

Martin Franz Sprinzl

Dr.med

Der adenovirale Genomtransfer überwindet die Speziesbarriere der Hepatitis-B-Viren

Geboren am 24.06.1975 in Göttingen

Reifeprüfung am 01.07.1994 in Bayreuth

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1994 bis SS 2001

Physikum am 09.09.1996 an der Universität Greifswald

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 09.11.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Virologie, Hygiene-Institut/ Zentrum für Molekulare Biologie Heidelberg

Doktorvater: Prof. Dr. med. G. Darai/ Prof. Dr. rer. nat. H.Schaller

Aufgrund der hohen Speziespezifität der Hepatitis-B-Viren stehen nur begrenzt Replikationsmodelle zum Studium der Pathogenese und Therapie einer HBV-Infektion zur Verfügung. Wünschenswert wären jedoch gut charakterisierte Infektionssysteme *in vitro* und im Tiermodell. Einen Lösungsansatz bieten adenovirale Vektoren. Mit ihrer Hilfe ließen sich replikationskompetente hepadnavirale Genome in nicht permissive Spezies transduzieren, um im Weiteren eine annähernd natürliche hepadnavirale Replikation zu induzieren.

Daher wurden adenovirale Vektoren (Ad5 $\Delta E1/\Delta E3$) hergestellt, welche die Überlängengenome des DHBV (Enten-Hepatitis-B-Virus) und HBV (humanes Hepatitis-B-Virus) Wildtyps sowie ihre Varianten transferieren. Zur Transduktionskontrolle enthalten die adenoviralen Vektoren ein GFP-Markergen. Mit diesen rekombinanten Adenoviren wurden Transferexperimente in etablierten Zelllinien (LMH, HepG2), primäre Hepatozytenkulturen und Mäusen durchgeführt.

Gegenüber Hepatitis-B-Viren permissive sowie nicht permissive Hepatozyten und Hepatomzellen wurden *in vitro* mit den rekombinanten Adenoviren infiziert. Die transduzierten Zellen exprimierten daraufhin essentielle hepadnavirale Genprodukte und produzierten umhüllte DHBV-Partikel. Für HBV gelang in analoger Weise die Induktion der viralen Replikation nach Genomtransfer. Bemerkenswert ist, dass nach dem Transfer der Genomkonstrukte die natürliche hepadnavirale Replikationsmatritze (covalently-closed-circular DNA) nachweisbar war. Somit konnte sich eine autonome Replikation der Hepatitis-B-Viren etablieren.

In vivo (C57Bl6-Mäuse) wurden mittels Injektion von 5×10^8 rekombinanten Adenoviren DHBV-Genome in die Leber transferiert. Innerhalb von 5 Tagen nach Transduktion war sowohl DHBV-core-Protein in 5-10% der Hepatozyten als auch infektiöses DHBV im Serum der Mäuse nachzuweisen.

Mit dem adenoviralen Genomtransfer gelang es *in vitro* ein vielseitiges transientes Replikationssystem für Hepadnaviren zu entwickeln, mit dem es möglich sein wird zahlreiche hepadnavirale Varianten unter verschiedenen experimentellen Bedingungen zu untersuchen. Die rezeptorvermittelte Aufnahme des Vektors in die Zielzellen erlaubt einen wesentlich

besser steuerbaren DNA-Transfer, der in dieser Form mit konventionellen Transfektionsmethoden nicht möglich ist. Der adenovirale Genomtransfer ist daneben durch die hohe Transduktionseffizienz vielen anderen DNA-Transfermethoden *in vitro* überlegen. Außerdem wird die hepadnavirale Replikation von einem episomalen Genomkonstrukt eingeleitet, welches unter der Kontrolle hepadnaviraler Promotoren steht. Aus diesem Grund nähert sich der adenovirale Genomtransfer einer natürlichen HBV-Infektion weitgehend an. Schließlich wurde die Grundlage für ein hepadnavirales Tiermodell gelegt, da es gelang durch den Genomtransfer die DHBV-Replikation in Mäusen zu induzieren.