

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

1. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor: Prof. Dr. Ansgar W. Lohse

Untersuchungen der replikativen Aktivität der cccDNA in vivo in ruhenden und proliferierenden Hepatozyten mithilfe des uPA Mausmodelles

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin /Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Tim Broja aus Krefeld

Hamburg 2011

Für meine Familie

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 02.04.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. J. Petersen

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. M. Sterneck

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. G. Tiegs

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung.....	3
1.1	Allgemein.....	3
1.2	Übertragung.....	4
1.3	Verlauf.....	4
1.4	Immunpathogenese.....	5
1.5	Erreger.....	6
1.6	Lebenszyklus.....	7
1.7	Therapie.....	9
1.8	CccDNA.....	9
1.9	Mausmodell.....	11
1.10	Ziel und Versuchsaufbau.....	11
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Materialien.....	14
2.2	Methoden.....	21
2.2.1	Genotypisierung.....	21
2.2.2	Agarose-Gel-Elektrophorese.....	22
2.2.3	Isolierung und Transplantation.....	22
2.2.4	Schnitte.....	23
2.2.5	Färbungen.....	23
2.2.6	Biopsieverarbeitung.....	25
2.2.7	RNA/DNA-Quantifizierung.....	28
2.2.8	Light Cyclers.....	29
2.2.9	Reverse Transkription.....	34
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Anwachsen und Proliferation der seriell transplantierten PTH.....	35
3.2	Bestimmung der Änderung der intrahepatischen cccDNA-Anzahl.....	38
3.3	Bestimmung der Änderung der Virus-Last und die virale Aktivität.....	40
3.4	Pregenomic RNA(pgRNA).....	42
3.5	Zustand der Virusproteine zu verschiedenen Zeitpunkten.....	43

4	Diskussion.....	45
5	Zusammenfassung.....	50
6	Abkürzungsverzeichnis	51
7	Literaturverzeichnis	52
8	Danksagung	55
9	Lebenslauf	56
10	Eidesstattliche Erklärung	58

1 Einleitung

1.1 Allgemein

Weltweit sind etwa 2 Milliarden Menschen mit dem Hepatitis B Virus (HBV) in Kontakt gekommen, davon haben etwa 350 Millionen eine chronische Hepatitis B Infektion. Somit gehört die Hepatitis B Erkrankung zu den häufigsten Infektionskrankheiten. Etwa 600.000 Menschen sterben jährlich an der durch die chronische Hepatitis B verursachte Leberzirrhose und dem hepatozellulärem Karzinom (HCC). Trotz eines vorhandenen wirksamen Tot-Impfstoffes breitet sich das Virus noch weiter aus, so dass die Hepatitis B Erkrankung ein großes gesundheitspolitisches Problem darstellt.

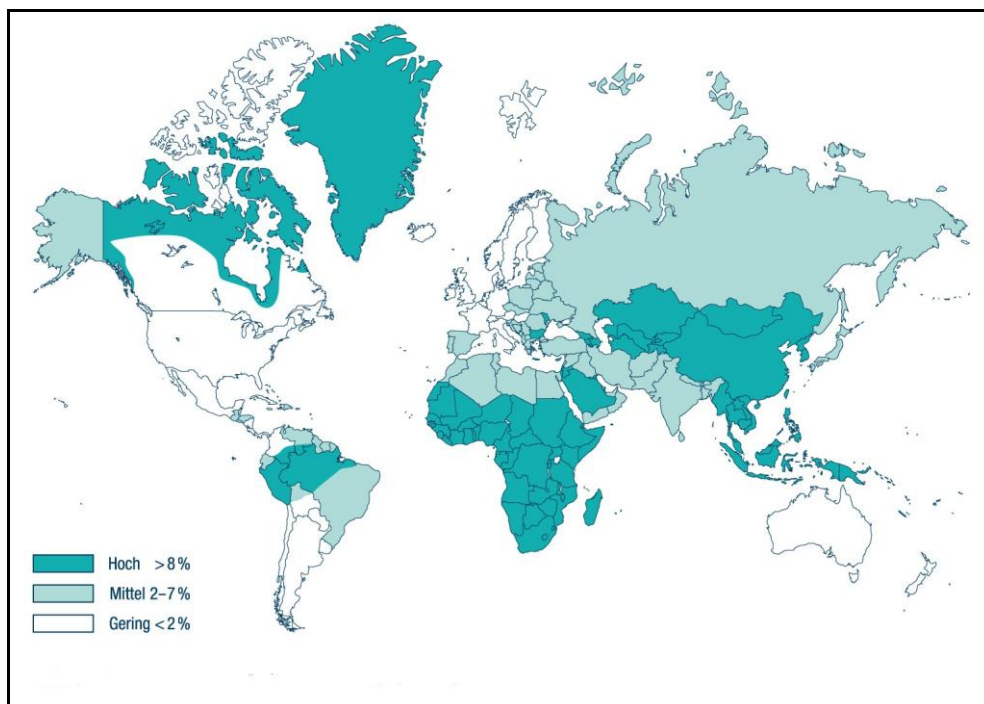


Abbildung 1: Weltweite Prävalenz des Hepatitis B Virus in drei Stufen: hoch, mittel und gering (Center for Disease Control (CDC), Travelers' Health: Yellow Book, 2006).

1.2 Übertragung

Das Virus ist hoch infektiös und wird über Blut/Blutprodukte (parenteral), über Sexualverkehr und vor allem in endemischen Gebieten perinatal übertragen.

1.3 Verlauf

Der klinische Verlauf der Hepatitis B Erkrankung ist sehr variabel und zeigt sich in verschieden starken Ausprägungen.

Man unterscheidet bei der Hepatitis B Infektion einen akuten und einen chronischen Verlauf. Wichtiger serologischer Parameter im Bezug auf den Verlauf ist das HBs Antigen (HBs-Ag). Von chronischer Hepatitis B spricht man bei einer Persistenz des HBs-Ag über sechs Monate.

Etwa 5-10% der HBV-Infektionen werden chronisch und führen zur Schädigung der Leber. Leberzirrhose und das HCC können die Folge sein. Als Sonderfall ist die perinatale Infektion zu sehen, bei der die Hepatitis B Erkrankung bei einem hohen Anteil von 90% chronisch wird, da das Immunsystem die Viruspartikel nicht als fremd erkennt (Visvanathan and Lewin, 2006).

Eine ausgeheilte HBV-Infektion ist definiert über den Verlust des HBsAG. Allerdings ist die Nomenklatur hier eher kritisch zu sehen, da es Hinweise darauf gibt, dass das Virus nie ganz aus den Leberzellen eliminiert wird. Daher kann es auch bei ausgeheilten Hepatitis B Erkrankungen zu spontanen Reaktivierung kommen, die besonders bei einer Immunsuppression, z.B. bei einer Chemotherapie oder der HIV-Erkrankung, auftreten kann (Lascar et al., 2005).

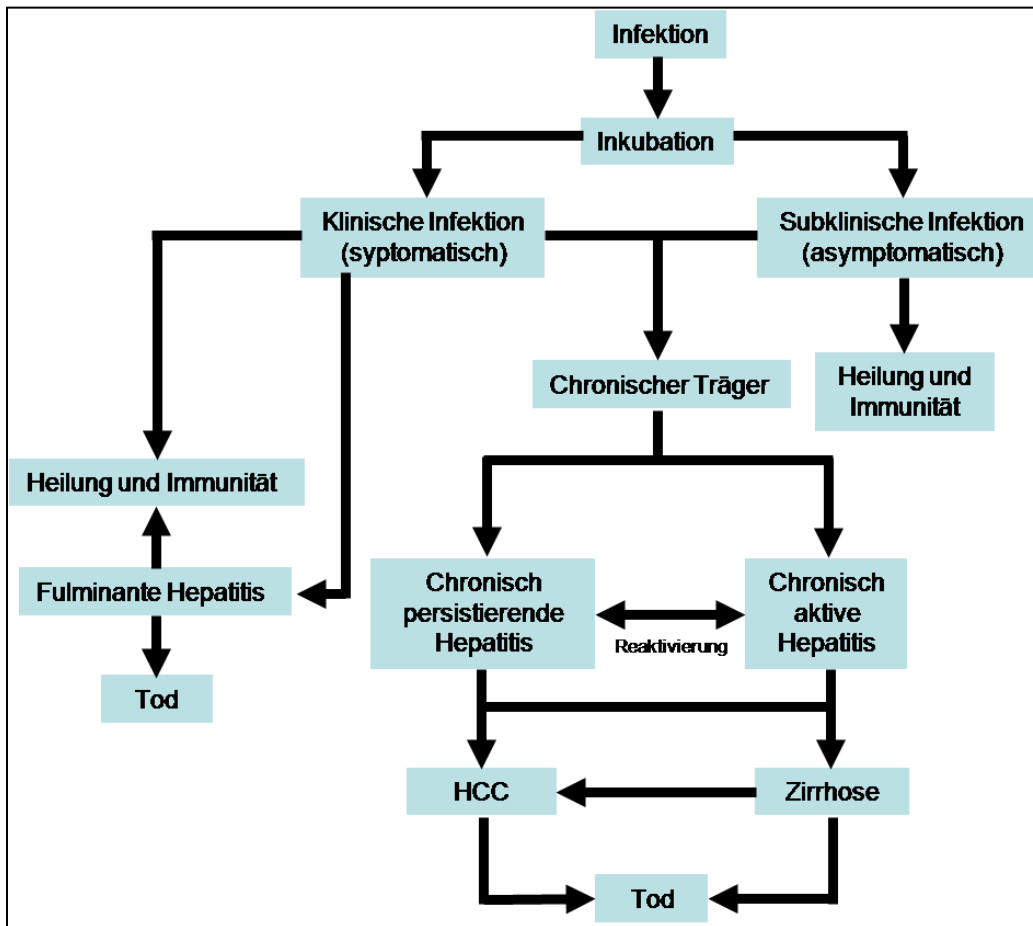


Abbildung 2: Mögliche Krankheitsverläufe bei Infektion mit dem Hepatitis B-Virus

1.4 Immunpathogenese

Das HBV löst eine Abwehrreaktion des Immunsystems aus. Diese besteht aus einem Zusammenspiel des initialen und adaptiven Immunsystems. Es wird angenommen, dass freigesetzte Zytokine wie insbesondere Interferon- γ (INF- γ), Tumor-necrosis-factor- α (TNF- α) und Interferon α/β (INF α/β) zu einer Inhibition der Replikation des Virus führen können (Guidotti et al., 1999, Murray et al., 2005). Zudem wird die Bildung zytotoxischer Immunzellen (z.B. CD8 positive T-Zellen) angeregt, die direkt auf infizierte Leberzellen wirken und zum Zelltod führen (Murray et al., 2005, Guidotti et al., 1996). Das HBV an sich ist nicht zytotoxisch (Webster et al., 2000).

Die durch die chronische Infektion verursachte Entzündungsreaktion ist einer der Hauptfaktoren zur Entwicklung der Leberfibrose.

Die Entwicklung des HCC ist noch nicht vollständig geklärt. Jedoch begünstigt sowohl der erhöhte Zyklus von Zelltod und Regeneration als auch die kontinuierliche Produktion von toxischen Sauerstoffradikalen in der persistierenden Infektion Mutationen im Wirts-Genom (Dandri et al., 1996). Zudem gibt es Hinweise, dass virale Faktoren einen synergistischen Effekt auf die Karzinogese haben.

1.5 Erreger

Das HBV gehört zu der Gruppe der behüllten Hepatitis-DNA-(Hepadna-) Viren. Das Virion (Dane-Partikel) besteht aus einer Virushülle und einem Kern (Nukleokapsid), in dem sich die Desoxyribonukleinsäure (DNA) und die daran gebundene reverse Polymerase befinden.

Die mit 3200 Basenpaaren kleine Virus-DNA liegt im Virion als relaxed circular DNA (rcDNA) vor. Sie ist partiell doppelsträngig und hat einen kompletten Minus-Strang sowie einen inkompletten Plus-Strang. Die DNA ist sehr kompakt und die einzelnen Nukleotide werden überlappend von mindestens einem offenen Leseraster (open reading frame) benutzt.

Das open reading frame (ORF) Polymerase (Pol) kodiert für die virale Polymerase, die mit ihrer reversen Transkriptase-Aktivität das zentrale Enzym der viralen Reproduktion darstellt.

Das ORF Core, auch als Core Region bezeichnet, kodiert für die strukturellen Proteine des Nukleokapsids (HBc-Ag). Hierunter fällt auch das für die Diagnostik und den Krankheitsverlauf wichtige HBeAg, welches aus einer Modifikation des HBcAg entsteht.

Das ORF S/pre-S kodiert für die viralen Oberflächen-Glycoproteine (HBs-Ag).

Das ORF X kodiert für ein komplexes regulatorisches Protein, das in Tiermodellen eine wichtige Rolle in Bezug auf die Infektiosität spielt und eine modulatorische Wirkung auf die Intensität der Virusexpression besitzt (Ganem, 2006).

Zunächst findet über die pregenomische RNA (pgRNA) die Translation des Core-Proteins und der viralen Polymerase statt. Das regulatorische X-Protein und die drei Oberflächenproteine werden von den anderen subgenomischen RNA translatiert. Nach einer komplexen Formierung der pgRNA mit der reversen Transkriptase und der Core-Proteine entsteht ein RNA-enthaltendes Nukleokapsid, welches über eine reverse Transkriptase und die Synthese des Plus-Stranges zu einem rcDNA-enthaltendem Nukleokapsid innerhalb des Cytoplasmas heran reift.

Das Nukleokapsid schließt sich mit den Oberflächenproteinen zusammen und wird als Virion aus den Leberzellen geschleust (Nassal, 2008).

Alternativ können die rcDNA-enthaltenden Kapside zurück in den Zellkern transportiert werden. Dieser Vorgang wird auch als „re-entry“ bezeichnet und führt zu einer erhöhten Anzahl an cccDNA-Klonen, die abhängig vom Wirt durchaus variieren kann. Dabei können bis zu 60 cccDNA-Kopien in einer Leberzelle gefunden werden (Zhang et al., 2003).

Ein wichtiger Unterschied zu einem vom Aufbau ähnlichen Retrovirus liegt darin, dass das HBV sein DNA-Genom nicht in die Leberzell-DNA integrieren muss, sondern die Virale Matrize (cccDNA) als eigenständige episomale Minichromosom entsteht.

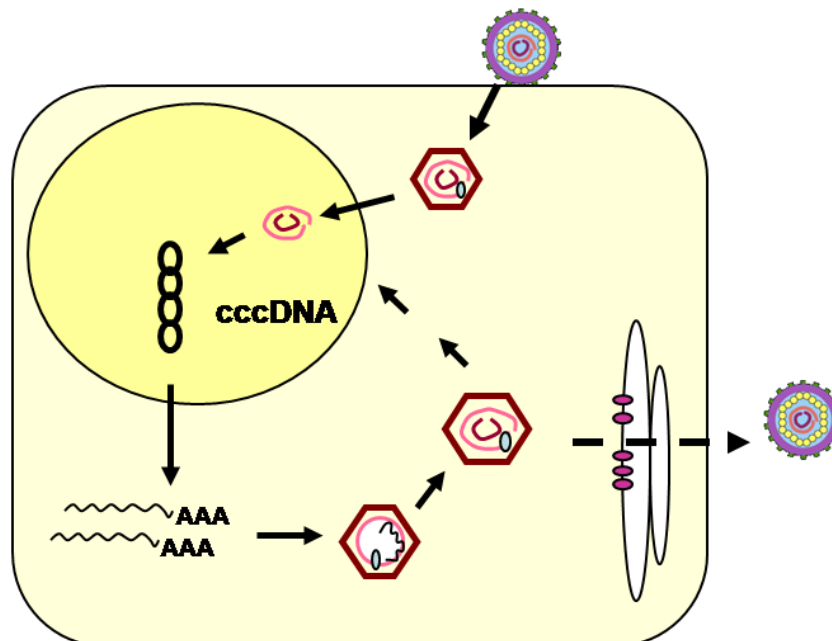


Abbildung 4: Lebenszyklus des Hepatitis B-Virus vom Eintritt in die Leberzelle bis zur Freilassung neuer Virionen.

1.7 Therapie

Bisher gibt es zwei verschiedene Ansätze bei der Behandlung von chronisch HBV-infizierten Patienten: Zum einen die Gabe von Interferon α (IFN α), welches sowohl direkt antiviral wirkt als auch über die Stimulation des Immunsystems die Ausbreitung des HBV hemmt. Zum anderen die Verabreichung von Nukleotid/Nukleosid-Analoga (NUCs), die die HBV Reverse Transkriptase hemmen und dadurch die Neusynthese von Virus-DNA verhindern. Allerdings besitzen NUCs keinen direkten Einfluss auf die cccDNA.

1.8 CccDNA

Die cccDNA im Zellkern der Leberzelle ist der essentielle Bestandteil im Lebenszyklus der Hepadna-Viren. Die cccDNA ist sehr stabil und verbleibt über lange Zeit im Zellkern. Selbst bei klinisch gesunden Patienten und trotz erfolgreicher medikamentöser Therapie ist immer noch eine geringe Menge an cccDNA in den Hepatozyten zu finden ist. Aus diesem Grund kommt es nicht zur kompletten Ausheilung der Hepatitis B-Infektion, und es kann zu einer Reaktivierung der Erkrankung kommen (Mason et al., 2005, Rehermann et al., 1996, Zoulim, 2005).

Die cccDNA, gebunden an Histon- und nicht Histon-Proteinen, liegt in chromatin-ähnlicher Struktur als eine Art Minichromosom im Zellkern vor (Levrero et al., 2009, Nassal, 2008). Da die cccDNA nicht in dem Wirts-Genom integriert vorliegt, wird die DNA auch nicht durch den zellulären semikonservativen Replikationsmechanismus repliziert, sondern nutzt die zellulären Transkriptionsfaktoren zur Vervielfältigung.

In dem „Duck-Hepatitis-B-Virus“ System wurde gezeigt, dass durch diesen Replikationsmechanismus sich pro Hepatozyt bis zu 50 (Menge variiert im Krankheitsverlauf) cccDNA-Kopien anhäufen können. (Wu et al., 1990).

Versuche haben aufgezeigt, dass die cccDNA ein Molekül mit einer langen Halbwertszeit ist. Das wurde durch Studien festgestellt, in denen mit dem Woodchuck-Hepatitis-Virus (WHV) infizierte Tiere mit Polymerase-Hemmern behandelt wurden. Da Polymerase-Hemmer lediglich auf die Polymerase wirken und so die Entstehung weiterer Virus-DNA-Moleküle hemmen, führte die Behandlung

zwar zu einer Abnahme der viralen Produktion, der Pool der cccDNA blieb jedoch konstant (Dandri et al., 2000, Moraleda et al., 1997).

Erst nach einem sehr langen Zeitraum führte die Behandlung mit Polymerase-Hemmern auch zu einer Reduktion der cccDNA-Anzahl (Werle-Lapostolle et al., 2004).

Zwar lässt sich dieses Erkenntnis therapeutisch nutzen, es steigt jedoch mit der Länge der Behandlung auch die Anzahl der resistenten Mutanten (Addison et al., 2002).

Um therapeutisch einen Fortschritt zu erlangen, ist es deshalb von großer Bedeutung, Wege zur Reduktion der intrahepatischen cccDNA-Last zu finden.

Bislang gibt es drei Erklärungsansätze für eine solche Reduktion.

Erklärungsansätze zur Reduktion der intrahepatischen cccDNA-Last:

1. „Verdünnung“ der cccDNA im Lebergewebe. Es wird angenommen, dass durch das Immunsystem infizierte Zellen eliminiert werden. Zur Kompensation proliferieren unter anderem die mit dem Virus infizierten Leberzellen. Durch die Zellteilung wird die cccDNA-Anzahl pro Zelle verdünnt (Mason et al., 2005, Zhang et al., 2003, Thermet et al., 2008).
2. „Verlust“ der cccDNA im Lebergewebe. Eine durch den Zelltod aktivierte Proliferation führt bei infizierten Hepatozyten zu einem Verlust der cccDNA durch Zellteilung, was sich durch den Mangel an zentromeren Strukturen für die cccDNA erklären ließe. So zeigte ein Versuch mit einer mit dem Duck-Hepatitis-Virus infizierten Ente, dass bei antiviraler Therapie mit Polymerase-Inhibitoren ein größerer Verlust an cccDNA zu beobachten war, wenn eine höhere Proliferationsrate der Leberzellen vorlag (Addison et al., 2002).
3. CccDNA wird durch nicht zelltodvermittelnde Zytokine destabilisiert (Guidotti et al., 1999)

Dass Spuren einer WHV-Infektion in cccDNA-freien Woodchuck Hepatozyten in Form von Teilintegrationen von cccDNA in die Wirts-DNA gefunden wurden (Mason et al., 2005), spricht dafür, dass cccDNA in den Zellen bereits vorhanden gewesen war. Dieses Erkenntnis deutet darauf hin, dass cccDNA (wie oben in den Ansätzen zwei und drei beschrieben) aus den Zellen verloren gehen kann.

Generell geht man davon aus, dass die cccDNA im Nukleus sehr stabil ist, wenn keine Zellteilung stattfindet (Moraleda et al., 1997). Es ist jedoch bislang wenig über die Auswirkungen auf die cccDNA bei Zellproliferation bekannt, hauptsächlich auf Grund der geringen Breite an HBV-Wirten und der limitierten Anzahl an Infektionsmodellen. Mit Hilfe des unten beschriebenen Mausmodells soll im Rahmen der vorliegenden Dissertation der Effekt bei Zellproliferation untersucht werden.

1.9 Mausmodell

Bei dem Leberregenerations-Mausmodell wirkt bei Uroplasminogenaktivator (uPA)-transgenen Mäusen die Expression von dem Albumin-Promoter hepatotoxisch und induziert somit einen starken Wachstums-Vorteil für transplantierte Hepatozyten, was zu einer spezifischen Repopulation der erkrankten Mäuselebern führt (Dandri et al., 2006).

Durch das Kreuzen von uPA-transgenen Mäusen mit immundefizienten Mäusen (scid/beige), deren Reifung der T- und B-Lymphozyten gestört ist, erhält man Mäuse, in die man xenogene Hepatozyten transplantieren kann, ohne dass das Immunsystem diese fremden Hepatozyten abstößt. So ist es unter anderem möglich, auch primäre Hepatozyten von anderen Arten zu transplantieren, die sich durch Hepadnaviren infizieren lassen (Dandri et al., 2001a, Dandri et al., 2001b, Dandri et al., 2005, Dandri et al., 2008, Petersen et al., 1998, Petersen et al., 2008).

1.10 Ziel und Versuchsaufbau

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Stabilität, die Aktivität, sowie die Verteilung der cccDNA in vivo bei sich proliferierenden Hepatozyten zu untersuchen. Der Hinweis darauf, dass die cccDNA bei der Proliferation verloren gehen kann, sollte im Rahmen dieser Dissertation untersucht werden (siehe zweiter Erklärungsansatz

Abschnitt 1.8). Zwei weitere Möglichkeiten zogen wir bei der Verteilung der cccDNA bei proliferierenden Zellen Betracht, sodass sich drei verschiedene Alternativen ergaben:

1. Ungleiche Verteilung der cccDNA auf die proliferierenden Zellen
2. Gleiche Verteilung der cccDNA auf die proliferierenden Zellen
3. CccDNA kann bei der Proliferation verloren gehen

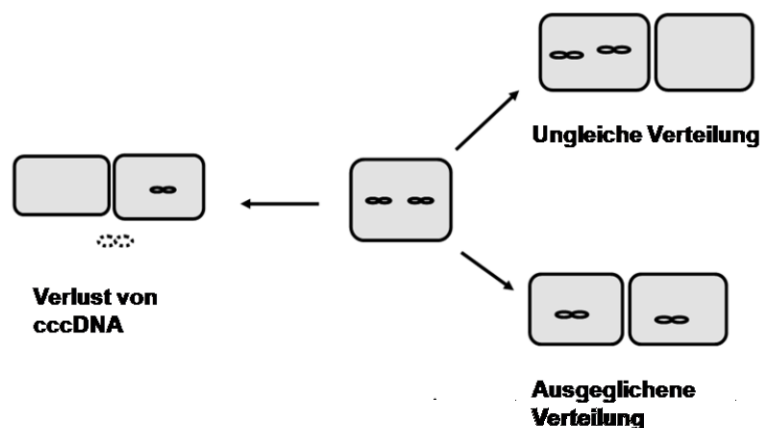


Abbildung 5: Mögliche Verteilung der cccDNA bei Zellteilung

Wir erhofften uns neue Erkenntnisse über die Aktivität und Stabilität der cccDNA, die dazu beitragen können neue Therapieansätze zur Reduktion der cccDNA zu entwickeln.

So wurden im Rahmen dieser Dissertation von chimären Mäusen primäre Tupaia-Hepatozyten (PTH) chronisch mit dem Woolly-Monkey-Hepatitis B-Virus (WM-HBV) infiziert, isoliert und diese seriell in uPA Mäuse transplantiert. Das WM-HBV ist zu dem HBV hochhomolog und ist besonders infektiös für Tupaia-Hepatozyten. Da die Isolation aus human-chimären Mäusen wegen der Verfettung der menschlichen Leber noch problematisch ist, wurden PTH verwendet.

Das Wachstum transplanteder Hepatozyten, das zu Beginn auf Grund der Leberrepopulation induziert wird, macht es möglich, die cccDNA bei sich proliferierenden PTH zu beobachten. Da die Leberrepopulation und somit die Zellproliferation nach einer gewissen Zeit nachlässt, konnten wir für unsere

Untersuchung zusätzlich die proliferierenden PTH mit den ruhenden PTH am gleichen Modell vergleichen.

Insgesamt wurden 19 Tiere seriell transplantiert und diese zu unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten sakrifiziert (5, 10, 20, 40 und 80 Tage). Die Lebern wurden entnommen und für unsere Versuche verwendet.

Mit Hilfe einer real time Polymerase Chain Reaction (PCR) wurden zum einen die Tupaia-Repopulation in der Leber (Messung erfolgte über den β -Actin-Anteil), die cccDNA-Anzahl, die rcDNA-Anzahl, sowie mit Hilfe reverser Transkription die pgRNA-Werte gemessen.

Zusätzlich wurden mit immunhistologischen Färbungen für Proliferationsmarker die Tupaia-Repopulation der Mausleber und die Proliferationsrate der PTH bestimmt.

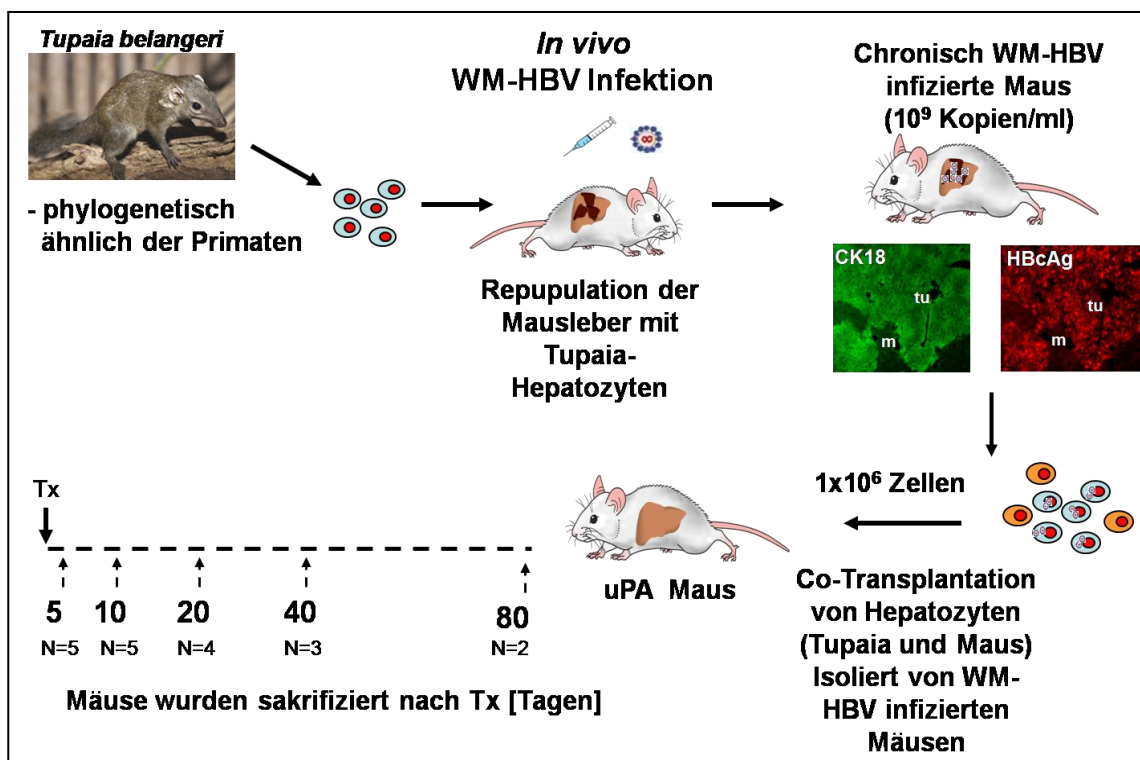


Abbildung 6: Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit beginnend bei der Repopulation über die Infektion und Co-Transplantation bis hin zur Sakrifizierung.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Aceton

Biesterfeld Chemiedistribution GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland

Agarose UltraPure

Invitrogen, Eugene, Oregon, USA

Aquatex

Merck, Darmstadt, Deutschland

Biosphere Filter Tips 10µl

Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

BSA (Bovines Serum Albumin)

DADE Behring, Deerfield, USA

Citratpuffer pH 6

Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA

Chirurgische Klammern

Becton Dickinson and Company, USA

Cryostat Frigocut 2800

Reichert-Jung, NY, USA

DAPI Hoechst 33258 (bis-benzimide)

Molecular Probes, Oregon, USA

Deckgläser

Marienfeld Laboratory Glassware, Deutschland

DNA Engine Peltier Thermal Cycler
Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Doppelfärbekit EnVision
Dako Cytomation, Dänemark

Ethanol 75%, 90%, 100%
Apotheke des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Ethidiumbromid, aqueous solution, 500 µg/ml
Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Falcon-Röhrchen 50 ml
Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

Fluorescent Mounting Medium
Dako Cytomation, Dänemark

Formaldehyd 16 % (Methanol free) ultra pure, 10 ml Brechfläschchen
Polysciences Inc., Warrington, USA

FRET-Sonden für die light cycler PCR

β-Actin:

- GGTGACAGCAGTCGCAGT-FL;
- LCRed640-GTTGAAGCGAGCATCCCTAGAGTTCTG-PH

cccDNA :

- GGG GTC TCC ATG CAT CTC CAG GTTFL
- LC-Red-AGG TGA AGC GAA GAG CAC ACG GCC-PH

rcDNA :

- CACTCACCAACCTGCTGTCCACCGA-FL
- LCRed640-TGTCCTGGGTATCGCTGGATGTGTTT

pgRNA :

- TCCTTAGCTTCTTGGGTGGGAACFL
- LCRed640-ATTTGGAGGATCCTGCTGCTAGAGAATTAGT-PH

Gelkasten

Peqlab, Erlangen, Deutschland

Gel Doc 2000

Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Goat-Anti-Rabbit (rot) Alexa Flour 546

Invitrogen, Eugene, Oregon, USA

Hämatoxylin

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Isopentan

Apotheke des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf

Isopropanol

Apotheke des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf

Ketamin

Apotheke des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf

Kühlblock Light Cycler Centrifuge Adapters

Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Ladder-Mix o gene Ruler (ready to use), Fermentas

Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA

Loading Buffer 6xDNA Loading Dye, Fermentas

Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA

Light Cycler Capillaries (20ul)

Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Light Cycler Fast Start DNA Master HybProbe
Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Light Cycler Instrument 1.5
Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Light Cycler Software 3.5
Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Master Pure Complete DNA&RNA Purification Set
Epicentre, Madison, USA

Methanol
J.T. Baker, Deventer, Dänemark

Minishaker
IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland

Mikrotom-Klingen
Feather, Japan

Mikrowelle HMT75M421
Bosch, Deutschland

Mikrotubes „Safe-Lock micro test tubes“
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Objektträger Super Frost/ Plus
Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland

PBS
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Pipetten

Gilson Medical, Frankreich

Pipettenspitzen

Nerbe plus, Deutschland

Polyclonal Rabbit Anti-Virus Core Antigen

DakoCytomation, Dänemark

Präzisionswischtücher Kimtech Science

Kimberly-Clark, Dallas, USA

Primärantikörper (CK 18-AK KlonDC 10)

Dako Cytomation, Dänemark

Primärantikörper (Mouse anti-PCNA Klon PC 10)

Invitrogen, Eugene, Oregon, USA

Primer für die Genotypisierung:

uPA :

- vorwärts: CATCCCTGTGACCCCTCC
- rückwärts: CTCCAAACCACCCCCTC

Primer für die light cyclor PCR

β-actin:

- vorwärts: AACGAGATGAGATTGGCA
- rückwärts: AATCCAAGTCCTCGGC

cccDNA :

- vorwärts: CTC CCC TCC TGT GCC TTT
- rückwärts: GCC CAA AAG CCA CCC AAG

rcDNA :

- vorwärts: CTCGTGGTGGACTT
- rückwärts: CAGCAGGATGAAGAGGAA

pgRNA :

- vorwärts: CACTGTTCACCGCACCATATA
- rückwärts: ACCTTCAGTCCCAGTTTG

Quant-iT ds DNA BR, Molecular Probes
Invitrogen, Eugene, Oregon, USA

Quant-iT RNA BR, Molecular Probes
Invitrogen, Eugene, Oregon, USA

Qbit-Fluorometer
Invitrogen, Eugene, Oregon, USA

Qbit-Tubes
Invitrogen, Eugene, Oregon, USA

REExtract-N-Amp Tissue PCR Kit
Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland

RNeasy mini kit
Qiagen, Venlo, Niederlande

Rompun
Apotheke des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf

Safe-Lock Tubes 1,5ml/ 2ml
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

TBST
Dako Cytomation, Dänemark

Tight Potter, Wheaton Dounce Tissue grinder tight
Wheaton Science Products, Millville, USA

Tischzentrifuge – Centrifuge5415 R
Eppendorf AG, Hamburg, Germany

Tischzentrifuge – Centrifuge5417 C
Eppendorf AG, Hamburg, Germany

Tissue-Tek
Sakura Finetek, USA

Thermomixer compact
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Transcriptor First Strand DNA Synthesis Kit
Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Wasserstoffperoxid 30%
Merck, Darmstadt, Germany

2.2 Methoden

2.2.1 Genotypisierung

Zum Nachweis des uPA-Transgens sowie des scid/beige-Transgens wurden die verwendeten Mäuse zuvor genotypisiert. Dazu wurde mit dem REExtract-N-Amp Tissue PCR Kitt von Sigma DNA aus den entnommenen Schwanzspitzen isoliert und anschließend genotypisiert.

Zunächst wurde dafür der Mastermix 1 vorbereitet. Pro Probe wurde 100µl Extraction Solution sowie 25µl Tissue Preparation Solution in einen Tube gefüllt. Dieser Mastermix wurde zu den Schwanzbiopsien gefüllt und 10 Minuten inkubiert. Hinzu kamen weitere drei Minuten Inkubation bei 95°C auf einem Thermomixer. Anschließend wurde 100ul Neutralization Solution B in jede Probe gefüllt und danach gevortext.

Daraufhin folgte die PCR der gewünschten Genabschnitte. Hierfür wurde der Mastermix 2 angefertigt. Pro Probe wurde 5µl H₂O, 1µl Primer und 10µl REExtract-N-Amp PCR Reaction Mix in ein Tube gefüllt. Nun wurden 16µl von dem Mastermix 2 und 4µl von dem Tissue Extract in einem PCR-Tube zusammengefügt. Schlussendlich konnte die PCR mit den Proben (zuzüglich zwei Standardproben) durchgeführt werden (siehe Tabelle) und dann auf einem Agarosegel mit den Standards verglichen werden.

PCR:

Schritt	Temperatur	Zeit in hh:mm:ss
1	94°C	00:03:00
2	94°C	00:00:40
3	57°C	00:00:45
4	72°C	00:00:50
5	39 Zyklen der Schritte 2-4	
6	72°C	00:10:00

2.2.2 Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Erfolgskontrolle der PCR wurde eine Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde ein Agarosegel (2%) gegossen. Dazu wurde 1mg Agarose in 50ml TAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Sobald aus der Agarose/TAE-Puffer-Mischung eine klare, homogene Flüssigkeit wurde, konnte nach kurzem Abkühlen 1,5µl Ethidiumbromid hinzugefügt werden. Dieses Gel wurde in eine Gelkammer gegossen. 5µl des PCR-Produktes wurden mit 1µl Loading Buffer gemischt und in die Geltasche pipettiert. Um die Länge des PCR-Amplifikates zu bestimmen wurde in eine Geltasche 1µl Marker (Ladder-Mix o gene Ruler) pipettiert. Das fertig gelaufene Gel wurde in dem GelDoc 2000 belichtet und mit Hilfe des Programms GelDoc fotografiert und abgespeichert. Anhand der Fotos konnten die Längen der PCR-Produkte bestimmt werden.

2.2.3 Isolierung und Transplantation

18 bis 24 Tage alte Mäuse wurden mit einem Gemisch aus Rompun und Ketamin gemäß den Angaben der Hersteller narkotisiert. Die Mäuse wurden auf ihre rechte Seite gelegt, und ihre linke Seite mit 70%igem Ethanol sterilisiert. Dann wurden sie lateral mit einer Schere geöffnet, und die erhaltene Öffnung solange über dem Peritoneum verschoben, bis die Milz sichtbar war. Daraufhin wurde das Peritoneum mit einem weiteren Schnitt geöffnet, und die Milz mit einer Pinzette zur Hälfte herausgezogen. Die herausgezogene Milz wurde nun an ihrem distalen Ende mit 3.0 Seide ligiert, und durch die Ligatur hindurch 50µL der Zellsuspension mit einer 1ml gasdichten Hamilton Spritze und einer 30 G/45° Kanüle in die Milz injiziert. Die Ligatur wurde zugezogen, und die Milz wieder in die Körperhöhle zurück geschoben. Die Seiten der Wunde wurden arretiert, und die Wunde mit chirurgischen 1cm Klammern verschlossen. Die gesamte Operation wurde auf einer 37°C warmen Heizplatte durchgeführt, um eine Auskühlung der Mäuse zu vermeiden. Die Mäuse erwachten in der Regel 20-30 Minuten nach der Narkose.

2.2.4 Schnitte

Kryofixierung:

Die Gewebefragmente wurden direkt nach Entnahme in TissueTek eingebettet, und in mit Trockeneis versetztem Isopentan eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80°C.

Kryoschnitte:

Die Anfertigung der Kryoschnitte erfolgte am Rotationsmikrotom bei -20°C mit 10 µm Schichtdicke. Sie wurden auf einem Objektträger aufgebracht und entweder entsprechend dem jeweiligen Färbeprotokoll (siehe unten) unmittelbar fixiert oder unfixiert bei -80°C eingefroren. Die Lagerung und Aufbewahrung der Schnitte erfolgte bei -80°C für die Standard- und Fluoreszenzfärbungen.

2.2.5 Färbungen

2.2.5.1 PCNA/CK18

Die Objektträger wurden zum Fixieren für 15 Minuten in die mit Formaldehyd (4%) gefüllte Küvette gegeben. Im direkten Anschluss wurde der Objektträger für 15 Sekunden in Aceton getaucht. Dieser Schritt hilft bei der Entfettung der Schnitte. Nach der Fixierung wurden die Schnitte für 10 Minuten in TBST gewaschen. Nun wurden die Objektträger Rücken an Rücken in ein Falcon-Röhrchen gestellt. Der Deckel des Falcon-Röhrchens hatte zwei längliche Schnitte. Die Falcon-Röhrchen wurden mit Citrat-Puffer aufgefüllt und in einer Mikrowelle 2x5 Minuten zum Kochen gebracht. Bei diesem Schritt, der der Demaskierung dient, ist es wichtig, dass die Schnitte nie austrocknen. Danach wurden die Schnitte für etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Erst danach wurde der Objektträger drei Mal eine Minute in TBST gewaschen. Zur Peroxidaseblockierung wurde der Objektträger 10 Minuten in einem Methanol/Peroxidase-Mix inkubiert (Methanol 60µl/Peroxidase 6µl). Im Anschluss wurde der Objektträger 3x5 Minuten in TBST gewaschen und der Waschpuffer mit einem Wischtuch entfernt. Es folgte ein weiterer Blockade-Schritt. Dazu wurde 1% BSA auf den Schnitt pipettiert und 30 Minuten inkubiert. Nach 3x1 Minute Waschen wurde auf dem Schnitt der Primärantikörper PCNA (D10) 1/500 verdünnt mit TBST pipettiert (150µl). Dieser wurde mindestens eine Stunde bei

Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Es wurde 3×1 Minute in TBST gewaschen. Nach der Entfernung des Waschpuffers wurde der Schnitt mit dem Sekundärantikörper aus dem DoubleStaining Kit LinkPolymer für 30 Minuten in einer Feuchtkammer inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift von 3×1 Minute.

Der Objektträger wurde um die Schnitte trocken gewischt und ein weiterer Sekundär-Antikörper (Polymer HRP aus dem double staining kit) für 30 Minuten in einer Feuchtkammer inkubiert. Diese wurden wieder abgewaschen (3×1 Minute in TBST). Der Waschpuffer wurde wieder abgewischt und ein Substratgemisch (1ml DAB+Substratpuffer zu 10µl DAB+Chromogen Substrat) aus dem Double Staining Kit auf die Schnitte aufgetragen. Das Gemisch wurde inkubiert bis eine Farbreaktion zu beobachten war (ca. 1-3 Minuten). Die Farbreaktion wurde sofort mit destilliertem Wasser gestoppt.

Anschließend wurden die Schnitte mit einem Double-Stain-Block für fünf Minuten inkubiert. Dieser wurde dann wieder in einem Waschvorgang (3×1 Minute in TBST) abgewaschen. Der zweite Primärantikörper (CK 18-AK KlonDC10) wurde auf die Schnitte aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Es folgten ein Waschgang (3×1 Minute in TBST) und die Trocknung des Objektträgers. Der Sekundärantikörper LinkPolymer wurde für 30 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift (3×1 Minute) und das Entfernen des Waschpuffers. Ein weiterer Sekundärantikörper (Labelled Polymer-AP) wurde für 30 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert. Der Antikörper (Ak) wurde wieder abgewaschen (3×1 Minute in TBST). Es folgte die AP-Färbung. Dazu wurde ein Gemisch (1ml fast red Substratpuffer zu 10 µl AP-Chromogen) auf die Schnitte aufgetragen und inkubiert, bis eine Farbreaktion festzustellen war (ca. 15 – 30 Minuten). Diese Reaktion wurde mit destilliertem Wasser gestoppt. Zur Kernfärbung wurde Hämatoxin für 3 Minuten inkubieren gelassen und danach 10 Minuten bei laufendem Wasser abgewaschen. Die Objektträger wurden mit Aquatex eingedeckelt.

2.2.5.2 Core-Immunfluoreszens

Die Schnitte auf dem Objektträger wurden direkt aus einem -80°C kalten Gefrierschrank genommen und in Aceton 15 Minuten fixiert. Anschließend wurde der Objektträger zum Waschen 4×1 Minute in PBS gestellt. Um die Schnitte herum

wurde der Objektträger mit einem Präzisionswischtuch getrocknet. Dann wurde der Primärantikörper (Polyclonal Rabbit Antivirus Hep.BVirusCore antigen) in einer 1/1500-Verdünnung in PBS auf die Schnitte pipettiert (150µl pro Schnitt) und in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur eine Stunde lang inkubiert. Danach wurden die Schnitte wieder 3×3 Minuten in PBS gewaschen. Der Objektträger wurde um die Schnitte herum mit einem Tuch getrocknet. Es wurde der Sekundär-AK (Anti-Rabbit), der mit einem Fluoreszenzfarbstoff verbunden ist, mit einer Verdünnung von 1/200 in PBS auf die Schnitte pipettiert (150µl). Um das Verblässen des Fluoreszenzfarbstoffs zu vermindern, wurden ab jetzt möglichst alle Schritte in einer dunklen Kammer durchgeführt. Die Ak wurden in einer Feuchtkammer 45 Minuten inkubiert. Danach wurde der Ak wieder abgewischt (3×3 Minuten in PBS). Es folgte eine Kerngegenfärbung. Dazu wurde 4µl des Farbstoffes DAPI in eine mit 80 ml gefüllte Küvette gemischt. Der Objektträger wurde eine Minute in diese Küvette gestellt. Der Objektträger wurde herausgenommen und um die Schnitte mit einem Tuch getrocknet. Es wurde ein Tropfen Mounting-Medium auf die Schnitte gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Die Schnitte wurden bei 4°C in einer dunklen Kammer gelagert.

2.2.6 Biopsieverarbeitung

Etwa 15mg der entnommenen Leber wurden in eine 1,5ml Tube hineingegeben. Anschließend wurden 420µl RLT Buffer in das Tube gefüllt. Die Leber wurde mit Hilfe eines Tight-Potters homogenisiert. Dadurch wurden die Zellen inklusive der Zellkerne zerstört und die enthaltenen Nukleinsäuren freigelegt. Aus diesem Homogenisat wurden nun jeweils 200µl für die DNA- und die RNA-Extraktion verwendet. Zuerst wurde mit der RNA-Extraktion begonnen, während die DNA noch eine Stunde lang durch eine Proteinase K verdaut wurde. Die weitere Verarbeitung erfolgte gemäß dem Schema in Abbildung7.

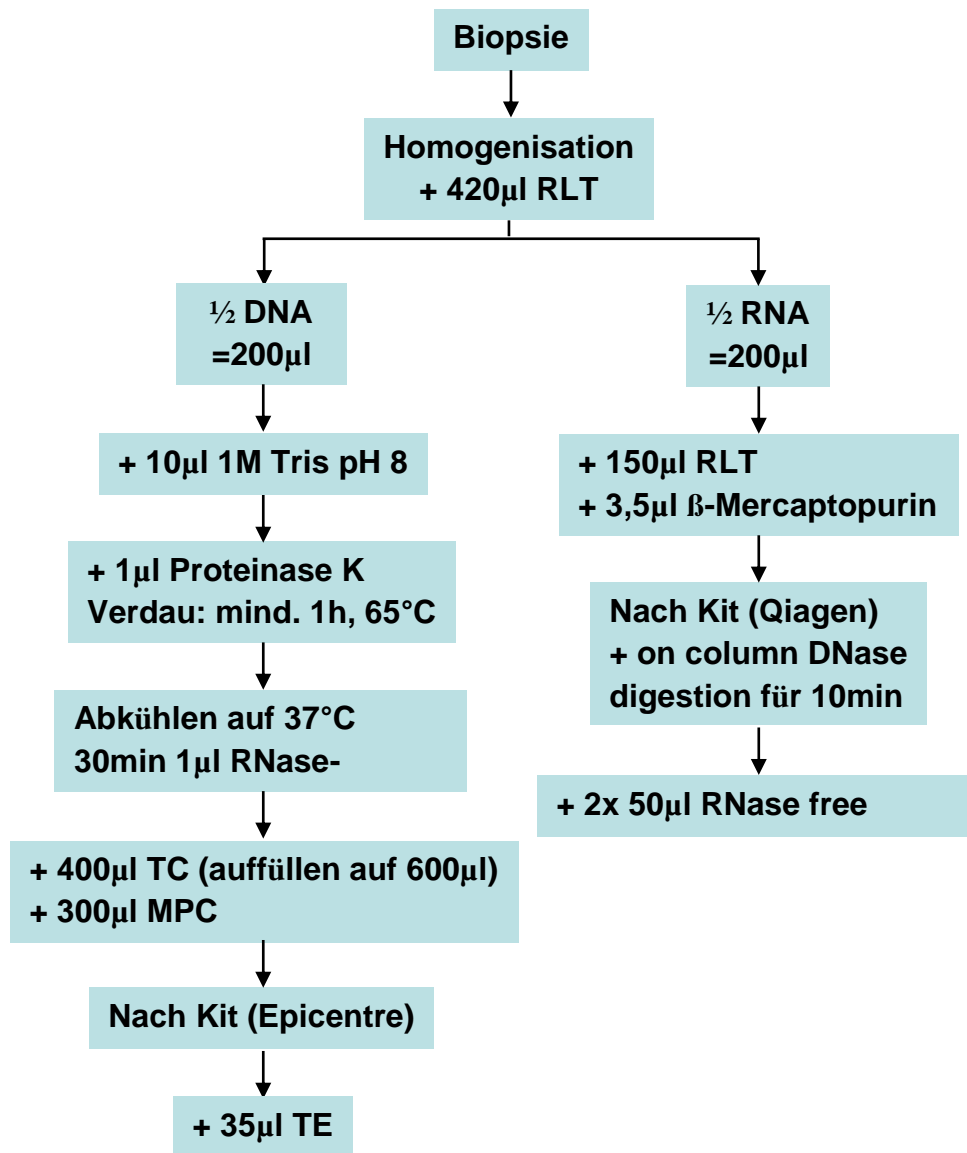


Abbildung7: Schematische Darstellung der Biopsieverarbeitung. Dabei wird sowohl der Weg der DNA-Gewinnung als auch der RNA-Gewinnung aus derselben Biopsie gezeigt.

RNA-Extraktion:

Um die RNA stabil zu halten, wurde dem Homogenisat (200µl) 150 µl RLT + 3,5µl β-Mercaptopurin zugefügt, kurz durchgemischt, danach wurden die Tubes auf das Eis gestellt.

Dann wurde 350µl von 70% Alkohol dem Homogenisat hinzugefügt und umgehend durchgemischt. 700µl der Probe wurde dann in ein RNeasy Spin Column pipettiert, welches sich in einem 2ml Tube befand, und für 15 Sekunden (15000rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. 350µl RW Buffer wurde in die Columns pipettiert und 15 Sekunden (15000rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. Dann wurde direkt auf die Membran der Columns der D-Nase-Inkubations-Mix pipettiert. Die Columns wurden für etwa 15 Minuten stehen gelassen.

Im Anschluss daran wurde 350µl RW1 Buffer in die Columns pipettiert, dann für 15 Sekunden (15000rpm) zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Dieser Schritt wurde wiederholt, nur dass jetzt für 2 Minuten zentrifugiert wurde. Das alte 2ml Collection Tube wurde danach verworfen und die Columns in einen neuen 1,5ml Tube gesetzt. Um nun die RNA aus der Membran auszuwaschen wurde 50µl Wasser direkt auf die Membran gegeben und die Columns für eine Minute (15000rpm) zentrifugiert. Das Wasser mit der gelösten RNA wurde in der Tube gesammelt. Dieser Schritt wurde wiederholt, so dass am Ende die RNA in 100µl Wasser gelöst war. Die Tubes wurden verschlossen und bei -80°C gelagert.

DNA-Extraktion:

Die DNA wurde unter Verwendung des MasterPure complete DNA purification kit (Epicentre, Biozym, Deutschland) aus den Leberbiopsien gewonnen.

Zur pH-Optimierung für den anschließenden Verdau wurde den 200µl des Homogenisats für die DNA-Extraktion 10µl 1M Tris pH 8 hinzugefügt.

Nach Zugabe von 1µl Proteinase K wurde die Probe in einem Schüttler nun mindestens eine Stunde bei 65°C und 500rpm inkubiert. Danach wurde die Probe auf der Arbeitsplatte auf 37°C abgekühlt. Es wurde 1µl DNase-free RNase hinzugefügt. Der RNase-Verdau fand für 30 Minuten bei 37°C statt. Nach dem Verdau wurde die Probe für 5 Minuten auf Eis gestellt.

Der Probe wurden 400µl TC-Buffer hinzugefügt, um sie auf die im Kit vorgesehenen 600µl aufzufüllen. Zu diesen 600µl Probe wurden 300µl MPC-Buffer hinzugefügt, um die enthaltenen Proteine zu fällen. Anschließend wurde die Probe für 10 Sekunden gevortext. Die nun milchig-trübe Probe wurde für 10 Minuten bei 16000g zentrifugiert.

Der Überstand mit den Nukleinsäuren wurde in ein neues Tube überführt und das Pellet verworfen.

Dem Überstand wurden 1000µl Isopropanol hinzugefügt und das Tube danach 30-40 Mal geschwenkt. Im Anschluss wurde die Probe zum Fällen der DNA bei 4°C bei 16000g für 10 Minuten zentrifugiert. Nun wurde das Isopropanol vorsichtig heraus pipettiert, um das entstandene Pellet nicht zu beschädigen.

Das Pellet wurde nun zwei Mal mit 1000µl 75% Ethanol gewaschen und das Ethanol anschließend wieder vollständig entfernt. Abschließend wurde das DNA-Pellet in 35µl TE-Buffer gelöst und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.7 RNA/DNA-Quantifizierung

RNA-Quantifizierung:

Zunächst wurde die Quant-iT Working-Solution angesetzt. Dazu wurde jeweils pro Probe und den beiden Standards 199µl Quant-iT Buffer und 1µl Quant-iT Reagent in ein Falcon-Röhrchen pipettiert. Nun wurde in speziellen Qbit-Tubes 180-199µl der Working Solution mit 1-20µl der zu messenden Proben zu einem Gesamt-Volumen von 200µl zusammengemischt. Die beiden Standards wurden in dem festen Verhältnis von 190µl Working-Solution zu 10µl Probe gemischt. Alle Tubes wurden gevortext und für zwei Minuten zur Inkubation stehen gelassen. Schlussendlich wurden zuerst die Standards und danach die restlichen Proben in den Qbit-Fluorometer gestellt und gemessen.

DNA-Quantifizierung:

Zunächst wurde die Quant-iT Working-Solution angesetzt. Dazu wurde jeweils pro Probe und den beiden Standards 199µl Quant-iT Buffer und 1µl Quant-iT Reagent in ein Falcon-Röhrchen pipettiert. Nun wurde in speziellen Qbit-Tubes 180-199µl der Working Solution mit 1-20µl der zu messenden Proben zu einem Gesamt-Volumen von 200µl zusammengemischt. Die beiden Standards wurden in dem festen Verhältnis von 190µl Working-Solution zu 10µl Probe gemischt. Dann wurden alle Tubes gevortext und für zwei Minuten zur Inkubation stehen gelassen.

Schlussendlich wurden zunächst die Standards und danach die restlichen Proben in den Qbit-Fluorometer gestellt und gemessen.

2.2.8 Light Cycler

Die Light Cycler Real-Time-PCR ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Nukleinsäuren auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion. Dabei wird die Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenz-Signalen, die während eines jeden PCR-Zyklus erfasst werden, durchgeführt.

Alle Messungen wurden mit dem Roche Fast Start HybProbe Kit im Roche Light Cycler durchgeführt.

Dabei wurde vor jedem PCR-Lauf ein Mastermix erstellt, dessen Inhalte dem Kit entnommen wurden. Die Sonden und Primer mussten zusätzlich bestellt werden und waren für die zu messende DNA-Sequenz spezifisch. Der Mastermix wurde zusammen mit den zu messenden Proben in die Glaskapillare pipettiert.

Jede Glaskapillare enthielt dann jeweils 20µl Mastermix. Dieser enthielt:

- x µl Master
- x µl MgCl
- x/x µl Primer 1/2
- x/x µl Sonden 1/2
- x µl H₂O
- x µl Proben

Anschließend wurden die Glaskapillaren zentrifugiert und in das Light Cycler Gerät gesetzt. Zu jedem Lauf gehörten immer sowohl eine Negativ-Probe (H₂O) als auch eine Standardreihe.

β-Actin-Lauf:

Der β-Actin-Lauf diente der Quantifizierung der Tupaia Zellenzahl in zuvor aufgereinigtem Lebergewebe. β-Actin ist ein für Tupaia-Zellen spezifisches Genäquivalent.

Ansetzung des Mastermixes pro Kapillare:

Master	2µl
MgCl	2,4µl
Primer1/2	1µl/1µl
Sonde1/2	2µl/2µl
H ₂ O	7,6-8,6µl
Probe	1-2µl
<hr/>	
Gesamt	20µl

Standard:

DNA-Proben abgezählter Tupaia Leber-Zellen.

Verdünnungsreihe Standard:

1	2	3	4	5
2000 Zellen	500 Zellen	100 Zellen	10 Zellen	5 Zellen

Light Cycler Program:

β-Actin							
Cycles	Target Temp. (°C)	Incub. Time(°C)	Temp. Transition Rate(°C)	Secondary target	Step size	Step Delay	Aquisition mode
1x Denature	95	10min.	20	0	0	0	None
Amplification	95	15sec.	20	0	0	0	None
	57	10sec.	20	0	0	0	single
	72	10sec	10	0	0	0	None
Kühlen	35	2min.	20	0	0	0	None

CccDNA-Lauf:

Der cccDNA-Lauf diente der Bestimmung der cccDNA in dem mit WM-HBV infizierten Lebergewebe.

Ansetzung des Mastermixes pro Kapillare:

Master	2µl
MgCl	2,4µl
Primer1/2	1µl/1µl
Sonde1/2	2µl/2µl
H ₂ O	7,6-8,6µl
Probe	1-2µl
<hr/>	
Gesamt	20µl

Standard: Klonierte WM-HBV DNA

Verdünnungsreihe Standard:

1	2	3	4	5	6	7
10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10

Light Cycler Program:

cccDNA							
Cycles	Target Temp. (°C)	Incub. Time(°C)	Temp. Transition Rate(°C)	Secondary target	Step size	Step Delay	Aquisition mode
1x Denature	95	10	20	0	0	0	None
Amplification	95	10	20	0	0	0	None
	58	5	20	0	0	0	single
	63	10	20	0	0	0	None
	72	20	20	0	0	0	None
Kühlen	35	2min.	20	0	0	0	None

TotWM-Lauf:

Der totWM-Lauf diente der Bestimmung der totalen Viruslast in dem zu untersuchenden Lebergewebe.

Ansetzung des Mastermixes pro Kapillare:

Master	2µl
MgCl	2,4µl
Primer1/2	1µl/1µl
Sonde1/2	2µl/2µl
H ₂ O	7,6-8,6µl
Probe	1-2µl
<hr/>	
Gesamt	20µl

Standard: Klonierte WM-HBV DNA

Verdünnungsreihe Standard:

1	2	3	4	5
2x10 ⁵	2x10 ⁴	2x10 ³	2x10 ²	2x10

Light Cyler Program:

totWM							
Cycles	Target Temp. (°C)	Incub. Time(°C)	Temp. Transition Rate(°C)	Secondary target	Step size	Step Delay	Aquisition mode
1x Denature	95	10min.	20	0	0	0	None
Amplifikation	95	10	20	0	0	0	None
	57	10	20	0	0	0	Single
	72	15	10	0	0	0	None
Kühlen	35	2min.	20	0	0	0	None

Pre-genomic RNA (pgRNA):

Der pgRNA-Lauf diente der Bestimmung der pgRNA im mit WM-HBV infizierten Lebergewebe. Die pgRNA ist die transkriptionelle RNA, mit der neue Virusgenome hergestellt werden.

Vor der Messung wurde die RNA in cDNA umgeschrieben.

Ansetzung des Mastermixes pro Kapillare:

Master	2µl
MgCl	2,4µl
Primer1/2	1µl/1µl
Sonde1/2	2µl/2µl
H ₂ O	7,6-8,6µl
Probe	1-2µl
<hr/>	
Gesamt	20µl

Standard: Klonierte WM-HBV DNA

Verdünnungsreihe Standard:

1	2	3	4	5	6	7
10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10

Light Cycler Program:

Pre-genomic-RNA							
Cycles	Target Temp. (°C)	Incub. Time(°C)	Temp. Transition Rate(°C)	Secondary target	Step size	Step Delay	Aquisition mode
1x Denature	95	10min.	20	0	0	0	None
Amplifikation	95	15sec.	20	0	0	0	None
	57	10sec.	20	0	0	0	Single
	72	10sec	10	0	0	0	None
Kühlen	35	2min.	20	0	0	0	None

2.2.9 Reverse Transkription

Nachdem der RNA-Gehalt in den RNA-Tubes bestimmt worden war, wurde nun 1 µg RNA in die PCR-Tubes pipettiert. Um ein Gesamtvolumen von 10 µl zu erreichen, wurde der Rest mit Wasser aufgefüllt. Desweiteren wurde noch jeweils 1 µl der drei Primer hinzugegeben (β-Actin, totWM, PreGenomic).

Es folgte die Denaturierung. Die Tubes wurden in die PCR-Blocks gestellt und das folgende Programm gestartet:

1. Denaturieren: 5 Min. 65°C
2. Cool-Down: Time = unendlich bei 4°C oder auf normales Eis stellen.

Es wurde der Mastermix vorbereitet (Transcriptor First Strand DNA Synthesis Kit):

- 4 µl (Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5 × conc.)
- 0,5 µl (Protector RNase Inhibitor 40U/µl)
- 2 µl (Desoxynucleotide Mix, 10mM)
- 0,5 µl (Transcriptor Reverse Transcriptase, 20U/µl)

Nach Beenden der Denaturierung, wurden die PCR-Tubes auf 20 µl mit dem Master-Mix aufgefüllt (7 µl Mastermix)

Die Tubes wurden erneut in den PCR-Block gestellt. Die reverse Transkription lief nach folgendem Programm ab:

1. Reverse Transkription: 30 Min. bei 60°C
2. Termination: 5 min bei 85°C
3. Cool down: 5 min. bis unendlich bei 4°C

3 Ergebnisse

3.1 Anwachsen und Proliferation der seriell transplantierten PTH

Nach der Analyse von Tupaia-spezifischen Gen-Äquivalenten (β -actin) mittels Real-Time-PCR zeigte sich, dass etwa 50% der isolierten Hepatozyten aus Tupaia-Zellen bestanden. Um einzuschätzen, ob die transplantierten PTH anwachsen und proliferierten, wurden Mäuse an Tag 5, 10, 20, 40 und 80 nach Transplantation sakrifiziert. Die aus diesen Lebern gefertigten Kryo-Schnitte wurden mit einem Proliferations-Marker (PCNA-Ak) sowie mit einem Tupaia spezifischen Marker (Ck18) gefärbt.

Nach 5 Tagen (s. Abbildung 8, Bild 1) ließ sich erkennen, dass sich die PTH einzeln oder im kleineren Verbund an Portalvenentrakte anlagerten. Anhand der Bilder 2-5 der Abbildung 8, die Leberschnitte von Mäusen zu späteren Zeitpunkten zeigen, sieht man, dass die PTH Cluster bildeten und von Beobachtungszeitpunkt zu Beobachtungszeitpunkt die Größe der Cluster deutlich zunahm. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die angewachsenen PTH klonal expandierten.

Die durch die PCNA-Färbung braun gefärbten Zellkerne zeigen, dass sich unter den PTH viele teilende Zellen befanden. Der Proliferationsindex (PCNA-positive Zellen/CK-18-positive Zellen) zeigt, dass über alle Beobachtungszeiträume eine erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zur normalen Hepatozyten-Proliferationsrate zu sehen war. Der Index nach 5 Tagen ist mit 29,4% kurz nach der Transplantation am größten, und sinkt dann bis zu den Tagen 20, 40 und 80 auf einen Durchschnittswert von 11,6%.

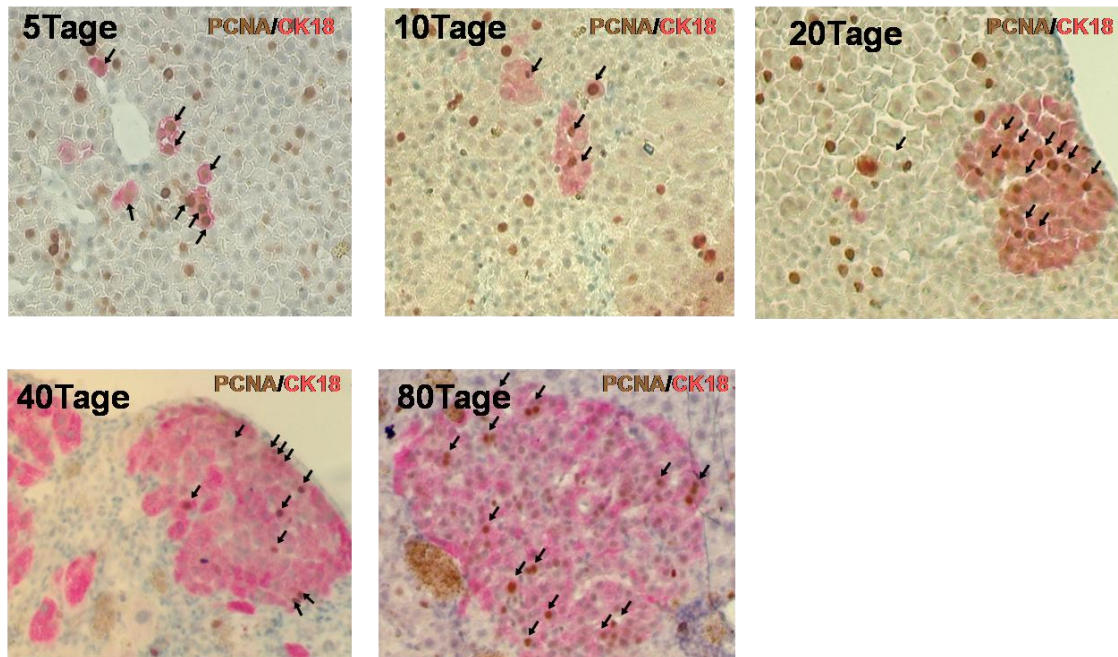


Abbildung 8: Doppelfärbung gegen Cytokeratin 18 (rote Färbung im Cytoplasma) und PCNA (braun Färbung im Zellkern). **Bild 1:** 5 Tage nach Transplantation der infizierten PTH **Bild 2:** 10 Tage nach Transplantation **Bild 3:** 20 Tage nach Transplantation **Bild 4:** 40 Tage nach Transplantation **Bild 5:** 80 Tage nach Transplantation.

Im Verlauf zeigen die Färbungen ein deutliches Wachstum der PTH.

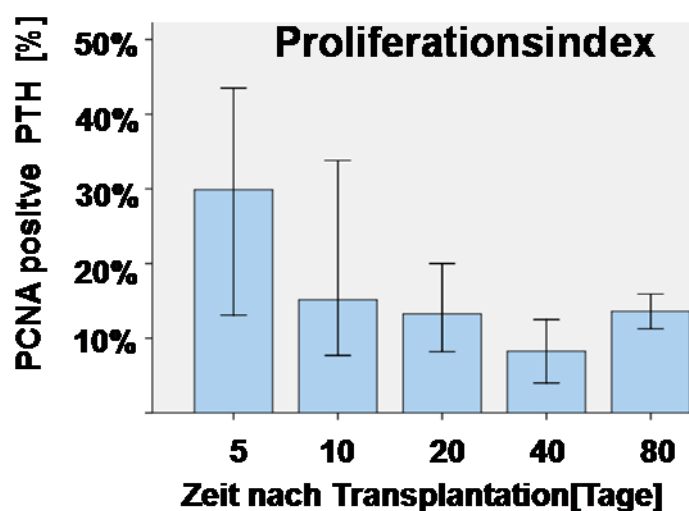


Abbildung 9:

Der Proliferationsindex (PCNA-positive Zellen/PTH) zu den einzelnen Saktifizierungs-Zeitpunkten. Zu Beginn ist die Proliferationsrate am stärksten und nimmt zu späteren Zeitpunkten ab.

Zusätzlich wurde die Durchschnittsanzahl der PTH von 200ng Leber-DNA zu jedem Zeitpunkt ermittelt, indem Tupaia-spezifische Genäquivalente (β -Actin) mittels einer Real-Time-PCR quantifiziert wurden.

Da generell neben den PTH auch die transplantierten Mäuse-Hepatozyten mitwachsen, bestimmten wir das Verhältnis von PTH zum Lebergewicht, indem wir die Anzahl der PTH durch das totale Gewicht der Leber teilten.

Wie man in Abbildung 10 sehen kann, liegt der Medianwert an Tag fünf nach Transplantation bei $1,9 \times 10^5$ PTH pro Mausleber ($1 - 2,6 \times 10^5$ range; n=5), 2×10^5 PTH ($1 - 4,3 \times 10^5$; range n=5) an Tag 10, $3,7 \times 10^5$ PTH ($1,8 - 4,7 \times 10^5$ range, n=4) an Tag 20, 7×10^5 PTH ($5,7 \times 10^5 - 2,5 \times 10^6$ range; n=3) an Tag 40 und $2,8 \times 10^6$ PTH ($2,2 - 3,3 \times 10^6$ range; n=2) an Tag 80.

Dies bedeutet, dass im ganzen Beobachtungszeitraum der prozentuale Anteil der PTH um $\Delta \log 1,5$ gesteigert wurde und bestätigte damit die Proliferation und den Wachstum der PTH.

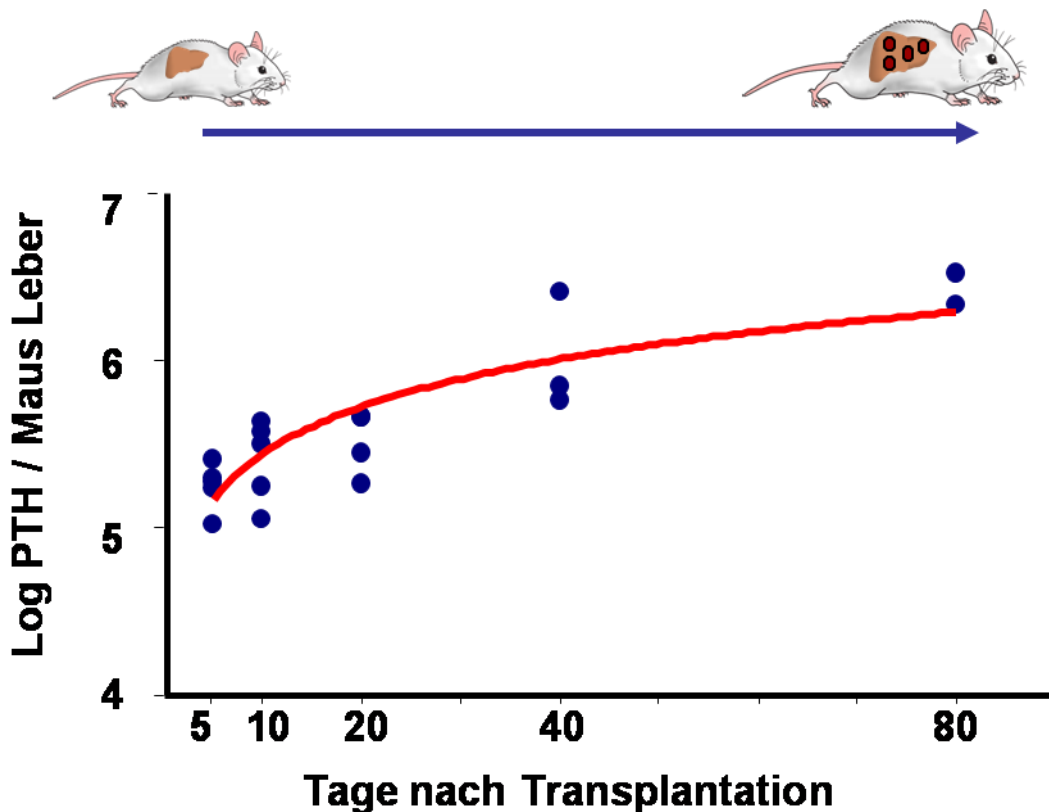


Abbildung 10:

Entwicklung der Tupaia-Genom-Äquivalente pro Mausleber. WM-HBV infizierten Hepatozyten verdoppeln sich im Beobachtungszeitraum von 80 Tagen um das 3,8-fache.

3.2 Bestimmung der Änderung der intrahepatischen cccDNA-Anzahl

Wie der Abbildung 11 zu entnehmen ist, lag die Anzahl der cccDNA-Kopien pro PTH in der Suspension vor der seriellen Transplantation bei 2,6 cccDNA-Kopien/Zelle. Nach 80 Tagen ist die Anzahl der cccDNA Kopien pro PTH hoch signifikant ($p < 0.0001$) um $\Delta 2$ log auf den Median-Wert von 0,02 Kopien gesunken. Einen besonders starken Abfall gab es nach 5 Tagen von 2,6 auf 0,6 Kopien sowie von Tag 20 (0,54 Kopien) bis Tag 40 (0,05).

Wir gingen davon aus, dass die Minderung der cccDNA zum einen durch die Proliferation der Hepatozyten (Verdünnung der cccDNA) verursacht wurde, zum anderen sollte aber auch der Annahme nachgegangen werden, dass bei den Proliferationsvorgängen auch cccDNA destabilisiert wird und deshalb verloren geht.

Aus diesem Grund wurden die cccDNA-Werte durch das totale Lebergewicht der jeweiligen Entnahme-Zeitpunkte geteilt. Es gab uns so eine Aussage über die absolute cccDNA-Anzahl. Wenn cccDNA lediglich „verdünnt“ gewesen wäre, hätte sich die Anzahl der cccDNA auf die ganze Leber gerechnet nicht signifikant vermindert. Wie aber in Abbildung 12 zu sehen ist, vermindert sich die Anzahl der cccDNA vom Zeitpunkt nach 5 Tagen (Baseline) bis zum Tag 80 um das 5-fache. Dabei wird deutlich, dass die Reduktion der cccDNA in den ersten 40 Tagen stärker war als in den letzten 40 Tagen.

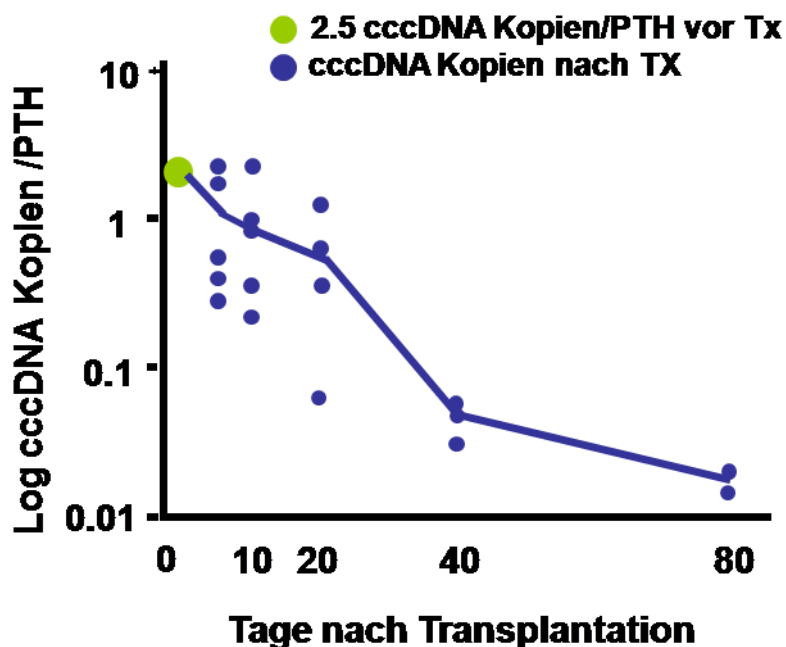


Abbildung 11:

Die Anzahl der cccDNA Kopien pro PTH sinkt signifikant um $\Delta 2$ log

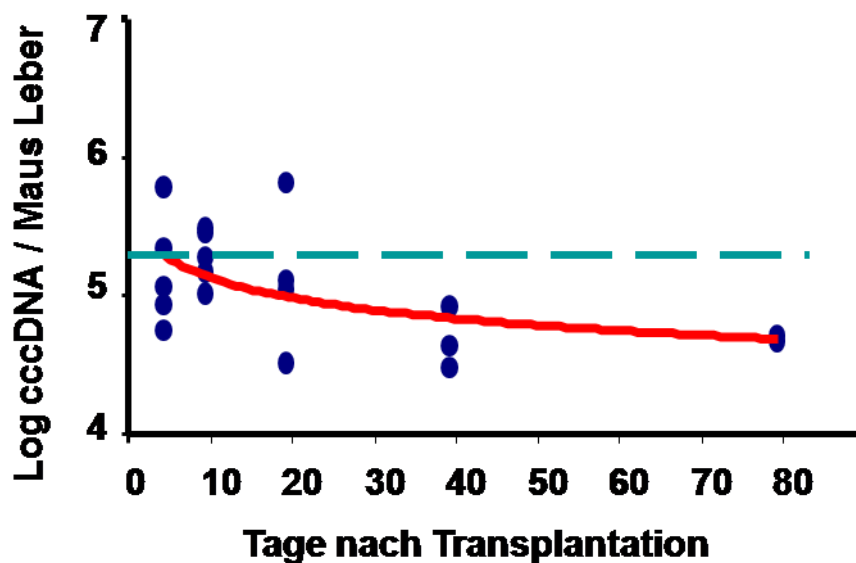


Abbildung 12:

Die Anzahl der cccDNA-Kopien pro Mausleber sinkt im Beobachtungszeitraum um das 5-Fache

3.3 Bestimmung der Änderung der Virus-Last und die virale Aktivität

Vor der Zell-Transplantation haben wir in der Suspension einen durchschnittlichen rcDNA Gehalt von 1030 Kopien pro PTH mit der Real-Time PCR quantifiziert. Mit dem Median-Wert von 185 rcDNA/PTH Kopien (range 14 - 720 rcDNA/PTH) am Tag 5, mit 69 Kopien (range 20 - 128 Kopien rcDNA/PTH) am Tag 10, 17 Kopien (range 6 - 42 Kopien rcDNA/PTH) am Tag 20, 2,4 Kopien (range 2 - 6 Kopien rcDNA/PTH) am Tag 40 und 2 Kopien rcDNA/PTH am Tag 80, ist durch den Wachstum-Prozess der PTH der Verlust der intrahepatischen Virus-Last induziert worden ($\Delta 3 \log$ rcDNA/PTH; $p < 0.0001$) (siehe Abbildung 13).

Um die intrahepatische virale Aktivität zu bestimmen, haben wir den Quotienten aus rcDNA pro cccDNA gebildet. Abbildung 14 veranschaulicht den Abfall der viralen Aktivität. Vor der Transplantation betrug der Wert 413 rcDNA/cccDNA. Fünf Tage nach Transplantation fanden sich der 93 Kopien rcDNA/cccDNA. Bis zum Tag 20 verminderte sich die virale Aktivität zwar weiter auf einen Median-Wert von 51 rcDNA/cccDNA (N=4), der Abfall jedoch war nicht mehr so deutlich.

Interessanterweise stieg die virale Aktivität bis zu Tag 80 sogar wieder auf 128 Kopien rcDNA/cccDNA an. Daher konnte angenommen werden, dass die virale Aktivität auf Grund der Stagnation der regenerativen Proliferation wieder zunahm.

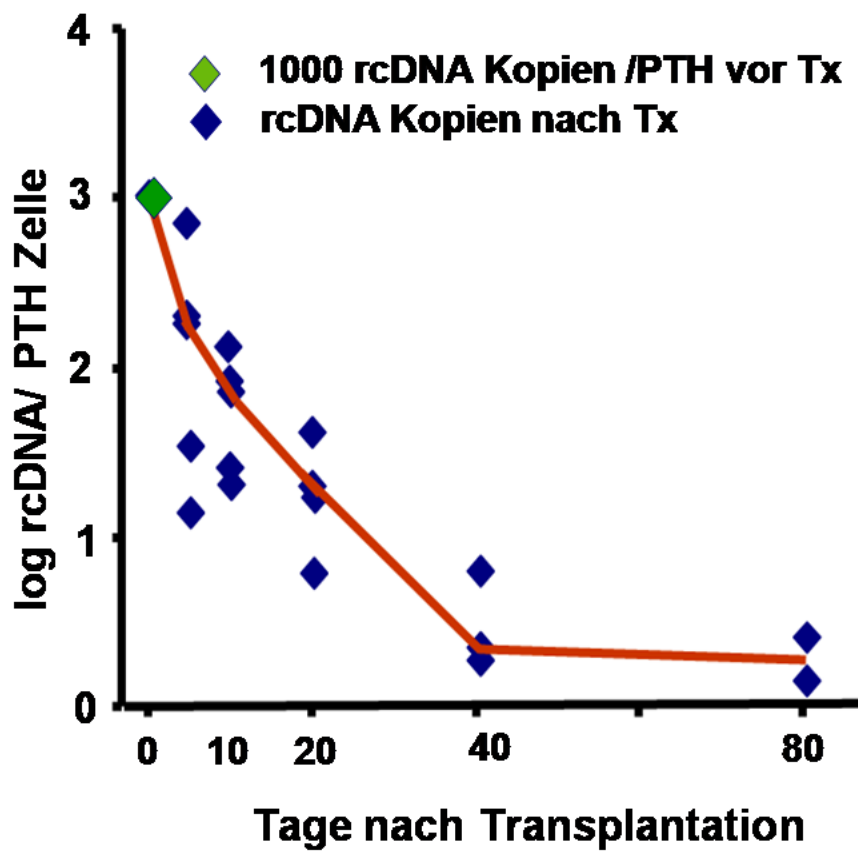


Abbildung 13:

Die Entwicklung der intrahepatischen viralen Last, gemessen als rcDNA pro PTH. Im Beobachtungszeitraum von 80 Tagen fällt die virale Last um ($\Delta 3$ log).

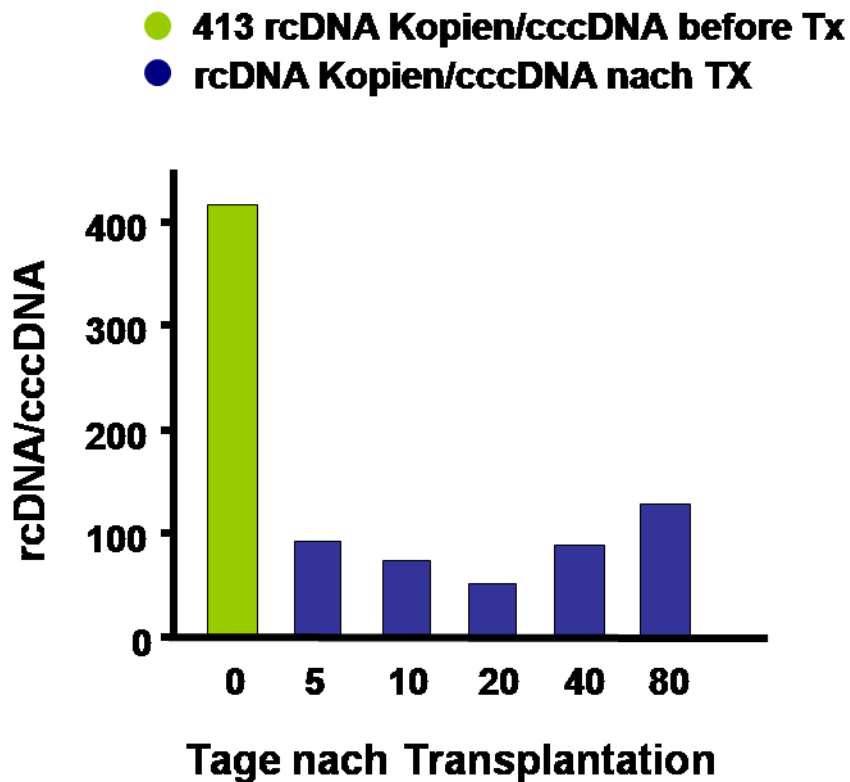


Abbildung 14:

Die Entwicklung der viralen Aktivität(rcDNA/cccDNA). Die Aktivität bei den Sakrifizierungszeitpunkten fällt im Vergleich zu der Aktivität der zu transplantierten Zellsuspension stark ab.

3.4 Pregenomic RNA(pgRNA)

Da über die pgRNA die rcDNA synthetisiert wird, war es interessant zu erfahren, ob die Werte der rcDNA mit denen der pgRNA korrelierten. Mithilfe von Primern, die speziell Sequenzen der pgRNA erkennen, konnten wir die pgRNA separat zu den anderen RNA bestimmen.

In Relation zu PTH-spezifischem β -actin erkennt man einen hoch signifikanten Abfall der pgRNA von 10 auf 0,2 ($\Delta 1,5$ log). Geringer war der Abfall ab dem fünften Tag bis zum Tag 40 von 0,2 auf 0,02. Erst bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt Tag 80 stieg die Anzahl wieder leicht bis auf 0,2 an.

Auch bei den pgRNA ergab sich ein ähnlicher Verlauf wie für die anderen gemessenen Werte. Die ausgeprägte Proliferation bei den ersten

Beobachtungszeitpunkten scheint zu einem pgRNA Verlust zu führen, wohingegen eine verminderte Proliferationsrate wieder zu einem Anstieg führt.

Der Zusammenhang, dass ein reduzierter pgRNA Bestand zu reduzierten rcDNA Werten führt liegt also nah.

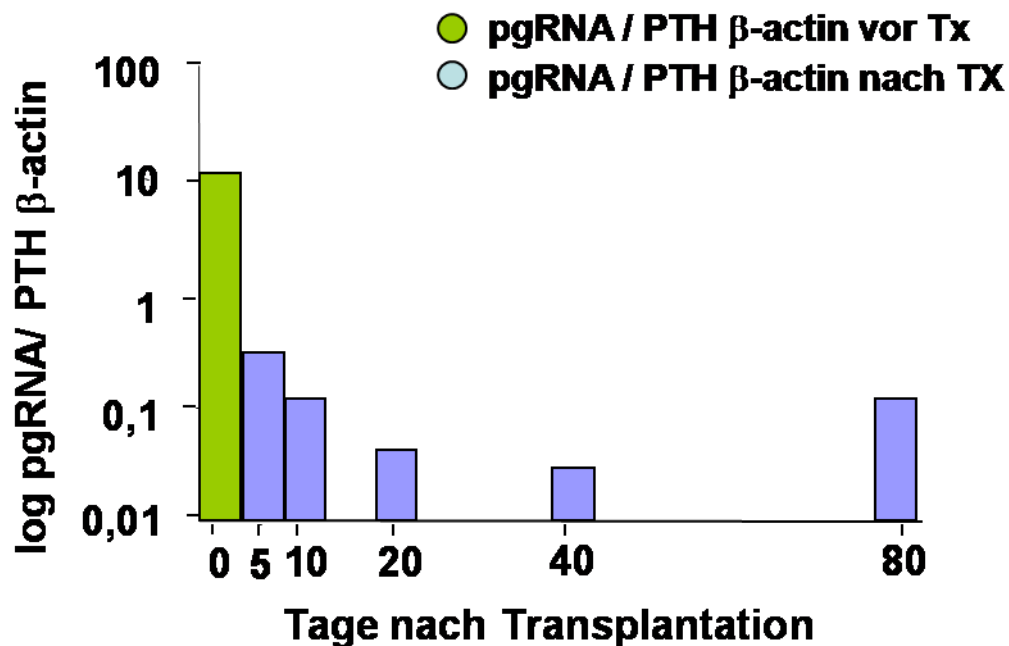


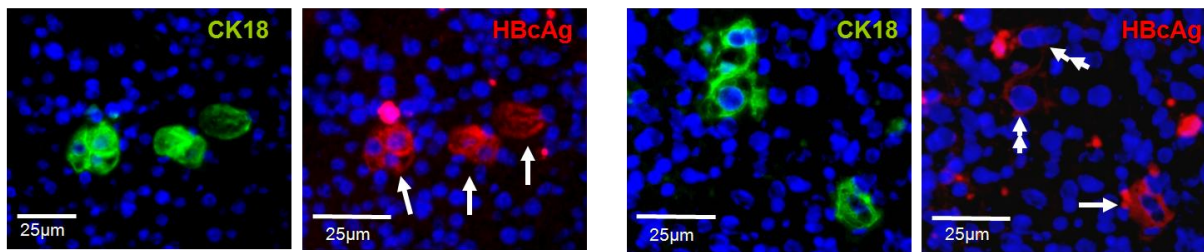
Abbildung 15:

Die Entwicklung der transkriptionellen Aktivität(pgRNA/PTH), die vergleichbar ist mit der viralen Aktivität.

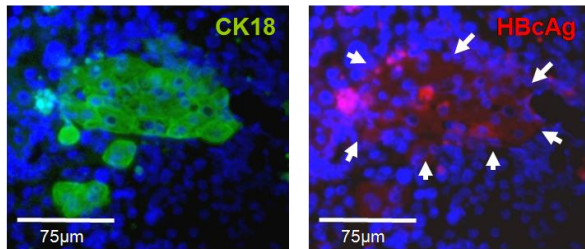
3.5 Zustand der Virusproteine zu verschiedenen Zeitpunkten

In der Doppelfärbung CK18/HBcAg (siehe Abbildung 16-18) sieht man, dass nach Tag 5 alle CK18-positiven Zellen auch HBcAg-Positiv waren. Deshalb war davon auszugehen, dass fast alle Tupaia Hepatozyten auch das Virus enthalten. In der Färbung nach 10 Tagen war jedoch das Signal der HBcAg-Färbung bereits deutlich abgeschwächt und nach 80 Tagen war es gar nicht mehr sichtbar. Der Schluss liegt nah, dass die Produktion der Virus-Proteine gehemmt wird, wenn das Wachstum der PTH zunimmt.

5 Tage nach Transplantation



10 Tage nach Transplantation



80 Tage nach Transplantation

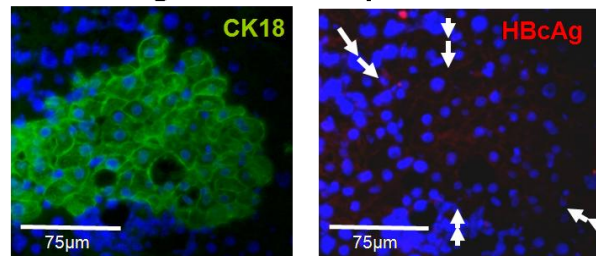


Abbildung 16-18:

Doppel-Floureszenzfärbung gegen CK18(grün, linkes Bild) und HBcAg(rot, rechtes Bild). **Abbildung 16:** 5 Tage nach Transplantation. **Abbildung 17:** 10 Tage nach Transplantation. **Abbildung 18:** 80 Tage nach Transplantation.

Nach Proliferation und Größenwachstum der PTH, wird das Signal für die HBcAg im Laufe der Beobachtungszeiträume immer geringer.

4 Diskussion

Die cccDNA ist das zentrale Molekül im Lebenszyklus des HBV. Da die cccDNA bei ruhenden Zellen eine große Stabilität aufweist und die Halbwertszeit sehr lang ist (Moraleda et al., 1997, Werle-Lapostolle et al., 2004, Addison et al., 2002, Lutgehetmann et al., 2008), verbleibt das Virus im Wirt. Angewandte aktuelle Therapien vermögen es zwar, das Virus in der Aktivität zu hemmen, können es aber nicht vollständig eliminieren, da sie nicht direkt die Stabilität der cccDNA beeinflussen können (Dandri et al., 2000, Moraleda et al., 1997).

Aus diesem Grund sollte nach weiteren Ansätzen gesucht werden, um vor allem die Minderung cccDNA zu beschleunigen. Daher ist es von großer Bedeutung, mehr Informationen über Mechanismen, die die Stabilität und Aktivität der cccDNA beeinflussen können, zu erlangen.

Bisher ergaben Studien Aufschlüsse über das Verhalten der cccDNA in ruhenden Zellen (Moraleda et al., 1997, Werle-Lapostolle et al., 2004, Addison et al., 2002, Lutgehetmann et al., 2008). Das Verhalten der cccDNA in sich proliferierenden Zellen wurde jedoch bislang noch nicht ausreichend erforscht.

Deshalb haben wir im Rahmen des chimärischen-Mausmodells durch serielle Transplantation chronisch infizierte Tupaia-Hepatozyten isoliert und in naive junge uPA-Mäuse transplantiert, um die Proliferation von chronisch infizierten Zellen zu stimulieren. So konnten wir im Zuge der Leberregeneration die cccDNA bei sich proliferierenden Hepatozyten beobachten.

In unserer Studie haben wir 19 Mäuse seriell transplantiert. Um die cccDNA unter verschiedenen Proliferations-Zuständen zu untersuchen, haben wir Mäuse an Tag 5, 10, 20, 40 und 80 sakrifiziert und deren Lebern für die Versuche entnommen.

Mit den immunhistologischen Färbungen (CK18/PCNA) zeigten wir auf, dass Tupaia-Hepatozyten im Leberparenchym anwachsen (CK18) und durch Proliferation (PCNA) im Laufe der Beobachtungszeiträume Tupaia-Zell-Cluster bilden.

Die Proliferationsrate war nach 5 Tagen mit 29,4% am höchsten, fiel bis zum Tag 20 bis auf 13,7% ab und stagnierte im weiteren Verlauf. Diese Daten zeigen, dass die Transplantation die Proliferation der Tupaia-Zellen (PTH) induzierte. Der Effekt der Proliferation schwächt zu den späteren Beobachtungszeiträumen ab. Es lässt uns die Möglichkeit unsere erhobenen Daten von PTH in stark proliferierendem Zustand mit den Daten in gering proliferierendem Zustand zu vergleichen.

Wir erwarteten, dass sich im Zuge der Proliferation die gegebene Anzahl der cccDNA-Moleküle zufallsmäßig auf die proliferierenden Zellen verteilt und deshalb die cccDNA-Anzahl pro Leberzelle abnimmt, ohne dass die gesamte cccDNA-Last in der Leber sich signifikant verändert. Unsere Ergebnisse aus den cccDNA-Messungen zeigen allerdings einen nicht erwarteten deutlichen Abfall der cccDNA pro Zelle. Der Unterschied beträgt $\Delta 2$ log innerhalb von 80 Tagen. Das Verhältnis der cccDNA im Bezug auf das totale Lebergewicht zeigt, dass sich auch die gesamte cccDNA-Anzahl um das 5-fache reduziert hat. Mit diesen Ergebnissen konnte erstmals belegt werden, dass sich die cccDNA nicht nur auf das wachsende Lebergewebe verteilt, sondern bei der Proliferation auch cccDNA verloren geht.

Die Daten zeigen zudem, dass die Reduktion der cccDNA pro Zelle in den Beobachtungszeiträumen der stärker proliferierenden Zuständen (Tage 1-40) größer war als in geringproliferierenden Zuständen (Tage 40-80) und bekräftigen so einen Zusammenhang zwischen dem Verlust der cccDNA und der Proliferation.

Auch die intrahepatischen rcDNA-Werte fielen deutlich ab, allein innerhalb des Beobachtungszeitraumes um $\Delta 3$ log.

Wie oben erwähnt, verringerte sich in den Beobachtungszeiträumen die Anzahl der cccDNA, die als Matrize für die Neusynthese der rcDNA benötigt wird. Da die Halbwertszeit der rcDNA relativ kurz ist und deshalb eine dauerhafte Neusynthese zur Aufrechterhaltung eines konstanten rcDNA-Levels benötigt wird, lässt sich ein Teil des Abfalls der rcDNA mit der Reduzierung der cccDNA erklären.

Der Abfall der cccDNA, der im Gegensatz zu den rcDNA Werten nicht $\Delta 3$ log sondern $\Delta 2$ log betrug, scheint jedoch nicht für den kompletten Verlust der rcDNA verantwortlich zu sein.

Unsere Ergebnisse belegen, dass sich die virale Aktivität im Beobachtungszeitraum um fast das 8-fache reduzierte. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass es andere zusätzliche Faktoren und Mechanismen gibt, die entweder die Synthese der rcDNA hemmen oder die rcDNA destabilisieren.

Hinweise, dass die Synthese der rcDNA gehemmt ist, liefern uns die Ergebnisse der gemessenen pgRNA, da diese ähnlich stark wie die der rcDNA sinken, und die pgRNA eine Zwischenstufe bei der Synthese der rcDNA darstellt.

Es ist möglich, dass im Zuge der Regeneration des Lebergewebes entweder Schritte der Transkription bis zur fertigen pgRNA gehemmt werden und/oder posttranskriptionelle Faktoren für eine Destabilisierung der pgRNA sorgen und somit weniger rcDNA synthetisiert wird. Gezeigt werden konnte schon bei (Ozer et al., 1996), dass in der S-Phase des Zellzyklus, die bei jeder Proliferation durchlaufen werden muss, die Anzahl der mRNA für Synthese der HBV-DNA geringer wurde.

Eine weitere Möglichkeit für die Synthesehemmung der rcDNA könnte durch eine posttranskriptionelle Inhibition der rcDNA Synthese verursacht werden.

Welche Mechanismen und Faktoren hierbei eine Rolle spielen, bleibt offen. In einer Studie ging man davon aus, dass Interleukin 6, erhöht in Leberzellen bei chronischer Hepatitis B, einen hemmenden Effekt auf die HBV Replikation haben soll (Kuo et al., 2009). Eine andere Untersuchung berichtet, dass Moleküle wie hepatocyte nuclear factor 4 a (HNF4 α) und hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF1 α), die abhängig von dem Differenzierungsgrad der Zelle erhöht sind, die Transkription zur Synthese von Virusbestandteilen hemmen (Quasdorff et al., 2008).

Neben der Störung der rcDNA-Synthese könnte auch die Destabilisierung der fertigen rcDNA eine Rolle spielen, beispielsweise durch eine Cytokine-induzierte Kapsid-Destabilisierung.

Obwohl die Anzahl der rcDNA im Lebergewebe stark abfiel, war immer noch eine ausreichende Menge an rcDNA im Lebergewebe nachweisbar, um cccDNA über den äußeren oder inneren Syntheseweg zu bilden. Auch aus diesem Grund ist der deutliche cccDNA Abfall unerwartet.

Interessant wäre es zu betrachten, ob bei einer Hemmung der Neusynthese, beispielsweise durch Nukleosid/Nukleotid-Analoga, das Ausmaß des cccDNA-Verlustes noch verstärkt wird.

Die Core-HBsAg Immunfluoreszenzfärbung war nur an Tag 5 eindeutig. Die Färbung schwächte im Verlauf ab und ist ab Tag 10 nicht mehr nachzuweisen. Bei den anderen Beobachtungszeitpunkten ist keine Färbung mehr zu erkennen.

Die Färbung in den ersten beiden Beobachtungszeitpunkten konnte uns zeigen, dass Zellen HBV-positiv waren und dass die infizierten Hepatozyten anwachsen konnten.

In vorherigen Studien wurde berichtet, dass virale DNA im Zuge von Replikationen in die Wirts-DNA teil-integrieren kann (Mason et al., 2005). Es liegt nahe zu vermuten, dass die aktuell von uns gemessenen Werte für die rcDNA und cccDNA auch Werte der integrierten DNA enthalten. Um das zu erfahren, sollte die DNA auf Integrationen untersucht werden.

Insgesamt bleibt festzustellen, dass sich wohl nicht der Faktor Zellteilung alleine für den starken Abfall an cccDNA verantwortlich zeichnet. So erfolgte bei einer in vitro-Studie (Dandri et al., 2000) trotz Proliferation, angeregt durch Wachstumsfaktoren, sowie dem Einsatz von Nukleotid-/Nukleosid-Analoga kein Abfall von cccDNA. Es scheint so, als würden im Proliferationssetting der Leber andere Faktoren eine Rolle spielen, und hier bietet sich ein Ansatz für weitere Untersuchungen.

In früheren Studien hat man den cccDNA Verlust damit erklärt, dass die virale Replikation Zytokin-vermittelt gehemmt wird und infizierte Zellen durch zytotoxische Killerzellen zur Apoptose gebracht werden. Durch die Proliferation der nicht infizierten Zellen (Murray et al., 2005, Mason et al., 2005, Zhang et al., 2003, Mason et al., 2009) kann dann neues nichtinfiziertes Gewebe aufgebaut werden. Dieser Mechanismus, der bei der chronischen HBV Infektion ein wichtiger Faktor für die Eliminierung der cccDNA darstellt, spielt in der vorliegenden Arbeit keine große Rolle, da bei unserem Modell ausschließlich immundefiziente Mäuse verwendet wurden.

Daher kann man zusammenfassend sagen, dass durch die Ergebnisse dieser Arbeit neue Erkenntnisse über das Verhalten der cccDNA gewonnen wurden. Die Proliferation von infizierten Leberzellen führt demnach nicht nur zur cccDNA-Verdünnung aber auch zum Verlust von cccDNA und der Viruslast.

Um allerdings diese Ergebnisse zu verifizieren, sollten weitere Studien durchgeführt werden, bei denen eventuelle Fehler in der Anwendung oder Zuordnung ausgeschlossen werden können. Zudem wäre es wichtig, zu überprüfen ob die gleichen Ergebnisse auch bei humanen Hepatozyten, infiziert mit HBV, zu beobachten sind.

Eine andere Möglichkeit, Leberzellen zur Proliferation anzuregen, wäre eine Leberteileresektion. Der Vorteil gegenüber unserem Setting könnte sein, dass der Anpassungsprozess beim Anwachsen der Hepatozyten wegfiel.

Schlussendlich wäre bei Bestätigung unserer Ergebnisse zu prüfen, ob man unsere hier gewonnenen Erkenntnisse für neue Therapie-Ansätze auf der Basis von proliferierenden Leberzellen nutzen könnte. Dies könnte durch eine Schädigung von Leberzellen, z.B. durch eine IFN-Therapie, induziert werden. Möglich wäre eine solche Therapie in Kombination mit Nukleosid-/Nukleotid-Analoga, die die HBV-Replikation und damit indirekt die Entstehung weiterer cccDNA Moleküle hemmen. Auf diese Art könnte die Anzahl der cccDNA Moleküle erheblich gesenkt, vielleicht sogar ganz eliminiert werden.

5 Zusammenfassung

Primäre Tupaia-Hepatozyten, infiziert mit dem WM-HBV, wurden von einer hoch virämischen uPA/SCID-Maus isoliert und in 19 naive uPA-Mäuse transplantiert. Die Expansion der seriell transplantierten Hepatozyten wurde mit der Real-Time-PCR und immunohistochemisch bestimmt. Die Transplantation führte zu einer starken Proliferation der WM-HBV-infizierten Hepatozyten unter der es zu einer starken Reduktion der viralen Produktion und der pgRNA sowie zu einem $\Delta 2$ log Abfall der cccDNA pro Zelle kam. Dieser Abfall entstand zum einen durch die Verteilung des cccDNA-Pools auf die Tochterzellen, zum anderen durch einen intrahepatischen cccDNA-Verlust ($\Delta 0.5$ log; $P=0.02$).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Zellteilung im Zuge der Leberregeneration ohne Behandlung von antiviralen Medikamenten nicht nur eine starke Destabilisierung der cccDNA induziert und in Folge dessen zu cccDNA-freien Hepatozyten führt, sondern auch zu einem starken Abfall der viralen Produktivität.

Die Daten und Ergebnisse dieser Dissertation bildeten die Grundlage für folgendes veröffentlichtes Paper:

Hepatology.2010 Jul;52(1):16-24 „In vivo proliferation of hepadnavirus-infected hepatocytes induces loss of covalently closed circular DNA in mice.“
Lutgehetmann M, Volz T, Köpke A, Broja T, Tigges E, Murray JM, Petersen J, Dandri M.

6 Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
CccDNA	covalently closed circular DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
IFNa	Interferon a
INFa/b	Interferon a/b
INF- γ	Interferon- γ
HBV	Hepatitis B Virus
HNF1 α	hepatocyte nuclear factor 1 α
HNF4 α	hepatocyte nuclear factor 4 a
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
NUCs	Nukleotid/Nukleosid-Analoga
PCR	Polymerase Chain Reaction
PgRNA	pregenomic RNA
Pol	Polymerase
PTH	primäre Tupaia Hepatozyten
ORF	Open reading frame
RcDNA	Relaxed circular DNA
RNA	Ribonukleinsäure
TNF- α	Tumor-necrosis-factor- α
UPA	Uroplasminogenaktivator
WHV	Woodchuck-Hepatitis-Virus
WM-HBV	Woolly-Monkey Hepatitis B Virus

7 Literaturverzeichnis

- ADDISON, W. R., WALTERS, K. A., WONG, W. W., WILSON, J. S., MADEJ, D., JEWELL, L. D. & TYRRELL, D. L. (2002) Half-life of the duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA pool in vivo following inhibition of viral replication. *J Virol*, 76, 6356-63.
- DANDRI, M., BURDA, M. R., GOCHT, A., TOROK, E., POLLOK, J. M., ROGLER, C. E., WILL, H. & PETERSEN, J. (2001a) Woodchuck hepatocytes remain permissive for hepadnavirus infection and mouse liver repopulation after cryopreservation. *Hepatology*, 34, 824-33.
- DANDRI, M., BURDA, M. R., TOROK, E., POLLOK, J. M., IWANSKA, A., SOMMER, G., ROGIERS, X., ROGLER, C. E., GUPTA, S., WILL, H., GRETEN, H. & PETERSEN, J. (2001b) Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology*, 33, 981-8.
- DANDRI, M., BURDA, M. R., WILL, H. & PETERSEN, J. (2000) Increased hepatocyte turnover and inhibition of woodchuck hepatitis B virus replication by adefovir in vitro do not lead to reduction of the closed circular DNA. *Hepatology*, 32, 139-46.
- DANDRI, M., BURDA, M. R., ZUCKERMAN, D. M., WURSTHORN, K., MATSCHL, U., POLLOK, J. M., ROGIERS, X., GOCHT, A., KOCK, J., BLUM, H. E., VON WEIZSACKER, F. & PETERSEN, J. (2005) Chronic infection with hepatitis B viruses and antiviral drug evaluation in uPA mice after liver repopulation with tupaia hepatocytes. *J Hepatol*, 42, 54-60.
- DANDRI, M., LUTGEHETMANN, M., VOLZ, T. & PETERSEN, J. (2006) Small animal model systems for studying hepatitis B virus replication and pathogenesis. *Semin Liver Dis*, 26, 181-91.
- DANDRI, M., MURRAY, J. M., LUTGEHETMANN, M., VOLZ, T., LOHSE, A. W. & PETERSEN, J. (2008) Virion half-life in chronic hepatitis B infection is strongly correlated with levels of viremia. *Hepatology*, 48, 1079-86.
- DANDRI, M., SCHIRMACHER, P. & ROGLER, C. E. (1996) Woodchuck hepatitis virus X protein is present in chronically infected woodchuck liver and woodchuck hepatocellular carcinomas which are permissive for viral replication. *J Virol*, 70, 5246-54.
- GANEM, D. (2006) Hepadnaviridae and their replication. *Lippincott Williams & Wilkins*.
- GLEBE, D. & URBAN, S. (2007) Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol*, 13, 22-38.
- GUIDOTTI, L. G., ISHIKAWA, T., HOBBS, M. V., MATZKE, B., SCHREIBER, R. & CHISARI, F. V. (1996) Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*, 4, 25-36.
- GUIDOTTI, L. G., ROCHFORD, R., CHUNG, J., SHAPIRO, M., PURCELL, R. & CHISARI, F. V. (1999) Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science*, 284, 825-9.
- KANN, M., SCHMITZ, A. & RABE, B. (2007) Intracellular transport of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol*, 13, 39-47.
- KUO, T. M., HU, C. P., CHEN, Y. L., HONG, M. H., JENG, K. S., LIANG, C. C., CHEN, M. L. & CHANG, C. (2009) HBV replication is significantly reduced by IL-6. *J Biomed Sci*, 16, 41.
- LASCAR, R. M., LOPES, A. R., GILSON, R. J., DUNN, C., JOHNSTONE, R., COPAS, A., REIGNAT, S., WEBSTER, G., BERTOLETTI, A. & MAINI, M. K. (2005) Effect of

- HIV infection and antiretroviral therapy on hepatitis B virus (HBV)-specific T cell responses in patients who have resolved HBV infection. *J Infect Dis*, 191, 1169-79.
- LEVRERO, M., POLLICINO, T., PETERSEN, J., BELLONI, L., RAIMONDO, G. & DANDRI, M. (2009) Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 51, 581-92.
- LUTGEHETMANN, M., VOLZT, T., QUAAS, A., ZANKEL, M., FISCHER, C., DANDRI, M. & PETERSEN, J. (2008) Sequential combination therapy leads to biochemical and histological improvement despite low ongoing intrahepatic hepatitis B virus replication. *Antivir Ther*, 13, 57-66.
- MASON, W. S., JILBERT, A. R. & SUMMERS, J. (2005) Clonal expansion of hepatocytes during chronic woodchuck hepatitis virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 1139-44.
- MASON, W. S., LOW, H. C., XU, C., ALDRICH, C. E., SCOUGALL, C. A., GROSSE, A., CLOUSTON, A., CHAVEZ, D., LITWIN, S., PERI, S., JILBERT, A. R. & LANFORD, R. E. (2009) Detection of clonally expanded hepatocytes in chimpanzees with chronic hepatitis B virus infection. *J Virol*, 83, 8396-408.
- MORALEDA, G., SAPUTELLI, J., ALDRICH, C. E., AVERETT, D., CONDREAY, L. & MASON, W. S. (1997) Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus. *J Virol*, 71, 9392-9.
- MURRAY, J. M., WIELAND, S. F., PURCELL, R. H. & CHISARI, F. V. (2005) Dynamics of hepatitis B virus clearance in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 17780-5.
- NASSAL, M. (2008) Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res*, 134, 235-49.
- OZER, A., KHAOUSTOV, V. I., MEARN, M., LEWIS, D. E., GENTA, R. M., DARLINGTON, G. J. & YOFFE, B. (1996) Effect of hepatocyte proliferation and cellular DNA synthesis on hepatitis B virus replication. *Gastroenterology*, 110, 1519-28.
- PETERSEN, J., DANDRI, M., GUPTA, S. & ROGLER, C. E. (1998) Liver repopulation with xenogenic hepatocytes in B and T cell-deficient mice leads to chronic hepadnavirus infection and clonal growth of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 310-5.
- PETERSEN, J., DANDRI, M., MIER, W., LUTGEHETMANN, M., VOLZ, T., VON WEIZSACKER, F., HABERKORN, U., FISCHER, L., POLLOK, J. M., ERBES, B., SEITZ, S. & URBAN, S. (2008) Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nat Biotechnol*, 26, 335-41.
- QUASDORFF, M., HOSEL, M., ODENTHAL, M., ZEDLER, U., BOHNE, F., GRIPON, P., DIENES, H. P., DREBBER, U., STIPPEL, D., GOESER, T. & PROTZER, U. (2008) A concerted action of HNF4alpha and HNF1alpha links hepatitis B virus replication to hepatocyte differentiation. *Cell Microbiol*, 10, 1478-90.
- REHERMANN, B., FERRARI, C., PASQUINELLI, C. & CHISARI, F. V. (1996) The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med*, 2, 1104-8.
- THERMET, A., BURONFOSSE, T., WERLE-LAPOSTOLLE, B., CHEVALLIER, M., PRADAT, P., TREPO, C., ZOULIM, F. & COVA, L. (2008) DNA vaccination in combination or not with lamivudine treatment breaks humoral immune tolerance and enhances cccDNA clearance in the duck model of chronic hepatitis B virus infection. *J Gen Virol*, 89, 1192-201.
- VISVANATHAN, K. & LEWIN, S. R. (2006) Immunopathogenesis: role of innate and adaptive immune responses. *Semin Liver Dis*, 26, 104-15.

- WEBSTER, G. J., REIGNAT, S., MAINI, M. K., WHALLEY, S. A., OGG, G. S., KING, A., BROWN, D., AMLOT, P. L., WILLIAMS, R., VERGANI, D., DUSHEIKO, G. M. & BERTOLETTI, A. (2000) Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology*, 32, 1117-24.
- WERLE-LAPOSTOLLE, B., BOWDEN, S., LOCARNINI, S., WURSTHORN, K., PETERSEN, J., LAU, G., TREPO, C., MARCELLIN, P., GOODMAN, Z., DELANEY, W. E. T., XIONG, S., BROSGART, C. L., CHEN, S. S., GIBBS, C. S. & ZOULIM, F. (2004) Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology*, 126, 1750-8.
- WU, T. T., COATES, L., ALDRICH, C. E., SUMMERS, J. & MASON, W. S. (1990) In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway. *Virology*, 175, 255-61.
- ZHANG, Y. Y., ZHANG, B. H., THEELE, D., LITWIN, S., TOLL, E. & SUMMERS, J. (2003) Single-cell analysis of covalently closed circular DNA copy numbers in a hepadnavirus-infected liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 12372-7.
- ZOULIM, F. (2005) New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J Hepatol*, 42, 302-8.

8 Danksagung

Liebe Maura, Lieber Jörg, Lieber Marc, Lieber Tassilo,

Ich möchte mich bei Euch bedanken zum einen für die Bereitstellung der Arbeit, zum anderen für die wunderbare Betreuung, die ich von Beginn bis zur Fertigstellung meiner Dissertation von Euch bekommen habe.

Ich habe bei Euch nicht nur eine Doktorarbeit geschrieben, sondern auch viel gelacht und eine gute Zeit gehabt.

Ich danke meiner Familie. Es gibt nichts Schöneres als zu wissen dass Ihr zu jeder Zeit für mich da seid.

Sehr geehrter Herr Müggenkamp,
vielen Dank!

9 Lebenslauf

◆ Persönliche Daten

Name Tim Alexander Broja
Geburtsdatum/-ort 06.11.1981/Krefeld
Eltern Dr. Arnold Broja
Birgit Broja
Staatsangehörigkeit deutsch

◆ Schulische Ausbildung

1988 – 1992 Grundschule Sollbrüggen, Krefeld
1992 – 2001 Gymnasium am Moltkeplatz, Krefeld
Abschluss Abitur (Note: 1,9)

◆ Universitäre Ausbildung

10.2002 – 02.2004 Studium des Wirtschaftsingenieurwesens
Universität Karlsruhe (TH)
10.2004 – 12.2010 Studium der Humanmedizin
Universitätskrankenhaus Eppendorf der Freien Universität
Hamburg
09.2006 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Examensnote: 3 (befriedigend)
12.2010 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Examensnote: 1,5 (sehr gut)

◆ Famulaturen

09.2007 Pädiatrie
Austausch-Programm, International Federation of Medical
Students' Association (IFSMA)
Hospital Universitário Pequeno Anjo, Itajaí, Brasilien
10.2007 Kinderchirurgie
Austausch-Programm, International Federation of Medical
Students' Association (IFSMA)
Hospital Universitário Pequeno Anjo, Itajaí, Brasilien
08.2008 Innere Medizin
Arztpraxis Dr. Dujka, Krefeld
04.2009 Neurologie
Asklepios Klinik Altona, Hamburg

◆ **Praktisches Jahr**

- 08.2009 – 10.2009 Innere Medizin (1.Teil)
Asklepios Klinik Altona, Hamburg
- 10.2009 – 12.2009 Innere Medizin (2.Teil)
St. Bartholomew's Hospital, Barts and The London School of
Medicine (Queen Mary University of London), England
- 12.2009 – 01.2010 Chirurgie (1.Teil)
Asklepios Klinik Altona, Hamburg
- 01.2010 – 03.2010 Chirurgie (2.Teil)
Eerste River Hospital (University of Cape Town), Kapstadt,
Südafrika
- 03.2010 – 07.2010 Pädiatrie
Universitätsklinik Hamburg Eppendorf

◆ **Dissertation**

- Seit 07.2008 Arbeitsgruppe für Hepatologie und Zelltransplantation
Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg
Doktorvater: Prof. Dr. med. Jörg Petersen
- Thema „Untersuchungen der replikativen Aktivität der cccDNA in vivo in
ruhenden und proliferierenden Hepatozyten mit Hilfe des uPA
Mausmodells“
- Veröffentlichungen Hepatology.2010 Jul;52(1):16-24
„In vivo proliferation of hepadnavirus-infected hepatocytes
induces loss of covalently closed circular DNA in mice.“
Lutgehetmann M, Volz T, Köpke A, Broja T, Tigges E, Murray
JM, Petersen J, Dandri M.

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: