschlichen Körper überdauern zu können (Michalak et al. 1994). Höchstwahrscheinlich persistiert der Erreger in der Mehrzahl der Betroffenen sogar lebenslang. Dies kann zu einer erneuten HB-Reaktivierung unter immunsuppressiver Therapie führen (Knöll et al. 2007).

Erfolgt keine Heilung, kommt es zu einer Persistenz des Virus. Dabei gilt: je früher der Zeitpunkt der Infektion, umso größer die Wahrscheinlichkeit einer Ausbildung einer chronischen Hepatitis B-Erkrankung (Berk et al. 2003). Bei Infektion zum Zeitpunkt der Geburt durch eine HBeAg-seropositive Mutter beträgt die Wahrscheinlichkeit einer Chronifizierung mehr als 90% (Chang 2000). Für eine Vorhersage, ob es bei einer HBV-infizierten Schwangeren zu einer vertikalen Übertragung der Erkrankung kommt, scheint der Nachweis von HBeAg gut geeignet zu sein (Okada et al. 1976). Bei einem Erkrankungsalter zwischen 1 und 5 Jahren ist mit einer Chronifizierung der Erkrankung in nur noch bis zu 30% der Fälle zu rechnen. Bei Erwachsenen nimmt diese Zahl auf 1 bis 5% ab (Berk et al. 2003).

Von Chronifizierung wird gesprochen wenn es nach 6 Monaten zu keiner Ausheilung der Erkrankung gekommen und HBsAg immer noch positiv ist. Patienten mit einer

chronischen HBV-Infektion können 4 unterschiedlichen Stadien zugeteilt werden, die jedoch nicht zwingend durchlaufen werden.

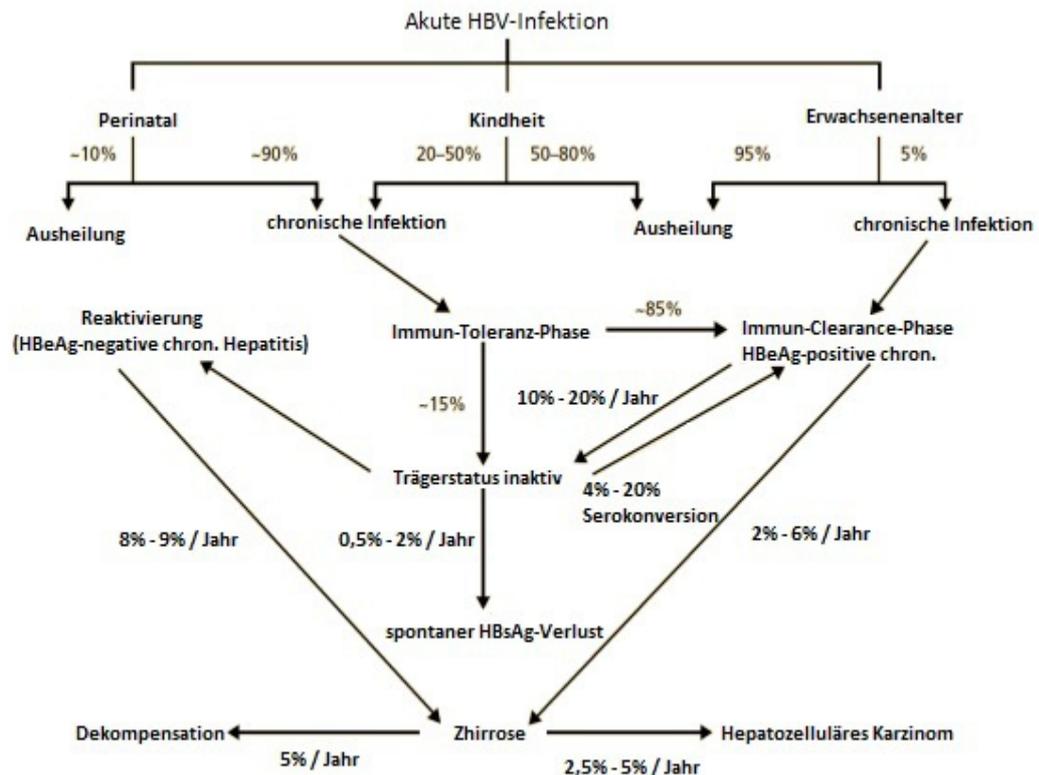


Abb. 6: Mögliche Verläufe einer Hepatitis B-Infektion,
(modifiziert nach Elgouhari, 2008, Hepatitis B virus infection:
Understanding its epidemiology, course, and diagnosis)

Die Immunitoleranz-Phase (Chu et al. 1985) ist dabei charakterisiert durch das Vorhandensein von HBeAg, als auch großen Mengen an HBV-DNA, wobei jedoch, trotz dieser hohen viralen Replikationsrate, eine inflammatorische Beteiligung der Leber nur in geringem Ausmaß oder nicht nachweisbar ist. Dementsprechend ist der Aminotransferase-Spiegel im Serum normwertig. Diese Form der chronischen Hepatitis B tritt vor allem bei Patienten mit sehr frühem Kontakt zum Virus, meist durch Infektion bei Geburt, auf (Yim und Lok 2006). Man nimmt an, dass eine transplazentäre Übertragung mütterlichen HBe-Antigens auf den Feten zu einer fehlenden spezifischen Immunantwort der T-Zellen führt (Hsu et al. 1992). Ein weiteres Stadium wird als Immunitoleranz-Phase oder als HBeAg-positive chronische Hepatitis B bezeichnet. Gekennzeichnet ist diese durch den Nachweis von HBeAg, sowie von HBV-DNA, aber

in geringeren Mengen als im zuvor beschriebenen Stadium, einer Erhöhung der ALT im Serum sowie einer histologisch aktiven und fibrotischen Leberentzündung (Pungpapong et al. 2007). Sogenannte inaktive Träger stellen eine weitere Möglichkeit der chronischen Infektion mit diesem Virus dar. Sie durchlaufen eine Serokonversion mit Verlust des HBeAg unter Bildung von Anti-HBe. Zusätzlich wird diese Antikörperbildung von einer Normalisierung der ALT-Werte und einer Verringerung der HBV-DNA, zum Teil bis unter die Nachweisgrenze, begleitet. Das HBsAg persistiert. Die spontane Serokonversionsrate (Verlust von HBsAg und Ausbildung von Anti-HBs) pro Jahr liegt bei 5 – 15 % (Lok et al. 2001). Leberbiopsien weisen meist nur eine geringe bis milde Hepatitis auf (Yim und Lok 2006). Franchis et al. zeigten, dass bei inaktiven HBsAg-Trägern mit initial normaler Leberfunktion in Italien, die über 130 Monaten beobachtet wurden, das Risiko zur Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms nur geringfügig erhöht war (Franchis et al. 1993). Dieser Status kann lebenslang andauern oder, wie in einem Drittel der Fälle, wieder in eine chronisch aktive Hepatitis übergehen. Das HBe-Antigen bleibt dabei aber negativ. HBV-DNA und Serum-ALT können nachgewiesen werden (Hadziyannis und Vassilopoulos 2001).

Phase	HBeAg	Anti-HBe	HBV-DNA	ALT	Leberbiopsie
Immun-Toleranz	positiv	negativ	hoch	normal	normal/unspezifisch
Immun- Clearance	positiv	negativ	moderate Erhöhung	erhöht	chronische Hepatitis
Trägerstatus inaktiv	negativ	positiv	gering / nicht nachweisbar	normal	unbedeutende Entzündung
Reaktivierung	negativ oder positiv	negativ oder positiv	moderat	erhöht	chronische Hepatitis

Tab.1: mögliche Stadien einer chronischen HBV-Infektion mit nachweisbaren Markern
(modifiziert nach Elgouhari, 2008, Hepatitis B virus infection:
Understanding its epidemiology, course and diagnosis)

1.3.3. Diagnostik

Zur Abklärung der Fragestellung nach einer Erkrankung an Hepatitis B steht dem Kliniker die Bestimmung einiger hilfreicher serologischer Marker zur Verfügung, deren Nachweis aber mit Bedacht und die Interpretation der Ergebnisse korrekt erfolgen müssen. Eines dieser zu bestimmenden Antigene ist das HBs-Antigen, das durch einen positiven Nachweis einen Hinweis auf eine aktuelle Infektion mit HB-Virus gibt (Liaw und Chu 14). Dieses Patientengut leidet nicht notwendigerweise an einer akuten Entzündung der Leber. Bei chronischen HBsAg-Trägern ist eine normale Leberfunktion sogar relativ häufig (Bonino et al. 2010). Eine Unterscheidung von akuter und chronischer Infektion ist bei alleiniger Bestimmung des HBsAg nicht möglich. Falsch-negative HBsAg-Ergebnisse können auf seltene Escape-Mutationen in den HBsAg-Epitopen zurückzuführen sein. Keine Rolle in der serologischen Diagnostik spielt das HBcAg im Gegensatz zu dessen leicht verändertem sezerniertem Äquivalent, dem HBeAg. Dieses virale Protein ist ein Marker sowohl für die Replikationsrate des Virus als auch für die Infektiosität (Bonino et al. 1981).

Neben den Antigenen kann auch die Detektion der entsprechenden Antikörper erfolgen: die Bestimmung von Antikörpern gegen das HBsAg dient dem Nachweis einer ausgeheilten akuten HBV-Infektion oder der Dokumentation einer erfolgreichen Impfung (Bonino et al. 2010), wobei eine routinemäßige Überprüfung der impfinduzierten Antikörperbildung in nur wenigen Fällen indiziert ist. Die Differenzierung von Zustand nach Infektion und Zustand nach Impfung erfolgt durch Untersuchung von Anti-HBc (Bonino et al. 2010). Dieser Nachweis fällt bei Impfungen immer negativ aus, aufgrund der Tatsache, dass das für die Anti-HBc-Bildung verantwortliche Protein, HBcAg, nur im Kapsid des Virus vorhanden ist, jedoch nicht im Impfstoff.

Eine positive Anti-HBe-Bestimmung deutet auf eine vorliegende Serokonversion eines chronisch HBeAg-positiven Patienten zum inaktiven HBsAg-Träger-Status hin (Bonino et al. 2010). Diese Serokonversion, durch eine Untersuchung an mehr als 3000 Patienten festgestellt, erfolgt bei in der Kindheit Infizierten im Mittel im Alter von 35 Jahren (Yuen et al. 2005), wobei von einer spontanen Konversionsrate von 5-10 % im Jahr auszugehen ist. Diese Statusveränderung geht mit einem verminderten Risiko für ein hepatozelluläres Karzinom einher (Hui et al. 2007). Ein prognostischer Faktor, der

auf eine erfolgreiche Serokonversion hinweisen kann, ist die signifikante Abnahme des HBsAg bereits bis zu 2 Jahre im Voraus (Togo et al. 2011).

Nicht mehr wegedenkbar aus der Diagnostik ist der Nachweis von HBV-DNA. Über Bestimmung von HBV-DNA lassen sich Aussagen bezüglich Infektiosität, Vermehrungsaktivität, Prognose und Therapieansprechen ableiten. Bevor ein Hepatitis-B-Nachweis geführt wird, sollte man sich darüber im Klaren sein, ob der Verdacht auf eine akute oder chronische Infektion besteht, denn in Abhängigkeit davon sollten die aussagekräftigsten Parameter bestimmt werden. Bei einer akuten HBV-Infektion umfasst die virologisch-serologische Diagnostik anfänglich nur das HBsAg und das Anti-HBc. Bei Bedarf kann zusätzlich auch die Bestimmung von HBeAg und Anti-HBe erfolgen. Ist mit einer chronischen Erkrankung zu rechnen, so sollten alle relevanten Nachweise geführt werden. Diese umfassen: HBsAg, Anti-HBc, HBeAg, Anti-HBe und HBV-DNA (Cornberg et al. 2011).

Interpretation	HBsAg	Anti-HBs	HBeAg	Anti-HBe	Anti-IgM Core	Anti-IgG Core	HBV-DNA
HBV akut, frühe Phase	JA	NEIN	JA	NEIN	JA	JA / NEIN	hoch
HBV akut, Fensterphase	NEIN	NEIN	NEIN	JA	JA	JA	niedrig
HBeAg-positive chron.Hepatitis	JA	NEIN	JA	NEIN	NEIN (JA)	JA	hoch
HBeAg-negative chron. Hepatitis	JA	NEIN	NEIN	JA	NEIN	JA	moderat
Trägerstatus inaktiv	JA	NEIN	NEIN	JA	NEIN	JA	nicht nachweisbar / gering
Ausheilung	NEIN	JA / (NEIN)	NEIN	(JA) NEIN	NEIN	JA	nicht nachweisbar

Tab. 2: Serologische Marker der HBV-Infektion
(modifiziert nach Elgouhari, 2008,
Hepatitis B virus infection: Understanding its epidemiology, course, and diagnosis)

1.3.4. Therapie

Eine akute HBV-Infektion stellt, aufgrund der hohen Spontanheilungsrate, keine Indikation für eine antivirale Therapie dar. Erst bei Fällen einer schweren akuten oder fulminanten Hepatitis B, welche anhand einer Einschränkung der Leberfunktion erkannt wird, ist eine Behandlung anzustreben (Cornberg et al. 2011). In einer Studie wurde die Häufigkeit von Lebertransplantationen nach fulminanter Hepatitis B mit Therapie und ohne Therapie verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass im Fall einer Behandlung eine Lebertransplantation in nur 20 %, bei fehlenden medikamentösen Maßnahmen eine Transplantation aber in 50 – 80 % der Fälle, notwendig war (Tillmann et al. 2006). Bei der Untersuchung einer mit Lamivudin behandelten Gruppe mit schwerer akuter Hepatitis B im Vergleich zu einer Kontrollgruppe konnte gezeigt werden, dass der frühe Einsatz von Lamivudin zu einem stärkeren Rückgang der HBV-DNA, der Mortalität und insgesamt zu einer klinischen Verbesserung führte (Yu et al. 2010). Zur Indikationsstellung einer Therapie bei chronischer Hepatitis B werden Faktoren wie HBeAg-Status, die Virusreplikation, entzündliche Aktivität der Erkrankung und die Serum-Transaminasen herangezogen (Cornberg et al. 2011). Eine Behandlung inaktiver HBsAg-Träger ist aufgrund einer nur geringen HBV-assoziierten Morbidität und Sterblichkeit nicht angezeigt (Manno et al. 2004). Hier scheint die Datenlage jedoch widersprüchlich zu sein, da Chen et al. ein signifikant höheres Risiko für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms bei chronisch inaktiven HBsAg-Trägern proklamieren (Chen et al. 2010). Für die Therapie der chronischen Hepatitis B stehen derzeit zwei Medikamentengruppen zur Verfügung: die Interferon- bzw. die Nukleosid/Nukleotidanaloga-Gruppe. Für jede der beiden sind mehrere Medikamente zugelassen: Interferon α -2a, Interferon α -2b und PEG-Interferon α -2a bei den Interferonen, bei den Nukleosiden sind dies Lamivudin, Entecavir, Telbivudin und bei den Nukleotiden Adefovir und Tenofovir (Aspinall et al. 2011). PEG-Interferon verbessert die Wirkung der antiviralen Immunantwort, wohingegen die Nukleoside/Nukleotide die HBV-Polymerase inhibieren (Carey und Harrison 2009). Ziele einer Therapie sind eine dauerhafte Suppression der HBV-DNA unter die Nachweisgrenze sowie langfristig gesehen eine Serokonversion zu Anti-HBe und damit die Senkung der Morbidität und Mortalität der HBV-Infektion. Durch eine Therapie soll zudem die Entstehung einer Leberzirrhose oder auch eines hepatozellulären Karzinoms

verhindert werden (Jafri und Lok 2010). Für HBeAg-positive Patienten unter PEG-Interferon α -2b-Behandlung konnte gezeigt werden, dass auch der Genotyp des Virus in der Therapie eine Rolle spielt: in Nachsorgeuntersuchungen war ein negativer HBe-Ag-Nachweis, ein Serum HBV-DNA-Level unter 10000 Kopien/ml und der fehlende Nachweis von HBsAg signifikant häufiger beim Genotyp A zu finden (Buster et al. 2008). Dass der Genotyp als Prädiktor für das Ansprechen einer Therapie herangezogen werden kann, konnte durch Janssen et al. bereits gezeigt werden, sowie die Tatsache, dass die alleinige Behandlung mit PEG-Interferon einer Kombinationstherapie von PEG-Interferon mit Lamivudin überlegen ist (Janssen et al.). In einem Vergleich von 3 Behandlungsansätzen (PEG-Interferon α -2a, PEG-Interferon α -2a und Lamivudin, alleinige Lamivudingabe) bei chronisch HBeAg-positiv Infizierten ermittelten Lau et al. zudem auch die höchste Effektivität bzgl. HBeAg-, HBsAg-Serokonversion und HBV-DNA Suppression für die PEG-Interferon-Monotherapie (Lau et al. 2005). Eine neue Herausforderung an die Therapie der chronischen Hepatitis-B-Infektion stellt die Entstehung von Resistenzen des Virus, vor allem Lamivudin gegenüber, dar.

1.3.5. Immunprophylaxe

Zum Schutz vor einer möglichen Infektion mit dem Hepatitis B-Virus stehen sowohl eine passive als auch eine aktive Prophylaxe zur Verfügung. Die Bedeutung der passiven Immunisierung in Form von Hepatitis B-Immunglobulin (HBIG) liegt größtenteils in der Anwendung als Postexpositionsprophylaxe nach Kontakt mit infektiösem Material durch ungeschützte Individuen, zum Schutz Neugeborener bei HBsAg-positiver Mütter in Verbindung mit einer aktiven Immunisierung und bei Lebertransplantierten. Damit ein Schutz vor Erkrankung gewährleistet werden kann, muss die HBIG-Gabe jedoch innerhalb von 4 h bis höchstens 48 h, bei gefährdeten Neugeborenen bis maximal 12 h nach Geburt, erfolgen (Tillmann und Bock 2010; Heintges 2006). Der Impfstoff für die aktive Immunisierung wurde, bevor er seit den 80er Jahren in Hefezellen gentechnisch hergestellt werden konnte, aus dem Plasma chronisch Infizierter durch Aufreinigung und Inaktivierung gewonnen. Als antikörperinduzierendes Epitop enthielt dieses Plasma das SHBs-Antigen (des HBV-Genotyps A2) auf der Oberfläche der sphärischen 22 nm subviralen Partikel, ebenso wie der heute verwendete Impfstoff. Die anfänglich verfolgte Strategie bestand in der

Impfung von Risikogruppen. Als die erhoffte Prävalenzsenkung ausblieb, weitete die WHO die Impfeempfehlung aus. 1992 empfahl sie weltweit bereits Säuglinge zu impfen. 3 Jahre später wurde diese Empfehlung auch in Deutschland durch die STIKO umgesetzt (Jilg 1996). Säuglinge erhalten in den Monaten 2,3,4 jeweils eine Dosis des heute überwiegend verwendeten hexavalenten Impfstoffs, die nochmals im Alter zwischen 11 und 14 Monaten aufgefrischt wird. Das Impfschema bei Erwachsenen sieht 3 Impfungen mit monovalentem Hepatitis-B-Impfstoff vor und zwar zum Zeitpunkt 0, nach 4 Wochen und nach 6 Monaten (Jilg 2011). Coates et al. untersuchten in einer Metaanalyse die Ansprechrate auf diesen Impfstoff, der in über 90 % der gesunden Normalbevölkerung eine Immunität induziert. Die höchsten Raten konnten dabei für Kinder und junge Erwachsene ermittelt werden (Coates et al. 2001). Der Anstieg des Anti-HBs-Titers durch zwei verabreichte Impfdosen ist dabei relativ gering, erst der Booster, also die 3. Impfdosis nach einem halben Jahr, ist verantwortlich für die zum Teil sehr hohen Anti-HBs-Titer (Jilg et al. 1989) mit einem Maximum 4 Wochen nach Impfung. Jedoch bereits innerhalb der ersten 6 Monate fallen diese merklich und anschließend immer langsamer ab (Jilg et al. 1990). Wie lange nach der abgeschlossenen Immunisierung der Nachweis von Anti-HBs-Antikörpern gelingt ist dabei abhängig von der maximalen Anti-HBs-Konzentration nach der letzten Impfung. Diese wiederum ist abhängig sowohl von der Impfdosis als auch vom Alter und Geschlecht (Jilg et al. 1988). Liegt der Anti-HBs-Titer unterhalb der Nachweisgrenze so ist nach wie vor ein Schutz durch das immunologische Gedächtnis gegeben (Wenzel und Jilg 2010). Über den Zeitpunkt einer Impfauffrischung herrscht noch Uneinigkeit: die European Consensus Group on Hepatitis B Immunity sah im Jahr 2000 generell keine Notwendigkeit für eine Booster-Impfung (European Consensus Group on Hepatitis B Immunity 2000). Dieser Meinung haben sich inzwischen die meisten Impfkommisionen angeschlossen (Leuridan und van Damme 2011). Auch die STIKO vertritt in ihren neuesten Empfehlungen diese Ansicht; auf Grund der sehr beschränkten Datenlage bezüglich eines verlässlichen Schutzes über 15 Jahre hinaus empfiehlt sie aber für Personen mit stark erhöhtem Risiko einer Ansteckung eine Testung und Auffrischung wenn Anti-HBs < 100 IU/l ist (RKI - Empfehlungen der STIKO 2013).

1.4. Ziel der Arbeit

Die der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegende Fragestellung basiert auf einer Reihe von Beobachtungen, die vermuten lassen, dass die Virusreplikation bei akuter und chronischer HBV-Infektion durch immunologische Mechanismen kontrolliert wird. Möglicherweise kann deshalb auch die aktive Impfung einen gewissen Einfluss auf die Vermehrung des Hepatitis-B-Virus in infizierten Leberzellen haben. Der Einfluss zweier solcher impfinduzierter Mechanismen auf die Virusreplikation, nämlich HBs-Ag-spezifischer T-Helferzellen und HBsAg-spezifischer Antikörper (Anti-HBs), sollte in einem Zellkulturmodell untersucht werden.

Eine der erwähnten Beobachtungen stammt aus der Studie von Knöll et al., die zeigen konnten, dass selbst im Falle einer sogenannten ausgeheilten Hepatitis B-Infektion im Rahmen einer immunsuppressiven Therapie bei einer hämatologischen Grunderkrankung es zu einer erneuten Reaktivierung der Hepatitis B kommen kann. Dabei zeigten sich bei 6 von 7 Patienten im Patientenserum sowohl eine Konversion von Anti-HBs, welches nach Reinfektion rasch abfiel, zu HBsAg als auch HBV-DNA. Vermutet wird eine erneute Virusreplikation in der Leber durch Wegfall der immunologischen Kontrollen (Knöll et al. 2007). Auch Michalak et al und Hoofnagle et al beschäftigten sich mit der möglichen Reaktivierung einer latenten Hepatitis B-Infektion durch immunsuppressive Therapien (Michalak et al. 1994; Hoofnagle 2009). Spezifischen T-Zellen könnte darüber hinaus eine Rolle bei der Verhinderung der Entstehung einer chronischen Hepatitis B-Infektion Neugeborener durch Hepatitis B-positive Mütter zukommen. Diese Annahme basiert auf der Beobachtung, dass durch alleinige Gabe einer aktiven Hepatitis B-Immunsierung innerhalb von 12 h nach Kindsgeburt, eine perinatale Infektion in 75 % verhindert werden kann (Beasley et al. 1983), obwohl eine Antikörperbildung frühestens nach 8 – 12 Tagen erfolgt. Eine simultane Gabe von HBIG und aktiver Immunsierung scheint noch effektiver zu sein (Pande et al. 2013). Es stellt sich die Frage worauf die frühe Wirkung der aktiven Impfung basiert, wenn die Entstehung von Antikörpern erst einige Tage später einsetzt. Auch deshalb ist die Untersuchung des Einflusses spezifischer T-Zellen auf eine HBV-produzierende Zellkultur durchaus bedeutsam. Durch in-vitro Versuche in dieser Arbeit soll geklärt werden, ob diese Viruskontrolle vor initialer immunablativer Therapie durch

spezifische T-Zellen vermittelt wird. Und wie ist das Zusammenspiel der HBV-produzierenden Zellkultur mit Hepatitis B-Immunglobulin? Auch das eine wichtige Frage im Hinblick darauf, dass Hepatitis B-erkrankten und lebertransplantierten Patienten zur Verhinderung einer erneuten Reinfektion der Leber neben Nukleosid- oder Nukleotidanalogs auch HBIG verabreicht wird (Katz et al. 2010). Ursprünglich ging man davon aus, dass HBIG eine Reinfektion der Leber verhindert; inzwischen weiß man, dass es in den meisten Fällen zu einer Reinfektion kommt und daher HBIG wohl eher (bzw. auch) die Virusreplikation beeinflussen kann. Ein Versuchsansatz in diese Richtung, den Schilling et. al verfolgten, war die Reduktion der HBV-DNA und des HBsAg durch Zugabe von Anti-HBs zum Zellkulturmedium. Dabei konnten sie feststellen, dass neben einer verringerten Sekretion des HBs-Antigens in den Überstand, das Anti-HBs in die Zellen aufgenommen wurde und dort gemeinsam mit dem HBsAg im Zytosol vorlag. Darüberhinaus wurde beobachtet, dass die im Zytosol vorhandene Menge an HBsAg in Abhängigkeit von der Konzentration des Anti-HBs zugenommen hatte. Als Erklärung für diese Ergebnisse wurde, neben der bisherigen Vorstellung einer Neutralisierung der HBV-Virionen durch den Antikörper im Blut, eine Antikörper-Antigen-Interaktion innerhalb der Zelle vermutet (Schilling et al. 2003).

Auf dem Gebiet der Hepatitis B-Forschung wird häufig mit Zellkulturlinien gearbeitet, doch selten die Frage gestellt, ob und inwiefern Ergebnisse aus zellkulturbasierten Versuchen zu wiederholen bzw. vergleichbar sind. Auch dies ist in diesem Zusammenhang eine Frage, die gestellt werden muss. Suri et al. verwendeten beispielsweise für ihre Untersuchungen zur Fragestellung der nicht-zytopathischen Hemmung der HBV-Replikation durch IFN γ neben humanen Hepatozyten auch die stabil mit dem HBV-transfizierten Hep G 2.2.15 Zellen. Sie zeigten, dass von PBMCs produzierte Zytokine, im speziellen IFN γ , eine konzentrationsabhängige Verringerung der HBV-Replikation bewirken. Dies gelang ihnen durch Etablierung eines Kokulturversuches von PBMCs und Hep G 2.2.15-Zellen mittels eines Zellkultureinsatzes (Suri et al. 2001). Biermer et al. attestieren der Hep G2.2.15-Zelllinie nur eine geringe Sensitivität gegenüber TNF α und verwendeten zur Durchführung ihrer Experimente zur Hemmung der HBV-Replikation durch Zytokine transfizierte Hep G2-Zellen, die bei der Behandlung mit IFN γ jedoch nur eine moderate Verringerung der HBV-Reproduktion erreichen konnten. Diese sprachen aber

gut auf TNF α an. Sie konnten dabei zeigen, dass die Reduktion der HBV-Reproduktion durch einen nichtzytopathischen Effekt, der über den NF κ B-Signalpfad erfolgt, vermittelt wird. Dies wurde unter anderem durch Inhibition dieses Signalweges zusätzlich bestätigt, wodurch TNF α nicht mehr wirken konnte (Biermer et al. 2003). Phillips et al. konnten trotz der Verwendung der Hep G 2.2.15-Zelllinie, die laut Biermer et. al nur wenig sensitiv für TNF α sind, unter Zugabe von rekombinantem TNF α , als aber auch von rekombinantem INF γ , eine signifikante Reduktion in der HBV-DNA-Sekretion nachweisen (Phillips et al. 2009). Dieses Ergebnis konnten nicht alle Arbeitsgruppen zeigen: „Prolonged treatment with mTNF- α also failed to reduce HBV mRNA levels (...)“ (Pasquetto et al. 2002). Auch Hayashi et. al gelang es nicht in ihren Versuchen mit stabil HBV-transfizierten Hep G 2-Zellen unter Zugabe von IFN zum Medium bei einer Kulturdauer von 3 Tagen eine Reduktion für die HBV-DNA noch für das HBsAg im Überstand zu zeigen: „HBV DNA was found not to change at all after a 3-day treatment with IFN, at concentrations of 10^4 IU/ml for IFN- α and IFN- β and 10^5 IU/ml for IFN- γ “. „(...) no HBV antigen reduction was observed by treatment with IFNs for 3 days (Hayashi und Koike 1989).

Auch die oben erwähnten Versuche von Schilling et. al erfolgten unter Verwendung von Zellkulturen, darunter auch der Hep G 2.2.15-Hepatomzellen. Auch die Kokultur von primären humanen Hepatozyten mit zytokinhaltigem Medium führt zu Reduktion der von den Zellen produzierten HBV-Komponenten. Zum einen erfolgte gegenüber der Negativkontrolle eine um 48 Stunden verzögert beginnende Produktion der Proteine und der HBV-DNA, zum anderen wurden diese auch in geringeren Mengen produziert. Darüberhinaus erfolgten noch weitere Versuche mit primär infizierten Hepatozyten beispielsweise mit HBV-spezifischen und HBV-naiven Immunzellen. Auch hier konnte eine verringerte Produktion der Hepatozyten, zurückführbar auf die Immunzellen, gezeigt werden (Röhrl 2009). Doch nicht nur die Zellkultur wird für Versuche zur Gewinnung neuer Erkenntnisse herangezogen: auch in vivo an transgenen Mäusen konnten Franco et al. eine Reduktion der HBV-DNA-Replikation durch von HBVenv-TH₁-Zellen produziertem INF γ und TNF α aufzeigen (Franco et al. 1997).

Nicht zuletzt diese sich teilweise widersprechenden Ergebnisse der Arbeiten, die den Effekt von Zytokinen, T-Zellen und Anti-HBs auf HBV-infizierte Hepatomzellen analysierten, war ausschlaggebend für die vorliegende Dissertation.

Ihr Ziel war es also zu untersuchen, ob sich HBV-infizierte Hep G 2.2.15-Zellen als Modellsystem für eine chronische HBV-Infektion eignen um den Einfluss von

- Zytokinen
 - HBsAg-spezifischen T-Zellen
 - HBsAg-spezifischen Antikörpern (Anti-HBs)
- zu studieren.

2. Material

2.1 Geräte

AID Elispot Reader	Autoimmun Diagnostika, Strassberg, Deutschland
Architect i SR 1000	Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Deutschland
Gefrierschrank -80°C UF80-450S	Colora Messtechnik, Lorch, Deutschland
Heizblock	Gebrüder Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Heraeus BB6220 CU CO ₂ Inkubator	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Kühlschrank -20°C, glassline	Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland
Laminar Flow Einheit	BDK, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Mikroskop Fluovert FU	Leitz, Wetzlar, Deutschland
NanoDrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Neubauer improved bright line	Superior, Marienfeld, Deutschland
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Reference Pipetten (10 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Research Pipetten (100 µl, 200 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
StepOne Plus Real-Time-PCR-Cycler	Applied Biosystems, Foster City, USA
Stickstofftank -196°C BSR 390	CRYOSON, Schöllkrippen, Deutschland
Transferpette 8 / 12 Kanal (20-200µl)	Brand, Wertheim, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Zentrifuge Biofuge 15	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Zentrifuge Joan MR 22	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Rotanta RP	Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterialien

BD Discardit II (2 ml/5ml/10ml)	BD, Heidelberg, Deutschland
BD Falcon Cell Strainer 40 µm	BD, Heidelberg, Deutschland
BD Microlance 3 20 G	BD, Heidelberg, Deutschland
BD Plastipak 50 ml Spritze	BD, Heidelberg, Deutschland
Biosphere Filter Tips (10/200/1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
CellStar Tubes 15 ml / 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

CellStar 6 Well Culture Plate	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
CellStar 12 Suspension Culture Plate	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
CellStar 12 Well Culture Plate	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Einwegtransferpipette 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf Cups (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf Cups (2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kombistopfen	Dispomed Witt, Gelnhausen, Deutschland
Kryotube 1,8 ml	NUNC, Roskilde, Dänemark
Leucosep™ 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Micro Amp Optical 8-Cap Strip	Applied Biosystems, Foster City, USA
Micro Amp 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City, USA
Mikroschraubröhre 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
MiniMACS Separation Columns MS	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Multiscreen Filter Plates MSHAN 4550	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Multitips 10/25/50/100 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen (10/1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (200 µl)	Brand, Wertheim, Deutschland
Safe-Seal Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safe-Seal-Tips (10 µl)	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Safety-Multifly-Set	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten CellStar	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
ThinCert™-Zellkultureinsätze	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen Falcon 25,75,175 cm ²	
0,2 µm Vented Blue Plug Seal Cap	BD, Heidelberg, Deutschland

2.3 Chemikalien, Medien, Reagenzien

Dimethyl sulfoxide, minimum 99,5%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DMEM (4,5 g/l Glucose)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Ethanol (min. 99,9 %)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Fetal Bovine Serum	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Heparin-Natrium 5000	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Humanserum AB, männlich	LONZA, Verviers, Belgien

L-Glutamin (200 mM)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
MgCl ₂ Solution (25 mM)	Applied Biosystems, Foster City, USA
PANCOLL	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
PBS without Ca ²⁺ und Mg ²⁺	LONZA, Verviers, Belgien
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
rh IFN γ 20 μ g	AL-Immunotools, Frisothe, Deutschland
rh TNF α 10 μ g	AL-Immunotools, Frisothe, Deutschland
RPMI 1640	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Streptavidin-ALP	MABTECH AB, Nacka Strand, Schweden
TaqMan 2x Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG	Applied Biosystems, Foster City, USA
Trypan Blue Solution 0,4%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin/EDTA-Solution	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Tween 20	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Wasser (DEPC behandelt)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
1-Step™ NBT/BCIP	Thermo Scientific, Rockford, USA
10 x TaqMan Buffer A	Applied Biosystems, Foster City, USA

2.4 Kits

Architect System Anti-HBs	Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Deutschland
Architect System HBeAg	Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Deutschland
Architect System HBsAg (quantitativ)	Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Deutschland
MACS CD ₄ ⁺ T Cell Isolation Kit II Deutschland	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
HiTrap™ Desalting	GE Biosciences, Uppsala, Schweden
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.5 Enzyme

AmpliTaq Gold Polymerase (5 U/ μ l)	Applied Biosystems, Foster City, USA
---	--------------------------------------

2.6 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion in Martinsried bezogen.

S-Ag-Assay	Sequenz der Primer und Sonden	Länge	Richtung
HBV-S-Ag 1 (8µM)	nt 321 – nt 342 5'-CAA CCT CCA ATC ACT CAC CAA C-3'	22 bp	+/+
HBV-S-Ag Sonde (8µM)	nt 349 – nt 374 5'-FAM-TCC TCC AAY TTG TCC TGG TTA TCG CT-TAMRA-3'	26 bp	+/+
HBV-S-Ag 2 (8µM)	nt 401 – nt 379 5'-ATA TGA TAA AAC GCC GCA GAC AC-3'	23 bp	+/-

2.7 Plasmide

pHBV 991

Prof. R Thomsen, Uni Göttingen

2.8 Antikörper

Anti-HBs Ag purified 1 mg

antibodies-online, Atlanta, USA

Anti-Human IFN γ mAB 1-D1K

MABTECH AB, Nacka Strand, Schweden

Anti-Human IFN γ mAB 7 B6-1-Biotin

MABTECH AB, Nacka Strand, Schweden

Beriglobin 5 ml

CSL Behring, Marburg, Deutschland

Hepatitis-B-IgG 1ml

CSL Behring, Marburg, Deutschland

2.9 Zelllinien

Zelllinie (Referenz)	Beschreibung	Kultur
Hep G 2 (Knowles et al.; 1980)	Humane Hepatomzellen, adhärent	DMEM, 10 % FCS
Hep G 2.2.15 (Sells et al., 1987)	Humane Hepatomzellen, adhärent	DMEM, 10 % FCS

2.10 Software und Internet

Die Erstellung dieser Arbeit erfolgte mit Microsoft Word 2007. Die Graphiken wurden mit Microsoft Excel 2007 angefertigt. Zur Verwaltung und Archivierung der Literatur sowie zur Erstellung eines Literaturverzeichnisses diente Citavi 3.2. Die Ergebnisse der quantitativen PCR wurden mit Hilfe der Step One Software Version 2.1 ermittelt. Die Auswertung durchgeführter Elispots erfolgte mit der AID Elispot Reader Software Version 6.0 Die Literaturrecherche wurde größtenteils über Pubmed durchgeführt: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>.

3. Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Zelllinien

Zur Durchführung der Versuche wurden zwei Zellkulturlinien verwendet: Hep G 2- und Hep G 2.2.15-Zellen. Diese wurden dauerhaft in Kultur gehalten. Bei beiden Zelllinien handelte es sich um Hepatomzellen, die sich darin unterschieden, dass die Hep G 2.2.15-Zelllinie stabil mit dem Hepatitis-B-Virus transfiziert wurde und somit neben HBsAg und HBeAg auch HBV-DNA produzierten. Die Hep G 2-Zellen produzierten weder HBs-, HBeAg, noch HBV-DNA.

3.1.2. Zellkulturbedingungen

Diese Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37°C unter Anreicherung der Luft mit 5% CO₂ in DMEM kultiviert. Diesem Grundmedium wurden noch 10% fetales Kälberserum, 1% L-Glutamin und 0,5% Penicillin/Streptomycin hinzugefügt. Dabei war im Vorfeld vor allem auf die Inaktivierung des FCS zu achten, die durch Erhitzen auf 56°C im Wasserbad über eine Dauer von 45 Minuten erreicht wurde.

3.1.3. Kryokonservierung und Inkulturnahme

Zur Absicherung gegen die Unwägbarkeiten, die die Zellkultur mit sich bringt, wurden die Zellen zur Konservierung in Stickstoff bei -196°C eingefroren. Dabei wurde Wert darauf gelegt, dass dies in der Wachstumsphase der Zellen geschieht, also etwa 1-2 Tage nach dem Teilen der Zellen. Als Einfriermedium diente das Grundmedium „DMEM“, das mit 20% FCS und 10% DMSO angereichert wurde.

Im ersten Schritt mussten die Zellen gewonnen werden, was im Vorgehen den ersten Schritten des Splittens der Zellen entsprach: das Medium aus der Zellkulturflasche wurde abgegossen, diese mit PBS gewaschen und das PBS ebenfalls verworfen, durch Zugabe von Trypsin wurde abtrypsiniert. Das Kulturgefäß wurde nach einer kurzen Einwirkdauer des Trypsins ebenfalls entleert und für wenige Minuten im Brutschrank inkubiert, bevor die Zellen abgeklopft werden konnten. In ein bereits zu $\frac{3}{4}$ mit kaltem

PBS gefülltes Falcontube wurden die abgelösten Zellen in 10 ml PBS überführt, kurz geschwenkt und bei 4°C, 1200 rpm, 10 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet gelockert. Die Zellen wurden nun in das Einfriermedium aufgenommen und in Aliquote von 1 ml gleichmäßig auf die einzelnen Kryotubes verteilt. Es erfolgte eine 24-stündige Zwischenlagerung im Gefrierschrank bei -80°C, bevor sie schließlich in den Stickstofftank überführt wurden. Um diese konservierten Zellen wieder in Kultur nehmen zu können, mussten diese zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und dann in ein 50 ml Falcontube, das bereits bis zu $\frac{3}{4}$ mit kaltem PBS gefüllt war, überführt werden. Zweck davon war, das im Einfriermedium enthaltene zellschädigende DMSO von den Zellen abzuwaschen und gleichzeitig zu verdünnen. Es erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation ohne Bremse bei 4°C mit 1200 rpm. Im Folgenden wurde wie gewohnt der Überstand verworfen, das Pellet gelockert, in DMEM aufgenommen und in die Zellkulturflasche überführt. Bereits am nächsten Tag erfolgte ein Wechsel des Mediums zur Entfernung von unter Umständen noch vorhandenen DMSO-Resten.

3.1.4. Handhabung der Zellkultur

Das Teilen der Zellen, auch Splitten genannt, erfolgte nach mikroskopischer Kontrolle um damit deren Vitalität für den Einsatz bei Versuchen zu gewährleisten. Hatten die Zellen einen zusammenhängenden Zellrasen gebildet, so wurde wie folgt verfahren:

Das in der Zellkulturflasche befindliche und von den Zellen verbrauchte Medium wurde abgegossen und die Zellkulturflasche mit PBS gewaschen und ebenfalls dekantiert. Zum Ablösen der Zellen vom Zellkulturgefäß wurde nun unverdünntes Trypsin in die Flasche pipettiert und ebenso, nach leichtem Schwenken und kurzer Einwirkzeit, verworfen, bevor die Zellkulturflasche im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ für 2-5 Minuten zwischengelagert wurde. Dadurch war ein schonendes Ablösen der Zellen vom Zellkulturgefäßboden möglich. Im Anschluss wurden die Zellen vom Boden der Flasche durch leichtes Schlagen des Kulturgefäßes gegen den Handballen gelöst. Es erfolgte eine mikroskopische Kontrolle um festzustellen, ob die Zellen bereits als Einzelzellen vorlagen. War dies nicht der Fall, so wurden die Zellen wahlweise durch eine Kanüle gezogen oder zuvor nochmals fester aber doch behutsam abgeklopft. Lagen die Zellen einzeln vor, wurden diese in DMEM aufgenommen, die Flasche gut gespült, auf und

abpipettiert und diese im benötigten Verhältnis (1:2, 1:5, 1:10, 1:20) auf die Zellkulturflaschen verteilt. Ein Schwenken der Flasche zum Abschluß sollte einer gleichmäßigen Verteilung der Zellen dienen.

3.2. Bestimmung von HBsAg, HBeAg und HBV-DNA

3.2.1. HBsAg-Bestimmung

Die Bestimmung des HBsAg erfolgte aus Zellkulturüberständen am Architect i 1000 SR mittels des Architect HBsAg Reagent Kit der Firma Abbott Diagnostics. Diesem Kit liegt als Nachweisverfahren des HBsAg ein Chemolumineszenz-Immunoassay zu Grunde. Dabei wurden in einem ersten Schritt die zu vermessenden Proben mit monoklonalen Anti-HBs-beschichteten Mikropartikeln zusammengebracht. In der Probe vorliegendes HBsAg band über die Anti-HBs-Beschichtung an die Mikropartikel. Es erfolgte ein Waschschrift und im Anschluss die Zugabe von Acridinium-markiertem Anti-HBs-Konjugat. Es wurde erneut mit Waschpuffer gewaschen und zum Reaktionsgemisch nun eine Pre-Trigger Lösung als auch eine Triggerlösung hinzugegeben. Die durch die chemische Reaktion entstandene Lumineszenz wurde gemessen und über eine Kalibrationskurve die HBsAg-Probenkonzentration in IU/ml ermittelt. Ab einem Probenwert von 0,05 IU/ml wurden diese als reaktiv gewertet.

3.2.2. HBeAg-Bestimmung

Auch der Nachweis von HBeAg aus Zellkulturüberständen wurde am selben Gerät wie die Bestimmung des HBsAg unter Verwendung des Architect HBeAg Reagent Kit durchgeführt. Dabei folgte das Testprinzip der HBeAg-Bestimmung dem der HBsAg-Bestimmung. Dementsprechend fanden hier Anti-HBe beschichtete Mikropartikel ihren Einsatz. Der Nachweis über vorhandenes HBeAg erfolgte über einen Vergleich der chemischen Lichtreaktion der Proben zum kalibrierten Cut-off-Wert des Gerätes. Die angegebenen Einheiten waren Sample/Cut-off-Wert (S/Co), wobei eine positive Probe ab dem S/Co-Wert von 1,0 gegeben war.

3.2.3. HBV-DNA-Bestimmung

3.2.3.1 Nukleinsäureisolation

Die Isolierung der DNA aus den Proben, die entweder sofort weiterverarbeitet oder aber bei -20°C zwischengelagert wurden, erfolgte mittels des QIAamp DNA Blood Mini Kit. Hierzu wurde wie folgt vorgegangen: $200\ \mu\text{l}$ der Probe wurden mit $20\ \mu\text{l}$ Proteinase K, $190\ \mu\text{l}$ AL-Lysis-Puffer und, zum Nachweis eventuell vorhandener PCR-Inhibitoren, $10\ \mu\text{l}$ Volvox-DNA-haltiger Kontrolle (10^5 Kopien/ $5\ \mu\text{l}$, dies entspricht im Endansatz 10^4 Kopien) in einem Eppendorf-Gefäß vermischt und für 10 Minuten bei $56\ ^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Probe wurde kurz zentrifugiert und nach Zugabe von $200\ \mu\text{l}$ Ethanol mit dem Vortex durchmischt. Die Lösung wurde nun in ein Filter-Tube, ein sogenanntes Spin-Column, überführt und für 1 min. bei $8000\text{U}/\text{min}$ zentrifugiert. Dabei verblieb die DNA im Filter des Gefäßes, der Durchlauf konnte verworfen werden. An diesen Schritt schlossen sich zwei Waschschrte an: zuerst mit $500\ \mu\text{l}$ AW1-Puffer und einer Zentrifugation für 1 min. bei $8000\ \text{U}/\text{min}$, dann mit $500\ \mu\text{l}$ AW2-Puffer und einer Zentrifugation für 3 min. bei $14000\ \text{U}/\text{min}$. Zum Abschluss erfolgte die Elution der gewaschenen DNA durch die Zugabe von $100\ \mu\text{l}$ AE-Puffer und erneuter Zentrifugation bei $8000\ \text{U}/\text{min}$ für 1 Minute. Die nun im Eluat vorliegende DNA wurde bis zur Durchführung der Real-time-PCR im Gefrierschrank bei $-20\ ^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.3.2 Prinzip der Real-time PCR

Bei der Real-time-PCR mittels TaqMan-Sonden zur Bestimmung der HBV-DNA wurde auf ein bereits etabliertes System zurückgegriffen (Weinberger et al. 2000). Das Prinzip beruht auf einer Vervielfältigung der vorhandenen Nukleinsäuren, die durch Verwendung fluorogener Hydrolyse-Sonden detektiert werden kann. Diese Sonden weisen die komplementäre Basenfolge der nachzuweisenden DNA auf und bestehen aus einem Oligonukleotid, an dessen $5'$ -Ende ein sogenannter Reporter-Farbstoff (im konkreten Fall: 6-FAM, 6-Carboxyfluorescein mit der Absorptionswellenlänge von $495\ \text{nm}$ und der Emissionswellenlänge von $517\ \text{nm}$) kovalent gebunden ist, der bei Anregung Lichtwellen aussendet. Dieses emittierte Licht wird, bei ausreichender räumlicher Nähe zum zweiten Fluorophor, vom sog. Quencher (speziell hier: TAMRA, 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin), einem ebenfalls kovalent gebundenem Farbstoff am $3'$ -Ende des Oligonukleotids, dessen Absorbtionsspektrum dem Emissionsspektrum des

Reporters entspricht, aufgenommen. Es erfolgt also eine Energieübertragung, ein sog. Fluoreszenz Resonance Energy Transfer (FRET).

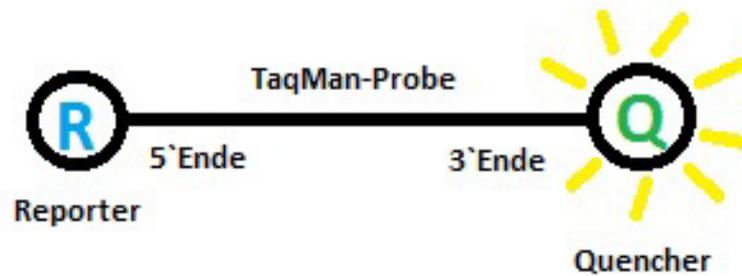


Abb.7: Bei ausreichender räumlicher Nähe nimmt der Quencher (Q) das vom Reporter-Farbstoff (R) ausgesendete Licht auf (modifiziert nach Dan Pierce)

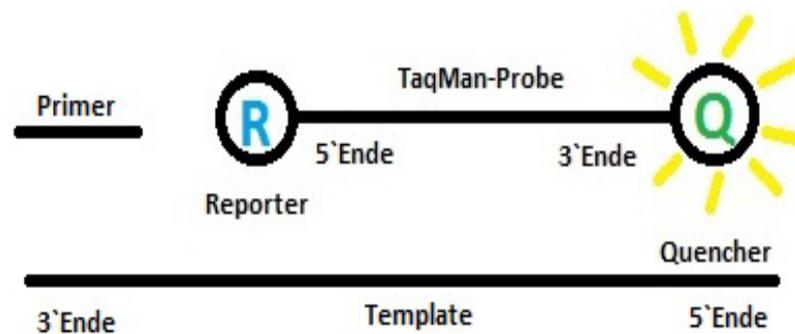


Abb.8: Die TaqMan®-Probe und der Primer binden an die Ziel-DNA. Durch die Bindung des Primers kann ein komplementärer DNA-Strang entstehen (modifiziert nach Dan Pierce)

Nun macht man sich die 5',3'-Exonukleasaktivität der Taq-Polymerase zu Nutze, die bei der Verlängerung der Nukleinsäuren dafür sorgt, dass es durch Hydrolyse zu einer räumlichen Trennung von Reporter und Quencher kommt. Diese Trennung hatte unmittelbar zur Folge, dass das vom Reporter emittierte Licht nicht mehr vom Quencher absorbiert wird und das Fluoreszenzsignal nun detektiert werden kann. Die gemessene Fluoreszenz ist dabei direkt proportional zur Menge des neu entstandenen PCR-Produktes.

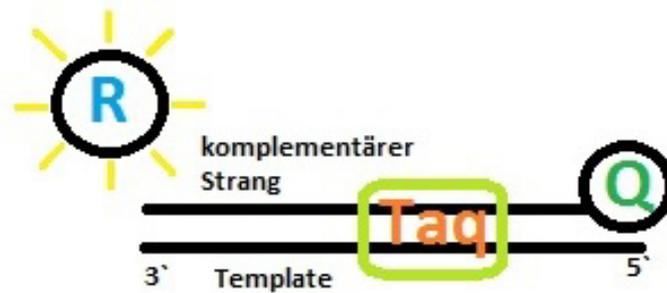


Abb.9: Der Reporter-Farbstoff wird durch die Verlängerung des DNA-Doppelstranges durch die Taq-Polymerase verdrängt. Durch diese räumliche Trennung kann nun das vom Reporter-Farbstoff ausgesendete Licht detektiert werden (modifiziert nach Dan Pierce)

3.2.3.3 Durchführung der Real-time PCR in der Praxis

Erste Schritte bei der Durchführung der PCR waren die korrekte Einstellung des PCR-Gerätes, die Erstellung eines Belegungsplanes, sowie die Berechnung der an Reagenzien benötigten Mengen. Waren diese Schritte abgeschlossen, wurde der PCR-Mastermix mit in der nachfolgenden Tabelle beschriebenen Komponenten zusammengestellt und anschließend in eine Optical-96-Well-Platte (Barcode) für StepOne Plus pipettiert.

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
H ₂ O (µl)	Carl Roth, Karlsruhe	
TaqMan 2xUniversal PCR-Master Mix No AmpErase® UNG	Roche für Applied Biosystems	
Primer: HBV Taq 1 (8µM)	Metabion, Martinsried	300 nM
Primer: HBV Taq 2 (8µM)	Metabion, Martinsried	300 nM
Sonde: HBV Taq So (8µM)	Metabion, Martinsried	200 nM

Mastermix Volumen/Ansatz	25 µl
Template Zugabe je Ansatz	5 µl
Volumen Gesamtansatz	30 µl

Tab.3: Komponenten des PCR-Mastermix zur HBV-SAg-Bestimmung

Primer und Sonden wiesen dabei folgende Eigenschaften auf:

S-Ag-Assay	Sequenz der Primer und Sonden	Länge	Richtung
HBV-S-Ag 1	nt 321 – nt 342 5`-CAA CCT CCA ATC ACT CAC CAA C-3`	22 bp	+/+
HBV-S-Ag Sonde	nt 349 – nt 374 5`-FAM-TCC TCC AAY TTG TCC TGG TTA TCG CT-TAMRA-3`	26 bp	+/+
HBV-S-Ag 2	nt 401 – nt 379 5`-ATA TGA TAA AAC GCC GCA GAC AC-3`	23 bp	+/-

Zu diesem Ansatz wurden jeweils 5 µl der zu bestimmenden Probe beigefügt, die im Vorfeld am Vortex durchmischt und anschließend kurz anzentrifugiert wurden. Die 96-Well-Platte wurde mit 8-optical caps verschlossen und bei 1000 rpm und Raumtemperatur für 1 Minute zentrifugiert. In den Real-time PCR-Cycler eingebracht, erfolgte die Quantifizierung der Nukleinsäuren in der Micro-AMP-Platte nach dem 30 µl TaqMan Standard-Schema:

Temperaturprofil 30 µl TaqMan Standard	
Stufe 1 1 Zyklus	95°C / 10 Minuten
Stufe 2 45 Zyklen	95°C / 15 Sekunden (Denaturierung) 60°C / 1 Minute (Annealing und Extension)

Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte über die in der folgenden Tabelle angegebenen Messkanäle:

Messkanäle
Filter 1 FAM™ dye ($\lambda = 520$ nm) (Reporter Dye)
Filter 3 TAMRA™ dye ($\lambda = 580$ nm) (Quencher Dye)
Filter 4 ROX™ dye ($\lambda = 610$ nm) (Passive Reference)

Darüber hinaus wurden als Standards folgende Verdünnungen des Plasmids pHBV 991 verwendet: 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 Kopien/Ansatz jeweils als Doppelwert und 10^4 , 10^6 Kopien/Ansatz als Einzelwert. Die Auswertung erfolgte mit StepOne Software Version 2.1.

3.3. Inhibitionsversuche mit IFN γ und TNF α

3.3.1. HBsAg-, HBeAg-, HBV-DNA-Produktion

Um sich einen ersten Eindruck von der Produktivität der Hep G 2.2.15 Zelllinie zu verschaffen, wurde über 8 Tage hinweg etwa in 24-stündigem Abstand 1 ml Zellkulturüberstand aus den 75 cm²-Zellkulturflaschen entnommen und durch 1 ml frisches Medium ersetzt. Aus dem gewonnenen Überstand erfolgte die Bestimmung von HBsAg, HBeAg und HBV-DNA.

3.3.2. Vorbereitung der Zytokine

Die für die Versuche verwendeten Zytokine, rhIFN γ und rhTNF α , wurden im lyophilisierten Zustand geliefert, sodass diese, in Abhängigkeit von der Ausgangsmenge, vor Versuchsbeginn mit sterilem PBS auf eine Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt wurden. Dazu wurde das Cup in der Tischzentrifuge zentrifugiert, dann die berechnete Menge PBS hinzugegeben und etwa 5 Minuten eine Auflösung des Zytokins abgewartet und schließlich noch, zur Durchmischung, auf- und abpipettiert. Das gelöste Zytokin wurde in Aliquoten bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Wurde das Zytokin benötigt, so wurde es aus dem Gefrierschrank entnommen, aufgetaut und mit 500 μl DMEM versetzt. Durch diese weitere Verdünnung lag eine Konzentration

von 1 ng/ μ l vor. In dieser Dilution war es schließlich möglich das Zytokin in den gewünschten Konzentrationen in den nachfolgend beschriebenen Versuchen zu verwenden.

3.3.3. Aussaat der Zellen in 6-Well-Platten

Beim Aussäen der Zellen in 6-Well-Platten wurde wie folgt vorgegangen: Waschen mit PBS, Zugabe von Trypsin, Zwischenlagerung im Brutschrank, Abtrypsinierung. Im Anschluss daran erfolgte die Aufnahme in steriles PBS und die Überführung in ein bereits mit vorgelegtem PBS befülltes Falcontube. Nun wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute ohne Bremse zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nach Abgießen des Überstandes gelockert, in Kulturmedium resuspendiert und die Anzahl an Lebendzellen bestimmt. Bevor jedoch die Zellsuspension und die benötigte Menge Zytokine in die 6 Well-Platten pipettiert wurden, wurde zuerst das Medium vorgelegt. Zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen und des Zytokins wurde die Platte nochmals vorsichtig geschwenkt und dann in den Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ gestellt. Die Zellzahl wurde dabei den Versuchsmodalitäten angepasst. Das Endvolumen der 6-Well-Platten betrug 3 ml.

3.3.4. Bestimmung der Lebendzellzahl

Hierfür wurde eine 1:10 Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau hergestellt. Der Farbstoff drang in die avitalen Zellen ein und färbte diese blau. Die intakten Zellen dagegen blieben farblos und wurden unter dem Mikroskop gezählt. Ausgezählt wurden vier große Quadrate, wiederum bestehend aus 16 kleinen Quadraten, der Neubauer-Zählkammer. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel

Mittelwert der Zellzahl in 4 Großquadraten x Verdünnungsfaktor = Zellzahl x 10⁴ / ml.

3.3.5. Einfluss von Zytokinen auf die HBV-Produktion

Hier soll die Frage untersucht werden, ob auch durch alleinige Zugabe von Zytokinen zum Kulturmedium eine Auswirkung auf die Produktivität der Zellkulturen auszumachen ist, oder ob dazu weitere, von immunologischen Zellen produzierte Faktoren nötig sind. Dazu werden im Folgenden zuerst die für diesen Versuch unterschiedlichen Ansätze erläutert.

3.3.5.1. Ausgangsbedingungen

In einem ersten Anlauf zur Austestung des Einflusses der Zytokine auf die Produktion von HBsAg, HBeAg und HBV-DNA durch die Hep G 2.2.15-Zellen wurden, gemäß vorheriger Beschreibung, die Zellen in 6-Well-Platten in einer Anzahl von $1,6 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Die Zytokine IFN γ und TNF α wurden dem Versuchsansatz in den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml und 20 ng/ml sofort hinzugefügt. Das Endvolumen im Well betrug 3 ml. Die Kulturdauer wurde auf 96 Stunden angelegt, wobei alle 24 Stunden eine Abnahme von 1 ml Zellkulturüberstand vorgenommen wurde. Diese für die Bestimmung der HBV-Komponenten abgenommene Probe wurde durch die entsprechende Menge an frischem Medium und Zytokin ersetzt.

3.3.5.2. Modifizierte Versuchsbedingungen

In einem leicht veränderten Ansatz wurden die Zellen der Hep G 2.2.15 Zelllinie in 6-Well-Platten ausgesät und bevor noch die Zytokinzugabe erfolgte, bei 3 ml Volumen bis zur vollständigen Konfluenz des Zellrasens kultiviert. Das verbrauchte Medium wurde vollständig durch frisches Medium ersetzt. Dabei erfolgte auch die Zugabe der Zytokine. Die Kultur wurde über 48 h weiter geführt. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurde der Zellkulturüberstand untersucht. An IFN- γ -Konzentrationen wurden hinzugegeben: 10 ng/ml, 20 ng/ml, 40 ng/ml, 100 ng/ml.

3.4. Einfluss HBV-un/geimpfter Spender-PBMC auf die Zellkultur

Nachdem bisher der Einfluss der Zytokine auf die Zellkultur im Fokus stand, wurde nun die Wirkung der peripheren mononukleären Blutzellen auf die Zellkultur analysiert. In 3-fach Ansätzen wurde der Effekt der PBMC von geimpften und ungeimpften Spendern auf die Produktivität der Zellkulturlinien untersucht, indem diese, nur durch die semipermeable Membran eines Zellkultureinsatzes voneinander getrennt, für 48 h kokultiviert wurden und dann eine Vermessung von HBsAg, HBeAg und HBV-DNA des Kulturüberstandes erfolgte.

Hierfür wurden, wie wiederum schon in vorhergehenden Versuchen beschrieben, Zellen der Hep G 2.2.15 Zellkultur in 6 Well-Platten ausgesät und das Erreichen eines konfluenten Zellrasens abgewartet. Waren die Zellen dicht gewachsen, wurde das

Medium gewechselt, Zellkultureinsätze wurden in die Wells eingehängt, PBMC wurden aufgetaut und so verteilt, dass sich in jedem ThinCert auf 3 ml T-Zell-Medium 2×10^6 Zellen befanden. Nach 48 h wurde die Kokultur beendet, der Überstand gesammelt und ausgewertet.

3.5. Humanes IgG, poly- und monoklonales Anti-HBs und Zellkultur

3.5.1. Überblick über verwendete Reagenzien

3.5.1.1. Humanes IgG

Als humanes IgG wurde das Beriglobin von CSL Behring verwendet. Dieses enthält 160 mg Protein vom Menschen. Der Anteil an Immunglobulin G beträgt dabei 95 %. Die Verteilung der IgG-Subklassen war wie folgt:

IgG₁ ca. 61 %, IgG₂ ca. 28 %, IgG₃ ca. 5 % und IgG₄ ca. 6 %. Weitere, aber für die Zellkultur irrelevante Bestandteile sind dem Datenblatt zu entnehmen. Eine eigene Bestimmung der Proteinmenge lieferte einen Wert von etwa 107 mg/ml. Die Bestimmung des Anti-HBs-Titers am Architect ergab ca. 1,93 IU/ml.

3.5.1.2. Polyklonales Anti-HBs

Das polyklonale Hepatitis-B-Immunglobulin (HBIG) wurde ebenfalls über Behring bezogen und zeichnete sich durch folgende Angaben aus: 1 ml enthielt 100–170 mg Hepatitis-B-Immunglobulin vom Menschen, davon mindestens 95 % Antikörper gegen HBs-Antigen. Der Anti-HBs-Titer wurde mit mindestens 200 IU/ml angegeben. Die weiteren Bestandteile entsprechen denen des humanen IgG. Die selbst vorgenommene Proteinmessung ergab einen Wert von 107 mg/ml. Die Vermessung des Anti-HBs-Titers am Architect lieferte ein Ergebnis von etwa 227 IU/ml.

3.5.1.3. Monoklonales Anti-HBs

Das monoklonale Anti-HBs vom IgG1-Isotyp wurde über antikoerper-online.de erworben. Die Spezifität schloss alle 4 Subtypen (adr, adw, ayr und ayw) ein. Die vom Hersteller angegebene Proteinmenge von 3 mg/ml konnte in eigenen Messungen bestätigt werden. Der Anti-HBs-Titer wurde mit 123 IU/ml beziffert. Zur Konservierung enthielt dieser Antikörper 0,1% (w/v) Natriumazid, das einen negativen

Einfluss auf die Zellkultur ausüben könnte. Um diesen Effekt zu ermitteln wurde in den Versuchsansätzen sowohl der Antikörper in der vorliegenden Form, als auch in entsalzter Variante (Anti-HBs-Titer: 0,7 IU/ml) eingesetzt. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine Natriumazid-Verdünnung erstellt und diese in der gleichen Konzentration wie im Antikörper eingesetzt.

3.5.2. Versuchsdurchführung

Der Versuchsaufbau lehnt sich, von kleineren Veränderungen abgesehen, sehr stark an die zuvor beschriebenen Inhibitionsversuche an. Deshalb wird hier auf eine ausführliche Darstellung verzichtet und lediglich auf die Abänderungen hingewiesen:

es wurden Zellen der Hep G 2.2.15 Zelllinie in 12-Well- anstatt von 6-Well-Platten ausgesät. Aufgrund der geringeren Maße der einzelnen Well wurde sowohl die ausgesäte Zellzahl auf 4×10^5 Zellen als auch das Endvolumen auf 2 ml reduziert. Außerdem wurden die Zusätze sofort und nicht erst nach Konfluenz des Zellrasens hinzugegeben. Die in Bezug auf die IgG-Menge im Versuch eingesetzten Verdünnungen waren: 1:20000, 1:2000, 1:200, 1:100, 1:20 und 1:10. Nach 3 Tagen wurde der komplette Überstand gesammelt und schließlich sowohl das HBeAg als auch die HBV-DNA bestimmt.

In einem ersten Versuchsansatz wurde dabei in Zweifachansätzen erst der Einfluss von humanem IgG, poly- und monoklonalem Antikörper sowie einer Natriumazidlösung auf die Zellkultur untersucht. Danach erfolgte ein Ansatz mit monoklonalem Anti-HBs, Natriumazidlösung, sowie jeweils der entsalzten Komponente der beiden Agenzien.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der verwendeten Hepatomzellen

Um sich einen ersten Überblick über Eigenschaften und Produktivität der verwendeten Hep G 2.2.15 Zellen zu verschaffen, wurde zu Beginn dieser Arbeit Virussynthese und Produktion viraler Proteine der Hepatomzellen untersucht. Diese Charakterisierung erfolgte sowohl mit den bereits am Institut vorhandenen Hep G 2.2.15-Zellen (Hep G 2.2.15 R) als auch mit einer Hep G 2.2.15-Zellkulturlinie, die freundlicherweise vom Helmholtz Zentrum München zur Verfügung gestellt wurde (Hep G 2.2.15 MUC). Nach Splitten der Zellen wurde über 8 Tage hinweg täglich 1 ml Zellkulturüberstand abgenommen und durch 1 ml frisches Medium ersetzt. Aus diesen Dreifach-Ansätzen erfolgte die Bestimmung der Durchschnittswerte von HBsAg, HBeAg und HBV-DNA. Wie die Abbildungen 10 und 11 zeigen, kam es in beiden Zelllinien zu deutlichen Zunahmen im HBsAg und HBeAg, wobei die HBsAg-Produktion in beiden Zelllinien von Tag 1 auf Tag 7 anstieg (in den Hep G 2.2.15 von 3,3 IU/ml auf 56,2 IU/ml, in den Hep G 2.2.15 MUC von 1,4 IU/ml auf 35,4 IU/ml) In der Produktion von HBeAg und HBV-DNA unterschieden sich die beiden Zelllinien deutlich: von Tag 1 auf Tag 7 stieg die HBeAg-Produktion in den Hep G 2.2.15 R von 1,1 IU/ml auf 3,3 IU/ml, in den Hep G 2.2.15 MUC von 3,2 IU/ml auf 22,4 IU/ml. Ähnlich verhielt es sich mit der Neubildung von HBV-DNA: während die Hep G 2.2.15 R-Zellen relativ konstant im Mittel ca. $5,5 \times 10^5$ DNA-Kopien pro Tag produzierten, stieg die DNA-Produktion der Hep G 2.2.15 MUC-Zellen im Verlauf von 7 Tagen von $4,9 \times 10^5$ auf $21,6 \times 10^5$ Kopien pro Tag. Obwohl es sich bei beiden Zelllinien um Hep G 2.2.15-Zellen handelte, konnten also bzgl. der Produktivität der Einzelkomponenten erhebliche Unterschiede festgestellt werden.

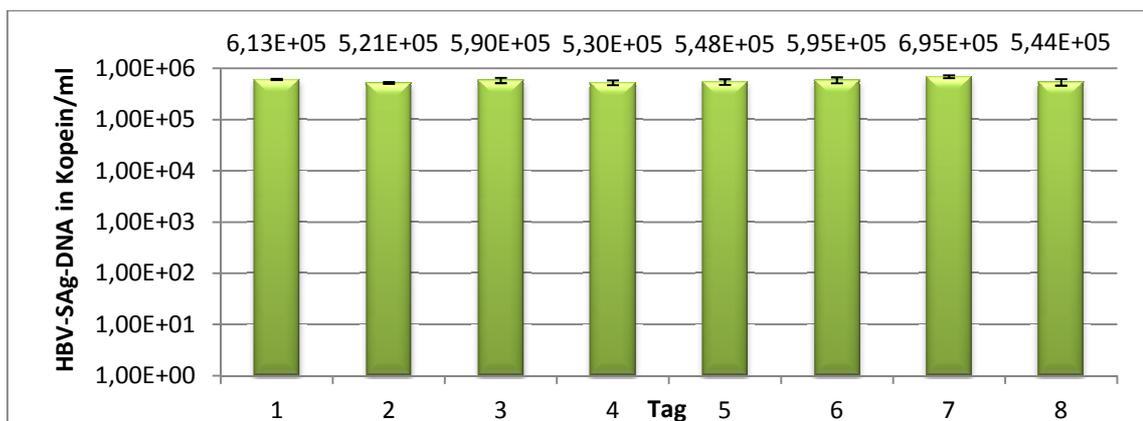
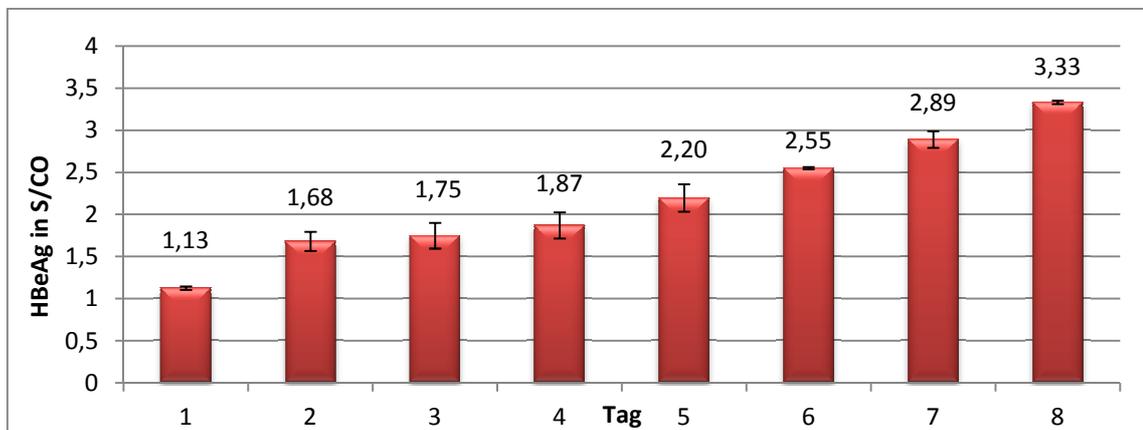
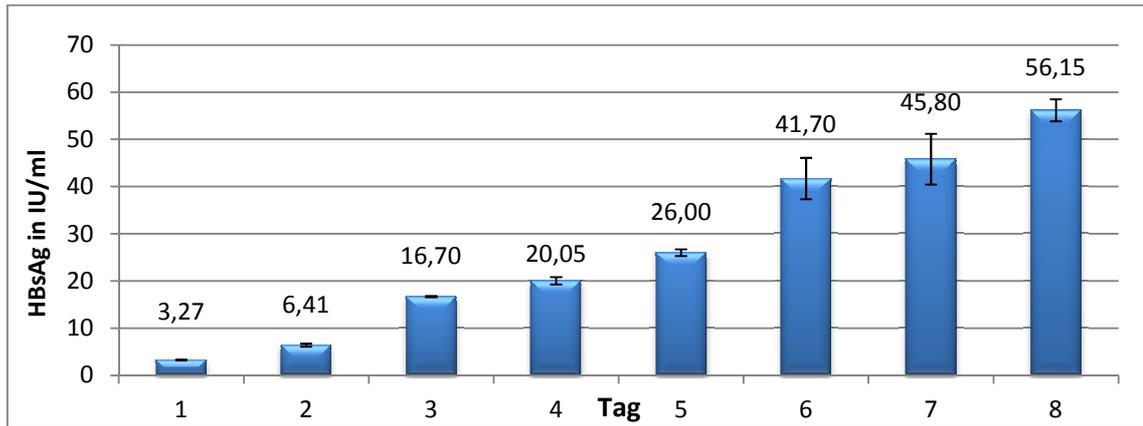


Abb.10: HBsAg-/HBeAg-/HBV-SAg-DNA -Produktion über 8 Tage durch Hep G 2.2.15 R-Zellen

Zum direkten Vergleich nachfolgend die Übersicht über die Produktivität der Hep G 2.2.15 MUC-Zellen :

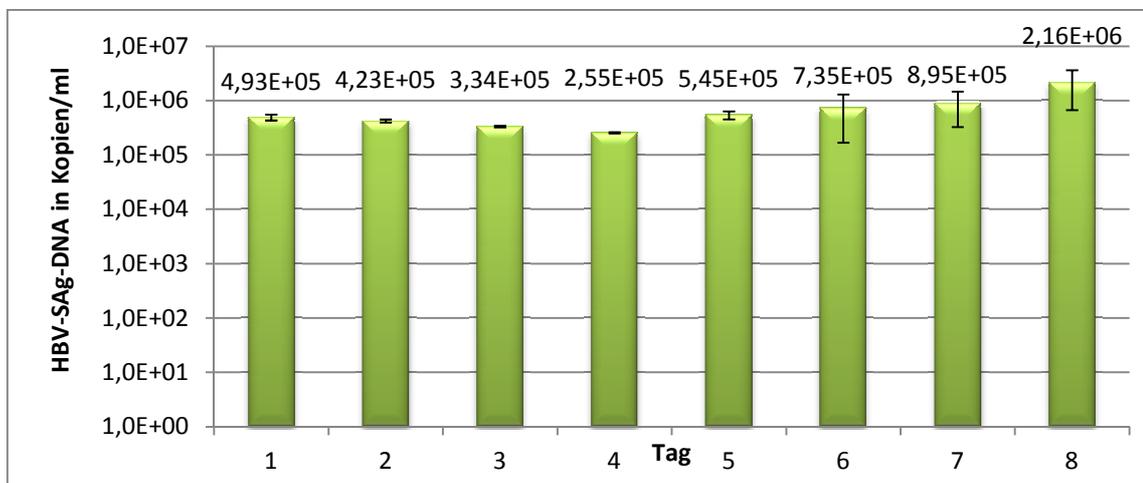
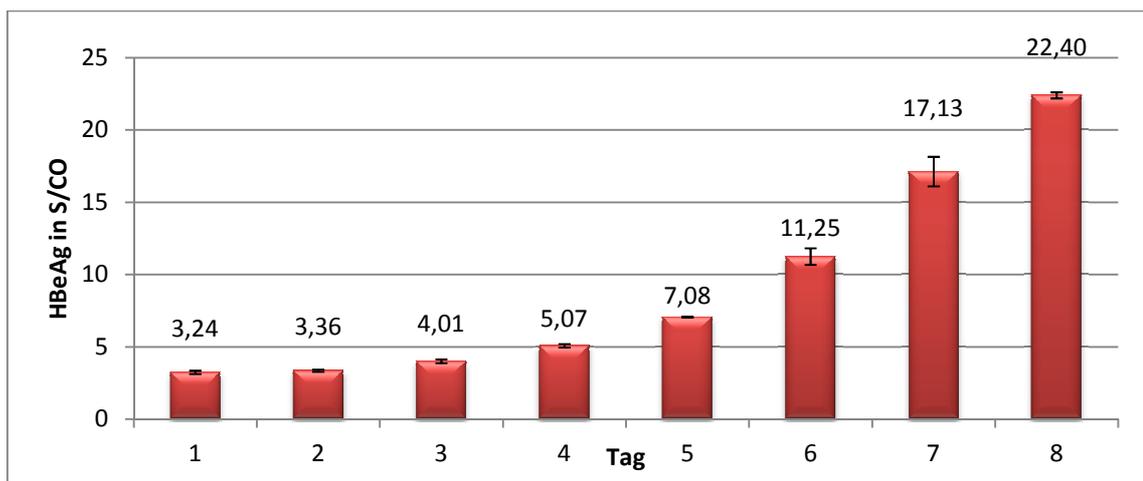
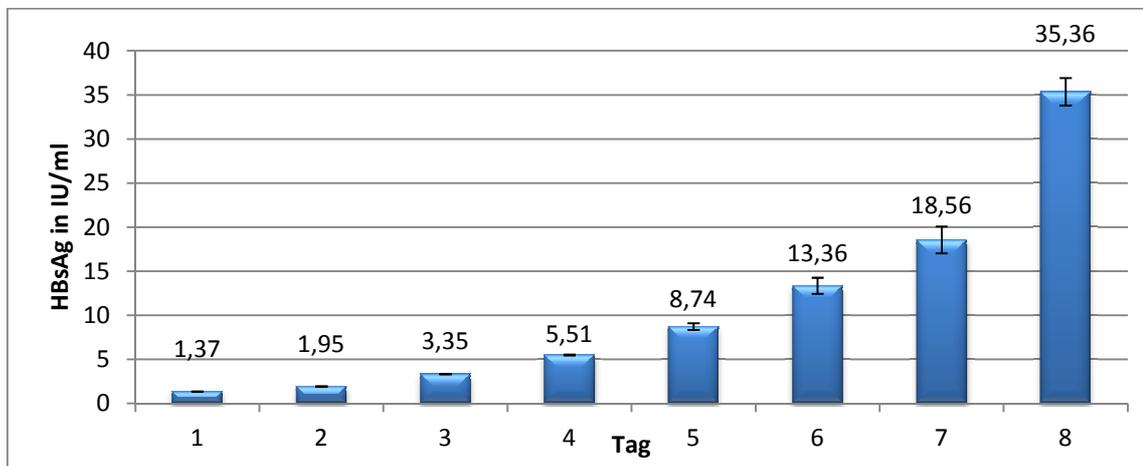


Abb.11:HBsAg/HBeAg/HBV-SAg-DNA-Produktion über 8 Tage durch Hep G 2.2.15 MUC

4.2. Einfluss HBsAg-spezifischer T-Zellen auf Virusreplikation und Virusproteinsynthese der Hepatomzellen Hep G 2.2.15

4.2.1. Einfluss von Zytokinen auf Virusreplikation und Proteinsynthese

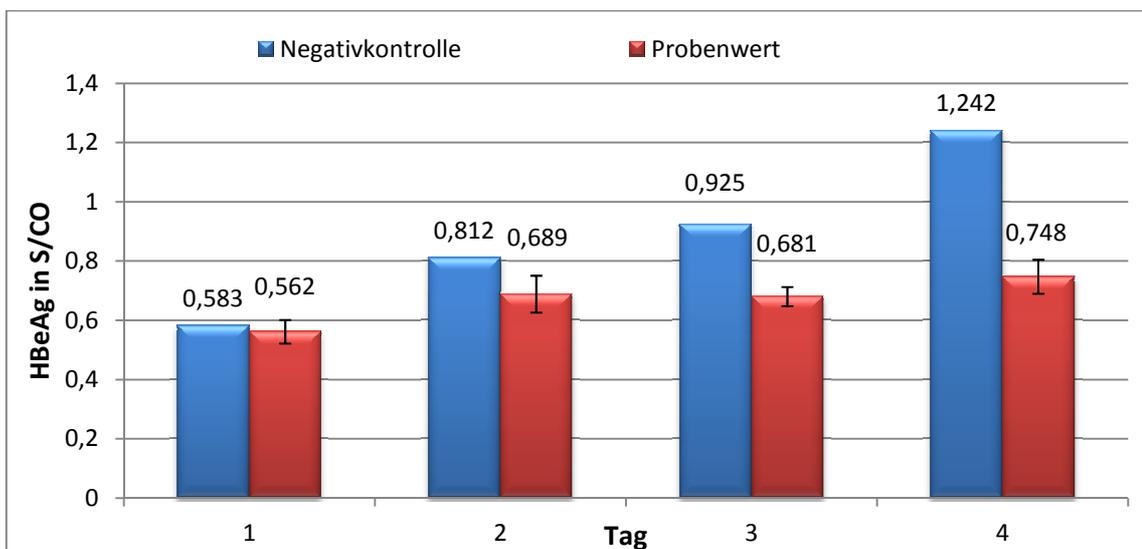
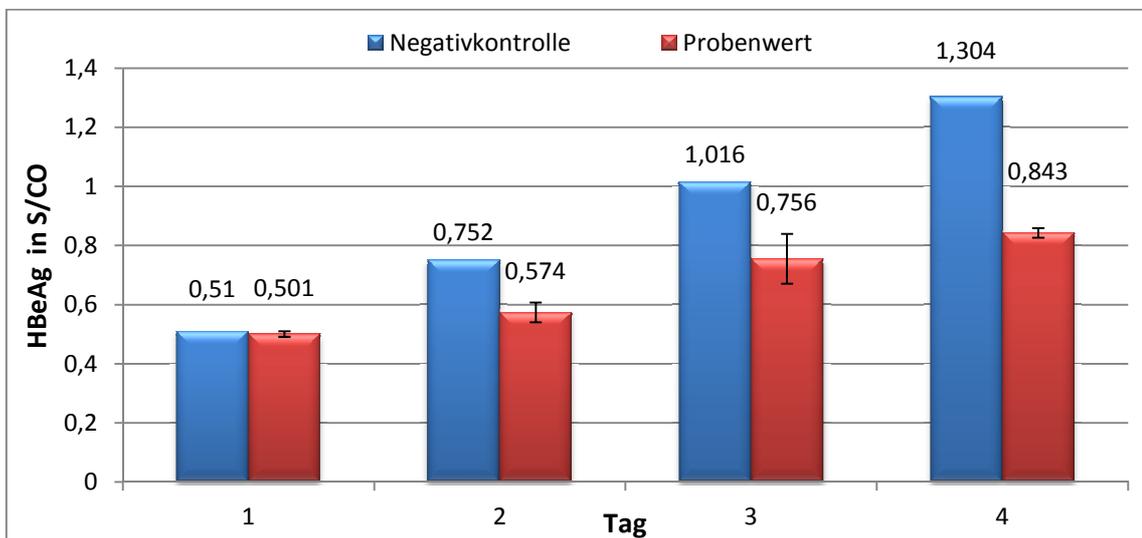
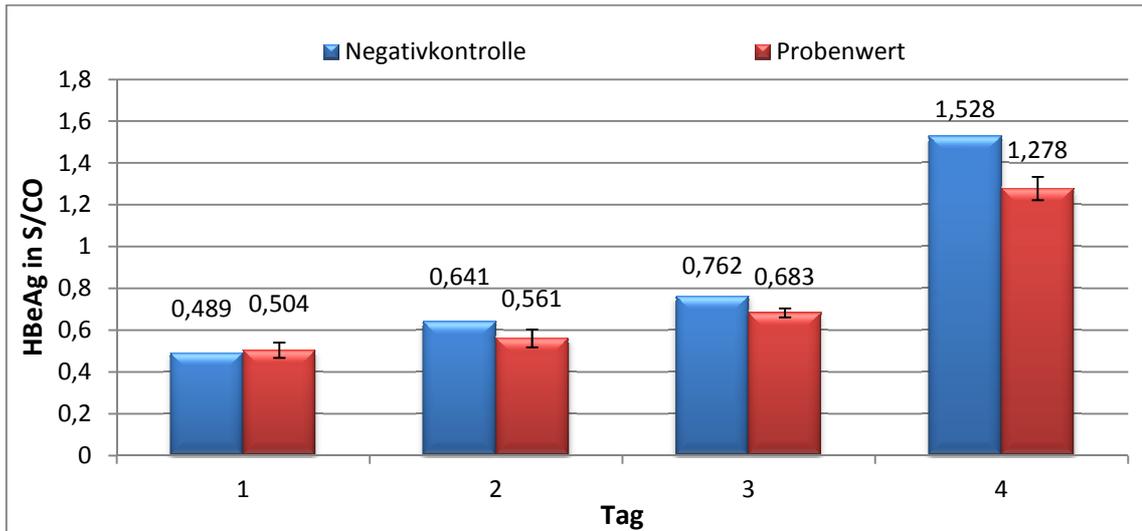
Da ein Einfluss HBsAg-spezifischer T-Helferzellen in erster Linie durch Zytokine ausgeübt werden dürfte, wurde zunächst die Wirksamkeit von IFN γ und TNF α , die beide von Th1-Helferzellen gebildet werden, auf die Virussynthese und Produktion viraler Proteine durch die Hep G 2.2.15-Zellen untersucht.

Mit Aussaat der Zellen erfolgte sogleich die Zugabe von IFN γ , TNF α bzw. von einer Kombination aus beiden Zytokinen in den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml und 20 ng/ml in einem jeweils eigenem Versuchsansatz. Die Negativkontrolle wurde im Einfachwert, die Proben im Dreifachansatz ausgetestet. Unter täglicher Abnahme und Ersatz von 1 ml Medium und der entsprechenden Zytokinmenge wurden die Zellen 4 Tage kultiviert und im Überstand jeweils HBsAg, HBeAg und HBV-DNA bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in den Abbildungen 12-17 gezeigt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Wirkung beider Zytokine sowohl mit der Dauer der Einwirkzeit als auch mit steigender Konzentration zunahm.

Die HBeAg-Produktion wurde von TNF α nur wenig beeinflusst (Abb. 13), die Wirkung von IFN γ auf die HBeAg-Synthese war etwas stärker ausgeprägt (Abb. 12) während die Kombination beider Zytokine bereits in der niedrigsten Konzentration einen deutlichen Effekt auslöste (Abb. 14). Die HBsAg-Synthese wurde besonders durch TNF α gehemmt (Abb. 16). Ein nennenswerter Einfluss auf die HBV-DNA-Synthese konnte mit diesem Ansatz nicht festgestellt werden (Abb. 17), was wohl vor allem auf die im Vergleich zu den Proteinnachweisverfahren geringe Empfindlichkeit gegenüber Konzentrationsveränderungen um einen Faktor ≤ 2 zurückzuführen sein dürfte.

Der stärkste Effekt konnte durch eine Kombination von 10 ng/ml IFN γ und 10 ng/ml TNF α auf die HBeAg-Synthese erzielt werden: am Tag 4 wurde eine Reduktion von knapp 60% erreicht.

Die Tabellen 4, 5, und 6 fassen alle Versuche noch einmal zusammen.

Abb.12: Einfluss von 1/10/20 ng/ml IFN γ auf die HBeAg-Produktion der Hep G 2.2.15

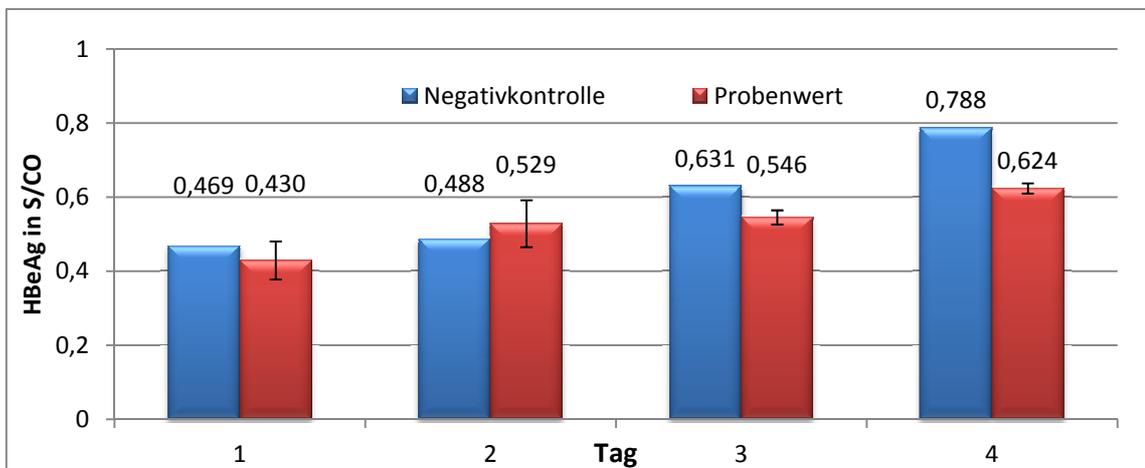
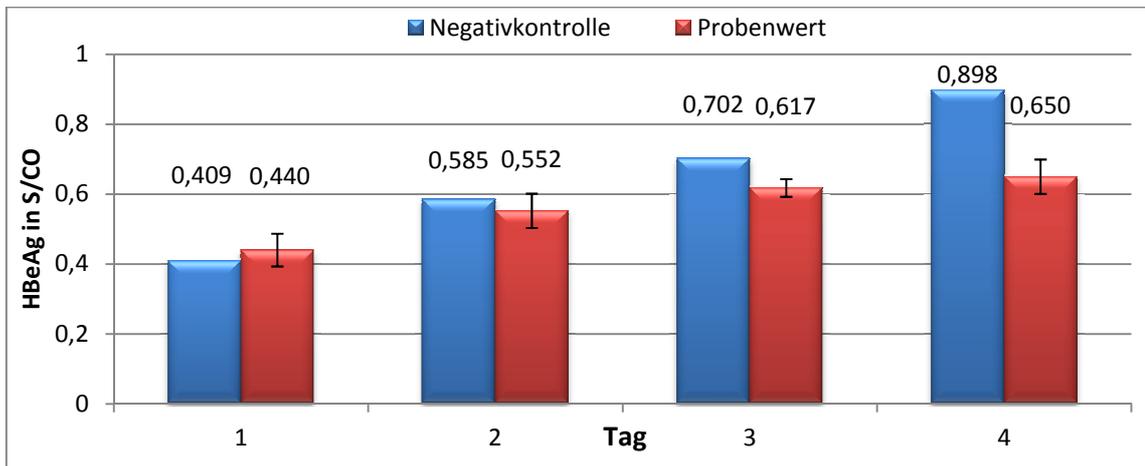
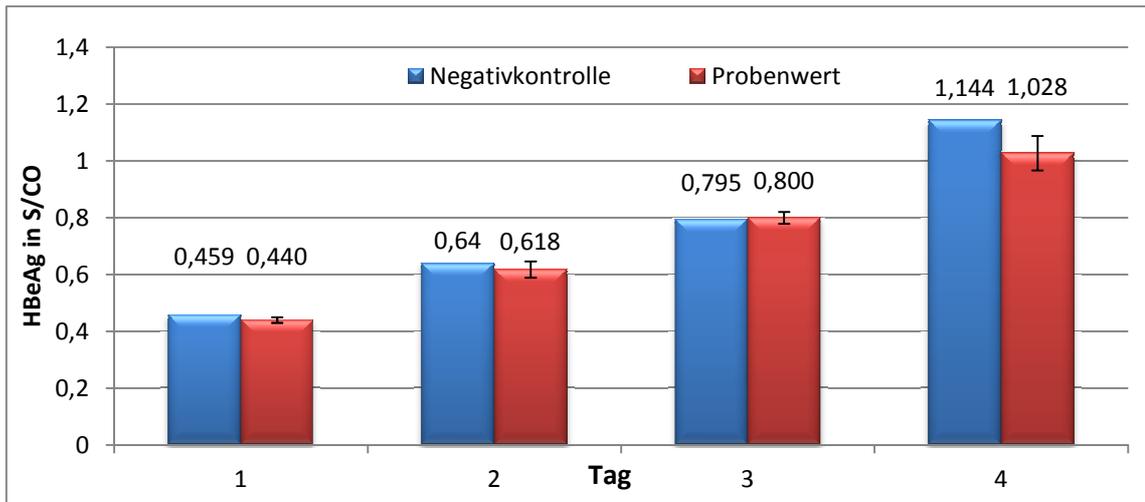
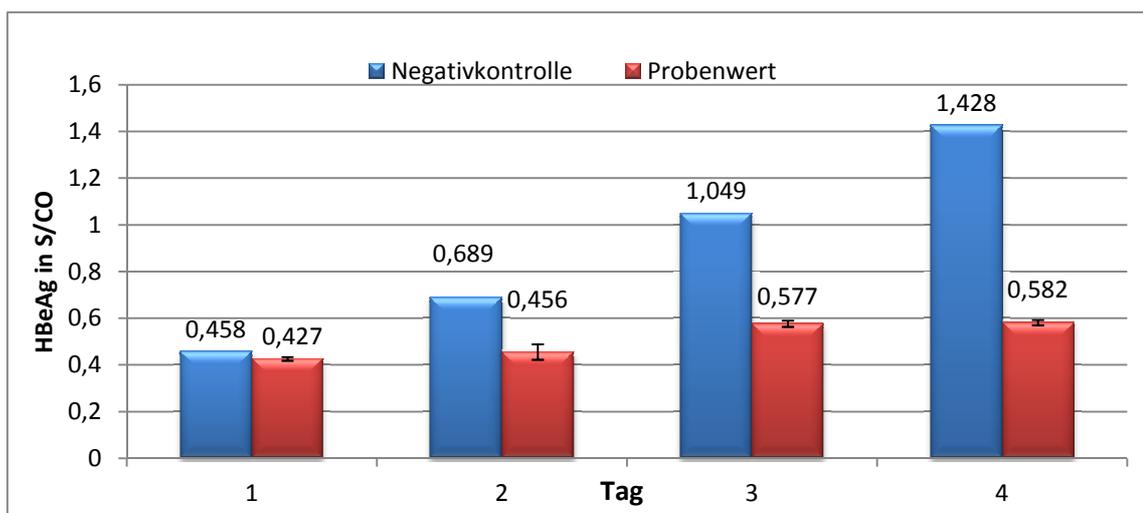
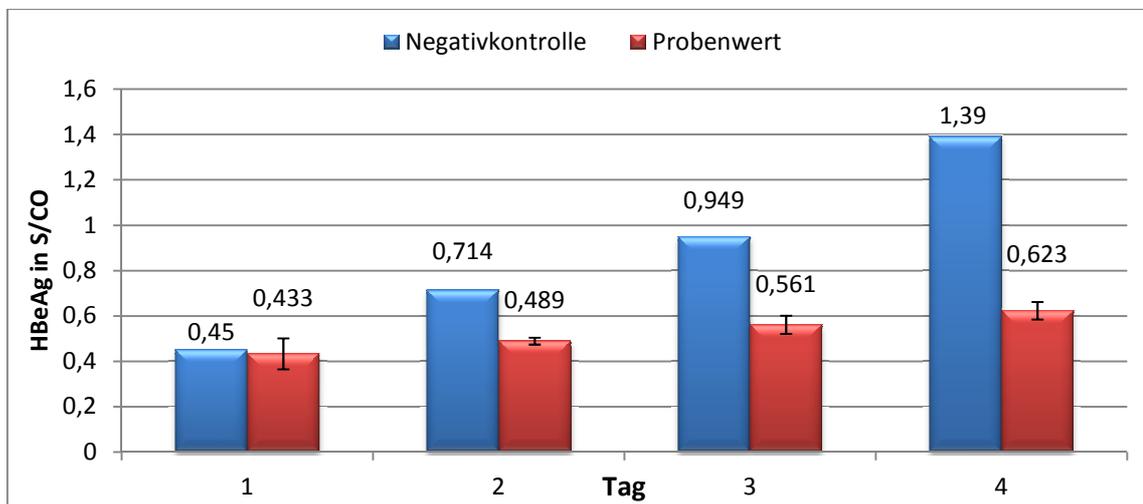
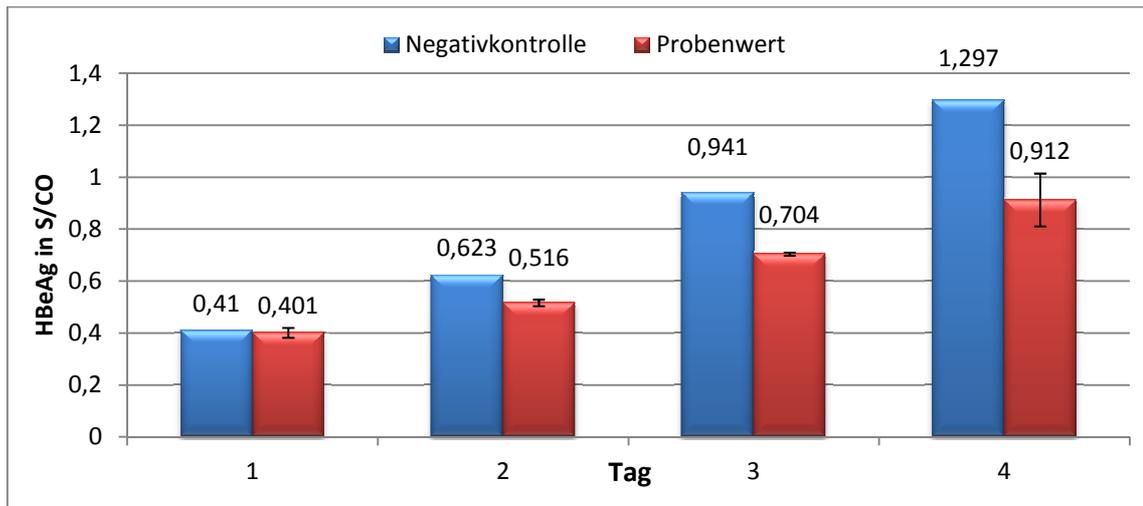
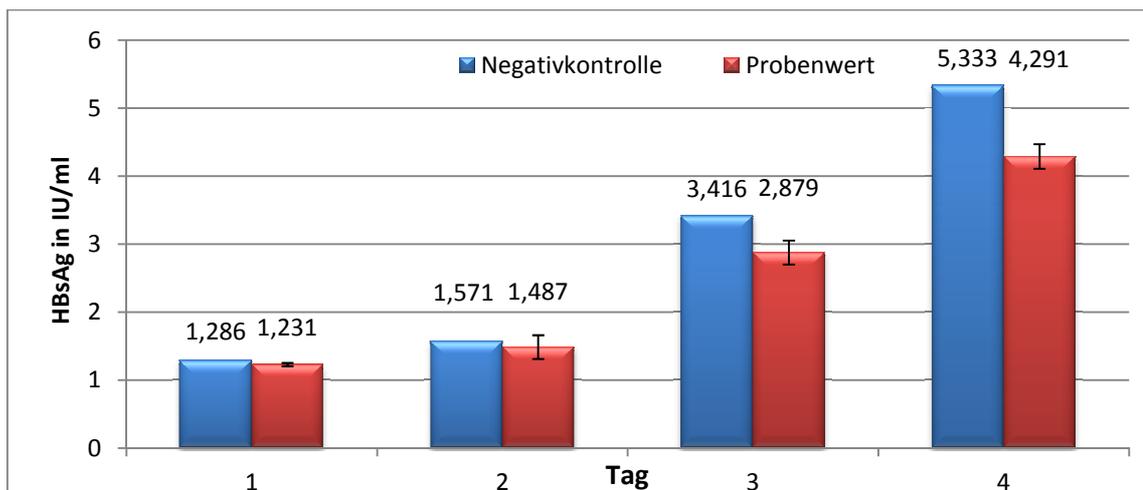
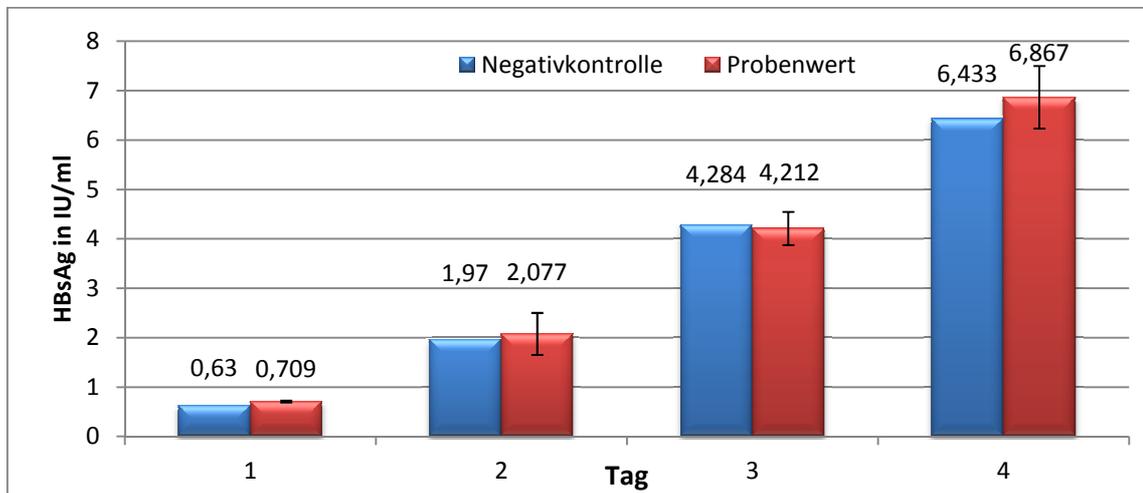
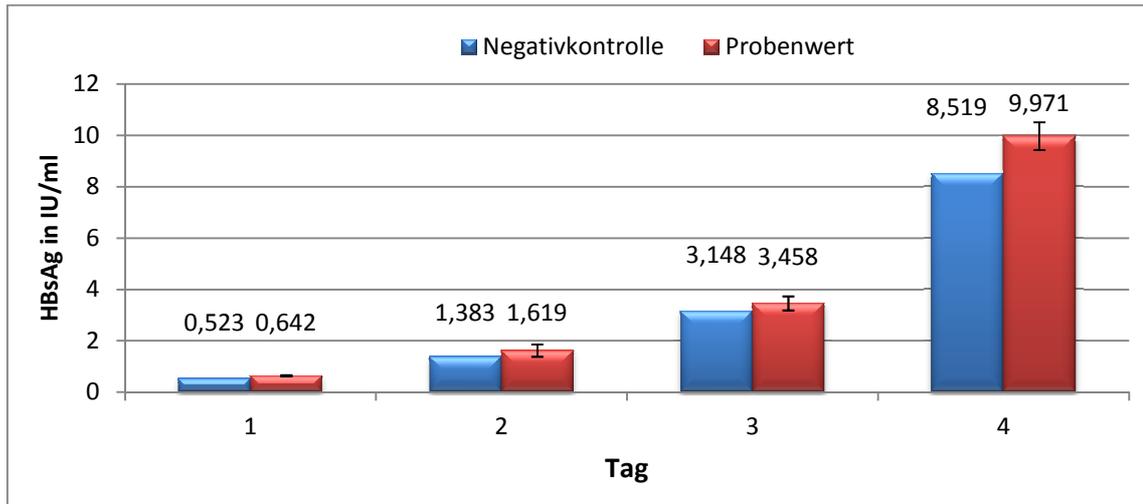
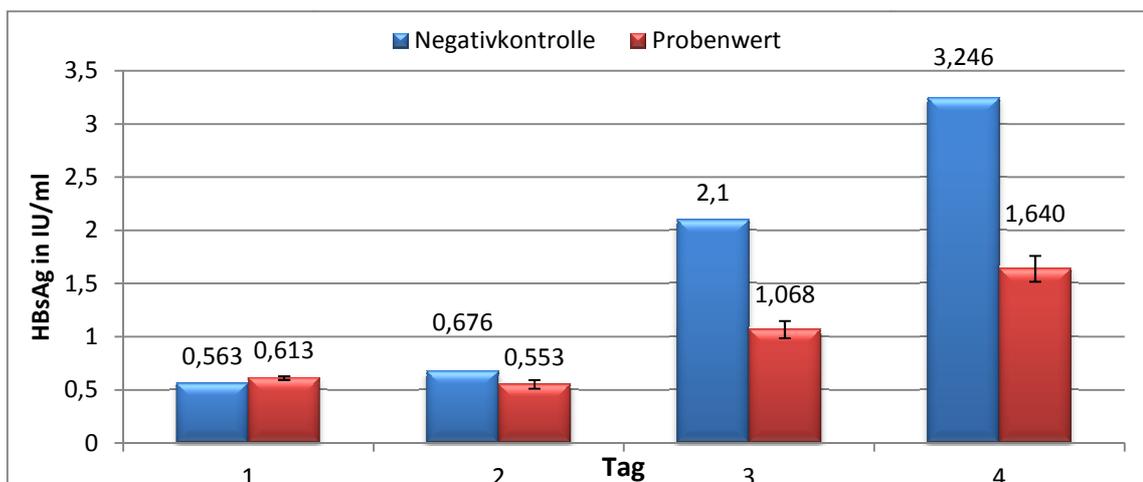
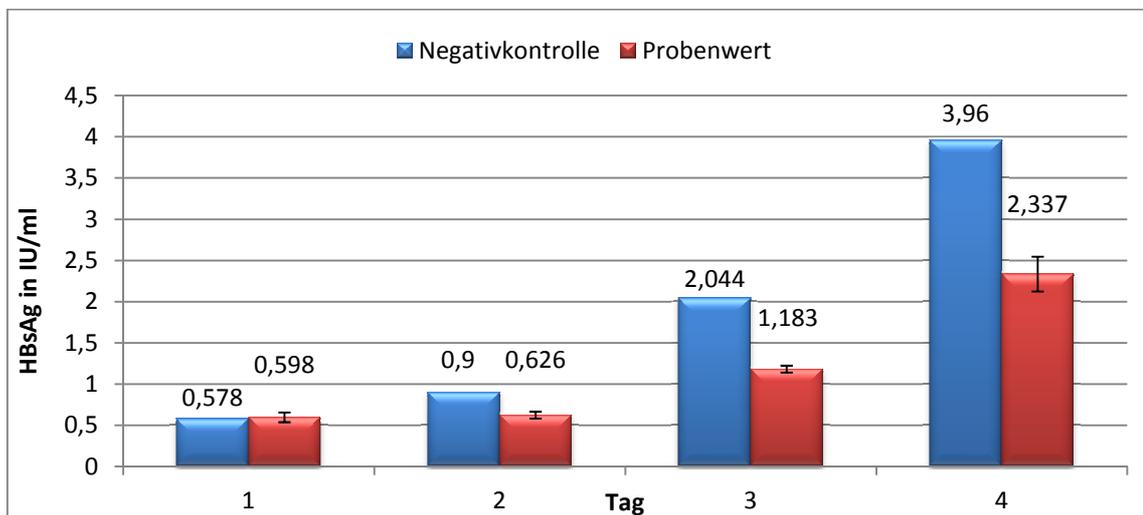
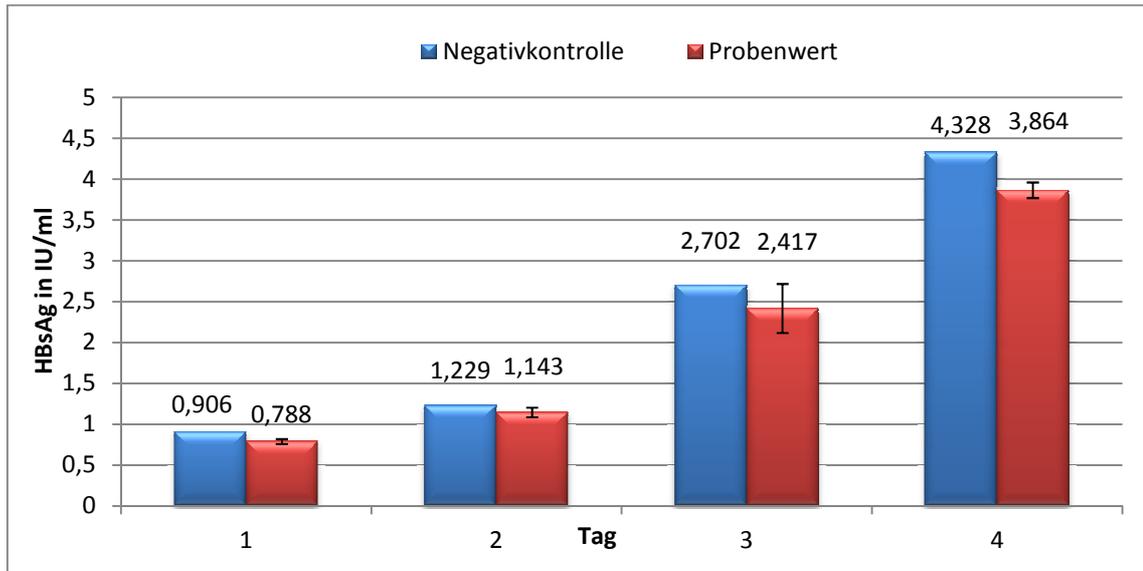


Abb.13: Einfluss von 1/10/20 ng/ml TNF α auf die HBeAg-Produktion der Hep G 2.2.15

Abb.14: Einfluss von je 0,5/5,0/10 ng/ml IFN γ und TNF α auf die HBeAg-Produktion der Hep G 2.2.15

Abb.15: Einfluss von 1/10/20ng/ml IFN γ auf die HBsAg-Produktion der Hep G 2.2.15

Abb.16: Einfluss von 1/10/ 20ng/ml TNF α auf die HBsAg-Produktion der Hep G 2.2.15

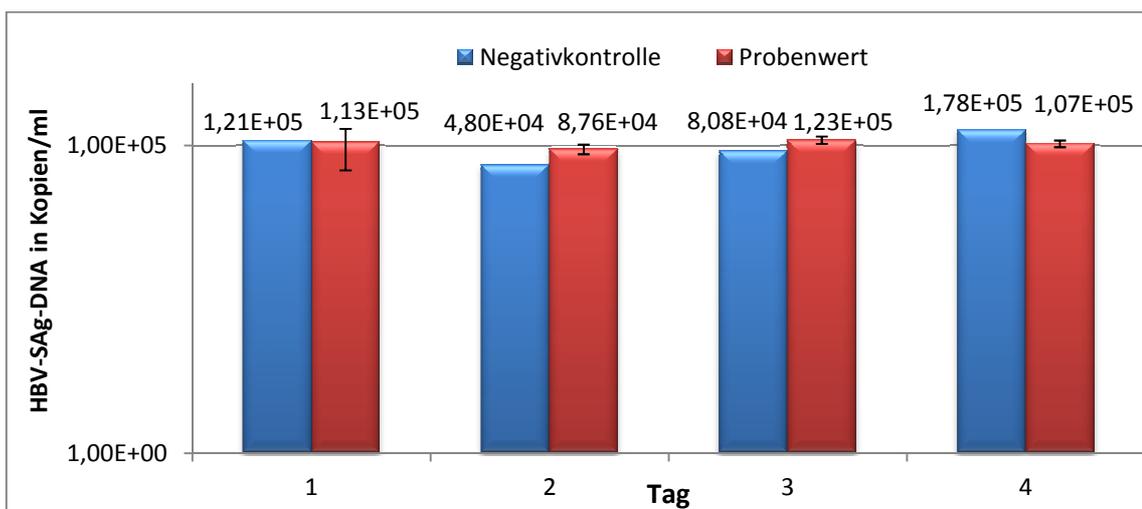
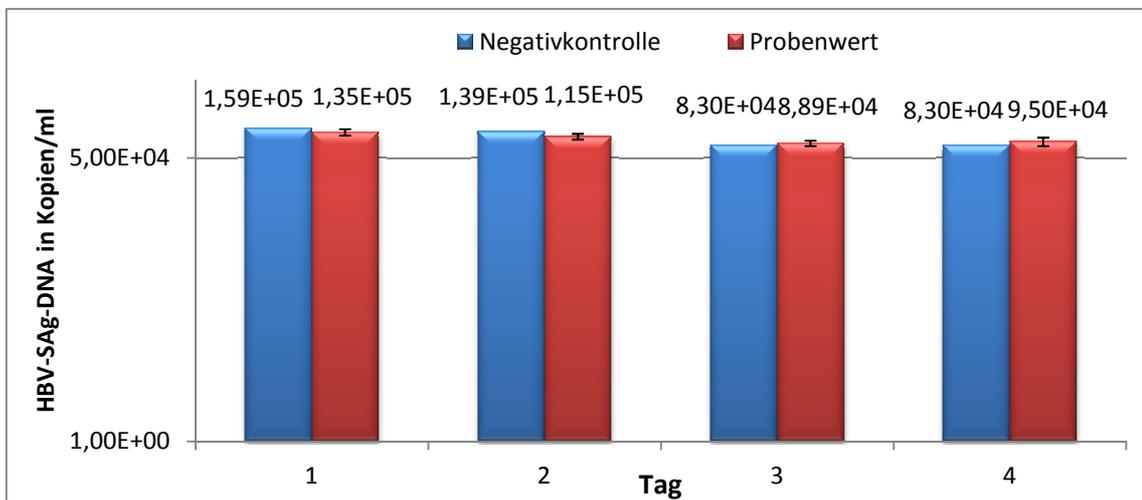
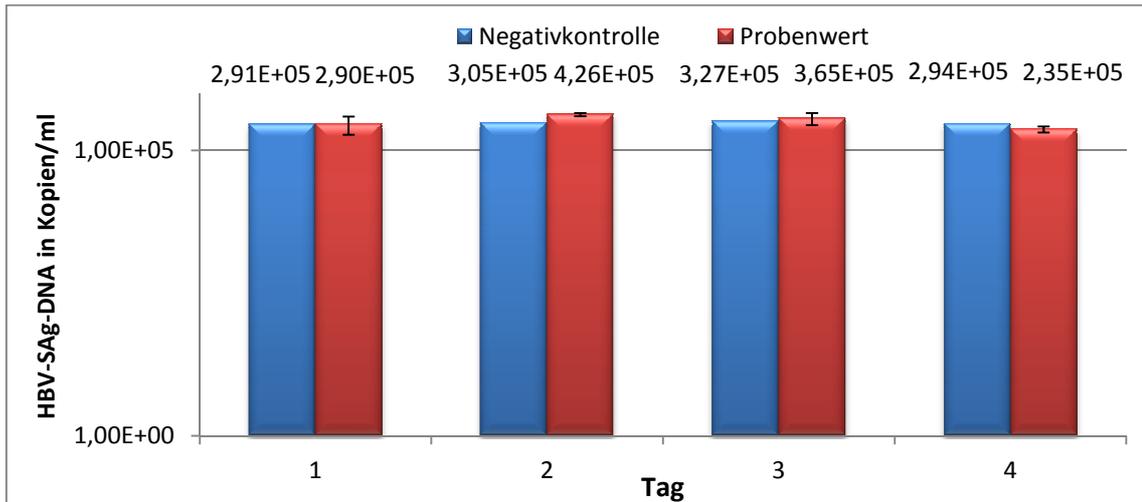


Abb.17: Einfluss von 20 ng/ml IFN γ , 20 ng/ml TNF α und 10 ng/ml IFN γ und TNF α auf die HBV-SAg-Produktion der Hep G 2.2.15

Änderung durch TNF α	1 ng/ml				10 ng/ml				20 ng/ml			
	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
Überstandsabnahme nach h												
HBsAg in %	- 13	- 6,9	- 10,5	- 10,7	+ 3,5	- 30,4	- 42,1	- 40,9	+ 9	- 18,1	- 49,1	- 49,5
HBeAg in %	- 4,1	- 3,4	+ 0,6	- 10,1	+ 7,5	- 5,6	- 12,1	- 27,6	- 8,3	+ 8	- 13,4	- 20,8
HBV-DNA in %	+ 180	- 12,6	- 36	- 8,9	+ 26,8	+ 7	- 14,3	- 25	- 15	- 17,3	+ 7	+ 15

Tab. 4: prozentuale Veränderung von HBsAg, HBeAg, HBV-SAg- und Core DNA durch TNF α

Veränderung durch IFN γ	1 ng /ml				10 ng/ ml				20 ng / ml			
	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
Überstands-abnahme nach in h												
HBsAg in %	+ 22,8	+ 17	+ 9,8	+ 17	+ 12,5	+ 5,4	- 1,7	+ 6,7	- 4,3	- 5,3	- 15,7	- 19,5
HBeAg in %	+ 3,1	- 12,5	- 10,4	- 16,4	- 1,8	- 23,6	- 25,6	- 35,4	- 3,6	- 15,1	- 26,3	- 39,7
HBV-DNA in %	- 12,5	- 8,6	+ 0,5	+ 27	+ 8,6	+ 10,8	+ 19,6	+ 88,2	- 0,3	+ 39,7	+ 11,6	- 20

Tab. 5: prozentuale Veränderung von HBsAg, HBeAg, HBV-SAg- und Core DNA durch IFN γ

Veränderung durch TNF α und IFN γ	1 ng / ml				10 ng / ml				20 ng / ml			
	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
Überstands-abnahme nach in h												
HBsAg in %	+ 20,9	- 6	- 13,5	+ 6,4	- 32,8	- 41,7	- 24,9	+ 4,7	- 30,4	- 44,4	- 37,7	- 22,2
HBeAg in %	- 2,2	- 17,2	- 25,2	- 29,7	- 3,7	- 31,5	- 40,8	- 55,2	- 6,8	- 33,8	- 44,9	- 59,2
HBV-DNA in %	- 4,6	+ 12,5	+ 27,8	- 4,2	- 6,8	+ 50	+ 8,2	- 10,7	- 6,6	+ 82,5	+ 52,2	- 39,8

Tab. 6: prozentuale Veränderung von HBs-, HBeAg, HBV- DNA durch TNF α und IFN γ

4.2.2. Kokultivierung von T-Zellen Geimpfter und HepG2.2.15-Zellen:

Beeinflussung von Virusreplikation und Proteinsynthese

Um einen möglichen Einfluss von spezifischen T-Zellen auf die Produktion viraler Bestandteile durch Hep G 2.2.15-Zellen zu untersuchen, wurden Kokultivierungsversuche von peripheren Blutlymphozyten (PBLs) gegen Hepatitis B geimpfter Spender mit den Hepatomzellen durchgeführt. Zellen ungeimpfter, hepatitis-B-negativer Spender dienten als Kontrolle. Diese Versuche erfolgten mit Hilfe des sogenannten Transwell-Systems, das die beiden Zellarten durch eine permeable Membran mit einer Porengröße von 0,4 μm trennt, aber Makromoleküle und Viren den Durchtritt erlaubt.

Konfluente Hep G 2.2.15-Zellen wurden mit 2×10^6 PBMC von 7 ungeimpften und 5 geimpften Spendern in 6-Well-Platten im Dreifachansatz kokultiviert. Die geimpften Spender waren innerhalb der letzten Jahren gegen Hepatitis B immunisiert worden und wiesen zum Zeitpunkt des Versuchs Anti-HBs-Konzentrationen von > 25.000 IU/l, 782 IU/l, 614 IU/l, 523 IU/l und 107 IU/ml auf. Dabei handelte es sich um Titerbestimmungen nach Verabreichung der ersten 3 Dosen Hepatitis-B-Impfstoff. Einzig beim höchsten Titer handelte es sich um eine Auffrischimpfung. Die ungeimpften Spender waren Anti-HBs negativ (Anti-HBs $< 0,1$ IU/l). Nach einer Inkubation von 48 h Stunden erfolgte die HBsAg- und HBeAg-Bestimmung aus dem Überstand. Dabei konnte festgestellt werden, dass es in allen Fällen zu einer Abnahme beider vermessener Komponenten kam. Ein eindeutiger Unterschied zwischen den PBMC von geimpften und ungeimpften Probanden war dabei allerdings nicht nachzuweisen. Das im Medium befindliche HBsAg wies eine Reduktion durch geimpfte und ungeimpfte PBMC von fast 50 % auf. Für das HBeAg konnte ebenfalls durch beide Arten von Spenderzellen dieser Effekt gezeigt werden. Im Durchschnitt konnten die PBMC ungeimpfter Spender die HBeAg-Produktion um etwa 43,1 %, die Zellen geimpfter Spender die HBeAg-Menge um 39 % senken.

Eine spezifische Reduktion der HBV-Protein-Produktion durch die T-Zellen geimpfter Spender konnte also nicht gesehen werden. Auffallend war allerdings ein Spender, bei dem es zu einer Absenkung der HBs-Ag-Produktion um fast 80% kam und bei dem auch die Unterdrückung der HBeAg-Bildung mit 44,8 % die am stärksten ausgeprägte in der Gruppe der Geimpften war. Der 100%-Wert der beiden folgenden Abbildungen

bezieht sich auf eine Negativkontrolle. Dort wurden die Zellen in Anwesenheit von Zellkulturmedium kultiviert.

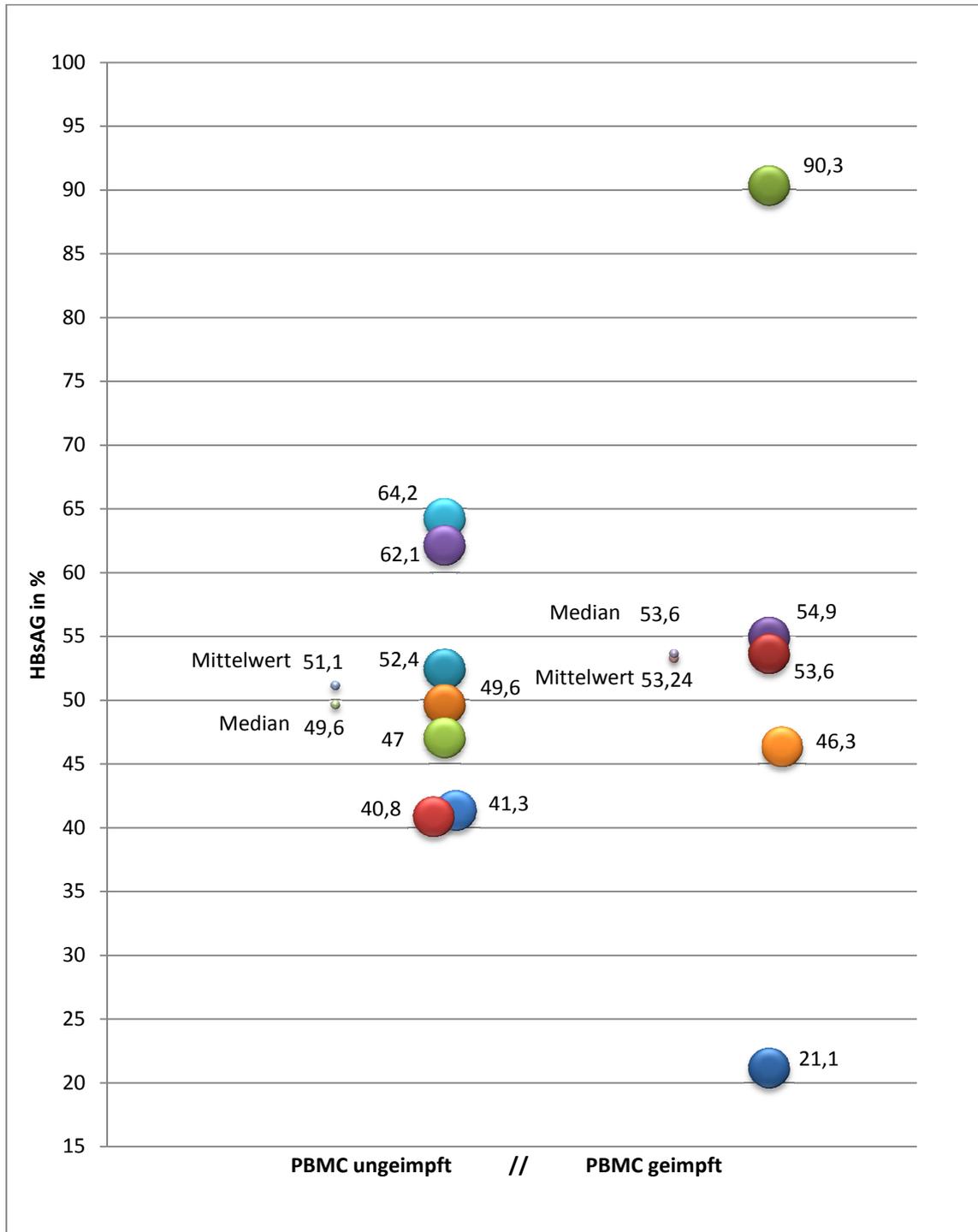


Abb.18: Einfluss der PBMC un/geimpfter Spender auf die HBsAg-Produktion

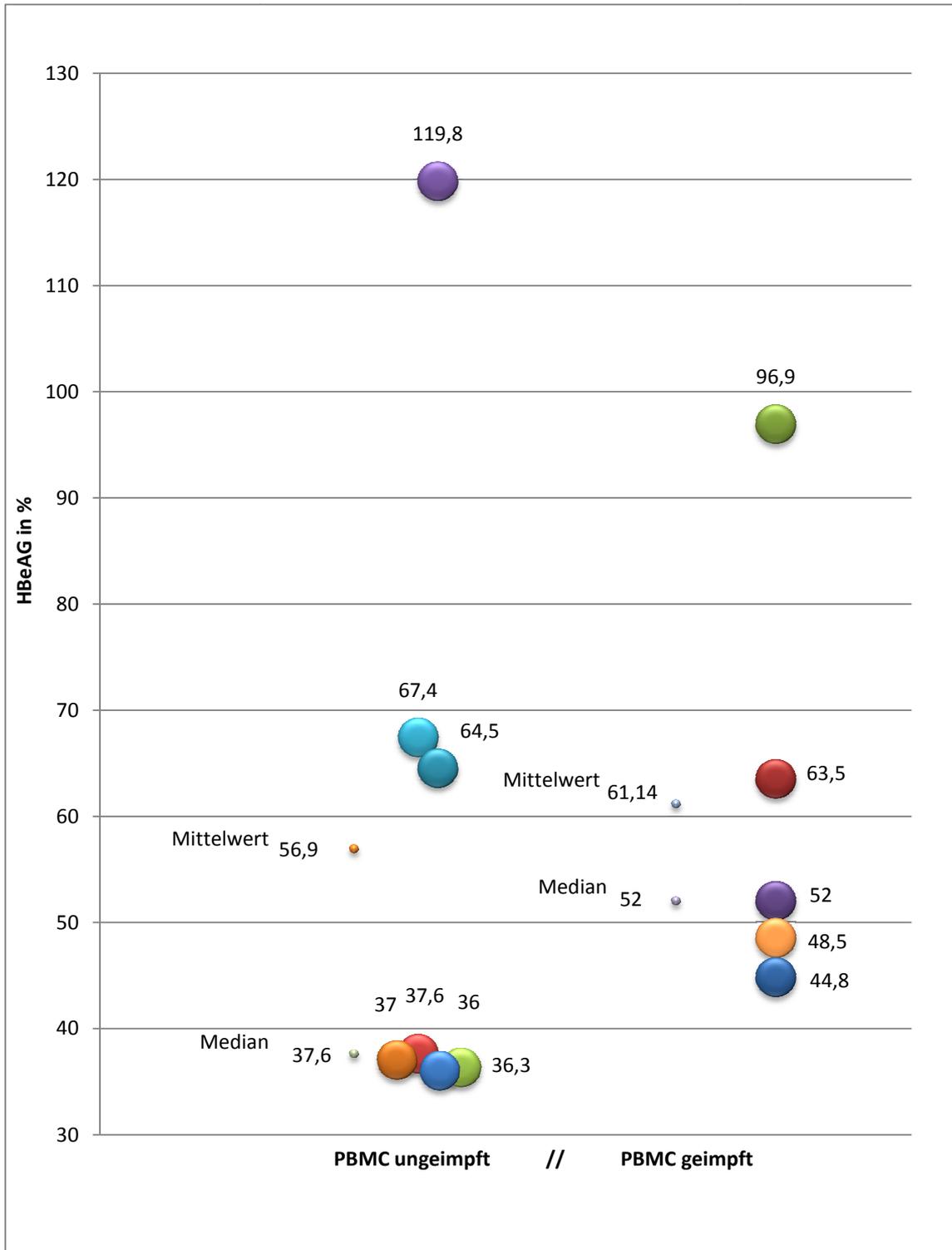


Abb.19 Einfluss der PBMC un/geimpfter Spender auf die HBeAg-Produktion

4.3. Einfluss von Anti-HBs auf Virusreplikation und Proteinsynthese

In dieser Testreihe sollte untersucht werden, ob Anti-HBs, die Antikörper gegen das Oberflächenprotein HBsAg des Hepatitis-B-Virus, Virusproduktion und Produktion viraler Proteine in den HBV-infizierten Hepatomzellen beeinflussen können. Dazu wurde polyklonales Hepatitis-B-Immunglobulin mit einem Anti-HBs-Gehalt von 227 IU/ml (HBIG), normales humanes IgG (AntiHBs 2 IU/ml, NIG) und monoklonales Anti-HBs in verschiedenen Verdünnungen dem Medium zugesetzt und über die Dauer von 72 Stunden mit den Zellen kokultiviert. Es erfolgte die Bestimmung von HBeAg und HBV-DNA aus den Überständen. Wie die Abb. 20 zeigt, kam es bereits durch NIG zu einer Hemmung der HBeAg-Synthese, die bei einer 1:20 Verdünnung 83% betrug. Die gleiche Verdünnung des HBIG führte zu einer 72%igen Abnahme des HBeAg. Offenbar waren hier unspezifische Faktoren wirksam, die sowohl im NIG als auch im HBIG vorhanden waren. Ein wahrscheinlich spezifischer Effekt des HBIG konnte allerdings bei einer Verdünnung beider Präparate im Verhältnis 1:200 beobachtet werden: hier betrug die hemmende Wirkung des NIG nur noch 8% gegenüber einer Hemmung von 35% durch HBIG.

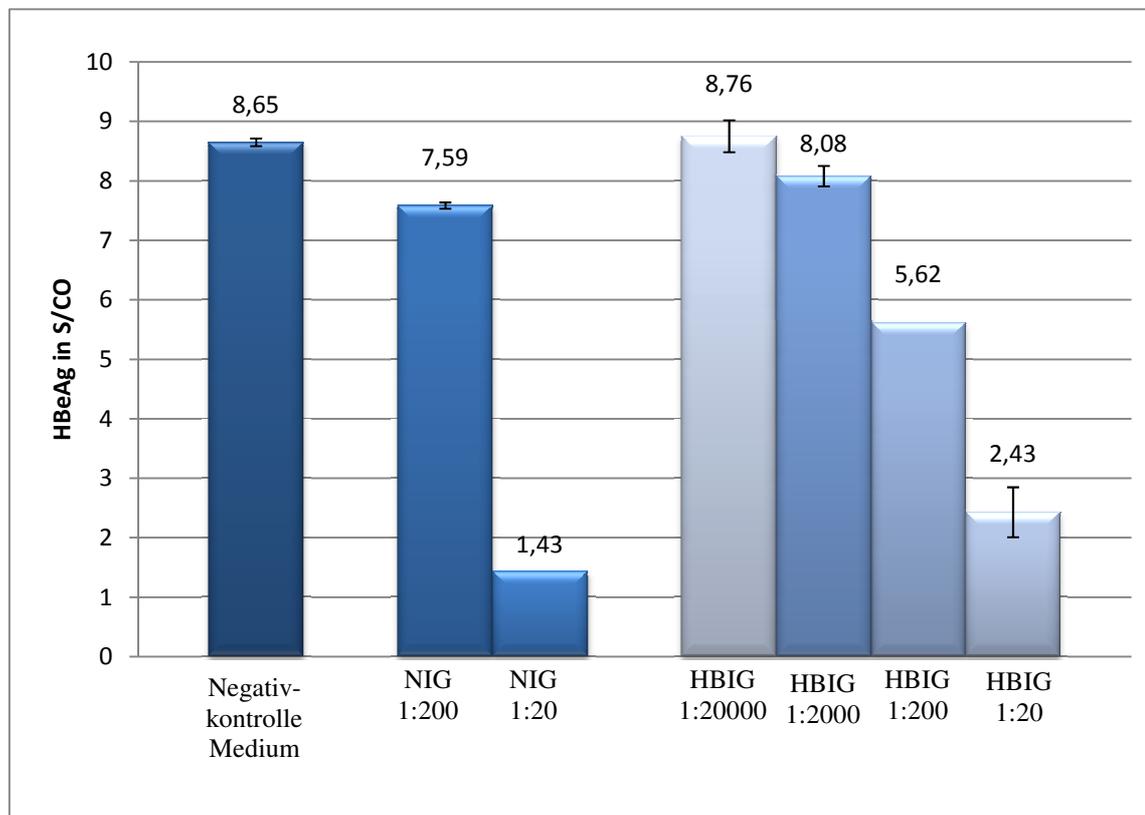


Abb.20: Einfluss von NIG und HBIG auf die HBeAg-Produktion

Der monoklonale Antikörper zeigte auch in der höchsten Konzentration von 10 mIU/ml keinerlei Beeinflussung der HBsAg- oder HBeAg-Synthese der Zellen.

5. Diskussion

5.1. Sekretion der HBV-Komponenten

Schon bei der Verlaufsbeobachtung der viralen Proteine als auch der HBV-DNA über 8 Tage wurden bereits Unterschiede, die einer Diskussion bedürfen, auffällig. Diese traten sowohl bei Betrachtung der jeweiligen Hep G 2.2.15-Zelllinie im Einzelnen sowie beim Vergleich der zwei Zelllinien unterschiedlicher Herkunft auf. Es konnte festgestellt werden, dass es erhebliche Unterschiede sowohl in der Produktionsmenge als auch in der Produktionskinetik zwischen den Zellkulturen gab. In der Sekretion der absoluten Menge des HBsAg noch ähnlich, wurde eine erhebliche Diskrepanz in der produzierten HBeAg-Menge nachgewiesen, die um mehr als das 6-fache voneinander abwich. Die Kinetik betreffend konnte bei einer Zelllinie eine nahezu lineare, bei der anderen eine eher exponentielle Sekretion für die HBV-Proteine nachgewiesen werden. Dass eine gewisse Abweichung in der Produktivität der Zellkulturen in verschiedenen Laboren existiert, ist aufgrund der individuellen Handhabung der Zellkultur nicht verwunderlich. Glebe et al. beschäftigten sich 2001 mit der Frage nach den optimalen Bedingungen für die HBV-Produktion in der Zellkultur. Dabei untersuchten sie den Einfluss verschiedener Medien, Medienzusätze, FCS und DMSO, als auch die Aussaatdichte der Zellen und konnten zeigen, dass diese die Zellkultur beeinflussten. Die Voraussetzung für eine optimale HBV-Produktion konnte jedoch nur durch eine Kombination aller Faktoren erzielt werden: geringe Konzentration an FCS, erhöhte DMSO-Menge und dichte Aussaat der Zellen (Glebe et al. 2001) Da die verwendeten Zelllinien jedoch unter komplett identischen Bedingungen kultiviert wurden, ist eher anzunehmen, dass die Ursache in der Zelllinie selbst zu suchen ist. Desweiteren konnte in der vorliegenden Arbeit über die Jahre hinweg auch festgestellt werden, dass sich die Produktivität der Zellen verändert. Dieser Aspekt war jedoch eher beiläufig aufgefallen und wurde nicht weiter untersucht. In Menge und Verlauf nahezu identisch war die HBV-DNA-Produktion, die jedoch bereits scheinbar nach 24-stündiger Inkubation der Zellen ihren Maximalwert erreicht hatte und über die Kulturdauer nur geringen Schwankungen unterworfen war. Dieses Maximum entspricht etwa dem Wert, den auch Glebe et al. in ihren Versuchen mit Hep G 2.2.15 - Zellkulturen ermitteln konnten (Glebe et al. 2001). Diese bereits nach Tag 1 erreichte große Menge an HBV-DNA lässt sich eventuell

darauf zurückführen, dass es nicht, wie bei einer frischen Infektion, zu einer erst langsam beginnenden Vermehrung und Sekretion der HBV-DNA kommt, sondern, dass dieser Prozess, durch die stabile Transfektion, ständig abläuft und keiner Anlaufphase bedarf (Delaney und Isom 1998). Eine nicht über diesen Ausgangswert ansteigende HBV-DNA-Kopienzahl legt den möglichen Schluss nahe, dass ein ständiger Abbau oder Zerfall der HBV-DNA stattfindet, was jedoch trotzdem, durch die zunehmende Zellzahl in der Kultur zu einem, wenn auch nur mäßigen, Anstieg führen müsste, oder, dass es unter Umständen zu einer negativen Rückkopplung durch die im Medium vorhandene DNA-Kopien auf die Hep G 2.2.15 - Zellen kommt. Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung dieser Beobachtung wäre, dass die Zellen zu wenig dicht ausgesät wurden und diese in ihrer Tätigkeit der Vermehrung die HBV-DNA-Produktion stark reduzierten (Glebe et al. 2001) und ein Anstieg der Kopienzahl im Medium erst bei längerer Zellkulturdauer detektiert hätte werden können.

Dass unter gleichen Bedingungen letztlich identische Zellkulturen in ihrer Produktion und Sekretion der HBV-Komponenten auf diese Art und Weise voneinander abweichen, lässt den Schluss zu, dass Versuche, die mit Hepatom-Zelllinien durchgeführt wurden, nur schwerlich miteinander vergleichbar und beurteilbar sind.

5.2. Inhibitionsversuche mit TNF α und INF γ

Die Ergebnisse der Hemmung der Produktion der HBV-Komponenten durch die Zugabe von Zytokinen unterschiedlicher Konzentrationen in das Kulturmedium unter Variation der Kulturdauer zeigten, wie bereits auch schon in anderen Arbeiten gezeigt wurde, einen Einfluss auf die Virusproteinsynthese durch Zytokine (Röhl 2009; Phillips et al. 2009). Häufig konnte ein mäßiger Rückgang der HBV-Protein-Sekretion erreicht werden, seltener eine ausgeprägte Verringerung der produzierten HBV-Komponenten. Dabei wurden sowohl Zellkultur, Kulturdauer, Zytokinkonzentration als auch die Zeiten der Abnahme des Überstands variiert. Am effektivsten zeigte sich dabei die Kombination aus TNF α und INF γ , wie dies auch von Pasquetto et. al für die HBV-Genexpression gezeigt werden konnte (Pasquetto et al. 2002). Nur wenig von den dem Medium zugesetzten Zytokinen beeinflusst blieb die HBV-DNA-Synthese. Möglicherweise war die Dauer unserer Versuche zu kurz; Pasquetto et al. zufolge

konnten erst 6 Tage nach Zytokinbehandlung Anzeichen einer Reduktion nachgewiesen werden (Pasquetto et al. 2002). Unsere Ansätze wurden nur 3 Tage kultiviert. Außerdem ist die PCR als Methode zum Nachweis sehr geringer DNA-Veränderungen weniger gut geeignet. Generell stößt man in der Literatur auf variierende Aussagen, was die Effektivität des Zytokinzusatzes zur Zellkultur angeht: so können Biermer et al. eine Reduktion der HBV-Replikation durch TNF α -Zugabe erreichen, verweisen jedoch auf zwei vorangehende Arbeiten, in denen der Effekt von TNF α geringer ausfällt. Sie vermuteten, dass in diesen Arbeiten Zellen verwendet wurden, die nicht TNF α sensitiv waren (Biermer et al. 2003). Möglicherweise spielt dieses Phänomen auch in der vorliegenden Arbeit eine Rolle. Unter Umständen büßten die von uns verwendeten Zellen im Lauf der Zeit ihre Ansprechbarkeit auf TNF α bzw. auf die verwendeten Zytokine ein, denn in späteren Versuchsreihen wurden geringere reduktive Effekte erzielt. Dass die Empfindlichkeit von Hepatomzellen gegenüber Zytokinen sehr variabel sein kann zeigt eine Publikation von Wang et al, in der das Phänomen einer Zytokinresistenz einer Hepatom-Zelllinie für IFN γ durch eine Mutation beschrieben wurde (Wang et al. 2005). In den Ergebnissen von Phillips et al., die in den Versuchen Hep G 2.2.15 - Zellen verwendeten, zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die HBV-DNA-Sekretion in den Überstand durch IFN γ . Im Vergleich zur Negativkontrolle konnte durch IFN γ eine maximale Verringerung der HBV-DNA um 63 % nach 48 Stunden Kultur, durch TNF α um 66 % nach 24 Stunden Kultur erreicht werden. Ein additiver Effekt wird für die Kombination beider Zytokine beschrieben (Phillips et al. 2009). Ähnliche Versuche beschrieben Parvez et al., die durch die Behandlung transfizierter Hep G 2-Zellen mit IFN γ -Konzentrationen von 0,1 $\mu\text{g/l}$ bis 5 $\mu\text{g/l}$ eine Reduktion der HBsAg-Produktion erreichen konnten (Parvez et al. 2006). Ausgeschlossen werden konnte, dass eine Verringerung der HBV-Produkte in der Hep G 2.2.15 – Zellkultur, wie in anderen Arbeiten gezeigt wurde, durch Zytokin bedingten Zelluntergang, durch eine veränderte Zellstruktur oder eine veränderte Zellzahl hervorgerufen wurden (Pasquetto et al. 2002).

Zwar finden sich überwiegend Arbeiten mit nicht immer vergleichbaren Versuchsbedingungen die einen Effekt der Zytokine bestätigen, doch ist dieser nicht immer eindeutig und klar ausgeprägt, sodass die Frage nach der Ursache dieser unterschiedlichen Ergebnisse gestellt werden sollte und die Ergebnisse der

Arbeitsgruppen nicht uneingeschränkt vergleichbar sind. Auf jeden Fall weisen die Publikationen auf eine Heterogenität dieser Zelllinie hin.

5.3. Einfluss von Spender-PBMC auf die Hep G 2.2.15 – Zellkultur

Von Hepatitis B ungeimpften und geimpften Spendern isolierte periphere mononukleäre Zellen des Blutes wurden mittels eines Zellkultureinsatzes mit einem konfluenten Hep G 2.2.15 -Zellrasen über eine Dauer von 48 Stunden kokultiviert. Diese Versuchsserie sollte zeigen, ob Lymphozyten von gegen Hepatitis B geimpften Spendern in der Lage sind, mittels löslicher Faktoren – u.U. eben Zytokine – die Virusreplikation bzw. die Synthese viraler Proteine in HepG 2.2.15-Zellen zu beeinflussen. Tatsächlich konnte eine Reduktion sowohl von HBs- als auch von HBeAg erreicht werden, allerdings wurde dieser Effekt durch Zellen sowohl geimpfter als auch ungeimpfter Spender etwa gleichermaßen ausgelöst. Die durch die PBMC verminderte Sekretion entspricht in etwa dem Ergebnis der Zugabe von 20 ng Zytokin/ml Medium, wobei die Reduktion des HBsAg, die im Inhibitionsversuch durch TNF α erreicht wurde, für naive und spezifische Zellen bei etwa 50 % lag. Die Verminderung des HBeAg, die im Inhibitionsversuch durch IFN γ erfolgte, betrug hier wiederum sowohl für naive als auch spezifische Zellen um die 40 %. Ob diese oder andere Zytokine bzw. Faktoren für diesen Effekt verantwortlich sind, ließ sich aus diesen Versuchen nicht ableiten. Ähnliche Ergebnisse hatten auch schon die Versuche von Röhl (Röhl 2009) gezeigt. Die in dieser Versuchsreihe zugegebenen PBMCs hatten keine Auswirkung auf die HBV-DNA-Synthese. Bezüglich der HBV-DNA wurden umfassende Versuche von Phillips et al. durchgeführt. Die Autoren untersuchten den Einfluss HBV-spezifischer CD8⁺-Zellen sowohl in indirekter als auch direkter Kultur mit Hep G 2.2.15 - Zellen. Dabei bestimmten sie zum einen die von den CD8⁺-Zellen produzierten Mengen an TNF α und IFN γ , zum anderen die zytoplasmatische als auch die sezernierte Menge an HBV-DNA. Das Verhältnis von CD8⁺-Zellen zu Hep G 2.2.15 wurde variiert. Die Kulturdauer betrug 48 h mit jeweils einer Probeentnahme nach 3, 24 und 48 Stunden. Dabei konnte für die HBV-DNA-Sekretion im indirekten Ansatz eine Reduktion um bis zu 74,1 %, im direkten Ansatz eine Verringerung um bis zu 82,3 % erreicht werden. Allerdings wurde im direkten Ansatz bei einem Verhältnis von CD8⁺-Zellen zu Hep G

2.2.15-Zellen von 1:6 ein Anstieg der HBV-DNA detektiert, der wohl auf einer Freisetzung der HBV-DNA aus den Zellen resultiert (Phillips et al. 2009). Erstaunlich ist, dass die in den eigenen Inhibitionsversuchen verwendeten Zytokinmengen, den sezernierten Zytokinmengen der CD8⁺-Zellen in der Größenordnung ähnlich sind bzw. diese übersteigen, jedoch ein Effekt nur durch Anwesenheit von CD8⁺-Zellen zu detektieren ist. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob neben den Zytokinen selbst noch andere zusätzliche Faktoren, durch die CD8⁺-Zellen produziert, dies bewirken könnten. Auch Suri et al. konnten in ihren Kokultur-Versuchen eine Reduktion der zytoplasmatischen HBV-DNA nachweisen. Dazu wurden PBMC von chronisch Hepatitis B-Infizierten verwendet, die nach adäquater Anregung der IFN γ -Produktion in Kokultur mit Hep G 2.2.15 die virale Replikation verminderten. Ohne Stimulation der PBMC war die produzierte IFN-Menge zu gering, als dass ein Effekt hätte beobachtet werden können (Suri et al. 2001). Während auch Phillips et al. einen Effekt der CD8⁺-Zellen auf die Produktivität der Hep G 2.2.15-Zellen mit vorheriger Stimulation der PBMC-Fraktion nachweisen, gelingt die in dieser Arbeit beschriebene Verringerung der HBV-Proteine ohne Stimulation. Durch die Verwendung unstimulierter PBMC konnten Suri et al. aufgrund einer zu geringen Interferon γ -Produktion keinen Erfolg erzielen.

5.4. Einfluss von Immunglobulinen auf die Hep G 2.2.15 Zellen

Nachdem bereits sowohl der Einfluss von Zytokinen und spezifischen PBMC auf die Hep G 2.2.15 - Zellkultur getestet wurde, erfolgte darüber hinaus noch eine Versuchsreihe, die klären sollte, ob Immunglobulin (Anti-HBs) einen Effekt auf die Virusreplikation und die Synthese von HBV-Proteinen in Hep G 2.2.15-Zellen hat. Anti-HBs wurde in Form von i.m. zu applizierendem Hepatitis-B-Immunglobulin (HBIG) eingesetzt, normales Immunglobulin zur i.m.-Injektion diente als Kontrolle. Die beiden Immunglobuline wurden dem Medium zugegeben und über eine bestimmte Dauer inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde der Zellkulturüberstand zur Bestimmung von HBeAg und HBV-DNA abgenommen. Dabei zeigte sich zunächst, dass offenbar die humane IgG-Fraktion per se, die ja in gleicher Menge in beiden Präparaten enthalten ist, einen inhibitorischen Effekt auf die Syntheseleistung in den

HepG 2.2.15-Zellen besitzt, da bei höheren Konzentrationen beide Präparate gleichermaßen die Produktion von HBeAg inhibierten. Erst bei stärkerer Verdünnung zeigte sich ein spezifischer Effekt des Anti-HBs.

5.5. Fazit

Nachdem unterschiedlichste Versuche mit der Hep G 2.2.15 – Zelllinie durchgeführt, Vergleiche mit früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe angestellt, die Versuchsbedingungen anderer Autoren und auch deren Ergebnisse betrachtet wurden, konnte festgestellt werden, dass spezifische Effekte, bedingt durch die der Zellkultur zugegebenen Agentien, in unterschiedlichem Ausmaß durchaus zu beobachten sind. Dies gilt für die Zytokine als auch für HBIG.

Daneben wurden ausgeprägte unspezifische Effekte auf Virusreplikation und Synthese viraler Proteine durch PBMCs auch nicht gegen Hepatitis B geimpfter Probanden als auch durch die IgG-Fraktion spezifischer wie unspezifischer Immunglobulinpräparate beobachtet.

Festgestellt wurde aber auch, dass die Ergebnisse verschiedener Versuche trotz hoher Genauigkeit und Sorgfalt, mit der die Durchführungen der praktischen Arbeiten erfolgte, relativ stark schwankten. Um eindeutige Aussagen zu erreichen war eine große Anzahl einzelner Versuche und die Verwendung von zwei HepG 2.2.15-Zelllinien notwendig.

Worin die Ursache für die Schwankungen in den Ergebnissen liegt, kann nicht abschließend geklärt werden. Vermutet wird, dass ein Faktor die Zellkultur selbst ist, die, unterschiedlichen Einflüssen ausgesetzt, auf unterschiedliche Weisen auf die Zusätze reagiert. Um diesen Verdacht allerdings wirklich erhärten zu können, müssten diesbezüglich weitere Versuche mit Hep G 2.2.15 – Kulturen anderer Arbeitsgruppen durchgeführt und verglichen werden.

6. Zusammenfassung

Zur Erforschung der chronischen Hepatitis B-Infektion werden oftmals stabil mit dem HB-Virus infizierte Zellkulturen verwendet. Es stellt sich aber die Frage, ob dieses in vitro Modell ein Ersatz für eine in vivo Infektion darstellen kann. Ausgehend von dieser Fragestellung erfolgte die Betrachtung der durch die Versuche mit Hep G 2.2.15 Zellen erhaltenen Ergebnisse.

Zu Beginn der Arbeit stand die Aufgabe der Charakterisierung der Hepatomzelllinie Hep G 2.2.15 durch quantitative Bestimmung der produzierten HBV-Komponenten über einen bestimmten Zeitraum. Zu diesem Zweck wurde neben der am Institut vorhandenen Hep G 2.2.15 Zelllinie zusätzlich auf eine Hep G 2.2.15-Zellkultur aus einem weiteren Labor zurückgegriffen. Es konnte festgestellt werden, dass es zwar zu einem kontinuierlichen Anstieg – linear aber auch exponentiell – bei den HBV-Proteinen kam, sich diese Kulturen jedoch, was die Quantität an HBsAg und HBeAg anging, stark unterschieden. Im Gegensatz dazu blieb die gemessene DNA-Kopienzahl über die Untersuchungsdauer hinweg für beide Kulturen relativ konstant.

Im Anschluss wurde der Einfluss rekombinanter humaner Zytokine, TNF α und IFN γ , in unterschiedlichen Konzentrationen und unter Modifikation der Versuchsbedingungen (Kulturdauer, Zeitpunkt der Zytokinzugabe, Zeitpunkt der Überstandsabnahme, Zellkulturlinie) untersucht. Dabei konnte nicht in allen Versuchsreihen eine Auswirkung auf die Produktion von HBsAg und HBeAg detektiert werden. Eine nachweisbare Wirksamkeit auf die HBV-DNA konnte, trotz geringer Schwankungen in der Kopienzahl, nicht gezeigt werden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Ergebnissen in anderen Arbeiten, welche durchgängig, teilweise unter sehr ähnlichen Bedingungen, einen Effekt der beiden Zytokine nachweisen konnten.

Nach diesen Ergebnissen durch Zugabe technisch hergestellter Agentien, wurde der Effekt durch von naiven und spezifischen PBMC sezernierten Zytokinen getestet, die, durch eine semipermeablen Membran getrennt, in Kokultur mit einem Hep G 2.2.15 – Zellrasen kultiviert wurden. Dabei konnte sowohl für die PBMC geimpfter als auch ungeimpfter Spender eine ähnlich starke Reduktion von HBsAg und HBeAg im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen werden. Die Verringerung der Produktion lag in etwa jeweils bei 50 %. Eine Auswirkung auf die HBV-DNA war wiederum nicht nachweisbar.

Zur Klärung des Einflusses unterschiedlicher Antikörper (humanes IgG, poly- und monoklonales Anti-HBs) wurden, wie bereits auch in den anderen Versuchsreihen, unterschiedliche Konzentrationen dieser Agentien dem Medium beigefügt und kokultiviert mit dem Resultat, dass sowohl das humane IgG als auch der polyklonale Antikörper eine Reduktion der HBeAg-Menge erreichen konnten. Nur in höheren Verdünnungen konnte das polyklonale Anti-HBs das HBeAg stärker verringern, bei geringeren Verdünnungen ließ sich ein spezifischer Effekt des HBIG feststellen.

Die Unterschiede in der Handhabung der Zellkulturen, sowohl zwischen verschiedenen Zelllinien als auch zwischen den Kulturen gleicher Zelllinien, die schwankenden Ergebnisse von Versuchsreihen unter gleichen Rahmenbedingungen, sowie die unzureichende Reproduzierbarkeit von Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, stellen in dieser Arbeit gefundene Gründe dar, weshalb sich durchaus noch eingehender mit der Frage beschäftigt werden sollte, inwiefern das Modell der Hep G 2.2.15 als in vitro Modell für eine chronische HB-Virus-Infektion stehen kann.

7. Literaturverzeichnis

Die ganze Heilige Schrift des Alten und Neuen Testaments. Das Buch d. Bücher (1975).
Vorläufige Endfassung d. Einheitsübers. 1.-70. Tsd. Stuttgart, London, Aschaffenburg:
Belser; Good Reading Limited; Pattloch.

Arauz-Ruiz, Patricia; Norder, Helene; Robertson, Betty H.; Magnius, Lars O. (2002):
Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America.
In: *J. Gen. Virol.* 83 (Pt 8), S. 2059–2073.

Aspinall, E. J.; Hawkins, G.; Fraser, A.; Hutchinson, S. J.; Goldberg, D. (2011):
Hepatitis B prevention, diagnosis, treatment and care: a review.
In: *Occupational Medicine* 61 (8), S. 531–540.

Bales, Stefan; Baumann, Hans Georg; Schnitzler, Norbert; Kramer, Michael (2003):
Infektionsschutzgesetz. Kommentar und Vorschriftensammlung.
2. Aufl. Stuttgart: Kohlhammer.

Beasley, R. Palmer; Chin-Yun Lee, George; Roan, Cheng-Hsiung; Hwang, Lu-Yu; Lan,
Chung-Chi; Huang, Fu-Yuan; Chen, Chiung-Lin (1983):
Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infections with hepatitis b immune
globulin and hepatitis b.
In: *The Lancet* 322 (8359), S. 1099–1102.
Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673683906244>

Berk, Paul D.; Lok, Anna; Fattovich, Giovanna (2003):
Natural History and Prognosis of Hepatitis B.
In: *Semin Liver Dis* 23 (1), S. 47–58.

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- B.
In: *Journal of Virology* 77 (7), S. 4033–4042.#

Blumberg, B. S.; Alter, H. J. (1965):
A "New" Antigen in Leukemia Sera.
In: *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 191 (7), S. 541–546.

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.
In: *Ann. Intern. Med.* 66 (5), S. 924–931.

Bonino, Ferruccio; Hoyer, Bill; Nelson, Judith; Engle, Ronald; Verme, Giorgio; Gerin, John
(1981):
Hepatitis B virus DNA in the sera of HBsAg carriers: A marker of active hepatitis B virus
replication in the liver.
In: *Hepatology* 1 (5), S. 386–391.

- Bonino, Ferruccio; Piratvisuth, Teerha; Brunetto, Maurizia R.; Liaw, Yun-Fan (2010):
Diagnostic markers of chronic hepatitis B infection and disease.
In: *Antivir. Ther. (Lond.)* 15 Suppl 3, S. 35–44.
- Bruss, Volker (2004):
Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. Mechanisms of Enveloped Virus Release.
In: *Virus Research* 106 (2), S. 199–209.
Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170204003272>
- Buster, Erik H. C. J.; Flink, Hajo J.; Cakaloglu, Yilmaz; Simon, Krzysztof; Trojan, Jörg;
Tabak, Fehmi et al. (2008):
Sustained HBeAg and HBsAg Loss After Long-term Follow-up of HBeAg-Positive Patients
Treated With Peginterferon α -2b.
In: *Gastroenterology* 135 (2), S. 459–467.
Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508508008500>
- Carey, Ivana; Harrison, Phillip M. (2009):
Monotherapy versus combination therapy for the treatment of chronic hepatitis B.
In: *Expert Opin. Investig. Drugs* 18 (11), S. 1655–1666.
- Chang, M. H. (2000):
Natural history of hepatitis B virus infection in children.
In: *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, S. E16-9.
- Chen, Jin-De; Yang, Hwai-I; Iloeje, Uchenna H.; You, San-Lin; Lu, Sheng-Nan; Wang, Li-
Yu et al. (2010):
Carriers of Inactive Hepatitis B Virus Are Still at Risk for Hepatocellular Carcinoma and
Liver-Related Death.
In: *Gastroenterology* 138 (5), S. 1747–1754.e1.
Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508510001484>
- Chu, Chia-Ming; Karayiannis, Peter; Fowler, Martin J. F.; Monjardino, Jon; Liaw, Yun-Fan;
Thomas, Howard C. (1985):
Natural history of chronic hepatitis B virus infection in taiwan: Studies of hepatitis B virus
DNA in serum.
In: *Hepatology* 5 (3), S. 431–434.
- Coates, Toby; Wilson, Rosamund; Patrick, Guy; André, Francis; Watson, Virginia (2001):
Hepatitis B vaccines:
Assessment of the seroprotective efficacy of two recombinant DNA vaccines.
In: *Clinical Therapeutics* 23 (3), S. 392–403.
Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149291801800448>
- Cornberg, M.; Protzer, U.; Petersen, J.; Wedemeyer, H.; Berg, T.; Jilg, W. et al. (2011):
Aktualisierung der S 3-Leitlinie zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-
Virusinfektion.
In: *Z Gastroenterol* 49 (7), S. 871–930.

Crowther, R. A.; Kiselev, N. A.; Böttcher, 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.

In: *Cell* 77 (6), S. 943–950

Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867494901422>

Dane, D. S.; Cameron, C. H.; Briggs, Moya (1970):

Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis
Originally published as Volume 1, Issue 7649.

In: *The Lancet* 295 (7649), S. 695–698

Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673670909268>

Delaney, William E.; Isom, Harriet C. (1998):

Hepatitis B virus replication in human HepG2 cells mediated by hepatitis B virus recombinant baculovirus.

In: *Hepatology* 28 (4), S. 1134–1146

Deutscher Ärzte-Verlag GmbH; Ärzteblatt, Redaktion Deutsches: Deutsches Ärzteblatt:
Gründe für eine generelle Impfung gegen Hepatitis B (22.11.1996).

Online verfügbar unter

<http://www.aerzteblatt.de/archiv/3985/Gruende-fuer-eine-generelle-Impfung-gegen-Hepatitis-B>, zuletzt geprüft am 16.02.2015

Doerr, Hans W. (2008):

Medizinische Virologie. Grundlage, Diagnostik und Therapie virologischer Erkrankungen.
2. Aufl. Stuttgart: Thieme

Elgouhari, Hesham M.; Abu-Rajab Tamimi, Tarek I.; Carey, William D. (2008):

Hepatitis B virus infection: understanding its epidemiology, course, and diagnosis.

In: *Cleve Clin J Med* 75 (12), S. 881–889

European Consensus Group on Hepatitis B Immunity (2000):

Are booster immunisations needed for lifelong hepatitis B immunity?

In: *The Lancet* 355 (9203), S. 561–565

Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673699072396>

Fischer, C.; Mauss, S.; Zehnter, E.; Bokemeyer, B.; Heyne, R.; Hüppe, D. (2012):

Epidemiologie und Klinik von Patienten mit chronischer Hepatitis B (CHB) in Deutschland –
Ergebnisse einer bundesweiten Querschnittstudie.

In: *Z Gastroenterol* 50 (01), S. 22–29

Franchis, R. de; Meucci, G.; Vecchi, M.; Tatarella, M.; Colombo, M.; Del Ninno, E. et al.
(1993):

The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers.

In: *Ann. Intern. Med.* 118 (3), S. 191–194

Franco, A.; Guidotti, L. G.; Hobbs, M. V.; Paschetto, V.; Chisari, F. V. (1997):
Pathogenetic effector function of CD4-positive T helper 1 cells in hepatitis B virus transgenic mice.

In: *J. Immunol.* 159 (4), S. 2001–2008

Glebe, Dieter; Berting, Andreas; Broehl, Sigrun; Naumann, Heike; Schuster, Ralph; Fiedler, Nicola et al. (2001):

Optimised Conditions for the Production of Hepatitis B Virus from Cell Culture.

In: *Intervirology* 44 (6), S. 370–378

Gust, Ian D.; Burrell, Christopher J.; Coulepis, Anthony G.; Robinson, William S.; Zuckerman, Arie J. (1986):

Taxonomic Classification of Human Hepatitis B Virus.

In: *Intervirology* 25 (1), S. 14–29

Hadziyannis, Stephanos J.; Vassilopoulos, Dimitrios (2001):

Hepatitis B e antigen–negative chronic hepatitis B.

In: *Hepatology* 34 (4), S. 617–624

Hauri, A. M.; Armstrong, G. L.; Hutin, Y. J. F. (2004):

The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings.

In: *International Journal of STD & AIDS* 15 (1), S. 7–16

Hayashi, Y.; Koike, K. (1989):

Interferon inhibits hepatitis B virus replication in a stable expression system of transfected viral DNA.

In: *J. Virol.* 63 (7), S. 2936–2940

Heermann KH, Goldmann U. Schwartz W. Seyffarth T. Baumgarten H. Gerlich WH (1984):
Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence.

In: *Journal of Virology* 52 (2), S. 396–402

Heintges, Tobias (2006):

Hepatitis B. Infektion - Therapie - Prophylaxe.

Unter Mitarbeit von Wulf Otto Böcher. Stuttgart: Thieme.

Homologous Serum Hepatitis (1947).

In: *The Lancet* 250 (6480), S. 691–692

Hoofnagle, Jay H. (2009):

Reactivation of hepatitis B.

In: *Hepatology* 49 (S5), S. S156

Hoofnagle, Jay H.; Liang, T. Jake (2009):

Hepatitis B: The virus and disease.

In: *Hepatology* 49 (S5), S. S13

Hsu, Hong-Yuan; Chang, Mei-Hwei; Hsieh, Kue-Hsiung; Lee, Chin-Yun; Lin, Ho-Hsiung; Hwang, Lih-Hwa et al. (1992):
Cellular Immune Response to HBcAg in Mother-to-Infant Transmission of Hepatitis B Virus.
In: *Hepatology* 15 (5), S. 770–776

Hui, Chee-Kin; Leung, Nancy; Shek, Tony W. H.; Yao, Hung; Lee, Wai-Ki; Lai, Jak-Yiu et al. (2007):
Sustained disease remission after spontaneous HBeAg seroconversion is associated with reduction in fibrosis progression in chronic hepatitis B Chinese patients.
In: *Hepatology* 46 (3), S. 690–698

Jafri, Syed-Mohammed R.; Lok, Anna Suk-Fong (2010):
Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis B.
In: *Clinics in Liver Disease* 14 (3), S. 425–438

Janssen, Harry L. A.; van Zonneveld, Monika; Senturk, Hakan; Zeuzem, Stefan; Akarca, Ulus S.; Cakaloglu, Yilmaz et al. (8):
Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial.
In: *The Lancet* 365 (9454), S. 123–129.
Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673605177010>

Jilg, W.; Schmidt, M.; Deinhardt, F. (1988):
Persistence of specific antibodies after hepatitis B vaccination.
In: *J. Hepatol.* 6 (2), S. 201–207.

Jilg, W.; Schmidt, M.; Deinhardt, F. (1989):
Four-year experience with a recombinant hepatitis B vaccine.
In: *Infection* 17 (2), S. 70–76

Jilg, Wolfgang (2011):
Impfstoffe gegen die Virushepatitiden A bis E. Was haben sie bewirkt, was können sie bewirken?
In: *Pharm Unserer Zeit* 40 (1), S. 36–43

Jilg, Wolfgang; Schmidt, Marion; Deinhardt, Friedrich (1990):
Decline of anti-HBs after hepatitis B vaccination and timing of revaccination.
Originally published as Volume 1, Issue 8682.
In: *The Lancet* 335 (8682), S. 173–174.
Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014067369090050F>

Katz, L.H; Paul, M.; Guy, D.G; Tur-Kaspa, R. (2010):
Prevention of recurrent hepatitis B virus infection after liver transplantation: hepatitis B immunoglobulin, antiviral drugs, or both? Systematic review and meta-analysis.
In: *Transplant Infectious Disease* 12 (4), S. 292–308

- Knöll, A.; Boehm, S.; Hahn, J.; Holler, E.; Jilg, W. (2007):
Long-term surveillance of haematopoietic stem cell recipients with resolved hepatitis B: high risk of viral reactivation even in a recipient with a vaccinated donor.
In: *J Viral Hepat* 14 (7), S. 478–483
- Kramvis, A.; Kew, M. C. (2005):
Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy.
In: *J. Viral Hepat.* 12 (5), S. 456–464
- Kramvis, Anna; Kew, Michael; François, Guido (2005):
Hepatitis B virus genotypes.
In: *Vaccine* 23 (19), S. 2409–2423.
Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X04008497>
- Krugman, S.; Giles, J. P.; Hammond, J. (1967):
Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection.
In: *JAMA* 200 (5), S. 365–373
- Kuntz, Erwin; Kuntz, Hans-Dieter (2008):
Hepatology. Textbook and atlas: history, morphology, biochemistry, diagnostics, clinic, therapy.
3. Aufl. Heidelberg: Springer
- 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.
In: *J. Virol.* 23 (2), S. 368–376
- Lau, George K. K.; Piratvisuth, Teerha; Luo, Kang Xian; Marcellin, Patrick; Thongsawat, Satawat; Cooksley, Graham et al. (2005):
Peginterferon Alfa-2a, Lamivudine, and the Combination for HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B. *New England Journal of Medicine.*
In: *N Engl J Med* 352 (26), S. 2682–2695
- Leuridan, E.; van Damme, P. (2011):
Hepatitis B and the Need for a Booster Dose.
In: *Clinical Infectious Diseases* 53 (1), S. 68–75
- Liaw, Yun-Fan; Chu, Chia-Ming (14):
Hepatitis B virus infection.
In: *The Lancet* 373 (9663), S. 582–592.
Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673609602075>
- Lok, A. S.; Heathcote, E. J.; Hoofnagle, J. H. (2001):
Management of hepatitis B: 2000--summary of a workshop.
In: *Gastroenterology* 120 (7), S. 1828–1853

Lürmann A. (1885): Eine Ikterusepidemie.

In: *Berliner klinische Wochenschrift* 1885, 1885 (22), S. 20–23

Manno, Mauro; Cammà, Calogero; Schepis, Filippo; Bassi, Fabio; Gelmini, Roberta; Giannini, Francesco et al. (2004):

Natural history of chronic HBV carriers in northern Italy: Morbidity and mortality after 30 years.

In: *Gastroenterology* 127 (3), S. 756–763.

Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508504010571>

Marschall, T.; Krämer, A.; Prüfer-Krämer, L.; Mikolajczyk, R.; Kretzschmar, M. (2005): Erhöhen Migrationen aus hohen und mittleren Endemiegebieten die Hepatitis B-Prävalenz in Deutschland?

In: *Dtsch med Wochenschr* 130 (48), S. 2753–2758

McMahon, B. J.; Alward, W. L. M.; Hall, D. B.; Heyward, W. L.; Bender, T. R.; Francis, D. P.; Maynard, J. E. (1985):

Acute Hepatitis B Virus Infection: Relation of Age to the Clinical Expression of Disease and Subsequent Development of the Carrier State.

In: *Journal of Infectious Diseases* 151 (4), S. 599–603

Michalak, T. I.; Pasquinelli, C.; Guilhot, S.; Chisari, F. V. (1994):

Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis.

In: *J. Clin. Invest.* 93 (1), S. 230–239

Nikolaus Mani (1959):

Die historischen Grundlagen der Leberforschung. Die Vorstellungen über Anatomie, Physiologie und Pathologie der Leber in der Antike.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Universität Basel. 1. Auflage. Basel: Benno Schwabe & Co

Norder, Hélène; Couroucé, Anne-Marie; Magnius, Lars O. (1994):

Complete Genomes, Phylogenetic Relatedness, and Structural Proteins of Six Strains of the Hepatitis B Virus, Four of Which Represent Two New Genotypes.

In: *Virology* 198 (2), S. 489–503.

Online verfügbar unter www.sciencedirect.com/science/article/pii/S00426822847106097

Okada, Kiyshi; Kamiyama, Ichiro; Inomata, Minako; Imai, Mitsunobu; Miyakawa, Yuzo; Mayumi, Makoto (1976):

E Antigen and Anti-E in the Serum of Asymptomatic Carrier Mothers as Indicators of Positive and Negative Transmission of Hepatitis B Virus to Their Infants. *New England Journal of Medicine*.

In: *N Engl J Med* 294 (14), S. 746–749

Okamoto, H.; Tsuda, F.; Sakugawa, H.; Sastrosowignjo, R. I.; Imai, M.; Miyakawa, Y.; Mayumi, M. (1988):

Typing Hepatitis B Virus by Homology in Nucleotide Sequence: Comparison of Surface Antigen Subtypes.

In: *Journal of General Virology* 69 (10), S. 2575–2583

Pande, C.; Sarin, S. K.; Patra, S.; Kumar, A.; Mishra, S.; Srivastava, S. et al. (2013):
Hepatitis B vaccination with or without hepatitis B immunoglobulin at birth to babies born of
HBsAg-positive mothers prevents overt HBV transmission but may not prevent occult HBV
infection in babies: a randomized controlled trial.

In: *J Viral Hepat*, S. n/a

Paracelsus.; Aschner, Bernhard (1993):
Sämtliche Werke.

Nach der 10bändigen Huserschen Gesamtausgabe (1589-1591) zum erstenmal in
neuzeitliches Deutsch übersetzt. 1. Aufl. Anger: Eick

Parvez, Mohammad-Khalid; Sehgal, Deepak; Sarin, Shiv-Kumar; Basir, Seemi-Farhat;
Jameel, Shahid (2006):

Inhibition of hepatitis B virus DNA replicative intermediate forms by recombinant interferon-
gamma.

In: *World J. Gastroenterol.* 12 (19), S. 3006–3014

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.

In: *Journal of Virology* 76 (11), S. 5646–5653

Patient, Romuald; Hourieux, Christophe; Roingeard, Philippe (2009):

Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles.

In: *Cellular Microbiology* 11 (11), S. 1561–1570

Phillips, S.; Chokshi, S.; Riva, A.; Evans, A.; Williams, R.; Naoumov, N. V. (2009):

CD8+ T Cell Control of Hepatitis B Virus Replication: Direct Comparison between Cytolytic
and Noncytolytic Functions.

In: *The Journal of Immunology* 184 (1), S. 287–295

Poethko-Müller, C.; Zimmermann, R.; Hamouda, O.; Faber, M.; Stark, K.; Ross, R.S;
Thamm, M. (2013):

Die Seroepidemiologie der Hepatitis A, B und C in Deutschland.

In: *Bundesgesundheitsbl.* 56 (5-6), S. 707–715, zuletzt geprüft am 16.02.2015.

Pungpapong, Surakit; Kim, W. Ray; Poterucha, John J. (2007):

Natural history of hepatitis B virus infection: an update for clinicians.

In: *Mayo Clin. Proc.* 82 (8), S. 967–975

RKI (2015): RKI - Infektionsepid. Jahrbuch - 2013.

Online verfügbar unter

<http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuecher/2013.html?nn=2374622>,
zuletzt aktualisiert am 16.02.2015, zuletzt geprüft am 16.02.2015

Röhr, Elena Simone (2009):

Untersuchungen zur Rolle der impfinduzierten HBsAg-spezifischen CD4 + T-Zellen bei der
Hepatitis-B-Virusinfektion humaner Hepatozyten.

Universität, Regensburg.

Online verfügbar unter <http://www.opus-bayern.de/uni-regensburg/volltexte/2009/1238/>.

- Roseman, A. M. (2005):
A structural model for maturation of the hepatitis B virus core.
In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (44), S. 15821–15826
- Schaefer, Stephan (2007):
Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes.
In: *World J. Gastroenterol.* 13 (1), S. 14–21
- Schilling, R.; Ijaz, S.; Davidoff, M.; Lee, J. Y.; Locarnini, S.; Williams, R.; Naoumov, N. V. (2003):
Endocytosis of Hepatitis B Immune Globulin into Hepatocytes Inhibits the Secretion of Hepatitis B Virus Surface Antigen and Virions.
In: *Journal of Virology* 77 (16), S. 8882–8892
- Stuyver, L.; Gendt, S. de; van Geyt, C.; Zoulim, F.; Fried, M.; Schinazi, R. F.; Rossau, R. (2000):
A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness.
In: *J. Gen. Virol.* 81 (Pt 1), S. 67–74
- Suri, Deepak; Schilling, Ralf; Lopes, Agnel R.; Mullerova, Ivana; Colucci, Giuseppe; Williams, Roger; Naoumov, Nikolai V. (2001):
Non-cytolytic inhibition of hepatitis B virus replication in human hepatocytes.
In: *Journal of Hepatology* 35 (6), S. 790–797
Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016882780100215X>
- Tassopoulos, N. C.; Papaevangelou, G. J.; Sjogren, M. H.; Roumeliotou-Karayannis, A.; Gerin, J. L.; Purcell, R. H. (1987):
Natural history of acute hepatitis B surface antigen-positive hepatitis in Greek adults.
In: *Gastroenterology* 92 (6), S. 1844–1850
- Tillmann, H. L.; Hadem, J.; Leifeld, L.; Zachou, K.; Canbay, A.; Eisenbach, C. et al. (2006):
Safety and efficacy of lamivudine in patients with severe acute or fulminant hepatitis B, a multicenter experience.
In: *J Viral Hepat* 13 (4), S. 256–263
- Tillmann, Hans Ludger; Bock, Thomas (2010):
Handbuch Hepatitis B - Diagnostik, Verlauf, Therapie.
2. Aufl. Bremen: UNI-MED Verl (UNI-MED Science)
- Tiollais, P.; Pourcel, C.; Dejean, A. (1985):
The hepatitis B virus.
In: *Nature* 317 (6037), S. 489–495
- Togo, S.; Arai, M.; Tawada, A.; Chiba, T.; Kanda, T.; Fujiwara, K. et al. (2011):
Clinical importance of serum hepatitis B surface antigen levels in chronic hepatitis B.
In: *Journal of Viral Hepatitis* 18 (10), S. e508
- Wang, Yan; Wei, Lai; Jiang, Dong; Cong, Xu; Fei, Ran; Xiao, Jiang; Wang, Yu (2005):
In vitro resistance to interferon of hepatitis B virus with precore mutation.
In: *World J. Gastroenterol.* 11 (5), S. 649–655

- Weinberger, Klaus M.; Wiedenmann, Elisabeth; Böhm, Stephan; Jilg, Wolfgang (2000): Sensitive and accurate quantitation of hepatitis B virus DNA using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR).
In: *Journal of Virological Methods* 85 (1–2), S. 75–82.
Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093499001548>
- Wenzel, Jürgen J.; Jilg, Wolfgang (2010): Loss of antibodies, but not of protection.
In: *Lancet Infect. Dis.* 10 (11), S. 738–739.
Online verfügbar unter <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309910702176>
- World Health Organization: WHO | Hepatitis B.
Online verfügbar unter <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/index.html>,
zuletzt geprüft am 24.05.2012
- Wynne, S. A.; Crowther, R. A.; Leslie, A. G. W. (1999):
The Crystal Structure of the Human Hepatitis B Virus Capsid.
In: *Molecular Cell* 3 (6), S. 771–780.
Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276501800095>
- Yim, Hyung Joon; Lok, Anna Suk-Fong (2006):
Natural history of chronic hepatitis B virus infection: What we knew in 1981 and what we know in 2005.
In: *Hepatology* 43 (S1), S. S173
- Yuen, M-F; Yuan, H-J; Wong, D. K-H; Yuen, J. C-H; Wong, W-M; Chan, A. O-O et al. (2005):
Prognostic determinants for chronic hepatitis B in Asians: therapeutic implications.
In: *Gut* 54 (11), S. 1610–1614
- Yu, Jian-Wu; Sun, Li-Jie; Zhao, Yong-Hua; Kang, Peng; Li, Shu-Chen (2010):
The Study of Efficacy of Lamivudine in Patients with Severe Acute Hepatitis B.
In: *Dig Dis Sci* 55 (3), S. 775–783

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Jilg für die Überlassung des Themas, die Unterstützung, Förderung, das Durchhaltevermögen sowie für die Nachsichtigkeit während der letzten Jahre.

Besonderen Dank auch an alle Mitarbeiter, die in unserer Arbeitsgruppe tätig waren. Insbesondere sind hier zu nennen:

Frau Dr. rer. nat. Barbara Daller, der ich aufs herzlichste Danke für ihre Geduld, dafür, dass sie immer ein offenes Ohr auch für die kleinsten Probleme hatte und dafür, dass sie einem Medizinstudenten beigebracht hat, wie „Labor überhaupt funktioniert“.

Herrn PD. Dr. med Jürgen Wenzel, der immer, wenn nötig, mit Rat und Tat zur Seite stand.

Meinen Mitdoktoranden und Leidensgenossen: Frau Dr. med. Julia Preiß und Ulf Leisner in Erinnerung an eine wechselhafte Laborzeit.

Mathias Schemmerer, der unser Laborteam als Praktikant vervollständigt hat.

Weitere Wegbegleiter aus dieser Zeit, denen an dieser Stelle, falls nicht schon während der Entstehung der Arbeit passiert, unbedingt ein großes Dankeschön zu sagen ist:

Frau Barbara Heldmann, die mir die Zellkultur nahe gebracht hat.

Frau Bianca Ehrlich, die unzählige meiner Proben ausgewertet hat.

Dem PCR-Team, Frau Anette Rohrhofer, Frau Jasmin Klein, Frau Sissi Schreder-Meindl, Frau Elke Kreuzpaintner, die mich in die PCR-Technik eingewiesen haben.

Ein Vergelts Gott auch Frau Barbara Hottenträger, Frau Irena Brunskole, Frau Sylvia Allmeier und Frau Eveline Lang.

Unserer Sekretärin Angela Niebauer danke ich für ihre Hilfe bei allen organisatorischen Angelegenheiten.

Allen Menschen, die mich ein Stück auf meinem Weg begleitet haben und mich noch immer begleiten:

Christian Eckl, Andrea Obermeier, Kathi Hilgart, Tina Binder, Andi Hilgart, Christina Putz, Doris und Christian Lauer...

Zu guter Letzt möchte ich mich in besonderem Maße herzlichst bei meiner Familie bedanken, ohne deren jahrelange Unterstützung Vieles nicht möglich gewesen wäre.