

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Andreas Untergasser

aus Erbach

Tag der mündlichen Prüfung:

Rekombinante Hepatitis B Viren-Vektoren
als Werkzeuge für Molekularbiologie und Therapie:
Optimierung eines Systems

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich
Prof. Dr. Richard Herrmann

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Virologie des Hygieneinstitutes der Universität Heidelberg in der Zeit von Februar 2001 bis September 2002 unter Anleitung von Pd. Dr. Ulrike Protzer ausgeführt.

Ich danke Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich, dass er mich in seinem Labor aufgenommen hat und sich bereit erklärte meine Doktorarbeit zu betreuen. Prof. Dr. Richard Hermann möchte ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferates danken. Ganz herzlich danke ich PD Dr. Ulrike Protzer, sie übernahm die direkte Betreuung meiner Arbeit. Die Zusammenarbeit war ausgesprochen kollegial und produktiv, was die Zeit im Labor sehr angenehm machte. Besonderer Dank gilt ihr für die sorgfältigen Korrekturen am vorliegenden Text kurz vor der Abgabe.

Heike Oberwinkler, Dr. Uta Klöcker und Jérôme Dumortier danke ich für eine gute Zeit im Labor und für die vielen lustigen Mittagspausen im botanischen Garten. Elisa Kieback danke ich für eine sehr gute Zusammenarbeit, eine bessere Laborpraktikantin kann man sich nicht wünschen. Dr. Andreas Knaust und Marc Windisch danke ich für die Freundschaft über das Labor hinaus und die kreativen Frisörbesuche. Frank Weissmann möchte ich für die vielen Cola-Pausen und Fritz-Besuche danken, die einen wichtigen Ausgleich zum Laboralltag darstellten.

Besonderer Dank gilt auch Dr. Peter Büchler, Dr. Henning Schulze-Bergkamen und Andreas Dax, durch deren unkomplizierte Kooperation die PHH eine Qualität erreichten, die vorher nicht denkbar war. Ich möchte mich bei allen Mitgliedern des Labors bedanken, die mir mit ihrem Erfahrungsschatz und unzähligen Ratschlägen bei allen wissenschaftlichen Problemen zur Seite standen. Ein Dankeschön gilt auch den Mitarbeitern des ZMBHs, der AG Bartenschlager und des Hygieneinstitutes, die mir immer aushalfen, wenn es durch meine Fehlplanungen zu Engpässen kam oder ich mal wieder irgendwelche Geräte brauchte.

Danken möchte ich auch Dr. Henning Schulze-Bergkamen, Dr. Jochen Bodem für ihre Verbesserungsvorschläge und meinem Onkel Prof. Klaus Schmidt, der dem Text den letzten grammatikalischen Schliff gab.

Tina Ötzmann danke ich für eine Beziehung, die ich nicht mit Worten beschreiben kann. Sie gibt mir Kraft in einer Form, die ich bisher nicht für möglich gehalten hatte - Sie hat mein Leben verändert.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mich während dieser Zeit in jeder erdenklichen Hinsicht unterstützten.

	Seite
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1. Gentherapie mit viralen Vektoren	2
2.2. Vektoren für eine lebergerichtete Gentherapie	4
2.3. Interaktion der HBV mit dem Wirt	5
2.4. Partikel Aufbau von HBV	6
2.5. Genomorganisation von HBV	6
2.6. Replikation von HBV	8
2.7. HBV als Vektor	9
2.8. Fragestellung der vorliegenden Arbeit	12
3. Ergebnisse	13
3.1. Etablierung primärer humaner Hepatozyten (PHH)-Kulturen	13
3.1.1. Anwachsverhalten in Abhängigkeit von der Ausplattierungsdichte	13
3.1.2. Einfluss von Polyethylenglycol (PEG) auf die Infektion von PHH	14
3.1.3. Abhängigkeit der Anzahl infizierter Zellen von der Viruskonzentration während der Infektion	15
3.1.4. Dauer und Höhe der Genexpression in infizierten PHH	16
3.1.5. Infektion PHH zu späten Zeitpunkten	17
3.1.6. Genexpression der HBV-Vektoren mit GFP oder GFP-NLS als Transgen	18
3.2. Weiterentwicklung der HBV-Vektor-Produktion	20
3.2.1. Einfluss der Transfektionsmethode und des Kulturmediums	21
3.2.2. Einfluss des Klärens auf die Virusqualität	23
3.2.3. Vergleich der Anreicherungsverfahren	24
3.2.4. Optimierung der Anreicherung mittels Ultrazentrifugation	26
3.3. Produktion leberspezifischer Vektoren mit Interferon als Transgen	27
3.3.1. rHBV mit Interferonen als Transgen	27
3.3.2. Herstellung rekombinanter Adenoviren	31

Inhaltsverzeichnis

	Seite
3.4. HBV-Vektoren, die den Nachweis eines Gentransfers erleichtern	33
3.4.1. rHBV mit dsRed 2 als Transgen	33
3.4.2. rHBV mit Renilla-Luziferase als Transgen	34
3.4.3. rHBV mit TTR-Promoter anstelle des preS2-Promoters	35
3.5. Vergrößerung der Transgen-Kapazität	39
3.5.1. Produktion von rHBV mit einer Genomüberlänge	39
3.5.2. Produktion von rHBV mit verschiedenen Genomdeletionen	41
3.5.3. Kombination verschiedener Genomdeletionen	45
3.5.4. Insertion großer Fremdgene in HBV-Vektoren mit verschiedenen Genomdeletionen	47
3.6. Ausblick: Wechselwirkung von HBV-Replikation auf die Apoptose-Induktion in PHH	52
4. Diskussion	54
4.1. PHH als Infektionssystem	54
4.2. Verbesserung des Infektionsnachweises	57
4.3. Erhöhung der Transgenkapazität	59
4.4. Produktion und Nachweis der Expression von Interferon exprimierenden Viren	61
4.5. HBV induziert keine Apoptose in PHH	63
4.6. Ausblick: Gentherapie von HCV mit HBV-Vektoren	64
5. Material und Methoden	65
5.1. Molekularbiologische Methoden	65
5.1.1. Kompetente Zellen	65
5.1.2. Transformation kompetenter Zellen	66
5.1.3. Plasmidpräparation	66
5.1.3.1. "Rapid boiling"-Methode	66
5.1.3.2. Minisäulchen	67
5.1.3.3. Maxi-Präparation	68
5.1.4. DNA-Verdau, Duplexformation und Ligation	68
5.1.5. Klonierung adenoviraler Expressionsplasmide	69

Inhaltsverzeichnis

	Seite
5.1.6. Cäsiumchlorid (CsCl) - Dichtegradient	70
5.1.7. DNA-Dotblot	70
5.1.8. Proteinbestimmung	71
5.1.9. Immunocapture und Southern Blot	71
5.2. Zellbiologische Methoden	72
5.2.1. Kulturmedien	72
5.2.2. Transfektion von Zellen	72
5.2.3. Einfrieren / Auftauen von Zellen	73
5.2.4. Detektion der GFP-Fluoreszenz	73
5.2.5. Detektion der Luciferase-Expression	73
5.2.6. HBs-Ag und HBe-Ag Bestimmung	74
5.2.7. Virenproduktion	74
5.2.7.1. Produktion rekombinanter HBV	74
5.2.7.2. Produktion rekombinanter Adenoviren	75
5.2.8. Virenpräparation	75
5.2.9. Primäre humane Hepatozyten	77
5.2.9.1. Medien und Zusätze	77
5.2.9.2. Präparation primärer humaner Leberzellkulturen	78
5.2.9.3. Infektion von primären humanen Hepatozyten mit rHBV	80
5.2.9.4. Infektion von primären humanen Hepatozyten mit Adenoviren	81
5.3. Plasmidkonstrukte	82
5.3.1. Ausgangsplasmide und benutzte Plasmide	83
5.3.2. Eigene Plasmidkonstrukte	84
5.4. Primer	96
6. Abkürzungen und Einheiten	98
6.1. Abkürzungen	98
6.2. Einheiten	99
7. Literaturverzeichnis	100
8. Publikationen, Vorträge, Poster	109

1. Zusammenfassung

Hepatitis B Virus (HBV) - Vektoren sind vielversprechende Kandidaten für einen lebergerichteten Gentransfer, da sie bevorzugt Hepatozyten infizieren und ihre Genexpression hepatozytenspezifisch ist. Es war bekannt, dass infektiöse HBV produziert werden konnten, in denen das kleine Hüllprotein (S) durch das grün fluoreszierende Protein (GFP) ersetzt wurde. Nach Infektion primärer humaner Hepatozyten (PHH) mit diesen Viren zeigten einzelne Zellen eine grüne Fluoreszenz.

Der Einsatz von HBV-Vektoren ist einerseits als Werkzeug in der Molekularbiologie und andererseits in der Therapie von Lebererkrankungen denkbar. In der vorliegenden Arbeit sollte der Nachweis eines Gentransfers verbessert sowie die Transgenkapazität exakt bestimmt und vergrößert werden. Im Hinblick auf eine mögliche Therapie von chronischer Hepatitis B oder C sollte ein lebergerichteter Interferontransfer etabliert werden.

Der Gentransfer in Hepatozyten durch Infektion konnte erst reproduzierbar untersucht werden, als PHH als Testsystem für die Vektoren etabliert waren und die Virusausbeute durch die Verwendung von Lipofektion sowie serumfreiem Medium bei der Virusproduktion 10fach erhöht wurde. Durch das Ersetzen des preS2/S-Promoters durch den Transthyretin-Promoter konnte eine Infektion von lebenden PHH zu einem früheren Zeitpunkt nachgewiesen werden, ohne die Leberspezifität des Promotors zu verlieren. Mit Renilla-Luziferase als Transgen gelang es, den Nachweis einer Infektion zu vereinfachen und quantifizierbare Ergebnisse zu erhalten. Diese Viren ermöglichten es, die Transgenkapazität und die Genexpression der HBV-Vektoren genauer zu untersuchen. Da die HBV-Vektoren eine über 400 bp hinausgehende Überlänge des Genoms nicht tolerierten, konnte die Transgenkapazität von ca. 800 bp nur durch Einführung weiterer Deletionen im viralen Genom vergrößert werden. Eine andere genomische Deletion erhöhte die Genexpression 5fach. Für einen lebergerichteten Interferontransfer wurden sowohl adenovirale Vektoren als auch HBV-Vektoren benutzt. Mit beiden Systemen gelang es, Viren zu produzieren, und mit beiden Vektoren war es auch möglich, Interferon-Expression in infizierten PHH nachzuweisen.

Durch diese Verbesserungen stellen die HBV-Vektoren ein Werkzeug zur mikroskopischen Identifikation infizierter, lebender PHH in Zellkultur da. Mit den Luziferase exprimierenden Viren ist es möglich, die Infektion einer gesamten Kulturschale zu quantifizieren und den Einfluss von Änderungen im viralen Genom auf Infektiosität, Transkription und Genexpression zu untersuchen. Interferon exprimierende HBV-Vektoren werden aktuell im Schimpansen Modell der chronischen Hepatitis C getestet.

2. Einleitung

2.1. Gentherapie mit viralen Vektoren

Gentherapie ist ein neues Konzept zur Behandlung menschlicher Erkrankungen. Es basiert auf dem Transfer von genetischem Material in Zellen des Patienten. In den Zellen wird das genetische Material exprimiert und hat einen therapeutischen Effekt zur Folge. Diese Technik hat das Potential, sowohl genetische Erkrankungen als auch erworbene Krankheiten, wie z.B. Krebs und Infektionserkrankungen, zu behandeln. Dabei bleiben der Transport genetischer Information in die Zielzellen und die Expression der Gene die kritischen Schritte in der Gentherapie.

Viren haben keinen eigenen Stoffwechsel und nutzen für ihre Vermehrung die lebenden Zellen eines Wirtes. Dort wird die genetische Information repliziert und die virale Proteine werden translatiert. Aus den produzierten Proteinen und der replizierten Nukleinsäuren bilden sich Nachkommen-Viren, die aus der Zelle freigesetzt werden. Aufgrund dieses Lebenszyklus sind Viren auf einen Transfer ihrer genetischen Information in die Zielzelle spezialisiert. Deswegen ist es naheliegend, Viren für den Transfer genetischer Information in die Zellen einzusetzen.

Obwohl die Anforderungen an die Genfähren sehr unterschiedlich sind, gibt es Eigenschaften, die alle Vektorsysteme haben sollten. Rekombinanten Viren sollten leicht und in hohen Konzentrationen produzierbar sein. Sie sollten das Transgen langfristig und ohne Schwankungen in den infizierten Zellen exprimieren. Eine Reaktion des Immunsystems des Patienten auf die Vektoren sollte vermieden werden. Für viele Anwendungen ist es wichtig, dass nur bestimmte Zielzellen infiziert werden. Wenn die Zielzellen eine niedrige Teilungsfrequenz haben, sollten die Viren auch ruhende Zellen infizieren können. Zuletzt sollte im Genom des Virus genügend Platz für das Transgen sein (Walther, 2000).

Vier verschiedene virale Vektoren sind besonders weit verbreitet: Adenovirale Vektoren, Adenoassoziierte-Viren-Vektoren, retrovirale Vektoren und lentivirale Vektoren. Lentiviren sind eine Untergruppe der Retroviren. In dieser Arbeit werden sie aber aufgrund ihrer Fähigkeit, ruhende Zellen zu infizieren, getrennt besprochen. Auch Herpesviren und Vakziniaviren wurden erfolgreich als Vektoren eingesetzt. Die verschiedenen Vektoren zeichnen sich durch unterschiedliche Vor- und Nachteile aus:

Adenovirale-Vektoren sind in Mengen bis zu 10^{10} pfu/ml produzierbar, können Transgene von 7-8 kb tragen und ruhende sowie teilende Zellen infizieren (Ballay, 1985; Karlsson, 1985). Nachteile sind eine unregelmäßige Expression des Transgens und eine starke

Immunreaktion auf die viralen Partikel. Sie integrieren nicht in das Genom, was ihre Anwendung auf Fälle beschränkt, bei denen nur ein vorübergehender Effekt erwünscht ist.

Adenoassoziierte-Viren-Vektoren können ruhende und teilende Zellen infizieren, können in das Genom integrieren und haben eine gleichmäßige Expression des Transgens. Sie induzieren keine starke Immunantwort und sind nicht pathogen. Nachteile sind niedrige Virustiter bei der Produktion und die geringe Transgenkapazität von 4 kb. Die Herstellung von Adenoassoziierten-Viren war aufgrund der bei der Produktion anwesenden Adenoviren oder Herpesviren schwierig. Besser geeignet sind Systeme, die ohne Wildtyp-Viren während der Produktion auskommen (Matsushita, 1998).

Retrovirale-Vektoren sind in Titern von 10^6 - 10^7 pfu/ml zu produzieren und exprimieren konstant das Transgens, da sie in das Genom integriert werden. Es wird keine starke Immunreaktion induziert und die Transgenkapazität beträgt 7-8 kb (Guild, 1988). Die Nachteile liegen in der Schwierigkeit, ruhende Zellen zu infizieren und den Transfer zielzellspezifisch zu gestalten. Eine zusätzliche Gefahr geht von der zufälligen Integration in das Genom des Wirtes aus, wodurch es unter Umständen zu einer Aktivierung von Genen oder zur Insertionsmutagenese kommen kann.

Lentivirale-Vektoren können ruhende wie auch teilende Zellen infizieren und haben eine Transgenkapazität von 10 kb. Die Genexpression ist nach Integration in das Wirtsgenom stabil (Naldini, 1998; Naldini, 1996; Walther, 2000). Eine Gefahr geht auch bei diesen Viren von der zufälligen Integration in das Genom und der damit verbundenen Möglichkeit der Dysregulation der zellulären Genexpression aus.

Herpesvirus-Vektoren zeichnen sich durch ein großes Spektrum infizierbarer Zellen und eine hohe Transgenkapazität von bis zu 50 kb aus. Die Partikel sind stabil, wodurch die Viren bis auf 10^{12} pfu/ml angereichert werden können. Die Nachteile sind eine mögliche Toxizität der Viren und das Risiko der Rekombination. Da die Viren nicht in das Genom integrieren, ist die Genexpression transient (Krisky, 1997).

Pockenvirus-Vektoren können große Transgene exprimieren und zeigen eine hohe Transgenexpression. Sie eignen sich besonders für replikationskompetente Impfstoffe, bei denen die Viren sich in der geimpften Person lokal vermehren. Das hat eine starke Reaktion des Immunsystems zur Folge. Es besteht das Risiko von cytopathischen Effekten durch das Virus (Paoletti, 1996).

Aufgrund der verschiedenen Anforderungen, die je nach gewünschter Therapie unterschiedlich sind, kann es kein optimales Vektorsystem für alle Anwendungen geben. So sind retrovirale Vektoren zum Beispiel eine geeignete Genfähre für eine Krebstherapie. Da sie

nur sich teilende Zellen infizieren können, würden sie bevorzugt schnellteilende Krebszellen erreichen. Retrovirale Vektoren sind aber eher ungeeignet für einen Gentransfer in die Leber. Aufgrund der niedrigen Teilungsrate der Leberzellen infizieren sie nur wenige Zellen.

2.2. Vektoren für eine lebergerichtete Gentherapie

Die Leber spielt eine wichtige Rolle bei der Entgiftung toxischer Stoffe. Sie reguliert den Kohlenhydrat-Spiegel im Blut, synthetisiert wichtige Stoffe wie Fette und Bluteiweiße und bildet die Galle. Aufgrund der vielfältigen Aufgaben gibt es eine große Anzahl angeborener, metabolischer Erkrankungen, die schwerwiegende Folgen für den Patienten haben und sich bislang nur unzureichend behandeln lassen. Die Leber ist aber auch der Ort der Replikation vieler Krankheitserreger, wie zum Beispiel von Hepatitis B und C Viren. Deshalb ist die Leber ein wichtiges Zielorgan einer Gentherapie.

Die Leber besteht zum Großteil aus ruhenden Hepatozyten und ist deshalb nur mit wenigen Vektorsystemen effektiv infizierbar. Adenovirale Vektoren infizieren nach intravenöser Injektion bevorzugt und sehr effizient Hepatozyten. Deshalb stellen sie zur Zeit das System der ersten Wahl dar. Allerdings weisen sie eine erhebliche Toxizität auf. Adenovirale Vektoren sind in der Lage, komplette HBV-Genome in Hepatozytenkulturen von Mäusen, Ratten, Tupaias und Menschen zu transferieren. Die mit dem Vektor infizierten Zellen sekretieren Hepatitis B Viren (HBV) in das Kulturmedium. Wurden adenovirale Vektoren in die Schwanzvene von Mäusen injiziert, konnte Enten-HBV im Serum der Tiere nachgewiesen werden (Sprinzl, 2001). Mit Adenoassoziierten-Viren-Vektoren gelang es, den humanen Faktor IX in den Lebern von Mäusen zu produzieren. Die erreichten Konzentrationen wären für einen therapeutischen Effekt ausreichend (Nakai, 1998). Da beide Vektoren nicht gerichtet die Leber infizieren, wird ein Teil dieser Vektoren auch andere Zellen im Körper infizieren, wo es, durch die Expression des Transgens, zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen kann. Das Murinen-Leukämie-Virus zeigt keine Leberspezifität. Durch Pseudotypisierung mit Oberflächenproteinen von HBV konnte der Gentransfer leberspezifisch gestaltet werden und primäre humane Hepatozyten (PHH) konnten in Zellkultur infiziert werden (Sung, 2002). Die Effizienz des Transfers war jedoch sehr gering, da Retroviren eine Zellteilung benötigen, um ihre Infektion etablieren zu können; Leberzellen haben eine niedrige Teilungsrate. Eine Anwendung in vivo kommt deshalb nicht in Frage.

HBV infiziert ruhende Hepatozyten effektiv. Im Entenmodellsystem war ein Virusgenom ausreichend für eine Infektion (Jilbert, 1996) und die Genexpression ist leberspezifisch. HBV

ist nicht zytopathisch. Aus diesen Gründen bietet sich HBV als Kandidat für eine lebergerichtete Gentherapie an.

2.3. Interaktion der HBV mit dem Wirt

Weltweit sind 350 Millionen Menschen chronisch mit HBV infiziert (WHO, 1996). Das Virus wird sowohl durch Blut oder sexuelle Kontakte übertragen. Chronisch infizierte Mütter übertragen HBV bei der Geburt auf ihre Kinder. Eine akute Infektion im Erwachsenenalter verläuft in der Hälfte der Fälle ohne Symptome. In den anderen Fällen entwickelt sich eine akute Hepatitis mit unterschiedlich starker temporärer Schädigung der Leber. Weniger als 1 % der Infizierten entwickeln eine fulminante Hepatitis mit schlechter Prognose. Bei 5 - 10 % der akut infizierten Erwachsenen und 90 % der infizierten Neugeborenen entwickelt sich eine chronische Hepatitis B mit einem deutlich erhöhten Risiko für eine Leberzirrhose und ein hepatozelluläres Karzinom (Ganem, 1996).

Seit längerer Zeit gibt es einen wirksamen Impfstoff gegen HBV (McAlleer, 1984), dennoch ging bisher die Zahl der weltweit neu Infizierten nicht zurück. Chronisch Infizierte werden unter anderem mit Interferon- α (INF- α) behandelt, welches aber nur in 20 - 35 % der Fälle wirksam ist (Hoofnagle, 1997; Lammert, 2000). Daneben kommt auch der RT-Inhibitor 3TC (Lamivudin[®]) zum Einsatz (Lau, 2000).

Aufgrund spezifischer Promotoren und der Bindung an spezifische Rezeptoren zeigt HBV eine hohe Organ- und Wirtsspezifität. So kann das HBV nur Menschen und höhere Primaten infizieren, und die Replikation der Viren ist auf die Leber beschränkt. Da erst kürzlich eine infizierbare Zelllinie verfügbar wurde (Gripon, 2002), ist für Infektionsexperimente bisher auf PHH zurückgegriffen worden. Dies ist ein Nachteil, da diese Zellen nur selten und in sehr unterschiedlicher Qualität verfügbar sind. Aus diesem Grund werden viele Experimente mit verwandten Viren durchgeführt, die unter anderem in Waldmurmeltieren (woodchuck hepatitis virus, WHV, Summers, 1978), Erdhörnchen (ground squirrel hepatitis Virus, GSHV, Marion, 1980), Reiher (heron hepatitis B virus, HHBV, Sprengel, 1988), Gänsen (snow goose hepatitis B virus, SGHBV, Chang, 1999) und Enten (duck hepatitis B virus, DHBV, Mason, 1980) vorkommen.

2.4. Partikel Aufbau von HBV

HBV gehört zur Gruppe kleiner, membranumhüllter DNA - Viren mit ausgeprägtem Lebertropismus, den Hepadnaviren. Die Replikation der Hepadnaviren erfolgt über ein RNA-Intermediat, aus dem noch im Zytoplasma der Wirtszelle durch reverse Transkription das DNA - Genom gebildet wird. Aus diesem Grund werden sie zu den Pararetroviren gezählt.

Die Virionen bestehen aus einer äußeren Lipid-Doppelschicht, die von der Wirtszelle stammt und in die virale Oberflächenproteine eingelagert sind. Bei HBV sind das drei Proteine: das große L - (large) Protein, das mittlere M - (middle) Protein und das kleine S - (small) Protein. Diese Proteine werden von einem ORF transkribiert. Die Länge der Proteine unterscheidet sich nur durch verschiedene Startstellen, das Carboxy-terminale Ende ist identisch (Abb. 2.1, innerer Kreis). Auf der Hülle der 42 - 47 nm großen Virionen ist das L-Protein angereichert. Zusätzlich bilden die Zellen subvirale Partikel, auf denen fast nur S-Protein zu finden ist. Subvirale Partikel können sphärischer oder filamentöser Gestalt von 20 nm Breite und variabler Länge sein. Sie enthalten keine Kapside oder DNA. In der Hülle der Virionen befindet sich das Kapsid, dessen einziges Strukturprotein das Core-Protein ist. In dem Kapsid ist die partiell doppelsträngige DNA mit der kovalent gebundenen viralen Polymerase (reverse Transkriptase) enthalten. Im Serum infizierter Menschen findet man durchschnittlich 10^9 Virionen, 10^{10} filamentöse und 10^{13} sphärische Partikel pro Milliliter (Heermann, 1991). Die Funktion der subviralen Partikel ist bis heute unklar, es wird aber davon ausgegangen, dass neutralisierende Antikörper von ihnen abgefangen werden.

2.5. Genomorganisation von HBV

Das Genom besteht aus einem zirkulären, partiell doppelsträngigen DNA - Molekül von 3,2 kb Größe. Die virale Polymerase ist über ihr terminales Protein kovalent an das 5' Ende des DNA - Stranges gebunden, welcher relativ zur ursprünglichen genomischen RNA Negativorientierung hat. Das terminale Protein dient bei der reversen Transkription als Primer (Bartenschlager, 1988). Zur Synthese des kürzeren DNA - Strangs (in Positivorientierung, relativ zur genomischen RNA) dient ein dort verbleibender RNA-Rest als Primer (Lien, 1986). Der Plusstrang variiert am 3' Ende in der Länge, wodurch ein Teil des Genoms einzelsträngig bleibt.

Insgesamt hat HBV vier Promotoren: den Core-, preS1-, preS2/S- und X-Promoter. Auf diese Promotoren wirken zwei Enhancer-Elemente ein, Enh I und Enh II (Abb. 2.1, als Box auf dem mittleren Kreis dargestellt). Enhancer I erhöht die Transkription aller vier Promotoren, während Enhancer II in erster Linie die Transkription des Promotors preS2/S erhöht.

HBV hat 4 offene Leseraster (ORF), die ganz oder teilweise überlappen und auf diese Weise die geringe Genomgröße der Viren ermöglichen (Abb. 2.1, innere Kreise). Die Proteine werden von verschiedenen mRNAs translatiert (Abb. 2.1, äußere Kreise). Die Transkription aller mRNAs wird am gleichen Polyadenylierungssignal beendet (Cattaneo, 1984), startet aber von unterschiedlichen Transkriptionsinitiationsstellen (Abb. 2.1, durch Dreiecke dargestellt). Von dem Überlängenprodukt wird das Core-Protein und durch einen internen Translationsstart das Polymerase-Protein gebildet. Die Hüllproteine L, M und S werden von mRNAs translatiert, die von 2 internen Promotoren induziert werden. Die mRNA, von der das X-Protein translatiert, wird von einem weiteren internen Promotor induziert. X-Protein ist essentiell für die Replikation in Tieren, doch in Zellkultur ist es nicht für die Bildung viraler Partikel notwendig. Die genaue Funktion des X-Proteins ist noch immer unklar. In Zellkultur wirkt es als Transaktivator und es wird vermutet, dass es bei der Tumorentstehung eine Rolle spielt (Seeger, 2000).

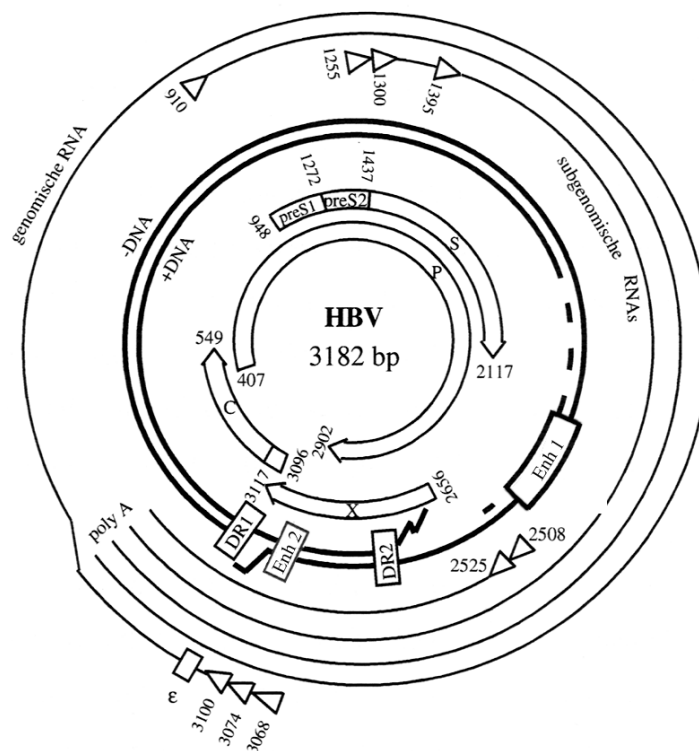


Abb. 2.1: Genomkarte von HBV und DHBV. Die äußeren Kreise stellen die genomischen und subgenomischen RNAs dar, die aufsitzenden Dreiecke die jeweiligen Startstellen der Transkription. Die Kreise in der Mitte symbolisieren das partiell doppelsträngige Genom der Viren, die inneren Kreise die ORF, von denen die viralen Proteine produziert werden.

2.6. Replikation von HBV

Um einen Hepatozyten infizieren zu können, muss ein Virion in das Zytoplasma der Zelle gelangen. Es wird angenommen, dass es mit den viralen Oberflächenproteinen an einen oder mehrere, noch unbekannte Rezeptor-Proteine bindet. Danach müssen die virale- und die Wirtsmembran fusionieren und das Kapsid in das Zytoplasma freisetzen (Abb.2.2). Es ist unklar, ob die Nukleokapside in den Nukleus transportiert werden und dort entpackt werden oder ob sie an der nukleären Membran dissoziieren und das Genom freisetzen, welches in den Nukleus transportiert wird (Ganem, 1996). Das partiell doppelsträngige DNA-Genom wird im Nukleus vervollständigt und liegt anschließend in kovalent geschlossener, zirkulärer Form (covalently closed circular; cccDNA) vor. Die zelluläre Polymerase II transkribiert von der cccDNA die genomischen und subgenomischen RNAs (Köck, 1993). Diese werden ungespleißt ins Zytoplasma transportiert, wo die viralen Proteine translatiert werden. Das Verpackungssignal ϵ am 5' Ende der genomischen RNA wird von der viralen Polymerase erkannt. Nach Bindung der Polymerase beginnt die Enkapsidierung des RNA-Polymerasekomplexes durch Anlagern von Core-Dimeren (Junker-Niepmann, 1990; Beck, 1997) (Abb.2.2). Noch in der Wirtszelle schreibt die Polymerase durch ihre reversen Transkriptaseaktivität die RNA in DNA um. Ein kritischer Schritt der reversen Transkription ist die Translokation des RNA-Primers von dem 5' DR 1 zum 3' DR 2. Unterbleibt die Translokation, so werden nicht-infektiöse, lineare Genome anstelle von infektiösen, kreisförmig geschlossenen Genomen gebildet. Für die Translokation ist neben DR 1 und DR 2 ein zentral im Genom liegendes Element (RC) wichtig (Chiang, 1992; siehe Abb. 2.1). Die neu entstandenen Nukleokapside können in den Kern reimportiert werden und dort die Kopienzahl der cccDNA erhöhen. Alternativ können sie in das Lumen des endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie des Golgi-Apparats knospen (Patzner, 1986; Huovila, 1992) und werden vermutlich über sekretorische Wege aus der Zelle freigesetzt (Abb.2.2).

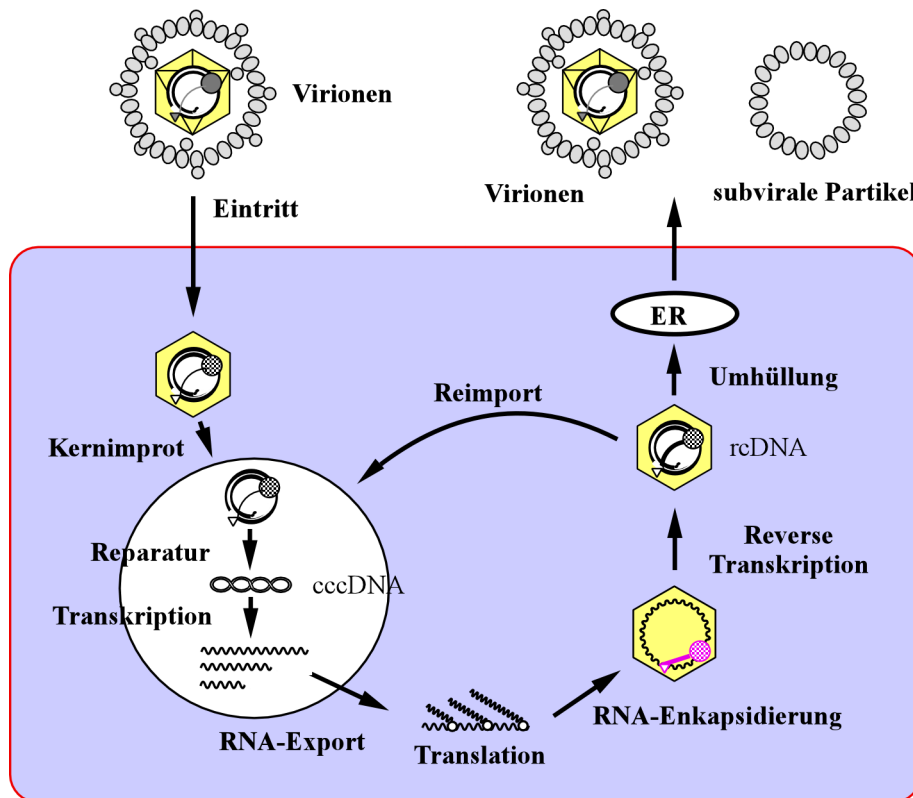


Abb. 2.2: Replikation der HBV. Die viralen Kapside werden nach der Fusion mit der Membran zum Kern transportiert. Die cccDNA wird im Kern transkribiert und die RNA ungespleißt exportiert. Von den mRNAs werden die Proteine translatiert, mit denen die genomische RNA in Kapside verpackt wird. Die Kapside knospen in das endoplasmatische Retikulum (ER) oder erhöhen den cccDNA-Pool im Kern. Nach der Knospung in das ER werden die Virionen sekretiert.

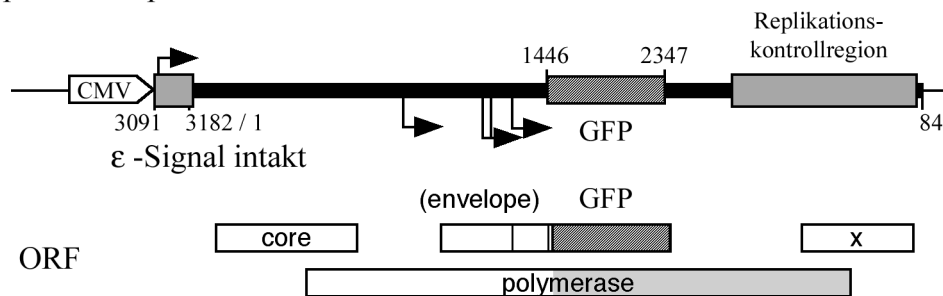
2.7. HBV als Vektor

Hepatitis B Viren eignen sich als Vektoren, da sie in der Lage sind, ruhende Hepatozyten zu infizieren. Dies ist aufgrund der niedrigen Teilungsaktivität der Hepatozyten wichtig. Weitere Vorteile sind die hohe Leberspezifität der Hepadnaviren sowie die Möglichkeit, rekombinante Viren in hohen Konzentrationen zu produzieren. Sie integrieren nur in seltenen Fällen in die genomische DNA. Ein Nachteil ist jedoch die Größenrestriktion des Genoms, da die reverse Transkription ab Genomlängen von über 110 % ineffizient wird. Ca. 25 % des Genoms bestehen aus cis-aktiven Elementen, die nicht ausgetauscht werden können.

HBV-Vektoren werden durch Kotransfektion eines Transfer- und eines Helferplasmid in Hepatomazelllinien produziert. Im Transferplasmid wurde das Gen für das S-Protein durch ein GFP-Gen ersetzt. Dabei wurden das Startkodon und die ersten beiden Aminosäuren des S-Proteins erhalten (Abb. 2.3). Durch diese Veränderung wurden die offenen Leserahmen für

das L-, M- und S-Protein sowie der für die Polymerase zerstört (in Abb. 2.3 durch grauen Balken dargestellt). Diese Proteine sind aber zur Produktion von infektiösen Partikeln essentiell und müssen von einem Helferplasmid in trans zur Verfügung gestellt werden (Protzer, 1999). Um eine Verpackung der vom Helferplasmid transkribierten prägenomischen RNA zu verhindern, wurde das Verpackungssignal ϵ am 5' Ende deletiert (Junker-Niepmann, 1990). Das hatte keinen Einfluss auf die Produktion viraler Proteine.

Transferplasmid - pCH GFP



Helferplasmid - pCH 3142

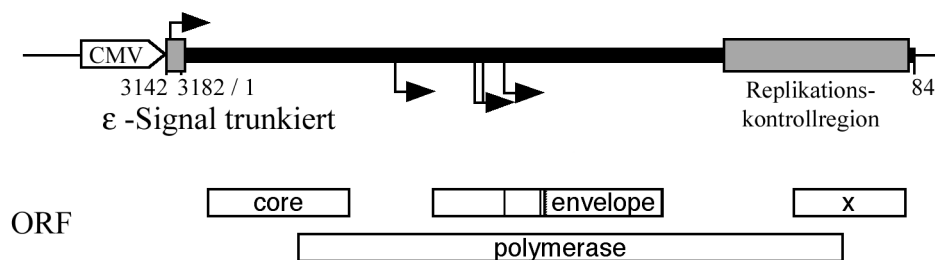


Abb. 2.3: Das Transferplasmid hat das GFP-Gen anstelle des S-Genes inseriert. Es ist nicht mehr in der Lage, die viralen Proteine L, M, S und Polymerase zu bilden. Das Helferplasmid ist in der Lage alle HBV-Proteine zu produzieren und stellt sie in trans zur Verfügung. Die mRNA des Helfers kann aufgrund des trunzierten ϵ -Signals nicht verpackt werden.

Nach Transfektion des Transfer- und des Helferplasmides in HuH 7-Zellen, werden von beiden Plasmiden RNAs transkribiert (Abb. 2.4, gewellte Linien). Die vom Helferplasmid transkribierte mRNA (Abb. 2.4, blau dargestellt) produzieren alle viralen Proteine, können aber durch die Deletion des Verpackungssignals nicht in Kapside verpackt werden. Das Transferplasmid transkribiert die prägenomische RNA (Abb. 2.4, grün dargestellt), die die Polymerase bindet und in ein Kapsid verpackt wird. Dieses wird von einer Membran umhüllt und sekretiert.

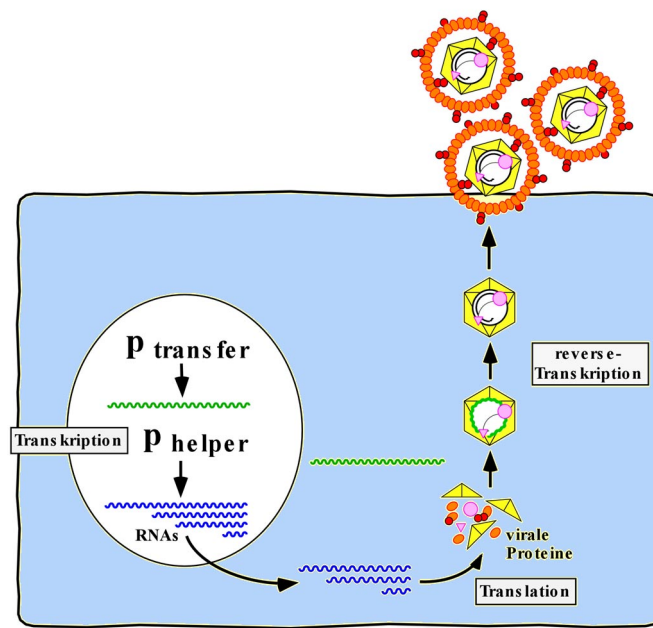


Abb. 2.4: Produktion der HBV-Vektoren. (b) Das Transferplasmid transkribiert eine pregenomische RNA (grün dargestellt), die mit den vom Helferplasmid (blau dargestellt) in trans zur Verfügung gestellten Proteinen virale Partikel aufbaut. Diese knospen in das ER und verlassen die Zelle.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit gelang es zu zeigen, dass in HBV-Vektoren alle viralen Gene ausgeschaltet werden können. Weder die Titer der Vektoren bei der Produktion noch die Infektiosität wurden reduziert (Untergasser, 2001). Außerdem konnte der preS 2 - Promotor gegen einen CMV-Promotor ausgetauscht werden. Diese Vektoren führten nach Infektion zu einer starken GFP-Fluoreszenz. Damit war es möglich, infizierte Zellen zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt zu identifizieren. Um Wechselwirkungen mit dem Immunsystem bei einer späteren Anwendung im Tiermodell zu vermeiden, wurden in der vorliegenden Arbeit nur Transferplasmide verwendet, bei denen alle viralen ORF durch eingeführte Stop-Kodons ausgeschaltet waren.

2.8. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der Arbeit war es, HBV-Vektoren weiterzuentwickeln, einerseits für einen Einsatz in der Gentherapie und andererseits als Werkzeug, um die frühen Schritte einer HBV-Infektion in Zellkultur untersuchen zu können.

Da HBV-Vektoren nur durch Infektion von primären humanen Hepatozyten (PHH) auf ihre Funktionalität getestet werden können, sollten zunächst die Kulturbedingungen im Hinblick auf die Infektion mit HBV optimiert werden. Wenn eine reproduzierbare HBV-Infektion in PHH möglich ist, sollten diese Zellen auch für Untersuchung der Virus-Zell-Interaktionen benutzt werden.

Die Infektion von PHH mit rekombinanten Viren wurde bisher durch die Expression von GFP im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. PHH haben ein hohes Hintergrundsignal, was den Nachweis GFP-positiver Zellen erschwert. In der vorliegenden Arbeit sollte das Nachweisverfahren verbessert werden. Einerseits sollte durch Verwendung verschiedener Promotoren, unter denen das Transgen exprimiert wird, die Genexpression erhöht werden, ohne die Leberspezifität der Genexpression zu verlieren. Andererseits sollte mit anderen Transgenen, versucht werden, einen einfacheren und quantifizierbaren Nachweis der Infektion zu etablieren.

In den bisher verwendeten Transferplasmiden waren ca. 800 bp große Transgene enthalten, aber die genaue Transgenkapazität der HBV-Vektoren war unbekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte die Transgenkapazität der HBV-Vektoren bestimmt werden. Da viele Transgene größer als 800 bp sind, sollte zudem versucht werden, die Kapazität der HBV-Vektoren zu erhöhen.

HBV-Vektoren wären aufgrund ihrer Leberspezifität für einen therapeutischen Einsatz bei chronische Hepatitis B oder C geeignet. Zu diesem Zweck sollten humane Interferone mittels HBV-Vektoren in der Leber exprimiert werden. Um die Mengen an Vektor produzieren zu können, die für eine Therapie benötigt werden, war es notwendig, die Produktionsbedingungen der Viren hinsichtlich der Ausbeute zu optimieren.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung primärer humaner Hepatozyten (PHH)-Kulturen

Hepatitis B Viren können nur Menschen und Schimpansen infizieren. Die Replikation der Viren ist auf Hepatozyten beschränkt. Da weder eine infizierbare Zelllinie noch ein Kleintiermodell verfügbar war, mussten PHH-Kulturen etabliert werden, um den Gentransfer der Hepatitis B Viren (HBV)-Vektoren in Zellkultur zu untersuchen. Die Effizienz des Gentransfers in PHH ist von den verwendeten Viruspräparationen, von der Qualität der PHH und den Kulturbedingungen während der Infektion abhängig. In diesem Abschnitt sollten die Kulturbedingungen verbessert und die Infektion charakterisiert werden, um die Effizienz des Gentransfers zu erhöhen.

3.1.1. Anwachsverhalten in Abhängigkeit von der Ausplattierungsdichte

Wurden PHH mit GFP exprimierenden HBV-Vektoren infiziert, so konnte GFP-Fluoreszenz nur in einzelnen Zellen beobachtet werden (Untergasser, 2001). Um einen Bereich zu finden, in dem möglichst viele Zellen anwachsen und einen dichten Rasen ausbildeten, wurden PHH in verschiedenen Dichten ausgesät und am 3. Tag nach Ausplattierung im Lichtmikroskop untersucht (Abb. 3.1).

Abb. 3.1: Anwachsverhalten PHH in Abhängigkeit von der Ausplattierungsdichte. PHH wurden in unterschiedlicher Dichte ausgesät und am 3. Tag nach Ausplattierung im Phasenkontrast fotografiert, um einen Bereich zu finden, in dem sie möglichst dicht anwachsen.

Es wurde festgestellt, dass die Zelldichte bei Aussaat sehr kritisch ist. Konfluent wuchsen nur Kulturen, bei denen $0,4 \times 10^6$ PHH / cm^2 ausplattiert wurden (Abb. 3.1, Bild c). Höhere (Abb. 3.1, Bild b) oder niedrigere Konzentrationen (Abb. 3.1, Bild d) führten nicht zur Ausbildung eines dichten Zellrasens. PHH, die in Konzentrationen unter $0,2 \times 10^6$ PHH / cm^2 (Abb. 3.1, Bild a) und über $0,8 \times 10^6$ PHH / cm^2 (Abb. 3.1, Bild e) ausplattiert wurden, konnten nicht für Experimente verwendet werden. Um ein gutes Anwachsen der Zellen sicherzustellen, wurden alle folgenden Kulturen mit $0,4 \times 10^6$ PHH / cm^2 ausgesät.

3.1.2. Einfluss von Polyethylenglycol (PEG) auf die Infektion von PHH

Gripon konnte zeigen, dass die Anwesenheit von PEG die Infektion von PHH mit HBV erleichtert (Gripon, 1993).

Diese Ergebnisse sollten mit unsere PHH-Präparationen reproduziert werden. Dazu wurden drei Ansätze PHH mit 100 viralen Partikeln (VP) pro Zelle (multiplicity of infection, moi) infiziert. Der zweite Ansatz wurde in Gegenwart von 5% PEG, der dritte in Gegenwart von 5% PEG und neutralisierenden Antikörpern infiziert (anti HBs-Ag, Hepatect®). Nach 18 Stunden wurden die Zellen durch dreimaligen Mediumwechsel gewaschen und Viren, PEG und Antikörper abgespült. Jeden zweiten Tag wurde das Medium abgenommen und das von infizierten Zellen sekretierte HBs-Ag bestimmt (Abb. 3.2).

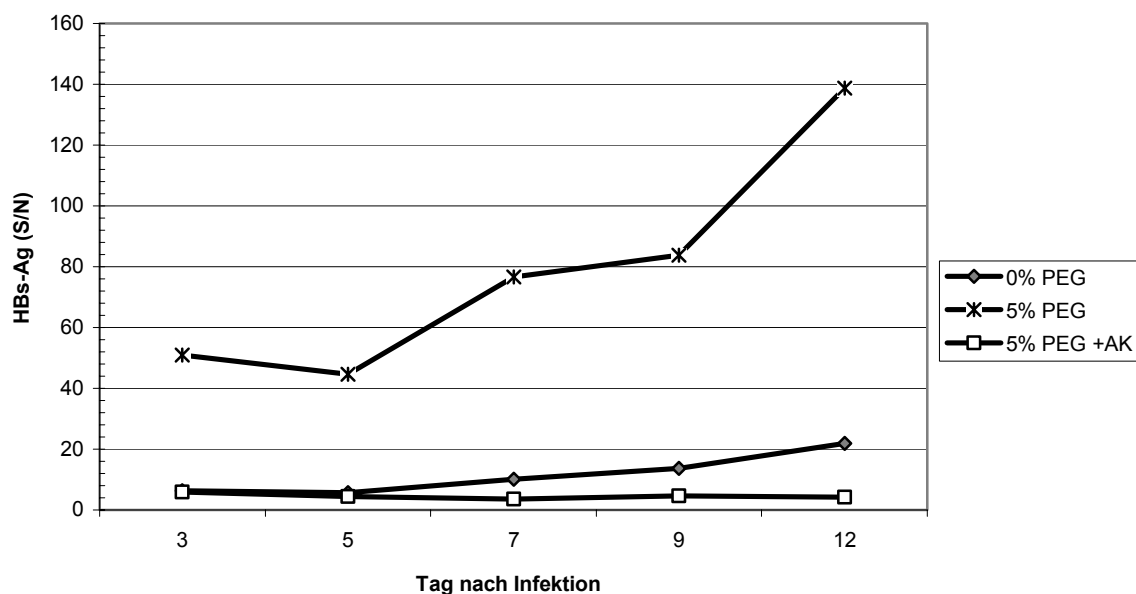


Abb. 3.2: PEG erhöht die Infizierbarkeit von PHH. PHH wurden am 2. Tag nach Aussaat mit Wildtyp-HBV in einer moi 100 VP/Zelle infiziert. Im zweiten Ansatz wurde 5% PEG zugegeben. Der dritte Ansatz wurde in Anwesenheit von 5% PEG und neutralisierenden Antikörpern infiziert. Jeden zweiten Tag nach Infektion wurde HBs-Ag im Überstand gemessen.

Da HBs-Ag sehr früh nach Infektion exprimiert wird, wurde es bereits ab der ersten Bestimmung detektiert. Der Anstieg ab dem 5. Tag könnte durch eine Ausbreitung des Virus in der Kultur bedingt sein. Die Infektion, die in Anwesenheit von 5% PEG durchgeführt wurde, produzierte 8-10fach mehr Antigen als der Kontrollansatz. Ein neutralisierender Antikörper blockierte die Infektion auch in Anwesenheit von 5% PEG so effizient, dass keine Produktion von Antigen nachgewiesen werden konnte. Daraus kann gefolgert werden, dass die Infektion durch PEG erleichtert wird, aber virusspezifisch blockierbar ist. Diese Ergebnisse sind durch Messung des HBe-Ag bestätigt worden (Daten nicht gezeigt). HBe-Ag wird erst in den PHH nach Infektion gebildet und eine Detektion der Viren sowie Wechselwirkungen des neutralisierenden Antikörpers mit dem HBe-Ag-Nachweis können ausgeschlossen werden. In allen Ansätzen wurde HBs-Ag detektiert, auch wenn neutralisierende Antikörper zugegeben wurden. 5% PEG wurde bei allen folgenden Infektionen verwendet.

3.1.3. Abhängigkeit der Anzahl infizierter Zellen von der Viruskonzentration während der Infektion

Es ist für spätere Versuche wichtig, zu wissen, in welchem Bereich die Anzahl der positiven Zellen oder die Antigenproduktion linear mit der Anzahl der eingesetzten Viren korreliert. In diesem Bereich, in dem noch nicht alle suszeptiblen Zellen infiziert sind, kann die Infektiosität der Viren quantifiziert werden. PHH wurden mit Wildtyp-HBV in verschiedenen MOI infiziert und HBs-Ag sowie HBe-Ag im Überstand am 6. Tag gemessen (Abb. 3.3a). Um einen Infektionsnachweis auf Einzelzellebene durchzuführen zu können, wurde parallel mit einem GFP exprimierenden HBV-Vektor in verschiedenen MOI infiziert (rHBV CMV-GFP 4⁻; Untergasser, 2001). Dieses Virus produziert nach Infektion GFP unter der Kontrolle eines CMV-Promotors, und infizierte Zellen zeigen im Fluoreszenzmikroskop grüne Fluoreszenz. Am 9. Tag nach Infektion wurden die GFP-positiven Zellen pro Sichtfeld ausgezählt. Zusätzlich wurde die Anzahl aller sichtbaren Hepatozyten ausgezählt. Um statistische Schwankungen zu vermeiden, wurden pro Ansatz zehn Sichtfelder ausgezählt (Abb. 3.3b).

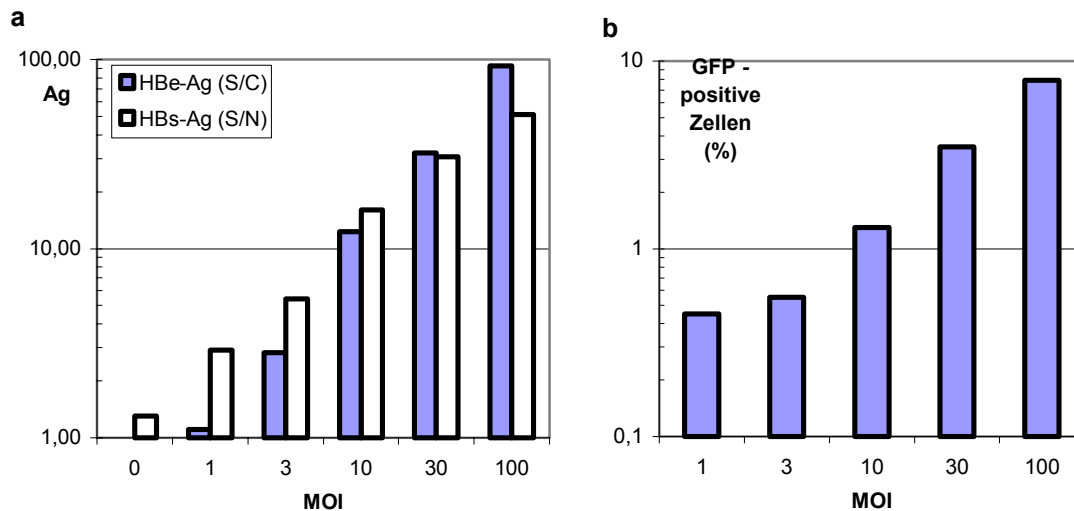


Abb. 3.3: Abhängigkeit der Anzahl infizierter Zellen von der Viruskonzentration während der Infektion. a) PHH infiziert mit unterschiedlichen moi Wildtyp-HBV. HBe-Ag und HBs-Ag wurden am 6. Tag im Überstand der Kultur gemessen. b) PHH infiziert mit unterschiedlichen moi eines GFP exprimierenden HBV-Vektors. GFP-positive Zellen wurden am 9. Tag mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

Eine Verdoppelung der HBV-Konzentration im Inokulum führte zu einer Verdoppelung der Antigenproduktion (Abb. 3.3a). Ebenso hatten Infektionen mit doppelten Mengen GFP exprimierender HBV-Vektoren doppelt so viele GFP exprimierenden PHH zur Folge (Abb. 3.3b). Diese Abhängigkeit blieb über den gesamten untersuchten Bereich bestehen. Das bedeutet, dass wir in unserem System nicht in der Lage waren, die Infektion zu sättigen.

3.1.4. Dauer und Höhe der Genexpression in infizierten PHH

Es sollte untersucht werden, wie lange PHH in Zellkultur überleben und wie konstant die Genexpression ist. Dies ist wichtig, da die Transgenexpression mancher HBV-Vektoren (rHBV-GFP) erst 8 bis 10 Tage nach Infektion nachgewiesen werden kann. Wildtyp-HBV haben den Vorteil, dass infizierte Zellen nach dem 2. Tag nach Infektion HBe-Ag in das Medium sekretieren. Das sekretierte HBe-Ag kann im Überstand quantifiziert werden. PHH wurden am 3. Tag nach Ausplattierung mit einer moi von 1, 10 und 100 VP/Zelle infiziert und die HBe-Ag Produktion jeden zweiten Tag gemessen. Da am 28. Tag nicht gemessen werden konnte, wurde dieser Wert am 27. Tag bestimmt (Abb. 3.4).

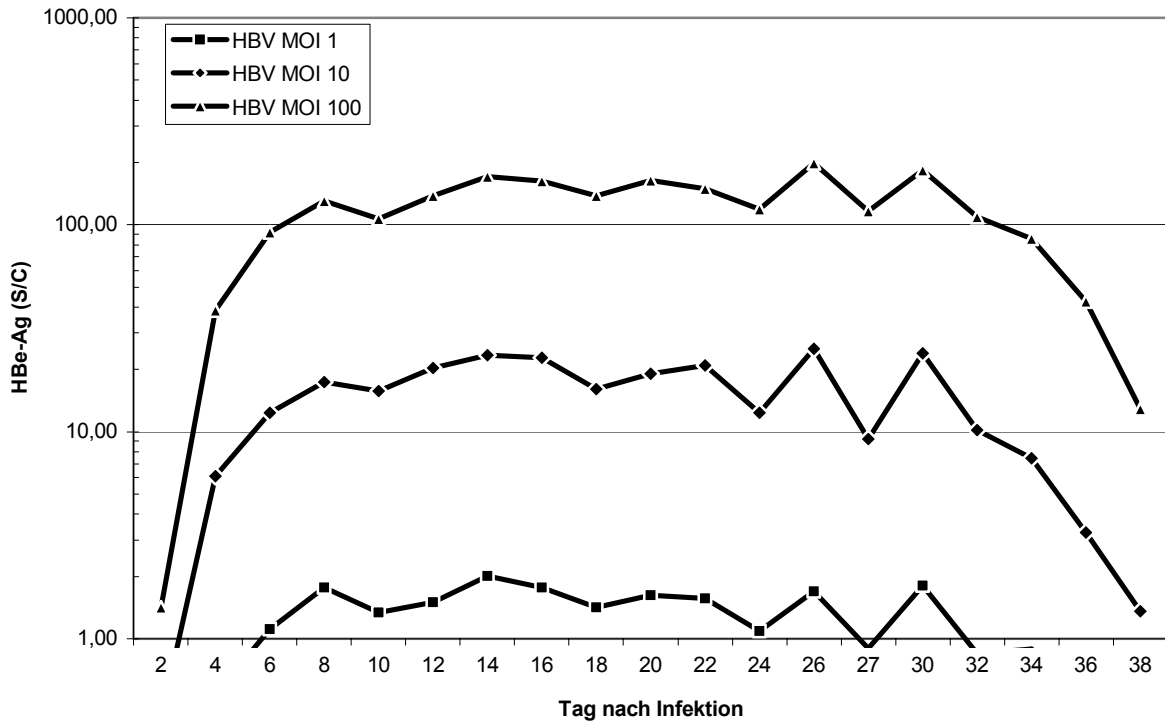


Abb. 3.4: Antigenexpression HBV infizierter PHH im Verlauf der Kulturdauer. PHH wurden mit Wildtyp-HBV in unterschiedlichen moi am 3. Tag nach Ausplattierung infiziert. HBe-Ag wurde jeden zweiten Tag im Überstand gemessen.

Die Ergebnisse zeigten, dass PHH über einen Zeitraum von über 30 Tagen in Zellkultur gehalten werden konnten. Nach einem Anstieg der Antigenproduktion bis zum 8. Tag produzierten die PHH gleichmäßig HBe-Ag. Unterschiede in der Antigenproduktion, die mit unterschiedlichen moi bei der Infektion korrelieren, bleiben über die gesamte Kulturdauer bestehen.

3.1.5. Infektion PHH zu späten Zeitpunkten

Für eine Präparation von PHH aus Leberresektaten ist es notwendig, frisches Material aus der Klinik zu erhalten (siehe 5.2.9). Da sich ausdifferenzierte PHH in Kultur nicht teilen, ist es nicht möglich, sie zu vermehren oder zu expandieren. Deshalb war es wichtig, herauszufinden, über welchen Zeitraum sie mit HBV infizierbar sind. Am 17. und 29. Tag nach Ausplattierung wurden die gleichen Zellen wie in 3.1.4 mit Wildtyp-HBV (moi 40 VP/Zelle) infiziert und HBe-Ag im Überstand gemessen (Abb. 3.5).

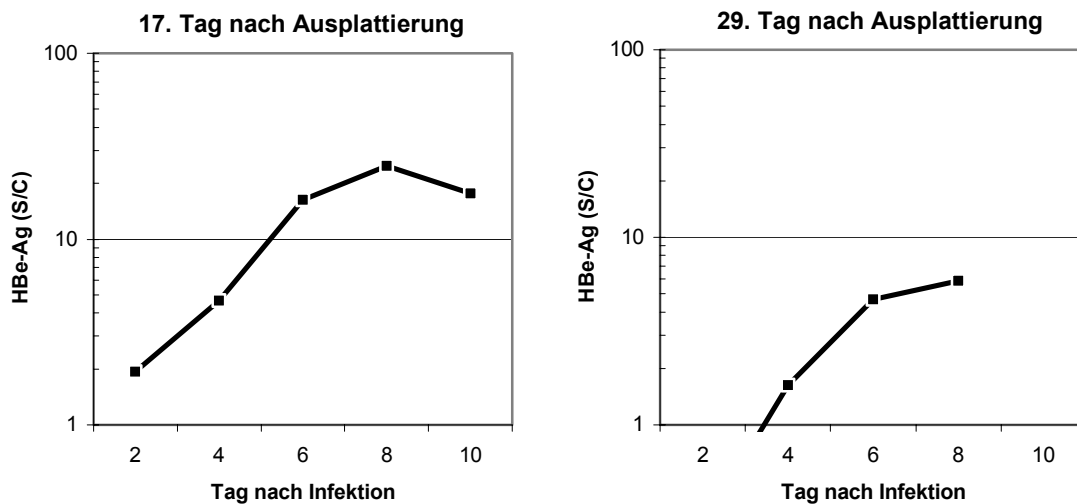


Abb. 3.5: Infektion von PHH zu späten Zeitpunkten. PHH wurden mit Wildtyp-HBV am 17. oder 29. Tag nach Ausplattierung mit einer moi 40 VP/Zelle infiziert. HBe-Ag wurde jeden zweiten Tag im Überstand gemessen.

Auch zu späteren Zeitpunkten, nach 2 bzw. 4 Wochen, war eine Infektion möglich. Die Infektionseffizienz nahm mit der Zeit allerdings ab, was ein niedrigeres HBe-Ag zur Folge hatte (im Vergleich zu Abb. 3.4). Daraus folgt, dass die Infektion am effizientesten in den ersten Tagen nach Ausplattierung der PHH ist. Alle folgenden PHH-Präparationen wurden aus diesem Grund innerhalb der ersten Woche nach Ausplattierung infiziert.

3.1.6. Genexpression der HBV-Vektoren mit GFP oder GFP-NLS als Transgen

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden HBV-Vektoren produziert (siehe Kapitel 2.7), deren Genome Stop-Kodons in allen offenen Leserahmen (ORF) der viralen Proteine tragen (rHBV GFP CPLX⁻; Untergasser, 2001). Als Transgen wurde entweder GFP oder GFP mit einem Kernlokalisierungssignal am C-terminalen Ende (GFP-NLS) benutzt. Mit diesen HBV-Vektoren wurden PHH infiziert. GFP exprimierende Zellen konnten nur bei HBV-Vektoren mit GFP als Transgen beobachtet werden. Im Gegensatz zu dem vergleichbaren Experiment mit DHBV-Vektoren, war bei den HBV-Vektoren mit GFP-NLS als Transgen keine nukleare GFP-Expression detektierbar. Daraus ergab sich die Frage, ob Viren mit GFP-NLS als Transgen nicht infektiös waren oder ob die Infektion der PHH der limitierende Faktor war. Um diese Frage zu beantworten, wurden PHH am 2. Tag nach dem Ausplattieren mit rHBV GFP L⁻ und rHBV GFP-NLS L⁻, infiziert. Bei diesen

Vektoren waren die ORFs für Core, trunkierte Polymerase und X-Protein aktiv. Parallel dazu wurden PHH mit rHBV GFP CPLX⁻ und rHBV GFP-NLS CPLX⁻, bei denen alle viralen ORF ausgeschaltet wurden, infiziert. Alle Infektionen wurden in Anwesenheit von 5% PEG durchgeführt. Am 9. Tag nach Infektion wurden positive Zellen im Fluoreszenzmikroskop photographiert (Abb. 3.6).

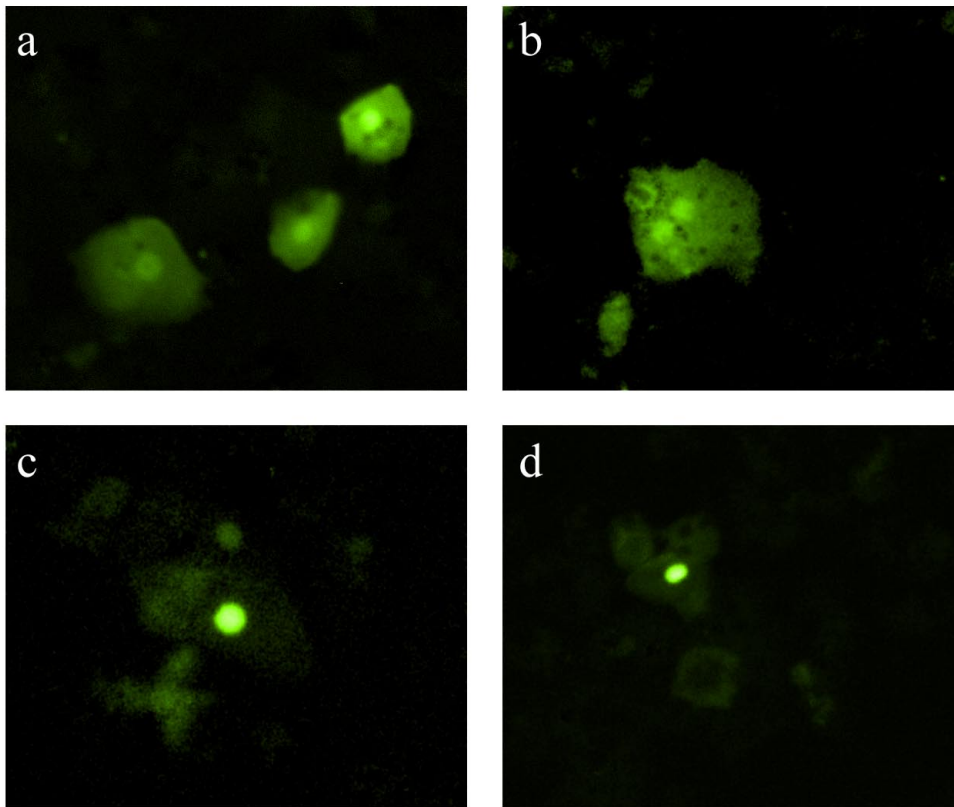


Abb. 3.6: Infektion mit GFP exprimierenden HBV-Vektoren. PHH wurden am 2. Tag nach Plattierung mit (a) rHBV GFP L⁻, (b) rHBV GFP CPLX⁻, (c) rHBV GFP-NLS L⁻ und (d) rHBV GFP-NLS CPLX⁻ infiziert. GFP-Fluoreszenz wurde am 9. Tag nach Infektion photographiert.

Es konnten GFP exprimierende Zellen bei allen vier HBV-Vektoren nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob GFP oder GFP-NLS als Transgen benutzt wurde. GFP-NLS zeigte, wie zu erwarten war, eine deutlich stärkere Akkumulation im Nukleus als GFP ohne NLS.