

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik

Die Erkennung viraler Partikel durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems am Beispiel des HBV und AAV

Mathias Broxtermann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Durner

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H.-W. Mewes
2. Univ.-Prof. Dr. U. Protzer

Die Dissertation wurde am 28.11.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 25.04.2012 angenommen.

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 Hepatitis B Virus (HBV)	3
1.1.1 Epidemiologie des humanen HBV	4
1.1.2 Partikelbau des HBV	4
1.1.3 Hüllproteine	6
1.1.4 Genomorganisation	6
1.1.5 Replikationszyklus	8
1.2 Adeno-Assoziierte Viren (AAV)	10
1.2.1 Partikelbau und Replikationszyklus	10
1.2.2 Gentherapie	13
1.3 Das humane Immunsystem	14
1.3.1 Das angeborene Immunsystem	16
1.3.2 Das adaptive Immunsystem	19
1.4 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems	20
1.4.1 Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR)	20
1.4.2 C-Typ Lektin Rezeptoren (CLR)	24
1.4.3 RIG-I-ähnliche Helikasen (RLR)	27
1.4.4 NOD-ähnliche Rezeptoren (NLR)	29
1.5 Leberanatomie und Zellpopulationen	31
1.6 Zielsetzung der Arbeit	33
2 Material & Methoden	35
2.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	35
2.1.1 Kits	35
2.1.2 Chemikalien & Reagenzien	36

2.1.3 Medien und Medienzusätze	38
2.1.4 Eukaryotische Zelllinien	38
2.1.5 Enzyme	39
2.1.6 Gewichts- und Längenstandards	39
2.1.7 Oligonukleotide	39
2.1.8 Radioisotope	41
2.1.9 Antikörper	41
2.1.10 Verbrauchsmaterial	41
2.1.11 Geräte	42
2.1.12 Software	43
2.1.13 Statistik	43
2.2 Verwendete Lösungen und Puffer	43
2.3 Zellkulturmedien	44
2.4 Zellbiologische Methoden	46
2.4.1 Etablierung von infektiösen HBV Stocks und Negativ-Kontrollen	46
2.4.1.1 Aussäen und Kultivieren von HepG2.215 und HepG2 Zellen	46
2.4.1.2 Konzentration von HBV aus dem Zellkulturmedium	46
2.4.2 Etablierung von rAAV Stocks, leeren AAV Kapsiden und Negativ-Kontrolle	47
2.4.3 Isolation und Kultivierung primärer humaner Zellen	47
2.4.3.1 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	47
2.4.3.2 Leberzell-Mischkulturen	48
2.4.3.3 Hochreine humane Leberzellkulturen	49
2.4.3.4 Primäre humane Leukozyten aus Blut	50
2.4.3.5 Differenzierung von pro-inflammatorischen MΦ aus Monozyten	51
2.4.3.6 THP-1 Zellen	51
2.4.3.7 Kultivierung von HEK-293 und HEK-293/TLR2 Zellen	51
2.4.3.8 Isolation muriner MΦ	52
2.4.4 Infektionsversuche und Aktivitätstests	52
2.4.4.1 HBV-Infektion von PHH und NPC	52

2.4.4.2 Inkubation von Zellen mit HBV	52
2.4.4.3 Infektion mit AAV Partikeln	53
2.4.4.4 Inkubation von Zellen mit Liganden für Mustererkennungsrezeptoren	53
2.4.4.5 Lagerung der abgenommenen Zellkulturmedien	54
2.4.5 Immunfärbung	54
2.4.6 Aufnahme von acetyliertem Low-Density-Lipoprotein	55
2.5 Molekularbiologische Methoden	55
2.5.1 RNA-Isolation aus Zellen	55
2.5.1.1 RNA-Isolation mittels Trizol Reagenz	55
2.5.1.2 RNA-Isolation mittels Peqlab Reagenz	55
2.5.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	56
2.5.1.4 DNA Verdau in RNA Proben	57
2.5.2 cDNA Synthese	57
2.5.3 Quantitative Light Cycler [®] Echtzeit-PCR (qPCR)	57
2.5.4 DNA-Isolation aus HBV Partikeln	60
2.5.5 Agarosegelelektrophorese DNA	61
2.5.6 Dot-Blot Analyse (HBV DNA)	61
2.5.7 Überprüfung der Zellkulturen auf Mykoplasmen mittels PCR	62
2.6 Biochemische Methoden	64
2.6.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay	64
2.6.2 Messung der HBV-Antigensekretion	64
2.6.3 Aufreinigung von HBV Partikeln	64
2.6.3.1 Anreicherung viraler Partikel durch Heparin-Affinitäts-Chromatographie	64
2.6.3.2 Aufreinigung von HBV Partikeln mittels Saccharose Dichtegradienten	65
2.6.4 Titerbestimmung und Charakterisierung der HBV-Stocks	66
3 Ergebnisse	67
3.1 Isolation primärer humaner Leberzellen	67
3.1.1 Isolation und Identifizierung	67
3.1.2 Charakterisierung der TLR in den Zellpopulationen	69

3.2 Erkennung von Viren in Leberzellen	71
3.2.1 Erkennung von HBV	71
3.2.2 Erkennung von AAV	75
3.3 Beteiligung von TLR und CLR an der Erkennung viraler Partikel	76
3.3.1 HBV Virionen und Kapside werden von humanen M Φ erkannt	79
3.3.2 Erkennung viraler Partikel durch TLR	80
3.3.2.1 Die Erkennung von HBV beansprucht die TLR Signalkaskade	80
3.3.2.2 HBV induziert TLR 2 Expression	83
3.3.2.3 HBV-spezifische IL-8 Induktion in HEK293-TLR2	83
3.3.2.4 Die Erkennung von HBV durch KC, LSEC und M Φ ist TLR 2-abhängig	84
3.3.2.5 Die Erkennung von AAV ist TLR 2-abhängig	87
3.3.2.6 TLR 9 ist nicht an der Erkennung von HBV beteiligt	88
3.3.3 Erkennung von HBV durch CLR	90
3.3.3.1 Die Erkennung von HBV erfordert eine Clathrin-abhängige Phagozytose	91
3.3.3.2 Die HBV-Erkennung ist Calcium-abhängig	92
3.3.3.3 Untersuchung der ITAM-Motiv-Rezeptor Signalkaskade	93
3.3.3.4 HBV Erkennung erfordert endosomale Reifung	95
3.3.3.5 Der Mannose Rezeptor und die Erkennung von HBV	96
4 Diskussion	99
4.1 Isolation primärer humaner Leberzellen	99
4.2 Erkennung viraler Partikel durch TLR	103
4.2.1 Erkennung von HBV Partikeln	103
4.2.2 Erkennung von AAV Kapsiden	109
4.3 Erkennung viraler Partikel durch CLR	110
4.4 Zusammenfassung	113
5 Abkürzungen und Abbildungen	115
5.1 Abkürzungen	115

5.2 Abbildungsverzeichnis	119
5.3 Tabellenverzeichnis	120
6 Literaturverzeichnis	121
Danksagung	149

Zusammenfassung

Viren sind wichtige Pathogene, die jährlich Millionen an tödlichen Infektionen verursachen. Das humane Hepatitis B Virus (HBV) ist der Erreger der Hepatitis B. Etwa 40% der Weltbevölkerung waren oder sind infiziert und etwa 350 Millionen leiden an einer chronischen Infektion mit etwa einer Million Toten jährlich. Für eine effektive Immunantwort muss das angeborene Immunsystem das Pathogen über Rezeptoren (PRR) binden, welche typische molekulare Pathogenmuster erkennen, und das adaptive Immunsystem aktivieren. Eine schwache Reaktion des adaptiven Immunsystems wird im Falle von HBV als Hauptgrund für eine persistierende Infektion vermutet. Das angeborene Immunsystem wurde dagegen kaum untersucht.

Neben ihrer Rolle als Pathogene sind modifizierte Viren ideale Vektoren für Gentherapien, da sie genetisches Material hocheffektiv in spezifische Zielzellen übertragen. Im Falle einer Gentherapie mit einem viralen Vektor ist allerdings eine Immunantwort unerwünscht, da sie sich gegen die transduzierten Zellen richten würde. AAV wird als Vektor in Leber-dirigierten Gentherapieansätzen verwendet, jedoch scheiterten Ansätze mit dem Ziel einer langzeitigen Genexpression in der Leber an der Immunantwort.

In dieser Arbeit wurde die Erkennung von HBV und AAV durch das angeborene Immunsystem untersucht. Zu diesem Zweck wurden zunächst verschiedene Leberzellpopulationen aus humanen Leberresektaten isoliert. Mit einem neuen Protokoll wurden primäre humane Hepatozyten (PHH), Kupffer Zellen (KC) und sinusoidale Endothelzellen (LSEC) kultiviert. Die isolierten Zellen wurden durch verschiedene Marker als hochrein identifiziert. Um ihre Rolle in der angeborenen Immunität zu beurteilen wurde ein Profil der am besten erforschten Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, der Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR), angelegt.

Nach Inkubation mit HBV Inokulum sekretierten KC und LSEC pro-inflammatorische Zytokine, PHH erstaunlicherweise jedoch nicht. Desweiteren wurde kein Interferon (IFN)- β sowie IL-1 β im Überstand gemessen. Die induzierten Zytokine liessen vermuten, dass HBV von einem PRR erkannt wird. Eine Erkennung von HBV Nukleinsäuren wurde ausgeschlossen. HBV wurde auch durch primäre humane Makrophagen (M Φ) erkannt, interessanterweise jedoch nicht durch murine M Φ . Eine Inkubation mit aufgereinigten HBV Partikeln ergab, dass nur infektiöse Virionen und Kapside erkannt werden. Versuche mit molekularen Inhibitoren ergaben schliesslich, dass die Erkennung abhängig von der TLR-Signalkaskade ist. Der TLR 2 wurde letztendlich als der Rezeptor identifiziert, der HBV Virionen erkennt. Weitere Experimente ergaben, dass die Erkennung von HBV von einer

Aufnahme der Partikel abhängt. Eine weitere, weniger gut beschriebene Signalkaskade, die von C-Typ Lektin Rezeptoren (CLR) verwendet wird, wurde als essentiell für die HBV-Erkennung identifiziert. Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung des Mannose Rezeptors bei der Erkennung hin.

AAV wurden ebenfalls mit primären humanen Leberzellen inkubiert. AAV induzierten pro-inflammatorische Zytokine nach Inkubation mit KC und LSEC, nicht jedoch mit PHH. Durch Experimente mit inhibitorischen Antikörpern sowie veränderten Zelllinien konnte gezeigt werden, dass leere AAV Kapside durch TLR 2 erkannt werden. Eine Erkennung von AAV Nukleinsäuren war, anders als durch bisherige Arbeiten im Maus-Modell impliziert, nicht essenziell für die Immunantwort.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit neue Interaktionsmöglichkeiten von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems bei der Erkennung von viralen Partikeln beschrieben. Diese Erkenntnisse werfen ein neues Licht auf die Rolle des angeborenen Immunsystems in der Pathogenese von HBV sowie der Gentherapie mit AAV.

1 Einleitung

1.1 Hepatitis B Virus (HBV)

Das humane Hepatitis B Virus (HBV) gehört zur Familie der *Hepadnaviridae*, der hepatotropen Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Viren. Das Virus zeichnet sich durch eine hohe Spezifität bezüglich seines Wirtes und der Wirtszelle aus, in der es repliziert. Die Replikation des Virus *per se* ist nicht zytopathisch, eine fulminante Leberentzündung (Hepatitis) und besonders ein chronischer Verlauf der Krankheit können jedoch zu schwerwiegenden Komplikationen führen [1].

Das auch als Dane-Partikel beschriebene infektiöse Virion infiziert spezifisch Hepatozyten des Menschen sowie humanoider Primaten wie Schimpansen, Orang Utans sowie Gorillas [2-5]. In Waldmurmeltiere wurde das verwandte *Woodchuck* HBV und in Enten das *Duck* HBV beschrieben [6], [7]. Die Erforschung des HBV und der entsprechenden Therapieansätze erfolgt derzeit vor allem an primären humanen Hepatozyten, Zelllinien und dem Modellorganismus Maus.

1.1.1 Epidemiologie des humanen HBV

Das humane HBV wurde 1966 von B.S. Blumberg durch Studien an australischen Ureinwohnern entdeckt und zunächst als Australia-Antigen beschrieben [8]. Die Identifizierung von HBV als infektiöses Agens der Leberentzündung erfolgte wenig später [9]. Inzwischen wurden acht verschiedene Genotypen des HBV identifiziert (A-H), die sich per Definition um mindestens 8% in ihrer Nukleotidsequenz unterscheiden und weltweit regional unterschiedlich verteilt sind [10]. Hepatitis B stellt eine der wichtigsten viralen Infektionskrankheiten weltweit dar, deren chronischer Verlauf zu Folgeerkrankungen wie beispielsweise Leberzirrhose und Leberzellkarzinom führen kann [11].

Die Übertragung erfolgt bereits durch ein geringes Volumen an Blut, da experimentell bereits ein einziger Viruspartikel eine Infektion verursachen kann und die Konzentration an infektiösen viralen Partikeln (VP) 10^9 - 10^{10} VP pro Milliliter (ml) Blut betragen kann [12], [13]. Außer einer Blutübertragung kann HBV auch durch Sexualkontakt übertragen werden. Laut dem Robert-Koch Institut (RKI) liegt die Zahl der an chronischer Hepatitis B erkrankten Menschen weltweit bei bis zu 350 Millionen, von denen 500.000 in Deutschland leben [14]. Bei etwa 40% der Weltbevölkerung lassen sich Antikörper gegen das HBV-Core-Antigen

(Anti-HBc) detektieren, was auf eine durchgestandene oder noch bestehende Infektion schliessen lässt [15]. Die Zahl der durch die chronische Hepatitis B verursachten Todesfälle wird auf eine Million pro Jahr geschätzt [16].

Der Verlauf der Krankheit nach Erstinfektion hängt vom Zustand des Immunsystems ab und variiert entsprechend. Abhängig vom Übertragungsweg und der Dosis an infektiösen Partikeln kann die Inkubationszeit zwischen 45 und 120 Tagen liegen [17]. Die anschließende Hepatitis verläuft bei 50% der betroffenen Erwachsenen asymptomatisch. In 1 % aller akuten HBV Infektionen kommt es zu einer fulminanten Hepatitis mit potentieller Todesfolge [14].

Im Regelfall tritt nach einer akuten Hepatitis eine vollständige Regeneration und eine lebenslange Immunität ein [18]. Eine Entwicklung zur chronischen Hepatitis verläuft abhängig von Immunsystem und Alter: Bei Erwachsenen liegt das Risiko bei 5-10 %, bei Kindern bei 30 % und bei Neugeborenen bei 90 % [19-21].

Patienten mit einer persistierenden HBV Infektion zeichnen sich durch eine aktive virale Replikation über einen Zeitraum von mehr als einem halben Jahr sowie durch die Detektierbarkeit von HBsAg (*Hepatitis B surface antigen*) aus. Eine persistierende HBV Infektion kann periodisch oder langfristig asymptomatisch verlaufen oder sich zu einer chronischen Hepatitis B entwickeln, welche sich durch sowie eine nekro-inflammatorische Leberschädigung auszeichnet [15], [21]. Eine chronische Erkrankung stellt ein schweres, die Lebenserwartung einschränkendes Gesundheitsrisiko dar, mit Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom (HCC) als gravierendste Folgeschäden [1], [17]. Die Leberschädigung wird allerdings nicht durch das Virus selbst, sondern vorwiegend durch die Immunantwort verursacht, insbesondere durch zytotoxische T-Lymphozyten [19], [22].

1.1.2 Partikelbau des HBV

Nach einer Infektion durch HBV werden nicht nur infektiöse Virionen sezerniert, sondern auch sogenannte subvirale Partikel (SVP). Diese unterscheiden sich morphologisch stark von den Dane-Partikeln, weisen jedoch eine ähnliche molekulare Oberflächenstruktur auf.

Die Dane-Partikel werden von einer Lipid-Doppelschicht umschlossen, in der virale Hüllproteine lokalisiert sind. Diese drei Proteine werden als L (*large*)-Protein, M (*middle*)-Protein und S (*small*)-Protein oder auch als *Surface*-Proteine bezeichnet [23]. Der diagnostische Nachweis dieser Proteine als HBsAg dient als wichtiger Marker einer Infektion (siehe 1.1.1) [13].

Die Lipid-Doppelschicht umschließt das ikosaedrische virale Nukleokapsid, welches einen Durchmesser von 25-27 nm hat (Abb. 1) [24]. Das Kapsid setzt sich aus einem Multimer aus

240 Untereinheiten des viralen C (*Core*)-Proteins zusammen, das im immunologischen Kontext als HBcAg bezeichnet wird. Bei einer Infektion sezernieren Wirts-Hepatozyten außerdem das HBe-Protein, das serologisch als HBeAg (*Hepatitis B e antigen*) detektiert wird und als Marker bei infizierten Patienten dient [25]. Das Kapsid umgibt das 3.2 kilo-Basenpaare (kb) große, partiell-doppelsträngige (ds) Genom, an dessen negativen DNA-Strang die virale Polymerase über ein terminales Protein am 5'-Ende kovalent gebunden ist [26].

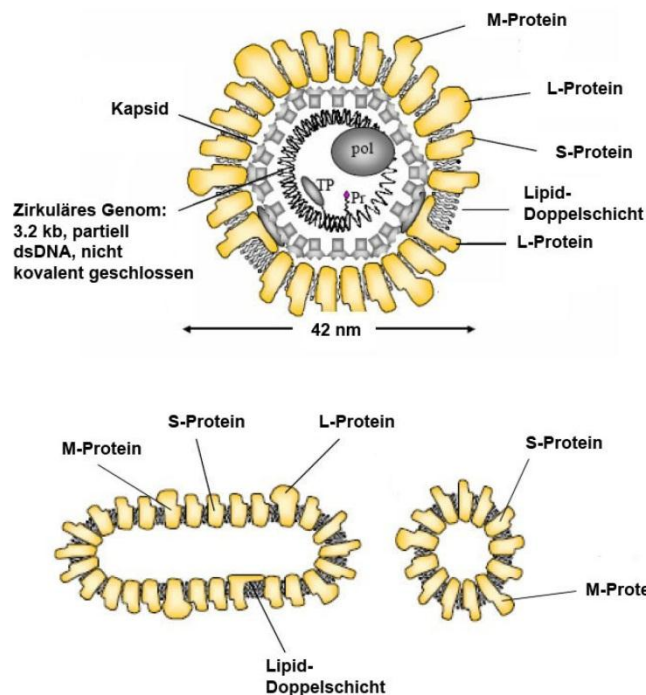


Abbildung 1: Schematische Darstellung der viralen Partikel. Dane-Partikel (oben) haben einen Durchmesser von 40-42 nm, filamentöse (links unten) und sphärische (rechts unten) Partikel einen Durchmesser von 20 nm. Die Länge von filamentösen Partikeln (links unten) kann 200-300 nm betragen. Pol: virale Polymerase; TP: Terminales Protein (Primase-Domäne der viralen Polymerase); Pr: 18 Nukleotide langer Ribonukleinsäure (RNA)-Primer, kovalent an den 5'-Terminus des (+) Stranges gebunden. *Modifiziert nach Weinberger [27].*

Die SVP entstehen ohne enzymatische Aktivität spontan durch Bildung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken der S-Proteine [28]. Die Partikel lassen sich in sphärische Partikel mit einem Durchmesser von etwa 20 nm und filamentöse Partikel mit einer Breite von etwa 20 nm und einer Länge von 200 bis zu 300 nm unterteilen. Die SVP umschließen kein Nukleokapsid oder für die Replikation essentielle Bestandteile des Genoms, sondern sind leere virale Membranpartikel und somit nicht infektiös. Filamentöse Partikel tragen dieselben Oberflächenproteine wie die infektiösen Virionen, sphärische das S- und das M-Protein und nur zu einem minimalen Anteil das L-Protein [11]. Die Verteilung ist Partikelspezifisch:

Dane-Partikel und filamentöse SVP tragen vor allem das L-Protein, SVP das S-Protein (~100 Monomere pro Partikel) auf der Oberfläche [21], [29].

Die viralen Partikel lassen sich in unterschiedlichen Verhältnissen im Serum infizierter Patienten nachweisen. So lassen sich pro ml Blutserum bis zu 10^{13} sphärische Partikel, 10^{10} filamentöse und 10^9 Virionen detektieren [23]. Der Sinn des Überschusses an nicht infektiösen Partikeln ist bislang nicht eindeutig geklärt. Es wird gemutmaßt, dass die nicht infektiösen Partikel die Erkennung der Virionen durch das Immunsystem erschweren [30].

1.1.3 Hüllproteine

Die Hüllproteine in der Lipid-Doppelschicht kommen mit unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen vor. L-, M- und S-Protein sind zum Teil glykosylierte Transmembran-Proteine mit einer hydrophoben Domäne am C-Terminus, welche durch vier α -Helices in die Membran eingelagert ist [31]. Die einzelnen Proteine assemblieren sich durch stabilisierende Disulfidbrücken zu komplexeren Multimeren [21]. Die unglykosylierten Oberflächenproteine werden nach ihrem spezifischen Molekulargewicht unterteilt: 39 kDa (L), 30 kDa (M) und 24 kDa (S).

Das S-Protein hat eine Glykosylierungsstelle am N-Terminus. Diese wird zum Teil (50 %) glykosyliert, wodurch das Protein auch mit einem Molekulargewicht von 27 kDa vorkommt [32]. Zusätzlich zur S-Domäne besitzt das M-Protein noch eine 55 Aminosäuren (AS) lange N-terminale Domäne (PreS2), die an der AS Asn4 eine weitere Glykosylierungsstelle besitzt [33]. Auch diese beiden Stellen werden nur zum Teil modifiziert, so dass insgesamt drei Varianten des M-Proteins auftreten: 30 kDa (unglykosyliert), 33 kDa (einfach glykosyliert) und 36 kDa (zweifach glykosyliert). Das L-Protein entspricht einer weiter verlängerten Variante des M-Proteins, mit der zusätzlichen Domäne PreS1. Durch Glykosylierung der S-Domäne entsteht die zweite Form des L-Proteins mit 42 kDa [34].

1.1.4 Genomorganisation

Das HBV-Genom zählt zu den kleinsten bekannten Virusgenomen und besteht aus einem zirkulären, partiell-ds DNA-Molekül von 3.2 kb Länge, das nicht kovalent geschlossen ist (Abb. 2) [35]. Der kurze positive Strang enthält Sequenzen, die mit den Sequenzen am 3'- und 5'-Terminus des negativen Stranges Basenpaarungen ausbilden, was die Ausbildung der entspannten zirkulären (rcDNA) Konformation erlaubt. Das terminale Protein, über das die virale Polymerase (Pol) an den 5'-Terminus des negativen Strangs gebunden ist, dient bei der reversen Transkription des negativen Stranges als Primer [36]. Im Zellkern der Wirtszelle

wird das Genom von der wirtseigenen Polymerase zur kovalent geschlossenen, zirkulären Form (cccDNA) umgewandelt, die dann als Transkriptionsmatrize dient.

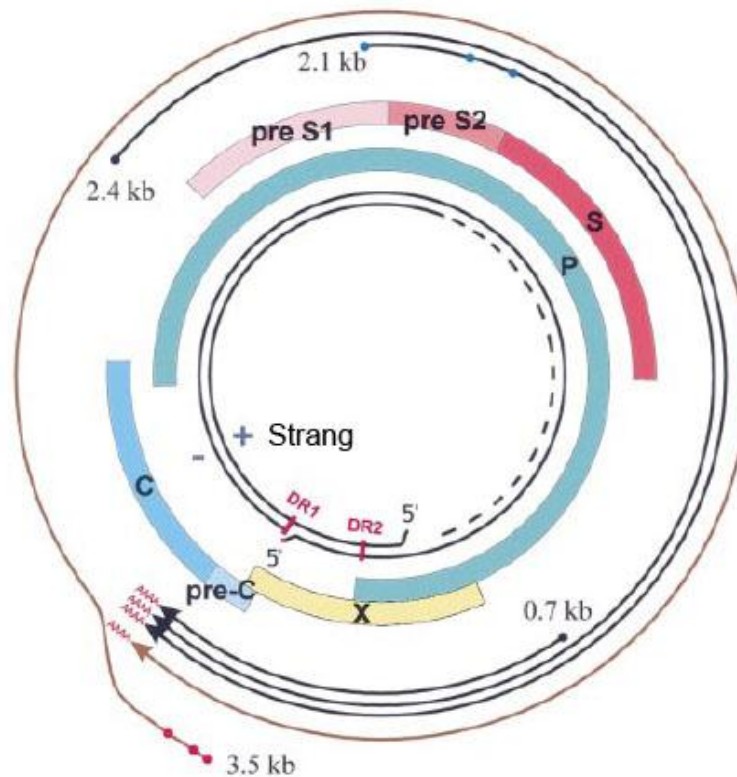


Abbildung 2: Genom des HBV mit den RNA Transkripten und den kodierten Genen. Die prägenomische (3.5 kb) sowie die subgenomischen RNA (2.4, 2.1 und 0.7 kb) sind als Pfeile dargestellt. Die kodierenden Regionen für die sieben viralen Proteine sind farbig hervorgehoben. Detaillierte Erklärung im Text. *Modifiziert nach Kidd-Ljunggren [37].*

Auf dem negativen Strang sind die sieben viralen Proteine in vier offenen, sich teilweise überschneidenden Leserastern (ORF) kodiert (Abb. 2). Die Leseraster sind als preC/C (Nukleokapsid/HBe-Protein), preS1/S2/S (Oberflächenproteine), P (virale Polymerase) und X (X-Protein) beschrieben [24]. Die Transkription der viralen Boten-RNA (mRNA) erfolgt von verschiedenen Promotoren und endet immer mit demselben Poly(A)-Signal: Kapsid-, pre-C-, preS1(L)-, preS2(S)- und X-Promotor [11]. Die Transkription ergibt die prägenomische sowie die pre-C mRNA und die verschiedenen subgenomischen mRNA [38]. Von den mRNA können, ausgehend von alternativen Startkodons, die verschiedenen viralen Proteine translatiert werden. Durch diese sehr komplexe Organisation ist die Größe des Genoms minimiert.

Zwei Enhancerelemente (Enh1/Enh2) steigern die Transkription der mRNA von den vier Promotoren [11], [39]. Zusätzlich wurde ein posttranskriptionales Regulationselement beschrieben, welches die Enh1 Region teilweise überlappt und für die effektive Expression

der HBV Genprodukte von Bedeutung ist, indem es *Slicing*-Prozesse inhibiert und den Transport von HBV Transkripten aus dem Kern in das Zytoplasma einleitet [40]. Desweiteren liegen zwei 11 bp lange, direkt wiederholende Sequenzen, DR1 und DR2 (*direct repeats*; Abb. 2), am 5' Ende des positiven Stranges vor, die für die Strang-spezifische DNA-Synthese bei der Replikation benötigt werden [41].

Die prägenomische mRNA (pgRNA) stellt mit 3.5 kb das längste Transkript dar und umfasst das gesamte HBV-Genom. Von ihr werden die virale Polymerase und das C-Protein translatiert (Abb. 2). Das HBe-Protein wird von der pre-C mRNA und die viralen Oberflächenproteine L, M und S von den beiden subgenomischen mRNA preS1 (2.4 kb) und preS2 (2.1 kb) translatiert. Die Translation erfolgt von drei Startkodons, endet jedoch immer mit demselben Stopkodon. Dementsprechend beinhalten das L- und M-Protein die Sequenz von S, jeweils mit einer N-terminalen Verlängerung: M setzt sich aus der S- und der PreS2-Domäne zusammen, L aus der S-, PreS2- und PreS1-Domäne [21].

Die kleinste subgenomische mRNA kodiert für das 154 AS lange X-Protein, dessen Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Bei Waldmurmeltieren wurde gezeigt, dass X für die Etablierung einer chronischen Infektion benötigt wird [42], [43]. Es wird vermutet, dass X für die spezifische Expression des HBV-Genoms in Hepatozyten eine Rolle spielt, und dass es diese Funktion über Protein-Protein-Wechselwirkungen ausübt [44].

1.1.5 Replikationszyklus

Die Replikation des HBV findet ausschließlich in Hepatozyten statt. Der exakte Mechanismus der Bindung und des Eintritts des Virus in die Wirtszellen ist bislang unbekannt. Eine Interaktion eines viralen Oberflächenproteins, wahrscheinlich des L-Proteins, mit einem nicht bekannten Membranprotein der Hepatozyten wird angenommen [45]. Durch Endozytose oder Membranfusion gelangt das Virion in die Zelle, wo es zur Freigabe des Nukleokapsids in das Zytoplasma kommt (Abb. 3). Ein aktiver Transport des Kapsids zum Nukleus der Hepatozyten durch zelluläre Motorproteine ist möglich, da am C-Terminus des C-Proteins ein Kern-Transportsignal lokalisiert ist [46], [47].

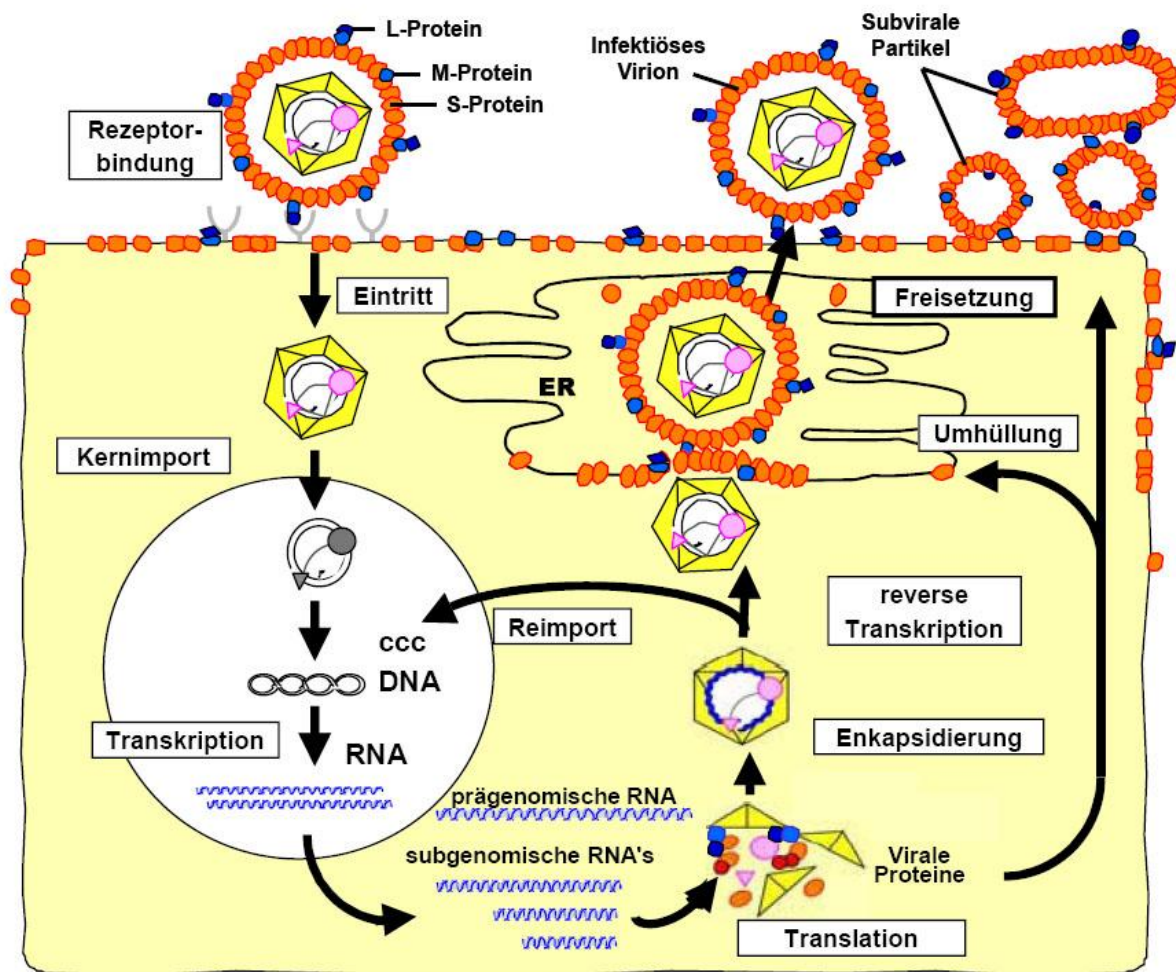


Abbildung 3: Replikationszyklus des Hepatitis B Virus in Hepatozyten. HBV bindet über einen unbekanntes Rezeptor an die Wirtszelle. Nach dem Eintritt wird das virale Nukleokapsid in das Zytoplasma entlassen. Das zyklische, partiell-ds DNA-Genom wird in den Kern importiert, wo es von zelleigenen Mechanismen zur zirkulären cccDNA umgewandelt wird. Die Transkription der viralen Gene ergibt verschiedene RNA-Spezies, die im Zytoplasma bzw. am rauen ER translatiert werden. Die prägenomische RNA wird im Zytoplasma von neu synthetisierten Kapsiden umhüllt, in denen die RNA von der reversen Transkriptasedomäne der viralen Polymerase zur rcDNA umgeschrieben wird. Fertige Kapside können entweder in den Nucleus reimportiert werden oder ins ER eingeschleust werden. Hier erhält das Kapsid die Doppellipidschicht mit den viralen Oberflächenproteinen und verlässt die Zelle auf dem sekretorischen Weg als infektiöses Virion. Gleichzeitig werden SVP an der Plasmamembran sezerniert, die ebenfalls virale Oberflächenproteine tragen. *Modifiziert nach Protzer et al. [48].*

Wie genau das virale Genom in den Zellkern gelangt ist ebenfalls unbekannt [11]. Es wird entweder eine Bindung des Kapsids an die Doppelmembran des Nucleus unter anschließender Einschleusung des DNA-Polymerase-Komplexes oder der Transport des gesamten Kapsids über die Kernporen angenommen. Vermutlich löst sich das Kapsid am Nucleus auf und der DNA-Polymerase-Komplex kann in den Zellkern eintreten [49]. Es wird angenommen, dass die zelleigenen Reparaturenzyme die rcDNA zur kovalent geschlossenen cccDNA

vervollständigen [50]. Hierbei wird der positive Strang verlängert, das am 5'-Terminus des negativen Strangs liegende terminale Protein abgebaut und der Ring vom 5'- zum 3'-Ende geschlossen. Die Reihenfolge der Abläufe sowie die Identität der beteiligten Enzyme ist noch nicht ausreichend erforscht. Die cccDNA liegt nun als „Minichromosom“ im Zellkern vor (Abb. 3). In seltenen Fällen integriert die HBV-DNA in die Wirts-DNA, worin in einer Studie eine Ursache für die Ausbildung eines HCC vermutet wurde [51].

Die cccDNA dient der zelleigenen Polymerase II als Transkriptionsmatrize, um die subgenomischen sowie die prägenomische RNA zu synthetisieren [52]. Die RNA werden ungespleißt in das Zytoplasma transportiert, wo Proteine der Wirtszelle die Translation durchführen. Die Proteinsequenzen der pgRNA (C-Protein, Polymerase und X) werden an freien Ribosomen translatiert. Die viralen Proteine L, M und S sowie das HBe-Protein werden an den Ribosomen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert.

Die Assemblierung der infektiösen Virionen beginnt mit der Bindung der Polymerase an eine Haarnadelstruktur am 5'-Terminus der pgRNA. C-Proteine dimerisieren und leiten durch Anlagerung an die pgRNA die Verpackung des pgRNA-Polymerase-Komplexes ein [53]. Die Synthese des negativen DNA-Stranges erfolgt im Kapsid durch die reverse Transkriptase-Aktivität der Polymerase, der die pgRNA als Matrize dient [54]. Gleichzeitig wird die RNA durch RNaseH Aktivität der Polymerase deletiert [11]. Der negative Strang dient wiederum als Synthesevorlage für den positiven Strang. Die komplementären Sequenzen des positiven Strangs paaren mit den 3'- und 5'-Termini des negativen Strangs. Bevor der positive Strang komplett synthetisiert ist wird somit bereits die Konformation der rcDNA ermöglicht [55].

Die fertigen Kapside können entweder zurück in den Zellkern importiert werden oder den sekretorischen Weg einschlagen. Ein Reimport wird im Anfangsstadium einer Infektion angenommen, um die Zahl der cccDNA-Kopien im Nukleus zu erhöhen, damit die Transkription effektiver verläuft [56]. In infizierten Hepatozyten wurde von 5-50 Kopien der viralen cccDNA berichtet. Beim sekretorischen Weg treten die Kapside in das Lumen des ER ein, wo sie die Lipid-Doppelschicht und virale Oberflächenproteine erhalten [57], [58]. Nachdem sie die Vesikel des Golgi-Apparates durchlaufen haben, werden die infektiösen Virionen von den Hepatozyten sezerniert.

1.2 Adeno-Assoziierte Viren (AAV)

1.2.1 Partikelbau und Replikationszyklus

Adeno-Assoziierte Viren (AAV), auf denen die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Adeno-Assoziierten viralen Vektoren (rAAV) basieren, gehören zu der

Familie der *Parvoviridae*, welche wiederum in die Unterfamilien der Wirbeltiere-infizierenden *Parvovirinae* und der Insekten-infizierenden *Densovirinae* unterteilt werden. *Parvovirinae* unterteilen sich in die Genera der Parvoviren, Amdoviren, Bocaviren, Erythroviren und Dependoviren, von denen AAV zu den letzteren gehören. Wie der Gennamen andeutet ist AAV von der Ko-Infektion eines „Hilfsvirus“, besonders des Adenovirus, abhängig, um eine produktive Infektion zu etablieren [59].

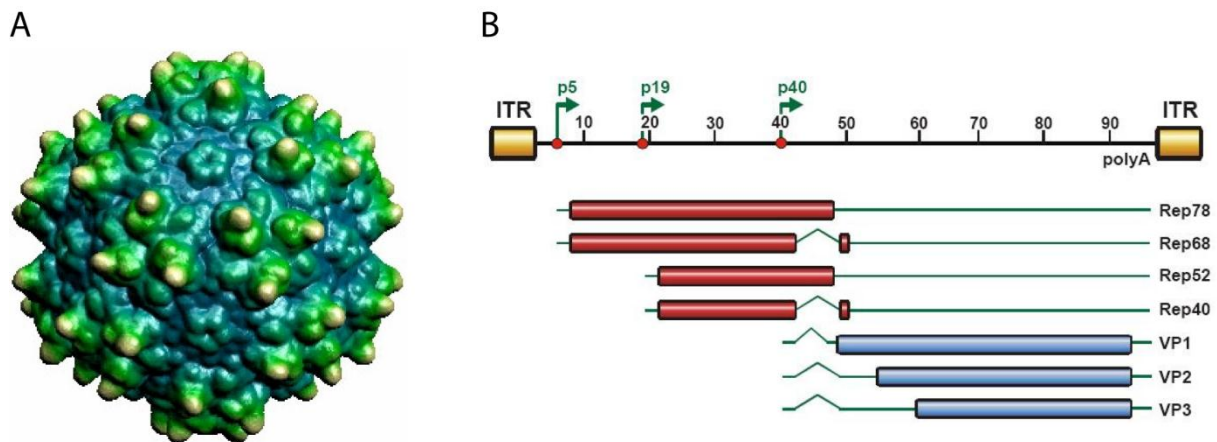


Abbildung 4: Kapsid und Genom des AAV2. A) Das Bild repräsentiert die Oberflächenstruktur des AAV2 Kapsids, von atomaren Koordinaten hergeleitet. Die Farben geben die Tiefe wieder, Gelb steht für einen größeren Radius, während von Grün zu Blau der Radius abnimmt. B) Das AAV Genom besteht aus 4680 Nukleotiden, welche in 100 Einheiten unterteilt sind. Die *inverted terminal repeats* (ITR) flankieren das Genom, drei virale Promotoren liegen an den Einheiten 5, 19 und 40 (p5, p19 und p40), das Polyadenylierungssignal bei Einheit 96. Offene Leseraster sind als Blöcke, nicht übersetzte Regionen als Linien und Introns als Knicke dargestellt. p5 und p19 regulieren die vier Rep Proteine, p40 die Kapsid Proteine VP1, VP2 und VP3. *Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Silke Uhlig* [60].

Bis heute wurden 14 Serotypen und verschiedene Varianten beschrieben, die als Kontaminationen von Adenovirus-Präparationen oder von integrierten proviralen Sequenzen in Nagern, Primaten und humanem Gewebe isoliert wurden [61-71]. AAV Virionen bestehen aus einem ikosaedrischen Kapsid, in dem das einzelsträngige (ss) DNA Genom von etwa 5 kb verpackt ist (Abb. 4). Das Genom besteht aus drei funktionalen Regionen: zwei ORF (*rep* und *cap*) und den invertierten terminalen Wiederholungen (*inverted terminal repeats*, ITR) [72]. Die ITR an den Enden des AAV Genoms dienen als Ursprung der Replikation und sind essentiell für die Integration sowie die folgende Desintegration des AAV Genoms in die Wirts-DNA [73-77]. Das *rep* ORF kodiert eine Gruppe nichtstruktureller Proteine, welche eine Rolle bei der Replikation, Integration, Transkriptionskontrolle und Verpackung der AAV DNA in Kapside spielen [78-82]. Das *cap* ORF kodiert die drei Kapsid Proteine VP1, VP2

und VP3, welche einen identischen C-Terminus besitzen, sich jedoch am N-Terminus unterscheiden, was zu den unterschiedlichen Molekulargewichten von 90 kDa (VP1), 72 kDa (VP2) und 60 kDa (VP3) führt [83], [84]. VP1 ist wichtig für die Infektiosität, VP3 für die Kapsid-Formation, während VP2 scheinbar keinen Zweck in der Reproduktion oder der Kapsid-Formation besitzt [85], [86].

Die detailliertesten Informationen über den Infektionsablauf von AAV sind für AAV2 bekannt. Der primäre Rezeptor für AAV2 ist HSPG (*heparan sulphate proteoglycan*), und vor einer erfolgreichen Internalisierung kommt es meistens zu mehreren Interaktionen mit der Membran [87], [88]. Für AAV8 wurde die Bindung an den Laminin Rezeptor (LamR) belegt [89]. AAV2 bindet den primären Rezeptor HSPG, benötigt jedoch die Ko-Rezeptoren FGFR-1 (*fibroblast growth factor receptor 1*), HGFR (*hepatocyte growth factor receptor*) und LamR für einen zweiten Schritt des Aufnahmemechanismus [59], [90]. Integrine ($\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$) vermitteln die Endozytose des Virus und eine Bindung führt letztendlich zu einer Clathrin-abhängigen Internalisierung und der gezielten Bewegung des Kapsids zum Nukleus [91-96]. AAV wird in der Zelle in endosomalen Kompartimenten unter Beteiligung von Mikrofilamenten und Mikrotubuli transportiert [88], [91], [97-101].

Zeitpunkt und Mechanismus der Ausschleusung von AAV aus den endosomalen Vesikeln ist immer noch umstritten, verschiedene Studien belegen die Freisetzung aus frühen Endosomen, späten Endosomen und perinuklearen, rezyklierenden Endosomen [97], [99-101]. Es wird angenommen dass eine Ansäuerung der Endosomen eine Konformationsänderung des viralen Kapsids einleitet, wodurch vorher verdeckte Regionen exponiert werden und der Austritt aus dem Endosom sowie den Eintritt in den Nukleus eingeleitet werden [102]. Der N-Terminus des VP1 ist unter Parvoviren konserviert, und enthält eine Phospholipase A₂ (PLA₂) homologe Domäne, welche während des Prozesses exponiert wird [103], [104]. Die katalytische Funktion von PLA₂ wird im Falle der Parvoviren für den Austritt aus dem Endosom durch lipolytische Porenbildung verantwortlich gemacht [104-106].

AAV Kapside akkumulieren am Nukleus bereits 15-30 Minuten *post infection* (p.i.), wobei der Großteil dieser Partikel intakte Virionen mit eingeschlossenem Genom sind [86]. Ob das Kapsid oder nur das Genom in den Nukleus eingeschleust wird bleibt kontrovers diskutiert. In Studien, in denen mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 5 Viren pro Zelle virale Genome im Nukleus detektiert wurden, fanden sich Kapside nur ausserhalb des Nukleus, woraus die Autoren schlossen, dass ein Eintritt des Kapsids nur selten vorkommt [86].

Umstritten ist ausserdem ob der Eintritt des Kapsids bzw. des Genoms in Abhängigkeit des Kern-Poren-Komplexes geschieht [102], [107], [108].

Im Nukleus wird das ss Genom in Abhängigkeit von adenoviralen Genen in die transkriptionskompetente dsDNA Form umgewandelt [109], [110]. Der Eintritt in einen lytischen oder latenten Lebenszyklus hängt von der Anwesenheit/Abwesenheit eines Hilfs-Virus ab. Ohne einen Hilfs-Virus geht AAV zum latenten Zyklus über und integriert an einem als AAVS1 bekannten Lokus auf Chromosom 19 [111], [112]. In der Anwesenheit eines Hilfs-Virus werden Expression und Replikation sofort initiiert. Als integrierter Provirus kann dies durch Infektion mit einem Hilfs-Virus wieder induziert werden [113].

1.2.2 Gentherapie

Der Begriff Gentherapie beschreibt die Verwendung genetischen Materials, um die Zellen eines Patienten zwecks der Behandlung einer Krankheit, erworben oder angeboren, zu verändern. Das genetische Material benötigt Träger, welche in nicht-virale und virale Vektoren unterteilt werden können. Viren eignen sich ideal als Vektoren, da sie molekulare Mechanismen entwickelt haben, welche ihr Genom effektiv in spezifische Wirtszellen transportieren. In der Gentherapie spielen Adenoviren, AAV und Retro-/Lentiviren eine Rolle, die unterschiedliche Wege zur Infektion einer Wirtszelle entwickelt haben [114] (Abb. 5).

Der Adenovirus ist ein nicht-umhüllter, dsDNA-Virus in Form eines ikosaedrischen Kapsids, welches aus Hexon-, Fiber- und Penton-Untereinheiten besteht [115]. Adenovirus Serotyp 5 wird regelmäßig als Vektor verwendet, sein primärer Rezeptor ist CAR (*coxsackie and adenovirus receptor*), der über den sogenannten Fiberknauf gebunden wird, gefolgt durch eine Interaktion der Pentonbasis mit Integrinen [116], [117].

AAV ist ebenfalls ein nicht-umhüllter Virus, jedoch mit einem ssDNA-Genom. Das ikosaedrische Kapsid besteht aus 60 Monomeren der Proteine VP1, VP2 und VP3 [83]. Wie beschrieben bindet AAV2 den primären Rezeptor HSPG, was durch Bindung an Ko-Rezeptoren wie FGFR und HGFR verstärkt wird [59], [87]. Die Bindung von Integrinen führt zur Clathrin-abhängigen Endozytose.

Retro-/Lentiviren sind umhüllte Viren mit einem diploiden, ss, positiv-strängigen (+) RNA Genom [114]. Das virale Genom wird vom Nukleokapsid und einer Lipiddoppelschicht, dem viralen *Envelope*, umhüllt. Letzterer trägt virale Glykoproteine, die bei der Rezeptorbindung und Membranfusion eine essentielle Rolle spielen [116]. Eine

Membranfusion zwischen viraler Membran und der Membran der Wirtszelle, vermittelt von den Glykoproteinen, stellt den ersten Schritt einer Infektion dar [118].

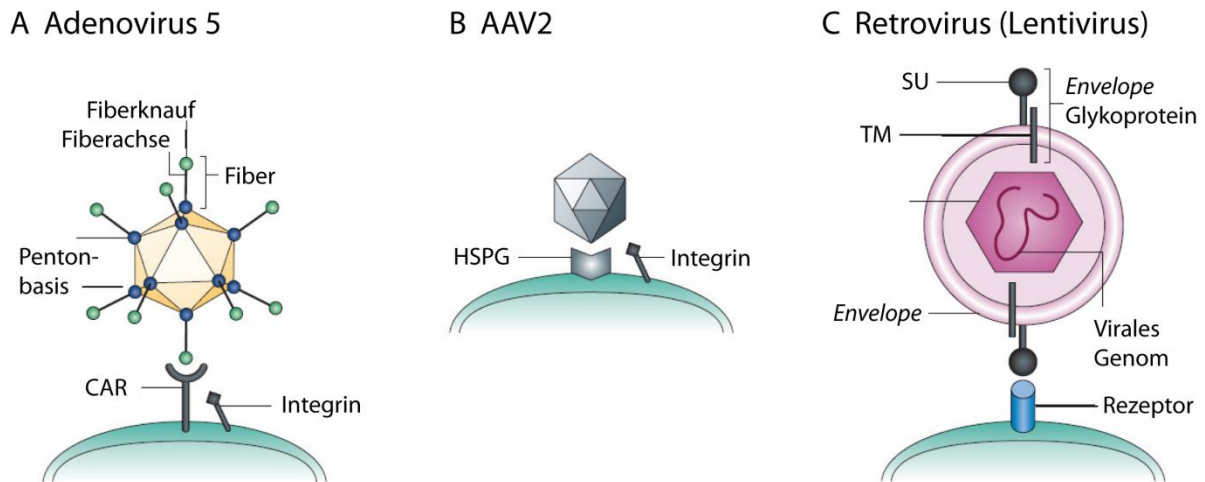


Abbildung 5: Virale Vektoren und ihre Eintrittsmechanismen. A) Adenovirus Serotyp 5 bindet seinen Rezeptor CAR (*coxsackie and adenovirus receptor*) über seinen Fiberknäuf. Eine Interaktion von Integrinen mit der Pentonbasis ermöglicht den Eintritt in die Wirtszelle durch Endozytose. B) Verschiedene Reste des AAV2 Kapsids binden den primären Rezeptor HSPG und andere Ko-Rezeptoren, wie z.B. Integrine. Die Aufnahme erfolgt über Endozytose. C) Umhüllte (*enveloped*) Viren fusionieren ihre Membran in der Regel mit der Membran der Wirtszelle. Nach einer nicht-spezifischen Adhäsion binden virale Glykoproteine spezifisch an ihren Rezeptor. Der Fusionsmechanismus variiert, resultiert jedoch immer in der Fusion der Membranen und der Freisetzung des Kapsids in das Zytoplasma. SU, *surface subunit*; TM, *transmembrane subunit*. *Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Silke Uhlig [60].*

1.3 Das humane Immunsystem

Jeder Organismus steht im permanenten Kontakt zu seiner Umgebung und anderen Lebewesen. Pathogene wie Parasiten, Pilze, Bakterien oder Viren stellen eine ständige Gefährdung dar, da diese ihren Fortbestand oft, oder im Fall der Viren obligatorisch, auf Kosten anderer Organismen sichern. Aus diesem Grunde haben Organismen spezialisierte, zelluläre Systeme entwickelt, um Pathogene zu bekämpfen.

Das Immunsystem der Säugetiere lässt sich in zwei Bereiche unterteilen: das unspezifische oder angeborene und das spezifische oder adaptive Immunsystem. Das angeborene System erkennt molekulare Muster, die für Pathogene charakteristisch sind (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP), mittels sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR). Das adaptive System zeichnet sich durch eine langsamere, aber hochspezifische Erkennung von Pathogenen durch Rezeptoren aus, welche durch genetische Rekombination ihre Spezifität erlangen [119], [120].

Leukozyten, weiße Blutkörperchen, sind die Effektorzellen beider Systeme. Sie stammen, wie Erythrozyten und Thrombozyten, von den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab (Abb. 6). Von diesen gehen zwei Zelllinien aus, die myeloide und die lymphoide Linie. Aus den lymphoiden Vorgängern gehen B- und T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen (NK) sowie die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) hervor. Aus der myeloiden Linie gehen die Vorgänger der roten Blutzellen sowie die Neutrophilen, Basophilen, Eosinophilen und Monozyten hervor. Aus den Monozyten entwickeln sich die myeloiden dendritischen Zellen (mDC) sowie die Makrophagen (MΦ) [120].

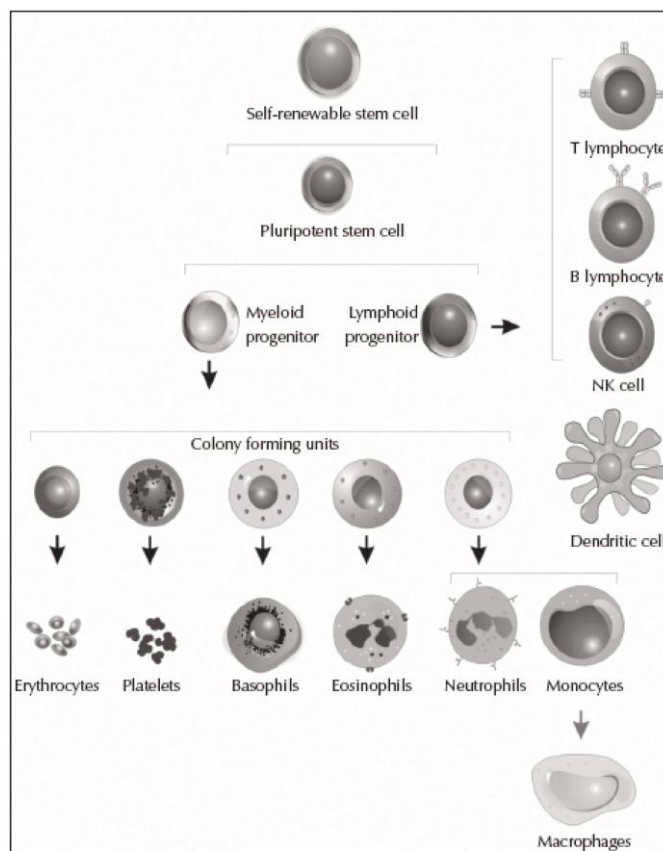


Abbildung 6: Ursprung der verschiedenen Zelllinien des Immunsystems. Aus gemeinsamen, pluripotenten Vorgängern des Knochenmarks gehen zwei Zelllinien des Immunsystems hervor: Die lymphoide Linie, aus der die T- und B-Lymphozyten sowie die NK Zellen hervorgehen (rechts), sowie die myeloide Linie, Ursprung der Basophilen, Eosinophilen, Neutrophilen sowie Monozyten (unten). Die DC (rechts) gehören entweder der lymphoiden (pDC) oder myeloiden (mDC) Linie an. *Modifiziert nach Crivinel et al. [121].*

Dendritische Zellen (DC) und MΦ stellen einen wichtigen Bestandteil des angeborenen Systems dar, da sie als Antigen präsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APC) die Informationen über ein abgefangenes Pathogen weiterleiten. Mittels PRR werden Pathogene erkannt, phagozytiert und deren Strukturproteine in Form von Peptiden als Antigene auf ihren

Haupthistokompatibilitätskomplexen (*Major Histocompatibility Complex*, MHC)-Klasse II präsentieren. T-Helfer Lymphozyten des adaptiven Systems erkennen receptorspezifisch die gebundenen Peptide auf den MHC Klasse II und aktivieren wiederum B- und T-Lymphozyten.

B- und T-Lymphozyten exprimieren hochspezifische Rezeptoren. Die variable Region, durch welche die Antigenerkennung vermittelt wird, wird durch somatische Rekombination zusammengestellt, wodurch jede Zelle nur einen Rezeptor exprimiert. Dadurch sind diese Zellen in der Lage, theoretisch für jedes erdenkliche Antigen einen Rezeptor zu generieren, da bis zu 10^{18} mögliche Rezeptorkombinationen angenommen werden [120]. Diese Rezeptoren werden im Falle der B-Lymphozyten, bei denen sie zur Superfamilie der Immunglobuline (Ig) gehören, B-Zell-Rezeptoren bzw. in sezernierter Form Antikörper (AK) und bei T-Lymphozyten T-Zell-Rezeptoren genannt.

1.3.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem der Säugetiere lässt sich in zwei Komponenten unterteilen: die zellulären Abwehrmechanismen in Form von hochspezialisierten Zellen, welche Pathogene erkennen, und eine lösliche Komponente, das sogenannte Komplementsystem.

Monozyten machen 3-8% der zirkulierenden Leukozyten aus und differenzieren im Gewebe zu mDC und MΦ [121]. Monozyten und MΦ phagozytieren effektiv Pathogene und Zellreste, und gewebständige MΦ können für Monate und Jahre als Wächter im Gewebe verbleiben. MΦ präsentieren prozessierte Antigene über ihre MHC und stimulieren so eine Immunantwort durch zytotoxische T-Lymphozyten [119]. Pathogene werden durch eine Bandbreite von exprimierten PRR erkannt und phagozytiert, deren Verteilung abhängig von der Differenzierung variieren kann [122-124]. MΦ lassen sich in zwei Subpopulationen unterteilen: Pro-inflammatorische (klassisch aktivierte) MΦ (M1) und anti-inflammatorische (alternativ aktivierte) MΦ (M2) [125], [126]. M1 MΦ besitzen mikrobizide und antitumorale Aktivität, sezernieren effektiv pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1β, IL-6, IL-12 und Tumornekrosefaktor (TNF)-α, und präsentieren Antigene [127], [128]. Sie zeichnen sich weiterhin durch ein schwächeres Phagozytosepotenzial, reduzierte Expression des Mannose Rezeptors (siehe 1.4.2) sowie eine minimale Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 aus [129], [130]. Sie werden durch Interferon (IFN)-γ allein oder zusätzlich durch Pathogenerkennung (Lipopolysaccharid, LPS) oder Zytokine induziert [126], [128]. Anti-inflammatorische M2 MΦ lassen sich weniger genau klassifizieren und werden in bis zu drei Subpopulationen unterteilt [127], [131]. Trotz dieser

hohen Plastizität werden M2 MΦ im Gegensatz zu M1 MΦ durch eine höhere Produktion von IL-10 und eine schwache Produktion von IL-12 charakterisiert [131]. Sie haben eine schwächere mikrobizide Aktivität, sekretieren weniger pro-inflammatorische Zytokine und exprimieren nur geringe Mengen des ko-stimulatorischen Moleküls CD86 [132], [133]. M2 wird somit eher eine Rolle als regulatorische MΦ zugesprochen, die sowohl bei der Gewebereparatur und bei der Entzündungskontrolle, aber auch in der Tumorprogression eine Rolle spielen [127], [128]. Die Differenzierung zu M2 MΦ wird durch IL-4, IL-13 oder MΦ-Koloniestimulierende Faktoren (*macrophage colony stimulating factors*, M-CSF) induziert [126], [127].

DC sind darauf spezialisiert, Antigene abzufangen und Lymphozyten zu präsentieren. DC sind in peripheren Geweben, etwa Haut, Leber und Darm, anwesend, wo sie Pathogene abfangen und aktiviert werden. DC erreichen als erste Zellen einen Infektionsherd, sogar noch vor den Neutrophilen. Aktivierte, nun gereifte DC migrieren zu nahen Lymphknoten, wo die nun prozessierten Antigene über MHC Moleküle T-Lymphozyten präsentiert werden [121]. DC können Antigene über längere Zeiträume in lymphatischen Organen präsentieren, worin ein Beitrag zum immunologischen Gedächtnis vermutet wird [134]. DC verfügen, vergleichbar mit MΦ, über eine Vielzahl an PRR [135]. Zwei Subpopulationen von DC differenzieren von einem gemeinsamen Vorgänger: myeloide DC (mDC) und plasmazytoide DC (pDC). Unter den mDC befinden sich die gewebsständigen DC, wie die Langerhanszellen der Haut, während pDC vor allem im peripheren Blut vorkommen. pDC verfügen über Rezeptoren, welche RNA und DNA erkennen, und sekretieren bei einer viralen Infektion große Mengen Typ I IFN (IFN- α/β). mDC exprimieren vor allem Oberflächenrezeptoren, die PAMP wie Peptidoglycane oder LPS erkennen [136].

Neutrophile sind die am häufigsten vorkommenden Leukozyten im peripheren Blut, zwischen 40 bis 70% der Leukozyten unter normalen Bedingungen, und spielen eine wichtige Rolle in der frühen Entzündungsreaktion [137]. Sie sind unter den ersten Zellen, die angelockt durch chemotaktische Moleküle wie IL-8 vom Blutstrom in das Gewebe einwandern. Neutrophile werden durch bakterielle Produkte, opsonierte Antigene, Komplementproteine und Immunkomplexe aktiviert, wodurch ihre Phagozytose-Kapazität erhöht wird [121]. Nach Aktivierung sekretieren sie verschiedene Mediatoren aus ihren Kompartimenten, die das Immunsystem am Entzündungsherd unterstützen.

NK stammen von einem gemeinsamen Vorgänger der T-Lymphozyten ab und machen 5 bis 20% der Blutleukozyten aus. Sie sind ein wichtiger Bestandteil der nicht-spezifischen Verteidigung, da sie sowohl durch Viren und Bakterien infizierte als auch Tumorzellen

erkennen und lysieren. NK rekrutieren darüber hinaus Neutrophile und M Φ und aktivieren DC und Lymphozyten. Die Expansion und Aktivierung von NK wird wiederum durch IL-12 und IL-15 von M Φ induziert, wodurch NK effektiver pro-inflammatorische Zytokine sekretieren und Zielzellen lysieren [138]. Die Zelllyse erfolgt durch die Enzyme Perforin, das Poren in der Membran der Zielzelle erzeugt, und Granzym, welches in die Zielzellen eindringt und eine Apoptose einleitet. NK verfügen über inhibitorische und aktivierende Rezeptoren, deren Signalkaskaden über die Aktivierung der NK entscheiden. Inhibitorische Rezeptoren erkennen MHC Klasse I auf Zielzellen, wodurch das inhibitorische Signal normalerweise überwiegt. Infizierte Zellen, besonders durch Viren, und Tumorzellen haben eine geringe Expression von MHC Klasse I und werden so zum Ziel der NK [139].

Basophile und Eosinophile entstehen und reifen im Knochenmark. Basophile machen weniger als 1% der peripheren Leukozyten aus und sind dringen normalerweise nicht in das Gewebe ein, können aber mit Eosinophilen an einen Infektionsherd rekrutiert werden. Sie sekretieren wichtige Mediatoren und Zytokine, wie TNF- α und GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), welche Neutrophile und M Φ anlocken und die Gefäße permeabel machen [140]. Eosinophile spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von parasitären Infektionen. Sie sind oft in Schleimhäuten lokalisiert und werden mit allergischen Reaktionen und Asthma in Verbindung gebracht [119]. Sie werden durch Chemotaxis an Infektionsherde rekrutiert und bekämpfen parasitäre Infektionen durch zytotoxische Aktivität in Abhängigkeit von AK (IgE) [140].

Eingedrungene Pathogene treffen im Körper auch auf lösliche Komponenten des Immunsystems, die Proteine des Komplementsystems, C-reaktive Proteine und andere [121]. Das Komplementsystem besteht aus mehr als 20 Glykoproteinen im Blutplasma, die in der Leber und durch M Φ produziert werden. Jedes Protein erlangt nach Aktivierung proteolytische Aktivität und aktiviert die nächsten Elemente der Kaskade, die immer in der Formierung des Membran-Angriffskomplexes (*membrane attack complex*, MAC) mündet. Der MAC induziert die osmotische Lyse der Zielzelle, in der Regel eines Bakteriums [119], [120]. Es gibt drei Kaskaden der Komplement-Aktivierung: Die klassische, die alternative, und die über Mannan-bindendes Lektin (MBL) induzierte. Die MBL Kaskade beginnt mit der Bindung von MBL an Mannosestrukturen auf der Oberfläche von Mikroorganismen und mündet in der beschriebenen Bildung des MAC. Die klassische Kaskade gleicht der MBL Kaskade, beginnt jedoch mit der Bindung von C1q Komponenten an zwei Moleküle IgG oder ein Molekül IgM auf einem Antigen (Immunkomplex), weshalb sie mit der humoralen Immunantwort assoziiert wird [141]. Die alternative Kaskade beginnt mit dem spontanen

Bruch der C3 Komponente in die C3a und C3b Fragmente, von denen C3b nun eine kovalente Bindung mit der Oberfläche von Mikroorganismen eingehen kann. Gebundenes C3b führt zur Formation der C5 Konvertase, einem gemeinsamen Schritt aller Kaskaden, von wo an sich die Kaskaden wieder gleichen [120], [121].

1.3.2 Das adaptive Immunsystem

Säugetiere und einige Wirbeltiere haben im Laufe der Evolution das adaptive Immunsystem entwickelt, welches in Kraft tritt wenn das angeborene Immunsystem die Verbreitung der Pathogene nicht mehr kontrollieren kann. Das adaptive Immunsystem ist zum Schutz des Organismus auf eine Interaktion mit dem angeborenen Immunsystem angewiesen [137], [140].

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch eine hochspezifische Antigenerkennung aus. Nach einer Erkennung benötigen die beteiligten Lymphozyten einige Tage, um durch klonale Expansion zu proliferieren, damit eine effektive Eliminierung des Pathogens erfolgen kann. Das adaptive Immunsystem ist zusätzlich in der Lage, für bereits erkannte Antigene eine Art zelluläres Gedächtnis zu entwickeln und bei einem erneuten Kontakt mit demselben Erreger schnell eine effektive Sekundärantwort einzuleiten [119], [120].

Die adaptive Immunantwort lässt sich in die zelluläre und die humorale Abwehr unterteilen. T-Lymphozyten sind die wichtigste Komponente der zellulären Immunantwort. Sie reifen im Thymus, woher auch der Name stammt, und werden dort auf Reaktivität mit körpereigenen Antigenen getestet. T-Lymphozyten lassen sich in zwei Klassen unterteilen: zytotoxische, CD8⁺ (*cluster of differentiation*) T-Lymphozyten (CTL) und CD4⁺ T-Helferzellen (T_H). CTL erkennen Antigene auf den MHC Klasse I infizierter Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor und eliminieren diese Zellen durch induzierte Apoptose. CTL können weiterhin über die sogenannte *cross*-Präsentation durch APC aktiviert werden, welche phagozytierte Antigene über einen unbekanntes Mechanismus auf ihren MHC Klasse I präsentieren. Die T_H erkennen durch APC auf MHC Klasse II präsentierte Antigene, und spielen eine regulatorische Rolle bei der Etablierung einer zellulären und humoralen Immunantwort, sowie der immunologischen Gedächtnisinitiierung und -entwicklung [119], [120], [140].

Die humorale Immunantwort in Form löslicher AK wird von den B-Zellen ausgeübt. Diese erkennen gelöste oder präsentierte Epitope über ihren B-Zell-Rezeptor, der durch membranständige IgM und IgD gebildet wird. Nach Aktivierung sezernieren diese ausdifferenzierten Plasmazellen AK der unterschiedlichen Isotypen IgM, IgG und auch IgA

mit derselben Spezifität. Diese leiten bei Antigenbindung eine Opsonierung, und somit eine Phagozytose durch APC, und eine Aktivierung des Komplementsystems ein. IgG produzierende Zellen werden als Gedächtniszellen ein wichtiger Bestandteil des immunologischen Gedächtnisses [120].

1.4 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

Vier Familien von Rezeptoren, die PAMP erkennen, wurden als wichtige Komponenten des angeborenen Immunsystems identifiziert: Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR), C-Typ Lektin Rezeptoren (CLR), RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*)-ähnliche Rezeptoren (RLR) und die zytosolischen NOD (*nucleotide binding and oligomerisation domain*)-ähnliche Rezeptoren (NLR) [142]. All diese Rezeptorklassen haben das Potenzial, nach Rezeptorbindung die Genexpression zu regulieren und auf erkannte Pathogene durch Sekretion spezifischer Zytokine zu reagieren.

1.4.1 Toll-ähnliche Rezeptoren

Das erste bekannte Mitglied der Toll-Rezeptorfamilie wurde als Typ I Transmembranprotein in *Drosophila melanogaster* beschrieben, welches die dorso-ventrale Entwicklung der Embryonen kontrolliert [143], [144]. Homologien mit der NF- κ B Signalkaskade bei Säugetieren, die hier eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielt, führten schließlich zur Entdeckung einer Rolle von Toll im Immunsystem von *Drosophila*. Für *Drosophila* wurden inzwischen acht Mitglieder der Toll Rezeptor-Familie beschrieben [145].

Für Säugetiere wurde eine eigene, homologe Familie von TLR beschrieben. Seit der Erstbeschreibung eines Säugetier-Homologs für Toll, welches als TLR 4 bekannt ist, wurden insgesamt 11 TLR beschrieben [146], [147].

Die TLR treten als Homo- und Heterodimere (TLR 1/2 und TLR 2/6) auf. Sie sind durch eine Transmembrandomäne in der Lipidmembran verankert, und zeichnen sich durch eine Leucin-reiche (*leucine-rich repeat*, LRR) Domäne am N-Terminus aus, die extrazellulär an Liganden bindet. Die C-terminale Domäne ragt in das Zytoplasma und vermittelt die Signaltransduktion bei Rezeptorbindung. Die intrazelluläre Domäne ist der signaltransduzierenden Domäne des Interleukin-1 Rezeptors sehr homolog, was zu der Bezeichnung TIR-Domäne (Toll/IL-1R) führte [148].

Die extrazelluläre Domäne der TLR, welche die Rezeptorbindung und Spezifität vermittelt, besteht aus mehreren LRR. Diese LRR Domänen wiederum bestehen aus 19-25 LRR

Motiven, die zwischen 24-29 AS lang sind [149]. Üblich sind das Motiv XLXXLXLXX, sowie andere AS-Reste (XØXXØXXXXFXXLX; Ø = hydrophobe Reste). Interessanterweise ermöglichen diese sehr homologen Sequenzen der verschiedenen TLR eine große Bandbreite an Ligandspezifitäten [147].

TLR werden aufgrund der erkannten PAMP klassifiziert. So erkennen TLR 1, 2 und 6 Proteinkomplexe, während TLR 3, 7, 8 und 9 Nukleinsäuren erkennen. Die Nukleinsäuren-erkennenden TLR sind im endosomalen Kompartiment lokalisiert und ragen mit ihrer extrazellulären Domäne in das Endosomenlumen, während die übrigen TLR an der Zelloberfläche lokalisiert sind. TLR 3 bildet hier eine Ausnahme, da er, abhängig vom Zelltyp, sowohl endosomal als auch in der Plasmamembran lokalisiert sein kann [150].

In Folgenden ist die Spezifität der einzelnen TLR aufgeführt:

TLR 1/2 und TLR 2/6: Diese Heterodimere erkennen eine Vielfalt an PAMP von gram-positiven Bakterien, Mycobakterien sowie Pilzen. Di- und tri-acetylierte Lipoproteine werden von den Heterodimeren differenziert detektiert [151], [152]. Auch Zymosan aus Hefe wird vom TLR2/6 Komplex erkannt, sodass die Rezeptoren ein relativ breites Ligandenspektrum besitzen.

TLR 3: Dieser TLR erkennt dsRNA, die für mehrzellige Eukaryoten relativ ungewöhnlich ist, jedoch bei der Replikation vieler Virusarten vorkommt. Über TLR 3 ist es dem Immunsystem möglich, eine virale Infektion früh zu detektieren und eine anti-virale Immunantwort zu initiieren [153].

TLR 4: Dieser Rezeptor wurde als Homolog zum Toll-Protein aus *Drosophila* als erster humaner TLR identifiziert [144]. Der Hauptligand ist das LPS der Zellwand gram-negativer Bakterien wie *E.coli* [154].

TLR 5: Bakterien bewegen sich in der Regel mithilfe von sogenannten Flagellen, zu deren Komponenten das bakterielle Protein Flagellin gehört. TLR 5 erkennt spezifisch Flagellin und ist somit bei der Früherkennung einer bakteriellen Infektion essentiell [155]. Bisher wurden keine weiteren Liganden beschrieben.

TLR 7 und TLR 8: Als Liganden für diese TLR wurden ssRNA beschrieben [156]. Der genaue Ligand war lange unbekannt. Bisher beschrieben war nur, dass sich die TLR mit synthetischen antiviralen Wirkstoffen wie Imiquimod (R-837) und Resiquimod (R-848) aktivieren lassen [157], [158].

TLR 9: Als Ligand für TLR 9 wurde unmethylierte bakterielle DNA beschrieben [159]. Cystein-Guanin-Dinucleotide sind in bakteriellen Genomen deutlich öfter distributiert als im Genom von Säugetieren. Ausserdem sind CpG in Säugetieren oft stark methyliert [160].

TLR 10: Über diesen TLR ist wenig bekannt. Weder ist ein Ligand/Pathogen noch ein synthetisches Analogon bislang beschrieben [147].

TLR 11: Dieser TLR ist noch nicht lange beschrieben. Als Ligand wurden uropathogene Bakterien identifiziert. Ein synthetisches Analogon ist nicht bekannt, auch wird die Expression im humanen System bezweifelt, da bisherige Analysen des humanen Genoms ein Stop-Kodon im vermuteten Leseraster des TLR 11-Gens detektierten [161].

Weiterhin erkennen einige TLR auch Antigene, die strukturell wenig gemeinsam haben. Außer den antiviralen TLR 3, 7 und 8, die ss und ds RNA erkennen, werden auch andere virale Komponenten von TLR detektiert. So erkennt TLR 4 nicht nur das bakterielle LPS, sondern auch das Fusions-Protein des Respiratorischen Synzytialen Virus (RSV) [162], das Hüllprotein des *Mouse mammary-tumor virus* (MMTV) [163], Fibronectin, Hitzeschock-Proteine und weitere strukturell nicht verwandte Liganden. Komponenten des Zytomegalievirus (CMV) sowie des Herpes-simplex-Virus (HSV)-1, aber auch das Kapsid des HBV werden von TLR 2 erkannt [164-166]. TLR 9, für den unmethylierte bakterielle DNA ursprünglich als Ligand identifiziert wurde, detektiert außerdem HSV-1, HSV-2 und CMV DNA [167-169].

Eine Pathogenerkennung durch einen TLR kann, abhängig vom Rezeptor, zwei verschiedene Signalwege aktivieren: Den MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*)-abhängigen und den MyD88-unabhängigen. MyD88 ist ein Adapterprotein, welches von allen TLR, mit der Ausnahme von TLR 3, universal zur Signaltransduktion genutzt wird (siehe Abb. 7) [170].

Wird ein Ligand von einem TLR gebunden, dimerisieren die TIR-Domänen, und MyD88 kann mit seiner TIR-Domäne an die zytoplasmatische Domäne des TLR binden (Abb. 7). Gebundenes MyD88 rekrutiert über eine DD (*death domain*) das inaktive Enzym IRAK (*IL-1R-associated kinase*) 4 an den Komplex, das nun IRAK1 phosphorylieren kann. Die aktivierte IRAK1 wird N-terminal autophosphoryliert und von TRAF (*tumor-necrosis factor-receptor-associated factor*) 6 gebunden. Das Heterodimer IRAK1/TRAF dissoziiert vom Rezeptor und bindet den membranständigen Komplex aus TAK (*transforming growth factor- β -activated kinase*) 1, TAB (*TAK1-binding protein*) 1, TAB2 und TAB3. Diese Bindung initiiert die Phosphorylierung des Komplexes, der sich von der Plasmamembran löst und im

Zytoplasma den IKK Komplex (*inhibitor of NF- κ B (I κ B) kinase*) aus IKK α , IKK β und NEMO (*NF- κ B essential modulator*) aktiviert. IKK kann nun I κ B phosphorylieren, wodurch dieses ubiquitiniert wird und NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) freigibt. NF- κ B kann in seiner aktiven Form als Dimer (p50/p65) in den Nukleus migrieren und die Transkription inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α induzieren (Abb. 7) [147], [171].

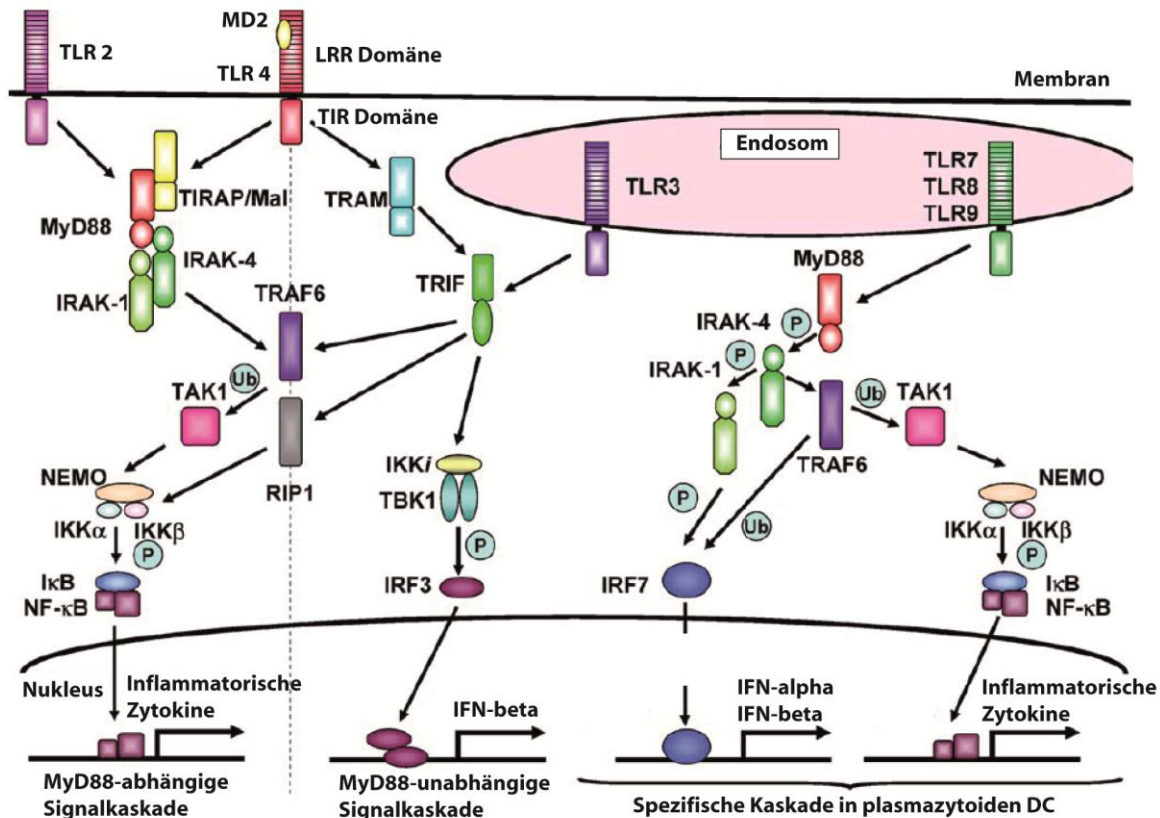


Abbildung 7: TLR Lokalisation und spezifische Signalkaskaden. TLR Signalkaskaden werden an den zytosolischen TIR Domänen initiiert. Nach Ligandenbindung assoziiert MyD88 mit der TIR Domäne der TLR und rekrutiert IRAK an den Rezeptor. IRAK aktivieren TRAF6, was zur Aktivierung von TAK1 und dem IKK Komplex aus IKK α , IKK β und NEMO führt. Der IKK Komplex phosphoryliert I κ B, wodurch NF- κ B in den Nukleus migrieren kann und die Transkription von Zytokinen induziert. Typ I IFN können durch TLR 4 sowie die endosomalen TLR 3, 7, 8 und 9 induziert werden. Stimulation mit LPS und dsRNA führt zur Aktivierung von IRF3 und zur Induktion von IFN- β . TRIF ist verantwortlich für die TLR 3 und 4 induzierte IRF3 Aktivierung, wobei TLR 4 einen weiteren Adaptor, TRAM, benötigt. TRIF interagiert mit TBK1, IKK α , RIP1 und TRAF6. pDC exprimieren TLR 7 und 9 und sezernieren IFN- α und IFN- β nach Stimulation mit ssRNA oder CpG DNA. Diese Induktion ist abhängig von MyD88, und benötigt die Aktivierung und Migration von IRF7 in den Nukleus. *Adaptiert von Uematsu und Akira [172].*

Der MyD88-unabhängige Signalweg wird nach aktuellem Forschungsstand nur durch TLR 3 und TLR 4 aktiviert. Über die Signalkaskade ist bekannt, dass eine Rezeptorbindung zu einer Aktivierung von TRIF (*TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- β*) führt (Abb. 7).

Durch TRIF werden auch Faktoren aktiviert, die eine NF- κ B Aktivierung induzieren, doch wird primär IRF (*interferon regulatory factor*)-3 aktiviert (Abb. 7) [173]. Dieser Transkriptionsfaktor migriert in den Nukleus und induziert die Transkription von IFN- β , und somit die Expression von IFN-induzierbaren Genen, sowie von TNF- α , was zu einer späteren Aktivierung von NF- κ B führt [170].

Neben MyD88 und TRIF wurden weitere Adaptorproteine identifiziert, die scheinbar an einer Modifizierung der Kaskade beteiligt sind: TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) [174] und TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*) [175]. Für diese Proteine wird vermutet, dass sie über TIR-Domänen mit den Rezeptoren interagieren und die Signalwege modifizieren.

1.4.2 C-Typ Lektin Rezeptoren (CLR)

Die APC des Immunsystems setzen sich vor allem aus M Φ , DC und B-Zellen zusammen. Diese Zellen phagozytieren und prozessieren Fremdkörper für eine effektive Präsentation an T-Zellen, um eine effiziente Verteidigung und ein immunologisches Gedächtnis zu etablieren. M Φ und DC verwenden diverse PRR für die Erkennung, die Phagozytose wird allerdings vor allem von CLR und sogenannten *Scavenger* Rezeptoren eingeleitet [176], [177]. *Scavenger* Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen und Mikroben, induzieren jedoch keine bekannte Signalkaskade [177], [178]. Aus diesem Grunde wurden in dieser Arbeit nur CLR berücksichtigt.

Der Terminus C-Typ Lektin definiert Kohlenhydrat-bindende Moleküle, welche Liganden in Abhängigkeit von Ca²⁺ binden [179]. CLR lassen sich in zwei Familien unterteilen: Typ I transmembrane CLR, auch Mannose Rezeptor Familie genannt, besitzen multiple Lektin-ähnliche Domänen, obwohl nicht alle als funktionale Kohlenhydrat-Erkennungsdomänen (CRD, *carbohydrate recognition domain*) arbeiten [180]. Zu dieser Familie zählen der namensgebende Mannose Rezeptor (MR), sowie DEC-205 und Endo-180.

Die Typ II Familie, manchmal auch *asialoglycoprotein receptor family* oder DC-SIGN Familie genannt, besitzen in der Regel eine CRD, wie im Fall von DC-SIGN, Dectin-2, Langerin und BDCA-2 [179], [181]. Echte Ca²⁺-abhängige CLR lassen sich in nach ihrer Affinität für Mannose- und Galaktose-verwandte Liganden unterteilen. Auf molekularer Ebene ist dies anhand bestimmter Aminosäure-Triplets erkennbar: EPN für Mannose- und QPD für Galaktose-Rezeptoren [182].

DC-SIGN, als Beispiel für die Typ II Rezeptoren, wurde ursprünglich als Interaktionspartner für ICAM-3 (*intercellular adhesion molecule 3*) beschrieben [183]. Die

Interaktion ist abhängig von Mannose-Resten, die bei der Erkennung des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) und anderer Pathogene, namentlich *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Helicobacter pylori* und *Schistosoma mansoni*, beteiligt sind [184], [185]. Die verschiedenen Liganden können nicht nur anhand der primären Mannose-Reste, sondern auch über sekundäre Bindungsstellen, welche die Geometrie der Kohlenhydrate mit einschliessen, unterschieden werden [186].

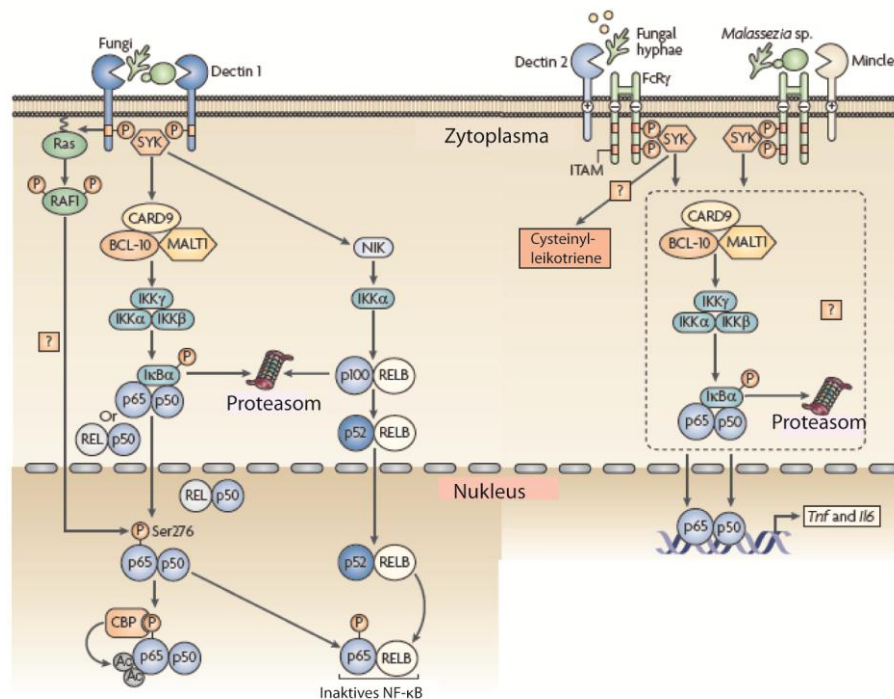


Abbildung 8: SYK und CARD9 abhängige Signalkaskaden von CLR. Die Bindung von Pilzen (*Fungi*) an Dectin-1 induziert die Phosphorylierung des YxxL Motivs in der zytoplasmatischen Domäne. SYK wird an zwei phosphorylierte Rezeptoren rekrutiert und bildet einen Komplex mit CARD9, BCL-10 (*B cell lymphoma 10*) und MALT1 (*mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene*). Dies induziert die Aktivierung des IKK Komplexes und die letztendliche Freigabe von NF-κB. Die SYK Aktivierung induziert auch den nicht-kanonischen NF-κB Signalweg über NIK (*NF-κB inducing kinase*) und IKKα, was folglich zur Prozessierung von p100 zu p52 und zur Migration des RELB-p52 Komplexes in den Nucleus führt. Ausserdem wird SYK-unabhängig die Kinase RAF1 durch Ras Proteine phosphoryliert. Dies führt zur Aktivierung von CBP (*CREB-binding protein*), was die Transkriptionsaktivität von RELB schwächt. Sowohl Dectin-2 als auch Mincle dimerisieren mit dem Adaptormolekül FcRγ (*Fc receptor γ-chain*). Die Phosphorylierung des ITAM des FcRγ nach CLR Aktivierung führt zur Rekrutierung von SYK und induziert die Signalkaskade zur Zytokinexpression. Beide Rezeptoren binden spezifische PAMP von Pilzen. Beide Signalkaskaden führen zur Transkription inflammatorischer Zytokine. *Adaptiert von Geijtenbeek und Gringhuis [181].*

Ligandenbindung führt zur Internalisierung des Fremdkörpers und zur Weiterleitung an endosomale/lysosomale Kompartimente zur Degradation und Präsentation an T-Zellen [187]. Interessanterweise wurde auch berichtet, dass verschiedene Viren, HIV und das Hepatitis C

Virus (HCV) sind dabei hervorzuheben, die Interaktion mit DC-SIGN ausnutzen, um einer lysosomalen Degradation und Präsentation an T-Zellen zu entgehen [188-190].

Abgesehen von der Aufnahme und Degradation von Pathogenen aktivieren CLR ausserdem Signalkaskaden und induzieren pro-inflammatorische Zytokine [181]. CLR kooperieren mit TLR und es scheint, dass eine angemessene Immunantwort auf der Interaktion beider Erkennungsmechanismen basiert [191]. Allerdings wurden auch TLR-unabhängige Signalwege beschrieben, über die CLR Zytokine induzieren können (Abb. 8).

Dectin-1 besitzt eine intrazelluläre ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation domain*), über welche unabhängig von TLR die Adaptormoleküle SYK (*spleen tyrosine kinase*), CARD9 (*Caspase recruitment domain-containing protein 9*) und NF- κ B aktiviert werden können [192] (Abb. 8). Die Rekrutierung von SYK an das phosphorylierte YxxL Motiv der ITAM Motive von zwei Dectin-1 Rezeptoren ist notwendig, um einen Adaptormolekül-Komplex aus CARD9, BCL-10 und MALT1 zu aktivieren [193]. Diese Aktivierung des SYK-CARD9 Signalweges führt zur Aktivierung der NF- κ B Untereinheiten p65 und REL, die Teil des kanonischen NF- κ B Signalweges sind. Zusätzlich wurde die Beteiligung des Dectin-1-SYK Signalweges an der Induktion des nicht-kanonischen NF- κ B Signalweges nachgewiesen, welcher die Translokation des RELB-p52 Dimers durch Aktivierung der NF- κ B-induzierenden Kinase (NIK) und I κ B Kinase- α (IKK α) einleitet [194]. Auch für andere CLR wurde die Induktion von Zytokinen unabhängig von TLR beschrieben: Dectin-2 und Mincle synergieren mit dem Adaptor FcR γ , über dessen ITAM SYK rekrutiert wird (Abb. 8) [195-198].

In der MR Familie ist der MR am besten beschrieben. Er bindet verschiedene Bakterien, Hefen und Viren durch Interaktion zwischen den multiplen CRD und Mannose-Resten auf den Fremdkörpern. Der MR wurde zuerst als endozytierender Rezeptor mit Spezifität für Mannose in alveolaren M Φ von Kaninchen beschrieben [199]. Auch dem MR wird eine Rolle in der Aufnahme und Präsentation von Pathogenen zugewiesen [200]. Über die multiplen CRD kann eine Vielzahl von Pathogenen erkannt werden, darunter *Mycobacterium tuberculosis*, HIV und Dengue-Virus, sowie *Candida albicans* [201-203]. Obwohl ein einziger Tyrosin-Rest an der zytoplasmatischen Domäne lokalisiert ist wurde eine direkte Beteiligung des MR an Signalkaskaden bislang nicht belegt [204]. Allerdings wurde die Interaktion zwischen dem MR und TLR 2 beschrieben, wobei dem MR auch eine Beteiligung bei der Induktion pro-inflammatorischer Zytokine nachgewiesen wurde [205].

1.4.3 RIG-I-ähnliche Helikasen (RLR)

Die beiden RLR RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) und MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) sind zytosolische RNA Helikasen, welche als kritische Rezeptoren für die Aktivierung einer anti-viralen Immunantwort durch virale RNA erachtet werden [206], [207].

RIG-I wurde erstmalig als durch Retinsäure in akuten Leukämie-Zellen induziertes Gen beschrieben [207]. Später wurde die Funktion als Rezeptor für synthetische dsRNA (polyI:C, *polyinosinic-polycytidylic acid*) nachgewiesen, einem starken Aktivator von Interferonen [208]. RIG-I gehört zu den DExD/H-Box RNA Helikasen Familie und besitzt eine CARD (*caspase recruitment domain*) am N-Terminus, während die Helikasen Domäne am C-Terminus lokalisiert ist. RIG-I besitzt keine konstitutive Funktion, induziert jedoch IFN im Fall einer viralen Infektion.

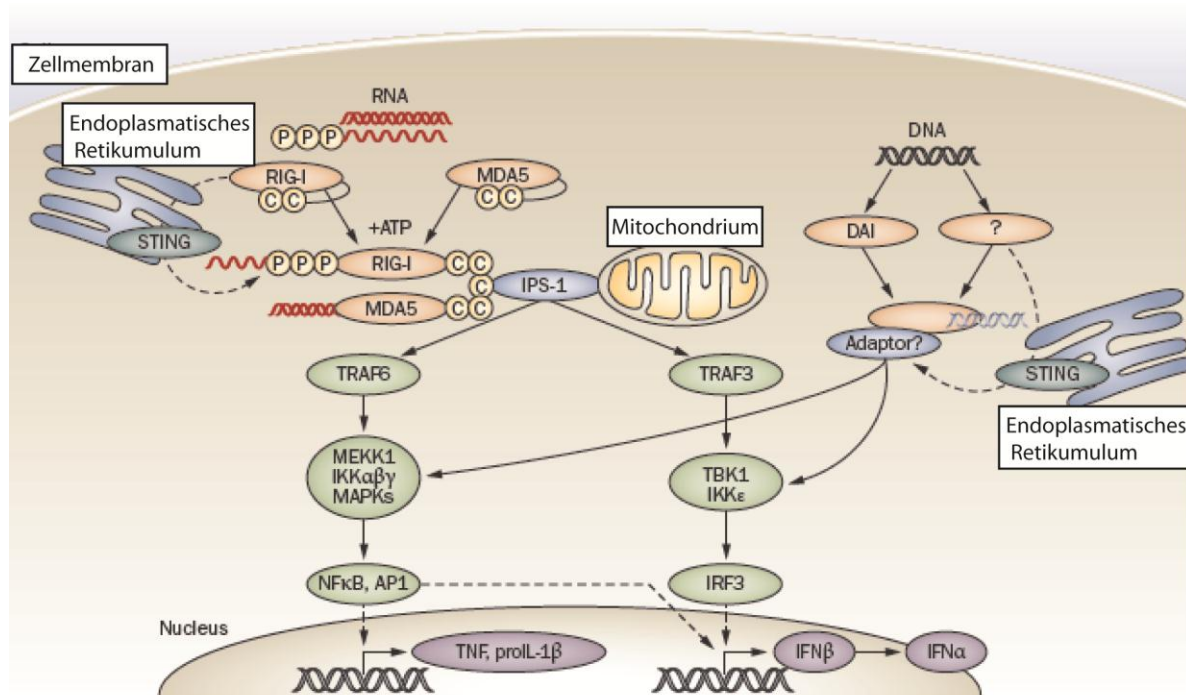


Abbildung 9: RLR und DAI Signalkaskade. Die RLR Signalkaskade zeigt RIG-I bzw. MDA-5, mit gebundener RNA, und die Signalkaskade über IPS-1, NF-κB und IRF3, die in der Induktion von Zytokinen und Typ I IFN Transkription mündet, in einer infizierten Zelle. Die Erkennung zytosolischer DNA durch DAI führt vergleichbar zur Induktion von Typ I IFN. Ein mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiertes Adaptorprotein, STING, bindet auch RIG-I und induziert so Typ I IFN durch RNA und DNA Erkennung. *Modifiziert nach Baccala et al. [209].*

MDA5 wurde erstmals als Gen beschrieben, welches durch den IFN- und Protein-Kinase C-aktivierenden Wirkstoff Mezerein in Melanom-Zelllinien induziert wurde [210]. MDA5 spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Virus-spezifischen angeborenen Immunität, erkennt

jedoch andere Viren als RIG-I [211-213]. Diese Spezifität ist auf Erkennung unterschiedlicher RNA-Strukturen zurückzuführen.

Es wurde nachgewiesen, dass RIG-I und MDA5 selektiv aktiviert werden können: 2006 wurde von zwei Gruppen belegt, dass RIG-I spezifisch durch 5'-Triphosphat (5'-ppp) virale RNA, die in den meisten Genomen von RNA-Viren sowie *in vitro*-transkribierter RNA vorkommt, aktiviert wird [214], [215]. Da 5'-ppp Reste in zelleigenen Transkripten entweder durch die 7-Methyl-Guanosin Kappe (mRNA) bedeckt sind oder im Reifungsprozess entfernt werden (tRNA und rRNA) kann virale von zelleigener RNA unterschieden werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass kurze dsRNA (~ 25 bp) mit einem Phosphatrest am 5'- oder 3'-Ende sowie kurze polyI:C Segmente RIG-I spezifisch aktivieren können [216], [217]. Zusammenfassend wird angenommen, dass RIG-I spezifisch 5'-ppp ssRNA sowie kurze dsRNA als fremd-RNA erkennt (Abb. 9) [207].

Da polyI:C der einzige synthetische Ligand für MDA5 ist, wurde angenommen, dass lange dsRNA Sequenzen der Ligand für MDA5 sind. Es wurde gezeigt, dass relativ lange polyI:C (> 1 kb) Sequenzen selektiv von MDA5 erkannt werden, während kurze polyI:C Stücke (< 1 kb) RIG-I aktivieren [217]. Weiterhin wurde gezeigt, dass lange RNA-Intermediate in Mengovirus (EMCV)-infizierten Zellen eine MDA5-abhängige IFN-Antwort induzieren [218]. Somit ist lange dsRNA der Ligand für MDA5.

RLR sind starke Aktivatoren von Typ I IFN, welche wiederum IFN-induzierbare Gene (ISG, *Interferon-stimulated genes*) induzieren. Verschiedene CARD-Adaptormoleküle wurden als Teil der Signalkaskade beschrieben: IPS-1 (*Interferon- β promoter stimulator 1*), VISA (*virus-induced signaling adaptor*) und Cardif (*CARD adapter inducing IFN- β*) [219-222]. Von diesen wurde für IPS-1 belegt, dass es absolut essentiell für die Signaltransduktion von RIG-I und MDA5 ist [223], [224]. IPS-1 besteht aus einer N-terminalen CARD Domäne sowie einer C-terminalen Transmembrandomäne, die in die äussere Membran der Mitochondrien integriert ist [221]. RIG-I und MDA5 interagieren mit IPS-1 durch CARD-CARD Interaktion, wodurch weitere Adapter der Signalkaskade rekrutiert werden (Abb. 9). Es wurde gezeigt, dass TRAF (*TNF receptor-associated factor*) Familien Moleküle an der Signaltransduktion beteiligt sind. TRAF 3 interagiert direkt mit dem TIM (*TRAF-interacting motif*) in IPS-1 [225], [226]. Desweiteren wurde eine Interaktion mit TRAF 2 und 6 nachgewiesen [220]. TRAF Adaptormoleküle leiten das Signal an weitere Proteinkinasen, IKK Familien Moleküle, weiter, welche für die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF-3 und -7 sowie NF- κ B wichtig sind. Der kanonische IKK Komplex, bestehend aus IKK- α , IKK- β und der Untereinheit NEMO, phosphoryliert I κ B, welcher vom Proteasom degradiert wird

und die Translokation von NF- κ B in den Nukleus ermöglicht [227]. Parallel dazu aktivieren die nicht-kanonischen Adaptoren TBK1 (*TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1*) und IKK ϵ die signalabhängige Phosphorylierung von IRF-3 und -7, welche ein funktionales Homo- bzw. Heterodimer bilden [228]. Die aktiven Formen von NF- κ B und IRF Dimeren induzieren nun im Nukleus die Transkription von Typ I IFN und die folgende IFN Signalkaskade (Abb. 9).

Erst kürzlich wurden die zytosolischen DNA-Rezeptoren beschrieben, die aus diesem Grund oft zusammen mit den RLR genannt werden [229]. Zytosolische dsDNA, insbesondere große Fragmente, induziert IFN- β unabhängig von RIG-I und MDA-5, was auf eine weitere Rezeptorklasse hinweist [230], [231]. Der erste in diesem Zusammenhang beschriebene Rezeptor war der DNA-abhängige Aktivator von IFN-regulatorischen Faktoren (*DNA-dependent activator of IFN regulatory factors, DAI*), welcher nach DNA-Erkennung IFN- β über IRF3 sowie die Kinase TBK1 induziert (Abb. 9) [232]. Eine Aktivierung von NF- κ B, vergleichbar zur Signalkaskade von TLR 3, wird ebenfalls vermutet [233]. Eine zentrale Rolle bei der IFN-Induktion scheint dem ER-assoziierten Stimulator von IFN-Genen (*stimulator of IFN-genes, STING*) zuzukommen, der auch mit RIG-I interagiert und somit eine wichtige Rolle bei der zytosolischen Nukleinsäureerkennung spielt [209]. Aufgrund des hohen Potenzials, IFN- β zu induzieren, wird für DAI eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Viren und anderen Pathogenen vermutet [229]. Ein weiterer Rezeptor zytosolischer dsDNA, „Abwesend im Melanom 2“ (*absent in melanoma 2, AIM2*), wurde erst kürzlich identifiziert [234], [235]. Im Gegensatz zu anderen nukleinsäureerkennenden Rezeptoren aktiviert AIM2 allerdings Caspase-1 und das Inflammasom. Weiterhin wird NF- κ B aktiviert, sodass pro-inflammatorische Zytokine ausgeschüttet werden und über Caspase-1 Pro-IL-1 β zu IL-1 β prozessiert wird (siehe 1.4.4).

1.4.4 NOD-ähnliche Rezeptoren (NLR)

Die intrazellulären NOD-like Rezeptoren (NLR) spielen eine wichtige Rolle in der Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien oder die Präsenz von bakteriellen Produkten in der Zelle. Die NLR Familie besteht aus mehr als 20 Rezeptoren, welche eine C-terminale LRR, eine zentrale Nukleotid-Bindedomäne (NACHT) sowie eine N-terminale Interaktionsdomäne mit einer CARD, Pyrin oder Bir (*baculovirus „inhibitor of apoptosis“ repeat*) Domäne [236]. Da ihre AS Sequenz keine Signal-Peptide oder Transmembran-Domänen enthält wird angenommen, dass sie im Zytosol lokalisiert sind [237].

Die exakten Mechanismen der Ligandenbindung sind nur unvollständig verstanden. Die ersten beschriebenen NLR waren Nod1 und Nod2, welche spezielle bakterielle Peptidoglykane erkennen [238-241]. Nod1 erkennt dabei Gram-negative bakterien, während Nod2 sowohl Gram-negative als auch positive bakterielle Produkte erkennt. NALP3 (*NACHT-LRR-PYD-containing Apaf-1-like protein*) ist ein weiterer Rezeptor mit einer Pyrin-Domäne, für den sowohl die Erkennung mikrobieller Produkte als auch zellulärer Gefahrensignale berichtet wurden [242], [243]. Unter Beteiligung von TLR Signalen führt diese Erkennung zur Aktivierung des Inflammasoms und zur Prozessierung von Pro-IL-1 β und Pro-IL-18 in ihre aktive Form (siehe Abb. 10) [237].

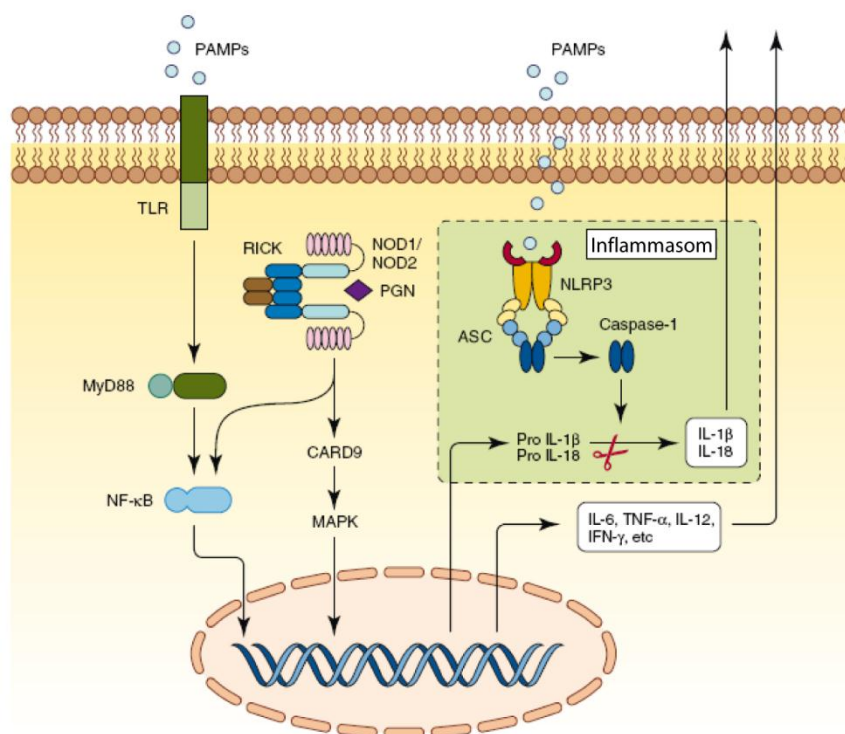


Abbildung 10: NLR Signalkaskaden und die Interaktion mit TLR. PAMP werden durch TLR und NLR erkannt, was im Falle von TLR und Nod1 und Nod2, welche bakterielle Peptidoglykane (PGN) erkennen, zur Aktivierung von NF- κ B führt. Direkte Aktivierung von Nod1 und Nod2 führt weiterhin zur Rekrutierung von RICK und zur Aktivierung von MAP Kinasen. Nlrp3 (NALP3) bildet einen Multiproteinkomplex mit ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) und Caspase-1, das sogenannte Inflammasom. Das Inflammasom spielt eine zentrale Rolle in einer bakteriellen Entzündung, da es die Zytokine Pro-IL-1 β und Pro-IL-18 in ihre aktive Form prozessiert. *Adaptiert von Zaki [244].*

Ausserdem ist NALP3 bislang der einzige NLR, für den einer Erkennung viraler Strukturen vorgeschlagen wurde. Es wird angenommen, dass NALP3 virale RNA erkennt und eine Rolle in der Immunantwort auf Adenovirus und MVA (*modified vaccinia virus Ankara strain*) spielt [245-247]. Zusätzlich zu diesen Rezeptoren wurden noch Ipaf und Naip (Naip5

in Mäusen) beschrieben, die intrazelluläres Flagellin unabhängig von TLR 5 erkennen und ebenso das Inflammasom aktivieren [248-250].

Die gut untersuchten Signalkaskaden der NLR umfassen die NF- κ B Kaskade, für Nod1 und Nod2, und die Aktivierung des Caspase-1 Inflammasom im Fall von NALP3, Ipaf und Naip. Nod1 und Nod2 bilden über CARD-CARD Interaktion Oligomere und rekrutieren RIP (*receptor-interacting protein*) 2 [251]. Der Komplex rekrutiert den IKK Komplex, was letztendlich zur Aktivierung von NF- κ B führt. Für die meisten NLR wird postuliert, dass sie Inflammasome bilden, welche Caspase-1, Pro-IL-1 β und Pro-IL-18 rekrutieren und aktivieren [252] (Abb. 10).

1.5 Leberanatomie und Zellpopulationen

Die Leber ist ein Organ, welches eine Vielfalt an für den Metabolismus essentiellen Funktionen ausführt. Die Leber wird intensiv durchblutet und kontrolliert den Blutzuckergehalt durch Glykogenlagerung und Glukoneogenese. Ebenfalls speichert sie Fette in Form von Lipoproteinen und einige Vitamine. Bei der Filtration des Blutes werden alte Erythrozyten eliminiert und das Hämoglobin abgebaut. Die Leber ist zudem die größte Drüse des Körpers und produziert die für die Verdauung wichtige Gallenflüssigkeit, Plasmaproteine und andere Faktoren, und spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung [253-256].

Die Leber lässt sich in zwei große Leberlappen unterteilen, den rechten (*Lobus dexter*) und den größeren linken (*Lobus sinister*). Dazu gibt es noch zwei kleinere Lappen, den quadratischen und den geschwänzten Lappen. An der Unterseite der Leber befindet sich die Leberpforte (*Porta hepatis*), an der die Leberarterie und die Pfortader in die Leber eintreten und die Gallengänge austreten. Die Leber wird außerdem in acht Lebersegmente unterteilt, vier des linken und vier des rechten Leberlappens [256].

Die Leber ist von einem feinen Netzwerk kleiner Blutgefäße durchzogen, den sogenannten Leber-Sinusoiden. Zwischen den Sinusoiden liegt das Leberparenchym, bestehend aus den Hepatozyten. Die Sinusoide werden von spezialisierten sinusoidalen Endothelzellen (*Liver sinusoidal endothelial cell*, LSEC) ausgekleidet (siehe Abb. 11). Leberständige M Φ , Kupfferzellen (*Kupffer cells*, KC) genannt, adhärieren an dieser Zellschicht. Das Sinusendothel ist von den Hepatozyten durch einen schmalen Spalt, den perisinusoidalen Raum oder Disse-Raum, getrennt. Im Disse-Raum kommen einzelne Zellen mit großen Lipidvakuolen vor, die Fettspeicherzellen oder Ito-Zellen (*hepatic stellate cells*) genannt werden.

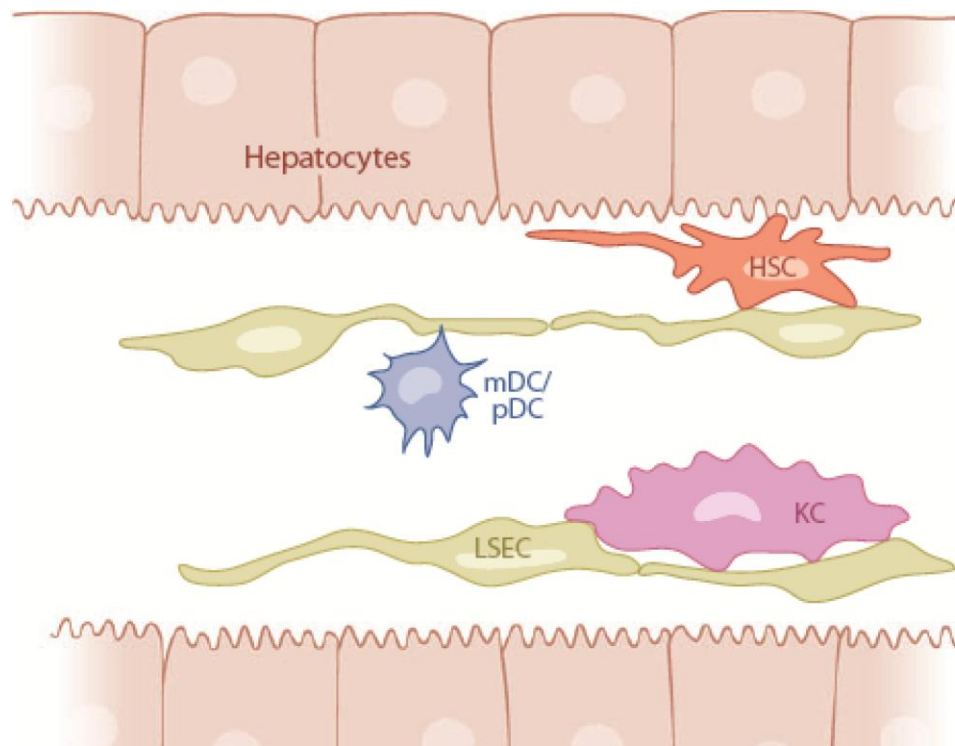


Abbildung 11: Zellen in einem Lebersinus. Hepatozyten bilden das Leberparenchym, während verschiedene Zellen im Sinus die Rolle der APC übernehmen. Mononukleare Phagozyten in Form der KC bevölkern das Sinusepithel, das durch LSEC gebildet wird. Im perisinusoidalen Raum oder Disse-Raum zwischen LSEC und Hepatozyten sind die fettspeichernden Ito-Zellen (hier HSC, *hepatic stellate cells*) zu finden. Verschiedene DC Populationen, mDC und pDC, können ebenfalls vorkommen. *Modifiziert nach Crispe [257].*

Hepatozyten führen die Hauptfunktionen des Lebermetabolismus aus, wie Glykogenlagerung und Glukosesekretion. Diese Zellen sind die Wirtszellen des HBV und werden hochspezifisch infiziert. Für keinen anderen Zelltyp wurde bisher von einer HBV-Replikation berichtet. Hepatozyten sind über enge Verbindungen (*tight junctions*) miteinander Verbunden (siehe Abb. 11) und unterscheiden sich hinsichtlich Größe und Dichte von den übrigen nicht-Parenchymzellen der Leber. Die als KC bekannten leberständigen MΦ wurden zuerst von Karl Wilhelm von Kupffer im Jahr 1876 beschrieben [258]. Aufgrund ihrer auffälligen Morphologie wurden sie auch als „Sternzellen“ bezeichnet, was zunächst zu einer Verwechslung mit Ito-Zellen führte, die als fettspeichernde Zellen in der Leber fungieren. Erst 1898 wurden KC als MΦ identifiziert. KC stammen, wie andere Leukozyten, aus dem Knochenmark, differenzieren zu Monozyten und migrieren ins Blut. Aus peripheren Monozyten entwickeln sich schließlich die Kupfferzellen [259]. Eine wichtige Funktion der KC liegt in der Phagozytose alter Erythrozyten, die abgebaut werden. Als MΦ nehmen diese Zellen jedoch noch weitere Funktionen im Immunsystem der Leber ein. LSEC stehen im ständigen Kontakt mit dem Blut und potentiellen Antigenen. Zum einen grenzen sie die

Hepatozyten vom direkten Blutkontakt ab, zum anderen ist bekannt, dass sie verschiedene Rezeptortypen, wie *Scavenger*-Rezeptoren und antibakterielle, Mannose-bindende PRR exprimieren. LSEC stellen somit auch einen Teil des angeborenen Immunsystems dar, indem sie Pathogene im Blut detektieren können [260].

1.6 Zielsetzung

Virale Partikel werden in der modernen medizinischen Forschung intensiv untersucht. Viren sind wichtige Pathogene, die jährlich Millionen an tödlichen Infektionen verursachen. Einige Viren, beispielhaft dafür HBV, sind in der Lage persistierende Infektionen zu etablieren, und sind erstaunlich resistent gegenüber anti-viralen Therapieansätzen. Für eine effektive Immunantwort gegen ein Pathogen muss das angeborene Immunsystem das Pathogen über PAMP erkennen und das adaptive Immunsystem aktivieren. Im Falle von HBV wird eine schwache Reaktion des adaptiven Immunsystems als Hauptgrund für eine persistierende Infektion angenommen. Dieser schwachen Immunantwort liegt möglicherweise eine mangelhafte Erkennung durch das angeborene Immunsystem zugrunde, welche im Falle von HBV kaum untersucht ist bzw. sogar komplett verneint wird.

Zum anderen sind Viren im Fall der zell-spezifischen Gentherapie ein idealer Vektor, mit AAV als wichtigem Vertreter. Aufgrund der Fähigkeit von Viren, genetisches Material hocheffektiv in spezifische Zielzellen zu übertragen, wird intensiv daran geforscht, diese ursprünglichen Krankheitserreger als modernes „Medikament“ zu etablieren. Im Falle einer Gentherapie mit einem viralen Vektor ist allerdings eine Immunantwort unerwünscht, da sie sich gegen die transduzierten Zellen richten und eine erfolgreiche Transkription des importierten genetischen Materials unterbinden würde. Bislang wurde die angeborene Immunantwort auf AAV in Mäusen untersucht, die jedoch aufgrund Spezies-spezifischer PRR-Unterschiede nicht unbedingt repräsentativ für Patienten sind.

Die Untersuchung der angeborenen Immunantwort gegen HBV und AAV interessierte somit von zwei unterschiedlichen Ansatzpunkten aus: Die Erkennung des infektiösen HBV Virions durch PRR des angeborenen Immunsystems wurde bislang nicht beschrieben. Aufgrund eigener Vorarbeiten sowie Literaturerkenntnissen, die eine Kontrolle der HBV Infektion vor dem Eingreifen der adaptiven Immunantwort dokumentieren, wurde die Erkennung von HBV durch PRR vermutet. Erkenntnisse über die Interaktion von HBV mit PRR könnten Aufschluss über die unterschiedlichen Krankheitsverläufe bieten. Eine mögliche Erkennung von AAV könnte hingegen fatale Konsequenzen für den Erfolg einer Gentherapie haben. Eine Erkennung des AAV durch PRR könnte eine effektive Immunantwort induzieren

und die Erfolgsaussichten der Therapie sozusagen im Keim ersticken. Langfristig bietet ein tiefergreifendes Verständnis der Interaktion von Viren Ansatzpunkte für effektivere antivirale Therapien. Aus diesen Gründen sollte in der hier vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob und durch welche Zellen bzw. PRR des angeborenen Immunsystems HBV und AAV erkannt werden können.

2 Material & Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem oder zweifach destilliertem Wasser aus dem Milli-Q Water System von Millipore angesetzt. Bei der Notwendigkeit von sterilem H₂O wurde autoklaviert und steril filtriert (0,2 µm Filter, B.Braun, Meisungen).

2.1.1 Kits

Real time PCR	LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Ref. 04887352001, LightCycler® 480 96-Loch Mikrotiterplatten; beides Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland Interferon α, β Response PCR Array, SABioscience, Frederick, MD
cDNA-Synthese	SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNA Verdau	RQ1 RNase-Free DNase, Ref. M6101, Promega, Madison, USA
HBV-DNA-Isolation	QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
Protein-Analyse	- Human IL-6, IL-8, TNFα und IL-1β ELISA Sets; alle BD OptEIA™ Sets, BD Biosciences, San Diego, USA - Maus IL-6 ELISA Set, BD OptEIA™ Set, BD Biosciences, San Diego, USA - Human IFN-alpha Module Set, Bender MedSystems, Wien, Österreich - Murex HBsAg Version 3, Murex Biotech Limited, Dartford, England - Luminex-based multiplex protein array, BioRad Laboratories, Hercules, CA
Zell-Isolation	- CD1c (BDCA-1) MicroBeads, human, - BDCA-4 MicroBeads, human, - CD11b MicroBeads, human,

	- CD14 MicroBeads, human,
	- CD19 MicroBeads, human,
	- CD31 MicroBeads, human; alle von Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
TLR-Aktivierung	Human TLR Agonist Kit, Invivogen, San Diego, USA
Toxizität-Test	Cell Proliferation Kit II (XTT), Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
PCR	PuReTaq Ready-to-go PCR Beads, Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
AcLDL Alexa Fluor [®] 488	Molecular Probes, Eugene, USA
Agarose	SeaKem LE Agarose, Cambrex Bio Science, Rockland, USA
Biocoll Separation Reagent	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Caesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Celastrol	Invivogen, San Diego, USA
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroquine	Invivogen, San Diego, USA
Curdlan	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>E.coli</i> Alexa Fluor [®] 488	Molecular Probes, Eugene, USA
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Flagellin	Invivogen, San Diego, USA
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FSL-1	Invivogen, San Diego, USA
Glukose	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Glycerol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
HKLM	Invivogen, San Diego, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kollagen	Serva, Heidelberg, Deutschland
LPS	Invivogen, San Diego, USA
LTA	Invivogen, San Diego, USA
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
M-CSF	Peptotech, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ODN 2395	Invivogen, San Diego, USA
ODN TTAGGG	Invivogen, San Diego, USA
OptiPrep™	Axis-Shield, Oslo, Norwegen
Pam3CSK4	Invivogen, San Diego, USA
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pepinh-MYD	Invivogen, San Diego, USA
Phenol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Piceatannol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Poly(I:C)	Invivogen, San Diego, USA
R406	Bereitgestellt durch die AG Ruland, TU München
Saccharose	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Saponin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Medien und Medienzusätze

Blasticidin	Invivogen, San Diego, USA
Dulbeccos MEM	Gibco, BRL, Eggenstein, Deutschland
Dymethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Serva, Heidelberg, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	HyClone, South Logan, USA
Gentamycin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glucose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Glutamin	Gibco, BRL, Eggenstein, Deutschland
HEPES pH 7.4	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
HBSS	Gibco, BRL, Eggenstein, Deutschland
Heparin	Liquemin, N 25000, Roche, Mannheim, Deutschland
Hydrocortison	Rotexmedica, Trittau, Deutschland
Hyrogold	Invivogen, San Diego, USA
Insulin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Inosin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumpyruvat	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS – Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Polyethylenglycol 6000	Merck, Darmstadt, Deutschland
VLI RPMI 1640	Gibco, BRL, Eggenstein, Deutschland
Williams Medium E	Gibco, BRL, Eggenstein, Deutschland

2.1.4 Eukaryotische Zelllinien

HepG2	Humane Hepatomzelllinie
HepG2.2.15	Humane Hepatomzelllinie, stabil transfiziert mit 2 Dimerkopien des HBV-Genoms [261]
HEK-293	Humane embryonale Nierenzelllinie [262]
293-hTLR2/CD14	HEK-293 Klon, stabil transfiziert mit humanem TLR2 und CD14 (Invivogen, Ref. 293-hTLR2CD14)
THP-1	Humane Monozytenzelllinie, akute Leukämie [263]

2.1.5 Enzyme

DNase I	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>E.coli</i> RNase H	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Kollagenase	Worthington, Lakewood, USA
Trypsin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.1.6 Gewichts- und Längenstandards

DNA – Standard

SmartLadder, 0,1-1kb	Eurogentec, Liege, Belgien
----------------------	----------------------------

2.1.7 Oligonukleotide

Alle Primerpaare wurden bei Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bestellt. Die gelieferten Primer wurden zunächst mit Nuclease-freiem H₂O zu einer Konzentration von 100 µM verdünnt. Aus diesem Stock wurden für die PCR Aliquots auf 20 µM verdünnt und bei –20°C gelagert.

Primer Housekeeping-Gene:

hGAPDH (+): 5' GGTATCGTGGAAGGACT 3'
hGAPDH (-): 5' GGGTGTCGCTGTTGAA 3'
mGAPDH (+): 5' ACCAACTGCTTAGCCC 3'
mGAPDH (-): 5' CCACGACGGACACATT 3'

Primer Rezeptoren:

hTLR 1 (+): 5' CCAATGTACCTGTGAGC 3'
hTLR 1 (-): 5' ATCGTGCCCACTATATG 3'
hTLR 2 (+): 5' CTCTCGGTGTCGGAAT 3'
hTLR 2 (-): 5' CCCGCTCACTGTAAGAA 3'
hTLR 3 (+): 5' AAGGGACTTTGAGGCG 3'
hTLR 3 (-): 5' AGGCACCTATCCGTTC 3'
hTLR 4 (+): 5' TCTTGGTGGAAGTTGAACG 3'
hTLR 4 (-): 5' GCCACACCGGGAATAA 3'
hTLR 5 (+): 5' GTACCCTGACTCGTTCT 3'
hTLR 5 (-): 5' TTCTGCACCCATGTGA 3'
hTLR 6 (+): 5' AGTGGACCCAGACTCG 3'

hTLR 6 (-): 5' AGTTCGTAATGGCACC 3'
hTLR 7 (+): 5' GACCGAGTGGGTTTTG 3'
hTLR 7 (-): 5' CTTGCGGGTTTGTGG 3'
hTLR 8 (+): 5' TGAGCTGCGCTACCAC 3'
hTLR 8 (-): 5' CTTCTGCCTTCGGGTT 3'
hTLR 9 (+): 5' CAAATACTAGATGTAAGCGCC 3'
hTLR 9 (-): 5' CTGCGTTTTGTCGAAG 3'
hTLR 10 (+): 5' TCCATTCCGGTGTACCT 3'
hTLR 10 (-): 5' TGACCTAGCATCCTGAG 3'
hMR (+): 5' AGAGGTTATGAAGCCATGTA 3'
hMR (-): 5' TTCAATGGACAATATCCAAATAGC 3'

Primer Zytokine:

hIL-6 (+): 5' AAACAACCTGAACCTTCC 3'
hIL-6 (-): 5' CAGGGGTGGTTATTGC 3'
hTNF α (+): 5' AGCACTGAAAGCATGA 3'
hTNF α (-): 5' GGGTTTGCTACAACATGG 3'
mTNF α (+): 5' ACG-TCGTAGCAAACCAC 3'
mTNF α (-): 5' AGATAGCAAATCGGCTG 3'
hIL-1 β (+): 5' GTACGATCACTGAACTGC 3'
hIL-1 β (-): 5' GAGTGGGCTTATCATCTTT 3'
hIFN- β (+): 5' GCCGCATTGACCATCT 3'
hIFN- β (-): 5' AGTTTCGGAGGTAACCTG 3'

Primer Markergene (alle human):

Albumin (+): 5' TTCGTTACACCAAGAAAGTACC 3'
Albumin (-): 5' TCTGTCACTTACTGGCGT 3'
CD 68 (+): 5' CGAGTCCTAGCCCAAC 3'
CD 68 (-): 5' CCGCCATGTAGCTCAG 3'
GFAP (+): 5' AGAACCGGATCACCAT 3'
GFAP (-): 5' GCGGAGCAACTATCCT 3'
L-SIGN (+): 5' AGCTCGTCGTAATCAAAAC 3'
L-SIGN (-): 5' GGGAAACAACCTATTCGTCT 3'

Primer für Mycoplasmen-PCR:

Myco (+): 5' CACCATCTGTC ACTCTGT TAAACC 3'

Myco (-): 5' GGAGCAAACAGGATTAGATACCC 3'

2.1.8 RadioisotopeDesoxycytosin-5'-[$\alpha^{32}\text{P}$]-triphosphat, spezifische Aktivität >3000 Ci/mmol**2.1.9 Antikörper**Primärantikörper

CD68, human [PG-M1]	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
HepPar, human1 [OCH1E5]	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Mannose Rezeptor, human [15-2]	Abcam, Cambridge, UK
Maus IgG1 Isotypkontrolle [NCG01]	Abcam, Cambridge, UK
TLR2, human [TL2.1]	Abcam, Cambridge, UK
Maus IgG2a Isotypkontrolle [MG2a-53]	Abcam, Cambridge, UK

Sekundärantikörper

Ziege Anti Maus (Alexa Fluor [®] 594)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
--	------------------------------------

2.1.10 Verbrauchsmaterial

Centricon [®] Plus-70	Millipore, Billerica, USA
Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
ELISA 96-Well-Platte	Maxisorb, Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Filterpapier	Whatman 3MM, Biometra, Göttingen, Deutschland
Histoacryl-Kleber	Braun, Melsungen, Deutschland
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Monolayer-Flaschen 150 cm ²	TPP, Trasadingen, Schweiz
Nylonmembran	Positively Charged Nylonmembrane, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Pipettenspitzen	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilfilter	Stericup [®] /Steritop [®] Filter Unit, Millipore Express [™] Plus (MEP) 0.22 μm , Millipore, Billerica, USA
Spritzen 50 ml	Perfusor [®] , Braun, Melsungen, Deutschland

Vivaspin 2 (30.000 MWCO HY)	SartoriusStedim Biotech, Ref. VS02H21, Göttingen, Deutschland
Zellkulturplatten (12/24 Loch)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Zellschaber	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhren	Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

2.1.11 Geräte

Autoradiographie	Molecular Imager FX, Biorad, Hercules, USA
Blotkammer	BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
Brutschränke	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Durchflußzytometer	FACS Canto II™, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
ELISA Reader	Infinite F200, TECAN, Crailsheim, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Olympus IX81, Hamburg, Deutschland
Heizblöcke	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Julabo U3 Tauchsieder	Julabo, Seelbach, Deutschland
Perfusionspumpe	Masterflex® L/S, Cole-Parmer Instrument Company, Berrington, USA
Laborflaschen	Schott, Mainz, Deutschland
Light Cycler	LightCycler® 480, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
pH-Meter	WTW, wissenschaftlich technische Werkstätten
Photometer	Smart Spec 3000, BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
Photosystem für Agarosegele	Gel-doc 2000, BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
Pipettierhilfe	Swift Pet®, Abimed, Langenfeld, Deutschland
Schüttler	Innova 4230, New Brunswick scientific, USA
Sterilbank (Zellkultur)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Waagen	Kern 440-47, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Vortex	Vortex Genie 2, Scientific Industries, New York, USA

Zentrifugen	Centrifuge 5417C / 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Multifuge 4 KR, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland Ultrazentrifuge XL-70, Beckman Coulter, Fullerton, USA Micro Centrifuge SD, Roth, Karlsruhe, Deutschland
-------------	--

2.1.12 Software

Autoradiographie	Quantity One Software, Biorad, Hercules, USA
Datenverarbeitung	Windows Vista/7, MS Office, Word und Excel, Microsoft, Redmont, USA GraphPad Prism 4.0, GraphPad Software, La Jolla, USA
Durchflußzytometrie	FACSDiva™, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Grafikprogramme	Adobe Illustrator CS3 13.0.0, Adobe, San Jose, USA
Light Cycler	LightCycler® Software release 1.5.0 (Version 1.5.0.39), Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

2.1.13 Statistik

Alle statistischen Kalkulationen wurden mit GraphPad Prism 4.0 durchgeführt. Für die Ermittlung der Signifikanz wurde der ungepaarte zweiseitige Students T-Test verwendet. Signifikanzen werden als * ($p < 0,05$) = signifikant, ** ($p < 0,01$) = sehr signifikant und *** ($p < 0,001$) = hoch signifikant angegeben. Fehlerbalken werden in einfach durchgeführten Experimenten als \pm SD (*Standard deviation*) des Mittelwertes (MW) (mit n Wiederholungen) angegeben. Bei mehrfach wiederholten Experimenten (mit N unabhängigen Experimenten) wird der Fehler als \pm SEM (*Standard error mean*) des MW aus allen Experimenten angegeben.

2.2 Verwendete Lösungen und Puffer

<u>Church-Puffer:</u>	0.25 M Phosphat-Puffer (pH 7.2) 1mM EDTA 1% BSA 7% SDS
<u>DNA-Ladepuffer:</u>	50% Glycerin 1% SDS

	0.1M EDTA pH 7.8
	0.1% (w/v) Bromphenolblau
	0.1% (w/v) Xylencyanol
	in ddH ₂ O
<u>Kollagenlösung:</u>	0.2 mg/ml Kollagen in sterilem H ₂ O
<u>MACS Puffer:</u>	2 % FCS
	2.0 mM EDTA
	in PBS, pH 7.4
<u>PBS:</u>	140 mM NaCl
	3 mM KCl
	8 mM Na ₂ HPO ₄
	1mM KH ₂ PO ₄
	1mM MgCl ₂
	1mM CaCl ₂ , auf 1l ddH ₂ O auffüllen
	pH auf 7.4 einstellen
<u>PBS 0,05% Tween:</u>	1 Liter PBS
	0.5 ml Tween 20
<u>1x SSC:</u>	150 mM NaCl
	15 mM Na-Citrat
<u>TBE-Puffer:</u>	100 mM Tris-HCl pH 8.0
	83 mM Borsäure
	10 mM EDTA

2.3 Zellkulturmedien

Präperfusions Medium:

HBSS (Ca/Mg-frei)	500 ml Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
EGTA (100 mM)	2.5 ml Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Heparin (5000 U/ml)	1 ml Roche, Mannheim, Deutschland

Collagenase Medium:

Williams Medium E	250 ml Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
CaCl ₂ (1 M)	0.9 ml Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Gentamycin (10 mg/ml)	2.5 ml Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland

Collagenase TypIV (419 U/mg) 200 mg Lot 88H8620 Sigma, Deisenhofen,
Deutschland

Wasch Medium:

Williams Med E 500 ml Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
 *Glutamin (200 mM) 5.6 ml Biochrom AG, Berlin, Deutschland
 *Glucose (5%) 6 ml Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
 *Hepes (1M, pH 7.4) 11.5 ml Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
 *Pen/Strep (5000 U/ml) 5.6 ml Biochrom AG, Berlin, Deutschland

(*Die Lösungen wurden gemischt und bei -20°C als Prämix gelagert)

PHH Medium (Wasch-Medium mit folgenden Additiva):

Gentamycin (10 mg/ml) 1 ml Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
 Hydrocortison 0.5 ml Sigma, Deisenhofen, Deutschland
 Insulin 0.15 ml (10 x) Serva, Heidelberg, Germany
 DMSO (100%) 8.7 ml Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Inosine (25 mg/ml) 0.28 ml Serva, Heidelberg, Germany

Leukozyten Vollmedium

VLE RPMI 1640 Biochrom AG, Berlin, Deutschland
 Pen/Strep (5000 U/ml) 5.5 ml Biochrom AG, Berlin, Deutschland
 Fötale Kälberserum (FCS) 50 ml, HyClone, South Logan, USA

THP1 Medium (LeukozytenVollmedium mit folgenden Additiva):

25 mM 2-ME

HepG2/HEK-293 Vollmedium:

Dulbeccos MEM Gibco, BRL, Eggenstein, Deutschland
 Fötale Kälberserum (FCS) 50 ml, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
 Glutamin (200 mM) 5.5 ml Biochrom AG, Berlin, Deutschland
 Pen/Strep (5000 U/ml) 5.5 ml Biochrom AG, Berlin, Deutschland
 Nicht essentielle Aminosäuren 5.5 ml Biochrom AG, Berlin, Deutschland
 Natriumpyruvat 5.5 ml Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland

Williams Vollmedium

Williams Med E	500 ml Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS)	50 ml, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Glutamin (200 mM)	5.5 ml Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Pen/Strep (5000 U/ml)	5.5 ml Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Nicht essentielle Aminosäuren	5.5 ml Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Natriumpyruvat	5.5 ml Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland

293/TLR2 (Vollmedium mit folgenden Additiva):

Blasticidin	10 µg/ml
Hygrogold	50µg/ml

1:1 Medium (Produktionsmedium für HepG2.2.15):

- 1/2 Williams Vollmedium (10% FCS)
- 1/2 PHH-Medium

2.4 Zellbiologische Methoden**2.4.1 Etablierung von infektiösen HBV-Stocks und Negativ-Kontrollen****2.4.1.1 Aussäen und Kultivieren von HepG2.215 und HepG2 Zellen**

Der Boden der Zellkulturflaschen wird mit einer Kollagenlösung (10%, 0.2 mg/ml) bedeckt und für 1h bei 37°C inkubiert. Die Lösung wird abgenommen und die Zellkulturflaschen zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Bei einer Langzeitkultivierung der adhären HepG2.215 Zelllinie wird die Ausbildung eines Monolayers durch kollagenisierten Haftgrund begünstigt. Zellen der Linie HepG2.215 werden zunächst in 150 cm² kollagenisierten Zellkulturflaschen mit 20 ml HepG2 Medium kultiviert, bis die Zellen konfluent wachsen. Zur Optimierung der HBV Produktion der Zellen wird das Medium gegen 1:1 Medium gewechselt. HepG2 werden nach demselben Protokoll behandelt, um eine Negativ-Kontrolle für Inkubationsversuche mit HBV zu erhalten.

2.4.1.2 Konzentration von HBV aus dem Zellkulturmedium

Drei Tage nach dem Wechsel auf 1:1 Medium wird das gesamte Medium abgenommen und durch neues 1:1 Medium ersetzt. Das abgenommene Medium wird gesammelt und zum

Entfernen von Zellfragmenten bei 4000 g vier Minuten (min) lang zentrifugiert. Der gesammelte Überstand (ÜS) wird anschließend durch einen 0.22 µm MEP Filter (Millipore) steril in eine 500 ml Zellkulturflasche filtriert. Maximal 70 ml des HBV enthaltenden ÜS können auf die Centricons (Plus-70) aufgetragen werden (mit dem ÜS aus HepG2 wird ebenso verfahren). Um die Viruspartikel durch Ultrafiltration anzureichern wird mit 3500 g bei 4°C 30 min zentrifugiert. Ist nicht genug ÜS filtriert, kann die Zentrifugation verlängert werden, um eine ausreichende Anreicherung zu erlangen.

Ist die Konzentration abgeschlossen wird das filtrierte Medium verworfen. Die Kappe und die Säule mit dem konzentrierten Restmedium wird umgedreht und mit 1000 g eine min lang zentrifugiert, sodass sich das Konzentrat aus der Säule in der Kappe sammelt. Das HBV-Medium-Konzentrat wird in einem 50 ml Falcon Gefäß gesammelt, resuspendiert, und anschließend aliquotiert und gelagert. Die Aliquots werden mit 10% Glycerol (Endkonzentration) versetzt und bei -80°C eingefroren. Der Titer der Aliquots wurde wie unter 2.6.4 beschrieben bestimmt. Konzentrierte ÜS aus HepG2.215 werden in den Experimenten als HBV Inokulum bezeichnet, die ÜS aus HepG2, die als Negativ-Kontrolle dienen, als mock Inokulum.

2.4.2 Etablierung von rAAV Stocks, leeren AAV Kapsiden und Negativ-Kontrolle

Stocks von rAAV und leeren Kapsiden für die AAV Serotypen 2 und 8 sowie Negativ-Kontrollen wurden freundlicherweise von unserer Kolaborationspartnerin Marianna Hösel und Kollegen etabliert.

rAAV, leere Kapside und mock Kontrolle wurden in HEK293 Zellen mittels der Adenovirus-freien Produktionsmethode produziert [264], [265]. Für die Produktion von rAAV wurden die Plasmide pXX6-80 [264], pscAAV/EGFP [265] oder pscLuci, und pRC [265] oder pXR8 [266] benutzt. Leere Kapside wurden durch Transfektion mit pXX6-80 und pRC oder pXR8, während für die Produktion der mock Kontrolle pXX6-80 und pscLuci benutzt wurden.

2.4.3 Isolation und Kultivierung primärer Zellen

2.4.3.1 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

20 µl der Zellsuspension mit isolierten Zellen werden 1:1 (v/v) mit Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zellkammer ausgezählt. Tote Zellen werden blau angefärbt, da die

Plasmamembran für das Trypanblau durchlässig wird, lebende Zellen bleiben ungefärbt. Die Anzahl der Zellen wird wie folgt bestimmt:

$$\text{Lebende Zellen/ml} = n * Vf * 10^4$$

Mit

n = Mittelwert der Zellen aus 4 ausgezählten Quadraten

Vf = Verdünnungsfaktor der Zellen, in diesem Fall 2

2.4.3.2 Leberzell-Mischkulturen

Leberresektate werden direkt von Leberoperationen im Klinikum rechts der Isar bezogen. Die Experimente mit humanen Leberresektaten finden in Konsens mit dem Spender und dem lokalen Ethikkomitee statt.

Um Mischkulturen aus angereicherten Hepatozyten und NPC zu erhalten werden die Resektate nach folgendem Protokoll präpariert:

1. Die Präparation basiert auf einer Kollagenase-Perfusion, die um eine vorbereitende Präperfusion mit Calciumfreiem Medium erweitert wurde [267]. Diese Methode ist die Standardtechnik zur Gewinnung von PHH. Vor der Präparation werden Präperusions-Medium und Kollagenase-Medium auf 42°C, PHH-Medium auf 37°C erwärmt. Das Waschmedium wird auf 4°C abgekühlt. Unter der Sterilbank werden ein Wasserbad mit 42°C und die Perfusionspumpe vorbereitet.

Die vom Pathologen freigegebenen Resektate werden direkt präpariert, notfalls in sterilem PBS bei 4°C maximal fünf Stunden aufbewahrt. Unter der Sterilbank wird der Schlauch in die Pumpe eingelegt, das eine Ende in das Präperusionsmedium im Wasserbad gehängt und eine Braunüle auf das andere Ende gesetzt. Kleinere Gefäße des Leberresektats werden mit Histoacryl-Klebstoff verschlossen. Für eine optimale Perfusion wird darauf geachtet, dass die Braunüle in ein Gefäß eingeführt wird, durch die das Medium in möglichst viele Gefäße verteilt wird. Zu erkennen ist dies an einem gleichmäßigen „Pumpen“ des Resektats sowie dem Austritt von Blut und Medium aus verschiedenen Gefäßöffnungen. Eine effektive Perfusion kann zudem an einer Entfärbung des Resektats beobachtet werden. Der Katheder wird in einem passenden Blutgefäß mit Histoacryl-Klebstoff fixiert. Nach dem Aushärten des Klebstoffes wird das Resektat mit Präperusionsmediums durchspült (Durchflussrate 20 ml/min). Eine vollständige Durchspülung des Präperates ist essentiell für die Präparation. Aus dem

Leberstück austretendes Medium wird abgesaugt und verworfen. Nach 500 ml Präperfusionsmedium wird angefangen mit Kollagenase-Perfusionsmedium durchzuspülen. In den verbleibenden 100 ml Medium wird das Leberresektat mit einem Skalpell vorsichtig abgeschabt, sodass möglichst alle Hepatozyten den Gewebsverband verlassen.

2. Die Suspension wird durch zwei Lagen Gaze und durch einen Sterilfilter (70 µm) in 50 ml Falcon Gefäße filtriert. Verbleibendes Gewebe in der Gaze wird vorsichtig zerdrückt, um verbleibende Zellen zu gewinnen. Die Zellen werden für 5 min mit 400 rpm (50 g) bei 10°C zentrifugiert. Anschließend wird noch zweimal in 40 ml Waschmedium resuspendiert und zentrifugiert. Die ÜS dieser Schritte werden gesammelt und bei 4°C aufbewahrt.
3. Die mit 50 g abzentrifugierten Zellen sind zum größten Teil Hepatozyten. Diese werden nun ausgezählt und auf kollagenisierten Platten ausgesät. Das Medium (PHH 10% FCS) wird nach 3h vorsichtig gewechselt. Nach 24h wird das Medium durch PHH 5% FCS ersetzt und nach 48h durch serumfreies PHH Medium.
4. Die gesammelten ÜS werden nun mit 250 g zentrifugiert und vereinigt. In den ÜS befindet sich die Masse der NPC, welche sich mit 50 g nur schwer abzentrifugieren lassen. Die zusammengeführten Zellen werden gezählt und auf nicht-kollagenisierten Platten ausgesät. Die Medienwechsel werden exakt wie bei den Hepatozyten Mischkulturen beschrieben durchgeführt.

2.4.3.3 Hochreine humane Leberzellkulturen

Um humane Hepatozyten, KC und LSEC besser zu trennen wird das beschriebene Protokoll um einige Schritte erweitert:

1. Dieser Schritt bleibt unverändert, siehe 2.4.3.2, Schritt 1.
2. Die Suspension wird durch zwei Lagen Gaze und durch einen Sterilfilter (70 µm) in 50 ml Falcon Gefäße filtriert. Verbleibendes Gewebe wird mechanisch zerdrückt, um verbleibende Zellen zu gewinnen. Die Zellen werden für 5 min mit 400 rpm (50 g) bei 10°C zentrifugiert. Anschließend wird noch zweimal in 40 ml Waschmedium resuspendiert und zentrifugiert.
3. PHH werden durch dreimalige Zentrifugation und Waschschrte bei 50 g für 5 min angereichert, während der NPC enthaltende Überstand gesammelt und bei 4°C gehalten wird.

4. Die angereicherten PHH werden gezählt und verbleibende NPC durch Anwendung von CD11b und CD31 Magnetischen Beads unter Einhaltung des Herstellerprotokolls (Miltenyi Biotec) depletiert.
5. Der Durchfluss mit unmarkierten PHH wird aufgefangen und in kollagenisierten Platten ausgesät. Die positiv markierten NPC werden gesammelt und mit den unmarkierten NPC vereinigt.
6. Die gesammelten NPC in den Überständen werden durch wiederholte Zentrifugation bei 300 g für 10 min aufkonzentriert und das resultierende Pellet resuspendiert. Die Zellen werden zuletzt in 10 ml PBS aufgenommen und vorsichtig auf einen Gradienten aus 9% OptiPrep (in PBS) auf 16% OptiPrep geschichtet. Die Zentrifugation erfolgt mit 800 g für 25 min bei RT mit deaktivierter Bremse.
7. Die resultierende weisse Bande zwischen der 16% und 9% OptiPrep Phase, in der sich die KC und LSEC gesammelt haben, wird abgenommen und nach einem Waschschrift mit PBS in PHH Medium ohne FCS aufgenommen. Die Zellzahl wird bestimmt und die Zellen mit einer Dichte von 6×10^5 Zellen pro cm^2 ausgesät. Die Zellen werden bei 37°C für 45 min inkubiert um die Adhärenz der KC an die Plastikoberfläche zu erlauben. Nach 45 min wurden die Platten gründlich mit PBS gewaschen und der ÜS wieder gesammelt. Die gesammelten, nicht-adhärenen LSEC werden gesammelt, gezählt und anschliessend mit CD31 Magnetic Beads nach dem Herstellerprotokoll isoliert. Die Puffer werden neu, steril und Azid-frei angesetzt. Isolierte LSEC werden gezählt und auf kollagenisierten Platten mit einer Dichte von 1×10^5 pro cm^2 ausgesät.
8. Alle isolierten Zellpopulationen werden zunächst mit PHH Medium mit 10% FCS kultiviert. PHH erhalten einen Medium Wechsel nach 3h. Nach 24h werden alle Zellen mit PBS gewaschen und erhalten neues PHH Medium mit 5% FCS. Nach insgesamt 48h wird das Medium zu PHH Medium ohne FCS gewechselt, und die Experimente können durchgeführt werden.

2.4.3.4 Primäre humane Leukozyten aus Blut

Vorbereitend für jede Isolation humaner Zellen aus Blut werden die Peripheren Blut-Leukozyten (PBMC) über einen Biocoll Gradienten abgetrennt. 50 ml Reaktionsgefäße werden mit 10 ml PBS und 25 U/ml Heparin und 50 ml Gefäße mit 20 ml Biocoll Separation Reagent (Ficoll) vorbereitet. Von medizinisch geschultem Personal wird Spenderblut mit einer 50 ml Spritze an einer Armvene entnommen und direkt mit PBS/Heparin verdünnt. Die Endkonzentration des Heparins beträgt 5 U/ml und verhindert die Blutgerinnung. Maximal 30

ml verdünnten Blutes werden auf je einen Ficoll-Gradienten aufgeschichtet. Die Falcon Gefäße werden mit 2000 rpm bei RT für 20 min ohne Bremse zentrifugiert, wodurch sich die PBMC von den dichteren Erythrozyten trennen. Die PBMC sammeln sich als weiße Bande an, während sich die Erythrozyten am Boden akkumulieren. Danach werden die PBMC mit einer 10 ml Pipette vorsichtig in ein neues 50 ml Gefäß überführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Um Ficoll- und Serumreste zu entfernen wird die Suspension mit 300 g bei RT für 10 min zentrifugiert und der ÜS verworfen.

Weitere für die Experimente wichtige primäre Zellen, also plasmazytoide dendritische Zellen (pDC), B-Zellen, myeloide dendritische Zellen (mDC) und Monozyten, werden dem Herstellerprotokoll (Miltenyi Biotec) nach durch entsprechende Magnetic Beads isoliert. Die Reinheit der Aufreinigung wurde in meiner Diplomarbeit durch FACS Analyse bestätigt [268].

2.4.3.5 Differenzierung von pro-inflammatorischen M Φ aus Monozyten

Proinflammatorische humane Makrophagen (M1 M Φ) werden aus isolierten Monozyten differenziert, indem diese über 7 Tage mit Leukozyten Vollmedium unter Zugabe von 800 U/ml GM-CSF in Kultur gehalten werden [269]. Die Zellen werden nach Isolation mit einer Dichte von 1×10^5 pro cm^2 ausgesät, nach 3-4 Tagen wird frisches Medium zugeführt. In allen Experimenten mit M1 M Φ werden 24-Loch Zellkulturplatten verwendet, sodass in jedem Loch (bzw. Experimentansatz) $1,9 \times 10^5$ M1 M Φ kultiviert sind.

2.4.3.6 Differenzierung von THP-1 Zellen

THP-1 Zellen werden in THP-1 Medium kultiviert. Zur Differenzierung werden sie über 60h mit verschiedenen Konzentrationen PMA (2,5 bis 100 ng/ml) inkubiert. Nach 60h werden die adhärennten Zellen gewaschen und in neuem THP-1 Medium aufgenommen.

2.4.3.7 Kultivierung von HEK-293 und HEK-293/TLR2 Zellen

HEK-293 Zellen werden in Zellkulturflaschen mit Vollmedium kultiviert und erhalten 2 bis 3 mal pro Woche einen Mediumwechsel. Für Versuche werden sie mit einer Dichte von 1×10^5 pro cm^2 in Zellkulturplatten (12/24 Loch) ausgesät.

HEK-293/TLR2 Zellen werden ebenso kultiviert, erhalten jedoch nach 2 Passagen einen Mediumwechsel zu 293/TLR2 Vollmedium, wie vom Hersteller (Invivogen) empfohlen.

2.4.3.8 Isolation muriner MΦ

Zwei unterschiedliche Subpopulationen von murinen Makrophagen MΦ (C57BL/6) wurden freundlicherweise von Ronny Müller und Laura Helming präpariert. Knochenmarkständige MΦ (*Bone-marrow derived macrophages*, BMM) werden durch Isolation von Knochenmarks-Stammzellen gewonnen, indem diese mit murinem M-CSF über 7 Tage inkubiert werden. Thioglykolat-MΦ werden gewonnen, indem in Mäusen durch Injektion von Thioglykolat eine artifizielle Bauchhöhleninfektion induziert wird. Nach 3 Tagen können Thioglykolat-MΦ, welche einen pro-inflammatorischen Phänotyp haben, durch Ausspülen der Bauchhöhle gewonnen werden. Als Kultivierungsmedium wird in beiden Fällen Leukozyten-Vollmedium verwendet.

2.4.4 Infektionsversuche und Aktivitätstests

2.4.4.1 HBV-Infektion von PHH und NPC

Die Infektion von PHH mit HBV findet am 4. Tag nach dem Aussäen mit Polyethylenglykol 6000 (PEG) statt. Das PHH-Medium wird abgenommen, und steril filtriertes, HBV enthaltendes PHH-Medium (5% PEG) hinzu pipettiert. Die PHH wurden mit einer *multiplicity of infection* (MOI) = 100 Viren/Zelle infiziert. Nach 24h werden die HBV enthaltenden ÜS abgenommen und gegen frisches PHH-Medium ausgetauscht. Um nicht gebundene Virionen zu entfernen wird zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Zur Etablierung der HBV-Replikation werden die Zellen neun Tage lang kultiviert. Medien werden 72h und 216h (Tag 9) *post infection* (bzw. *incubation* im Falle von anderen Zellen) (p.i.) abgenommen und gewechselt.

2.4.4.2 Inkubation von Zellen mit HBV

Um eine Immunreaktion der Zellen mit mit HBV Partikeln zu untersuchen werden die isolierten Zellen in 24-Loch-Zellkulturplatten mit HBV-Inokulum oder isolierten HBV Partikeln inkubiert. Bei Leberzellen erfolgte dies an Tag 2 nach der Isolation, bei MΦ an Tag 7 des Differenzierungsprotokolls. Bei THP-1 Zellen ist der Zeitpunkt für die Inkubation 60h nach Differenzierung mit PMA, bei HEK-293 Zellen wenn diese konfluent sind.

Das Medium der Zellen wird abgenommen, die Zellen werden in Leukozyten Medium mit 5% FCS aufgenommen. Drei Stunden später werden die Zellen mit PBS gewaschen und in serumfreiem Leukozyten Medium aufgenommen, in dem auf die Versuche durchgeführt werden. Die Zellen werden mit einer MOI von 100 VP/Zelle (infektiöse Virale Partikel, gemessen an HBV-DNA) in Falle von HBV Stock und isolierten Virionen bzw. einer

multiplicity of particles (MOP) von 100 Partikeln/Zelle in Falle von Filamenten und SVP inkubiert. Aufgrund geringer Quantität und Anreicherung werden die Kapside mit einer MOI von 10 Kapsiden/Zelle inokuliert. Isoliertes HBe-Protein wird in einer Konzentration eingesetzt, welche der Konzentration von HBe-Protein in eingesetzten HBV Stocks entspricht. Anschließend werden die Zellen bei 37°C inkubiert.

2.4.4.3 Infektion mit AAV Partikeln

Die Titer der AAV Präparationen sowie die Infektionsversuche wurden freundlicherweise von unserer Kolaborationspartnerin Marianna Hösel sowie Kollegen durchgeführt. Die genomischen Partikel-Titer werden durch qPCR (Roche) bestimmt. Die Zellen werden mit rAAV Serotyp 2 und 8 mit den in den Versuchen angegebenen *genomic-particle-per cell* (GOI) Mengen inkubiert. Als Negativ-Kontrolle werden die Zellen mit mock-Inokulum inkubiert. Für den Vergleich von leeren Kapsiden mit rAAV werden äquivalente Mengen an Kapsiden verwendet.

2.4.4.4 Inkubation von Zellen mit Liganden für Mustererkennungsrezeptoren

Tabelle 1: Verwendete PRR-Liganden und deren finale Konzentration

Rezeptor	Ligand	Analogon	Finale Konzentration
TLR 1/2	Pam3CysSerLys4 (Pam3CSK4)	Imitiert den acylierten N-Terminus bakterieller Lipoproteine	0.5 µg/ml
TLR 2	Heat Killed <i>Listeria monocytogenes</i> (HKLM)	Durch Hitze getötete <i>Listeria monocytogenes</i> , ein Gram-positives Bakterium	100 Partikel pro Zelle bzw. 10 ⁸ Partikel/ml
TLR 3	Poly(I:C)	Synthetisches Analogon zu viraler dsRNA	2.0 µg/ml
TLR 4	Lipopolysaccharide (LPS)	Strukturkomponente der äusseren Zellwand Gram-negativer Bakterien (<i>E.coli</i>)	100 ng/ml
TLR 2/6	FSL-1	Synthetisches Lipoprotein, Teil von LP44 (<i>Mycoplasma salivarium</i>)	500 ng/ml
TLR 7	Imiquimod (R837)	Imidazoquinolin-amin Analogon zu Guanosin	2.5 µg/ml
TLR 8	ssRNA40	ssRNA Oligonucleotid mit GU-reicher Sequenz	2.5 µg/ml
TLR 9	CpG ODN 2395	Synthetische Oligonucleotide mit unmethylierten CpG Dinucleotiden	2.0 µM
Dectin-1	Curdlan	Beta-1,3-Glykan von <i>Alcaligenes faecalis</i>	500 ng/ml

Um die Aktivität der verschiedenen Rezeptoren und Signalwege nachzuweisen, und um eine Positivkontrolle durchzuführen, werden die Zellen mit Liganden inkubiert, welche Pathogenmuster (PAMP) imitieren und spezifisch Rezeptoren aktivieren. Fall nicht anders vermerkt wurden die Liganden immer mit der in Tab. 1 beschriebenen Finalen Konzentration eingesetzt. Vor der Addition der Liganden wird das Medium gewechselt. Die Liganden werden anschliessend den Zellen beigefügt und die Zellen werden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.4.4.5 Lagerung der abgenommenen Zellkulturmedien

Nach einer Inkubationszeit von 5 h bzw. 20h wird der ÜS abgenommen und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um tote Zellen und Zellfragmente zu entfernen, werden diese mit 300 g kurz abzentrifugiert. Die Medien werden in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C eingefroren.

2.4.5 Immunfärbung

Kultivierte Zellen können auf der Platte fixiert, gefärbt und untersucht werden. Alle Schritte werden auf dem Schwenker bei RT durchgeführt, wenn nicht anders beschrieben. Das Volumen an Puffer für die verschiedenen Waschschrte beträgt 500 µl.

Das Medium wird abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 3% Paraformaldehyd 10 min fixiert. Um ungebundenes Paraformaldehyd zu entfernen wird mit 50 mM Ammoniumchlorid 5 min lang gewaschen. Die Zellen werden anschließend mit PBS (0.5% Saponin) 10 min lang permeabilisiert und unspezifische Bindestellen für 1h mit 10% Ziegen Serum in PBS (0.1% Saponin) geblockt. Anschließend wird der Primär-Antikörper (CD68, 1:100; HepPar1 1:25) in PBS (0.1% Saponin) zugegeben und bis zu 2h bei RT oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Der Primärantikörper wird durch dreimaliges Waschen für 10 min mit PBS (0.1% Saponin) entfernt. Anschließend wird der Sekundär-Antikörper (Ziege Anti Maus Alexa 594, 1 µg/ml) für 30 min in PBS (0.1% Saponin) mit den fixierten Zellen inkubiert, wobei die Platte vor Licht geschützt wird. Für die letzten 10 min wird Dapi (1 mg/ml werden 1:200 verdünnt) beigefügt, um die Nukleus-DNA zu färben. Nach drei abschließenden Waschschrten mit PBS werden die Zellen mit Mowiol überschichtet und können unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

2.4.6 Aufnahme von acetyliertem Low-Density-Lipoprotein

Um die Homogenität der LSEC zu überprüfen, werden die Zellen mit Alexa Fluor[®] 488 acetyliertem Low-Density-Lipoprotein (acLDL) inkubiert. Hierbei handelt es sich um markierte, acetylierte Lipoproteine niedriger Dichte. Endothelzellen sowie Makrophagen nehmen acLDL über *Scavenger*-Rezeptoren auf [270], [271]. Da die KC bereits durch den Adhärenzschritt zuvor depletiert werden, handelt es sich bei den acLDL-positiven Zellen um Endothelzellen. AcLDL wird in einer Konzentration von 2.5 µg/ml mit den Zellen für 1h bei 37°C inkubiert [272]. Die Zellen werden anschließend dreimal mit PBS gewaschen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolation aus Zellen

2.5.1.1 RNA-Isolation mittels Trizol Reagenz

In jedem Versuchsansatz (Triplikate, je $1,9 \times 10^5$ Zellen) werden die Zellen mit 1 ml Trizol Reagenz 5 min bei RT lysiert. Die Zellysate werden in ein RNase-freies 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und nochmals resuspendiert. An diesem Punkt können die Zellen auch bei -80°C für 3 Monate weggefroren werden. Zu der Suspension werden 200 µl Chloroform pipettiert, kurz auf dem Vortexer geschüttelt, und 3 min bei RT inkubiert. Eine Zentrifugation mit 12000 g für 15 min bei 4°C trennt die Suspension in drei Phasen. Die obere, wässrige Phase mit der gelösten RNA wird vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 500 µl Isopropanol werden dazupipettiert und 10 min bei RT ruhen gelassen. Erneut wird mit 12000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, wodurch ausgefallene Salze und RNA am Boden der Reaktionsgefäße pelletieren. Der ÜS wird vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wird mit 7500 g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert und der ÜS abgenommen. Anschließend wird nochmals kurz abzentrifugiert, um auch den letzten Rest des ÜS abnehmen zu können. Die Reaktionsgefäße werden bis zu 5 min zum trocknen stehen gelassen. Die RNA wird nun in DEPC-H₂O aufgenommen, anschließend wird die RNA-Konzentration bestimmt und die RNA wird bei -80°C eingefroren, oder die cDNA-Synthese wird direkt durchgeführt.

2.5.1.2 RNA-Isolation mittels Peqlab Reagenz

Die RNA-Isolation wurde im Laufe der Arbeit optimiert, indem RNA mit dem Trifast

Reagenz der Firma Peqlab isoliert wurden. Hierbei werden 1.5 ml peqGOLD Phasetrap A Reaktionsgefäße verwendet, die durch eine Wachsschicht die Trennung von wässriger und organischer Phase erleichterten. Die Aufreinigung wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt, die vergleichbar zur Trizol Aufreinigung ist.

2.5.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgt photometrisch durch die Messung der Extinktion bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von DNA. Die Extinktion bei dieser Wellenlänge ist proportional zur DNA-Konzentration der Lösung.

Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz gilt:

$$E = \varepsilon * c * d \Leftrightarrow c = E / (\varepsilon * d)$$

E = Extinktion bei 260 nm

ε = Extinktionskoeffizient (1/mol * cm)

c = Konzentration der DNA (mol/l)

d = Schichtdicke (cm)

Die Bestimmung der Konzentration einer unbekanntenen DNA-Lösung erfolgt durch den NanoDrop nach folgender Formel:

$$c \text{ (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$c \text{ (nmol/}\mu\text{l)} = A_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor} / M_w * L$$

M_w = Molekulargewicht pro Basenpaar (660g/mol)

L = Länge der DNA in bp

Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA, 35 $\mu\text{g/ml}$ ssDNA und 40 $\mu\text{g/ml}$ reiner ssRNA. Außerdem lässt sich aus dem Verhältnis der Absorptionsmaxima von DNA und Protein zueinander der Reinheitsgrad der isolierten DNA ableiten, da bei 280 nm das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen. Die Extinktion von DNA-Verdünnungen (1:100) in H_2O wurde gegen H_2O als Referenz gemessen.

2.5.1.4 DNA Verdau in RNA Proben

Im Falle der RNA-Isolation mit Trizol können verbleibende genomische DNA-Fragmente nicht ausgeschlossen werden. Der Verdau verbleibender DNA in RNA-Isolaten wird mit dem Q1 RNase-Free DNase Kit von Promega nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.5.2 cDNA Synthese

Mit Hilfe der cDNA-Synthese ist es möglich, mRNA in cDNA umzuschreiben. In einem Mastermix sind eine reverse Transkriptase sowie verschiedene Hexamere als Primer enthalten, sodass eine Umschreibung aller Sequenzen gewährleistet ist. Die cDNA-Synthese erfolgt mit Hilfe des SuperScript III First Strand Synthesis SuperMix for qPCR der Firma Invitrogen nach Herstellerprotokoll.

2.5.3 Quantitative Light Cycler[®] Echtzeit-PCR (qPCR)

Bei dem Light Cycler 480 der Firma Roche Diagnostics handelt es sich um einen Thermocycler, der mit einem Fluorimeter kombiniert ist. Die Reaktionsansätze werden in speziell dafür gelieferte 96-Loch-Mikrotiterplatten pipettiert. Während der fortschreitenden PCR kann man den Verlauf der Reaktionen über ein Sensorgramm verfolgen. Die Intensität des Fluoreszenzsignals aller Proben wird am Ende jeder Elongationsphase bei einer vorher festgelegten Temperatur gemessen. Über die Änderung der Fluoreszenzintensität nach jedem Reaktionszyklus kann die Amplifikation eines Fragmentes in Echtzeit mitverfolgt werden. SYBR Green wird als Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, welches bevorzugt in die kleine Furche doppelsträngiger DNA (dsDNA) interkaliert, wodurch die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes ansteigt. Das Fluoreszenzsignal ist direkt proportional zur DNA Konzentration. SYBR Green absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 488nm und emittiert bei 530 nm.

Die anfänglich enthaltene Menge an Matrizen DNA wird durch die Bestimmung des „Crossing Point“ (CP) quantifiziert. Der CP definiert die Zyklusnummer, bei der gleiche Fluoreszenzintensitäten für alle Amplifikationen auftreten. Zur Bestimmung dieses Punkts muss man die Anzahl der Reaktionszyklen so wählen, daß die sigmoide Kurve der Fluoreszenzintensität von der exponentiellen in die Sättigungs- oder Plateauphase übergeht. Innerhalb des linearen Bereichs der logarithmischen Kurve, also dem Bereich in dem das Fluoreszenzsignal exponentiell steigt, wird eine Gerade gelegt. Der Punkt an dem diese Gerade die Grundlinie schneidet wird als CP bezeichnet. Um die Auswertung zu standardisieren, wurden die CP nicht manuell gewählt, sondern mittels der Light-Cycler[®] Software automatisch ermittelt. Die Spezifität der PCR wird durch die Analyse der

Schmelztemperatur des Produkts in einer Schmelzkurve überprüft. Hierfür wird die Temperatur schrittweise von 40 auf 90°C erhöht mit ständiger Überwachung der Fluoreszenz. Da beim Schmelzen der dsDNA der Fluoreszenzfarbstoff entlassen wird, entsteht ein produkttypischer Kurvenverlauf. Die Schmelztemperatur ist für jedes Produkt spezifisch und ergibt sich in Abhängigkeit der Fragmentlänge und des Gehalts an Guanin und Cytosin und im Vergleich mit einem definierten Standard kann die Identität des Amplifikats bestimmt werden.

Alle Materialien für die quantitative PCR (qPCR) wurden von Roche Diagnostics bezogen. Es wurde folgender Master Mix angefertigt und zu je 2 µl Matrizen DNA gegeben.

PCR-Ansatz:

Volumen	Reagenz
5 µl	LightCycler® 480 SYBR Green I Master
0,5 µl	forward Primer (20 µM)
0,5 µl	reverse Primer (20 µM)
2 µl	ddH ₂ O

Um Pipetierfehler zu minimieren und den Verbrauch an cDNA zu verringern wurde die cDNA oft 1:4 verdünnt und anschließend 4 µl eingesetzt, die das ddH₂O dann ersetzten. Im Reaktionsmastermix (LightCycler® 480 SYBR Green I Master) sind Taq-DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, MgCl₂, SYBR Green I und dNTPs enthalten. Für die Negativkontrollen wird statt 2 µl *template* DNA 2 µl Wasser verwendet.

Es wird folgendes Standardprogramm verwendet:

Programmdaten C3 für die Echtzeit PCR

1. Initiale Denaturierung	95°C	300 sec
2. Zyklische Denaturierung	95°C	15 sec
3. Primer Annealing	60°C	10 sec
4. Elongation	72°C	25 sec

Die Schritte 2. bis 4. wurden in 45 Zyklen wiederholt.

5. Schmelzkurve von 65°C auf 95°C mit einer Geschwindigkeit von 0,11°C/sec

6. Kühlen 40°C 30 sec

Für die Quantifizierung der HBV PCR wird folgendes Programm verwendet:

Programmdaten rc HBV für die Echtzeit PCR

1. Initiale Denaturierung	95°C	300 sec
2. Zyklische Denaturierung	95°C	15 sec
3. Primer Annealing	60°C	10 sec
4. Elongation	72°C	25 sec

Die Schritte 2. bis 4. wurden in 45 Zyklen wiederholt.

- Schmelzkurve von 65°C auf 95°C mit einer Geschwindigkeit von 0,11°C/sec
- Kühlen 40°C 30 sec

Für das Interferon α , β Response PCR Array wird folgendes Programm verwendet:

Programmdaten „RT² Profiler“ für die Echtzeit PCR

1. Initiale Denaturierung	95°C	600 sec
2. Zyklische Denaturierung	95°C	15 sec
3. Primer Annealing + Elongation	60°C	60 sec

Die Schritte 2. bis 3. werden in 45 Zyklen wiederholt.

- Schmelzkurve von 60°C auf 95°C mit einer Geschwindigkeit von 0,03°C/sec
- Kühlen 40°C 30 sec

<http://www.sabiosciences.com/manuals/RocheLC4801.2.9.11E.pdf>

Die Veränderung der Fluoreszenzintensität wurde jeweils am Ende der Elongationsphase gemessen und gespeichert. Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR werden immer relativ dargestellt.

Zielnukleinsäure

Referenznukleinsäure

Gründe hierfür sind z.B. Unterschiede der Anfangsmenge an RNA, Unterschiede der RNA Qualität durch Degradation, Effizienzvariationen in der cDNA Synthese und, bei den kleinen Volumen, auch Pipettierfehler. Als Referenznukleinsäure wird ein Housekeeping-Gen verwendet, dessen Expression immer unverändert sein sollte. Die Amplifikation der Zielnukleinsäure kann daher zur Referenznukleinsäure normalisiert werden.

Bei optimaler Effizienz wird eine Nukleinsäure einmal pro Zyklus amplifiziert:

$$N = N_0 \times 2^n$$

N = Anzahl der DNA Moleküle nach n Zyklen

N_0 = Anzahl der DNA Moleküle nach dem ersten Zyklus

n = Anzahl der Zyklen

In der Realität arbeitet eine PCR natürlich immer suboptimal, z.B. durch Konkurrenz von Primern und bereits amplifizierten Produkten, Bindung an gleiche Sequenzen, abnehmende Reagenzkonzentration, Enzyminstabilität und Produktinhibition. Auch in der Amplifikationseffizienz zwischen Ziel- und Referenznukleinsäure können Unterschiede auftreten. Dies kann durch unterschiedliche Effizienz der cDNA Synthese oder auch verschiedene Fragmentlängen auftreten.

Diese Faktoren können durch einen sogenannten Kalibrator wieder kompensiert werden. Er normalisiert Endresultate der PCR, indem er die Fehler der Amplifizierung von Ziel- und Referenznukleinsäure ausgleicht.

Normalisierter Quotient:

$$\frac{\text{Konz. Zielnukleinsäure (Probe)} \times \text{Konz. Zeilnukleinsäure (Kalibrator)}}{\text{Konz. Referenznukleinsäure (Probe)} \times \text{Konz. Referenznukleinsäure (Kalibrator)}}$$

Es werden immer mindestens 5 Kalibratorverdünnungen verwendet. Alle PCR Amplifikationen dieser Proben ergeben eine Standardkurve, der die Software automatisch einen Wert von 1 zuweist. Die Ergebnisse der Proben-PCR-Analysen werden zu diesem Wert in Relation gesetzt.

2.5.4 DNA-Isolation aus HBV Partikeln

Um den Titer der HBV-Stocks durch Real Time PCR zu überprüfen, wird virale DNA aus den abgenommenen und aufkonzentrierten Aliquots isoliert. Die Isolation wird mit dem QIAamp[®] MinElute[®] Virus Spin Kit (Qiagen) nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.5.5 Agarosegelelektrophorese DNA

Bei der Agarosegelelektrophorese werden Moleküle nach ihrer Ladung und Größe in einem Gel aufgetrennt. Die Ladung der Moleküle ist bei Nukleinsäuren proportional zum Molekulargewicht. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgt horizontal in 0.8 – 2.0 % Agarosegel in 1 x TBE. Zur Detektion der DNA wird das abgekühlte Gel direkt mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Endkonzentration) versetzt und nach der Polymerisation mit 1 x TBE als Laufpuffer überschichtet. Ethidiumbromid ist ein organischer Fluoreszenzfarbstoff, der aufgrund seiner planaren Struktur zwischen die Basenpaare von dsDNA interkaliert. Auch bei ssDNA und RNA kann der Farbstoff sich zwischen die Basenpaare einlagern, allerdings ist die Interkalation hier schwächer als bei dsDNA. Unter UV-Licht (254-366 nm) wird Ethidiumbromid angeregt und emittiert Licht im orange-roten Bereich (590 nm), wodurch die eingelagerte DNA sichtbar wird. Die Proben werden vor dem Auftragen mit DNA-Ladepuffer inkubiert. Zusätzlich zu den Proben wird in eine Geltasche 5µl eines Bandenmarkers zur späteren Identifikation der Bandengrößen aufgetragen. Die Auftrennung der Proben verläuft unter konstanter Spannung (50-120 V).

2.5.6 Dot-Blot Analyse (HBV DNA)

Bei einer Dot-Blot Analyse werden Mediumsüberstände oder Viruskonzentrate auf eine Trägermembran mittels einer Blotapparatur aufgetropft und immobilisiert. Mit diesem Verfahren können Nukleinsäuren über eine Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde und eines entsprechenden Standards quantifiziert werden. In dieser Arbeit werden mit Hilfe der Dot Blot Analyse die HBV Stock Konzentrate aus HepG2.215 Zellen untersucht. Für die Dot Blot Analyse werden 500 µl des ÜS zunächst für 3 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Die Trägermembran, in diesem Fall eine Nylonmembran, und ein gleichgroßes Watmanpapier werden vorher mit H₂O befeuchtet und in die Blotapparatur eingespannt. Anschließend wird der ÜS direkt in die vorgegebenen Auftrags-Kavitäten pipettiert. Über eine Vakuumpumpe werden nun die Probenvolumen mit identischen Querschnittsflächen auf die Trägermembran aufgetragen. Nach dem Durchsaugen der Proben wird die Membran noch einmal mit PBS gespült. Die Membran wird nun für 5 min auf ein mit 0,4M NaOH getränktes Watmanpapier gelegt, um die dsDNA zu denaturieren. Darauf folgt eine Inkubation für 5 min auf einem mit 2 x SSC getränktem Watmanpapier zur Neutralisation. Danach wird die Membran luftgetrocknet und mit UV-Licht mit 125 mJ/cm² „crossgelinkt“ (*cross-linking*), um die Nukleinsäuren für die nachfolgende Hybridisierung zu fixieren.

Die Markierung der DNA-Sonde erfolgt über ein Random-Priming mit radioaktiven, phosphatmarkierten desoxy-Cytosin-Tri-Phosphaten [$(\alpha^{32}\text{P})\text{dCTP}$]. Radioaktiv markiert ist bei diesem Verfahren die α -ständige Phosphatgruppe. Für das Random-Priming wird das Rediprime II DNA Labeling System der Firma Amersham verwendet. In dem Mastermix des Kits (dNTP, DNA-Polymerase, Mg^{2+}) wird 25 ng lineare, ds HBV-DNA (in einem Gesamtvolumen von 45 μl) pipettiert und für 5 min bei 100°C denaturiert. Die Lösung wird unmittelbar danach auf Eis inkubiert. Daraufhin werden 5 μl der Radioaktivität [$(\alpha^{32}\text{P})\text{dCTP}$] (entspricht 50 μCi) in den Ansatz gegeben und für ca. 10 min im Brutsschrank bei 37°C inkubiert.

Die zu hybridisierenden Membranen werden bei 65°C im Hybridisierungssofen mit einem Puffer zu Blockade unspezifischer Bindungen (Church-Puffer mit 50 μl [10 $\mu\text{g}/\text{ml}$] Heringssperma-DNA) inkubiert. Vor Gebrauch wird die Heringssperma-DNA und die radioaktive Sonde bei 100°C für 5 min denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 65°C. Nach der Hybridisierung folgen mehrere Waschschriffe, um überschüssige Sondenfragmente und unspezifisch gebundene Sonden von der Membran zu entfernen. Im ersten Waschschriff wird mit vorgewärmten 2 x SSC bei 65°C für 5 min gewaschen. Dieser Vorgang wird wiederholt. Im dritten Waschschriff wird mit 2 x SSC mit 0.1% SDS bei 65°C für 10 min gewaschen. Die gewaschenen Membranen werden bei RT getrocknet und in Haushaltsfolie eingeschweißt. Zum Nachweis der Radioaktivität stehen zwei Verfahren zur Verfügung. Die Membranen können zum einen in eine Entwicklungskassette unter einen Röntgenfilm gelegt werden oder zum anderen unter einem Phosphorscreen inkubiert werden, der über eine CCD-Kamera ausgelesen wird. Wurde ein Standard mitaufgetragen, können anhand der gemessenen Counts pro Fläche Konzentrationsbestimmungen vorgenommen werden.

Die Dot Blot Membran kann für eine erneute Hybridisierung gestrippt werden. Hierbei werden hybridisierte Sonden-Fragmente entfernt. Die Membran wird in eine Hybridisierungsröhre gegeben und mit einer 1:10 Verdünnung [50 mM] des zuvor auf 100°C erhitzten Phosphatpuffers für 5 min inkubiert. Anschließend erfolgt die erneute Hybridisierung mit radioaktiv markierter Sonde.

2.5.7 Überprüfung der Zellkulturen auf Mykoplasmen

Mykoplasmen richten am Anfang eines Befalls keinen erkennbaren Schaden an. Als erstes kann man bei einer Infektion beobachten, dass die Kulturen etwas langsamer wachsen. Lichtmikroskopisch sichtbar sind Infektionen mit Mykoplasmen nicht, da die Größe der

Prokaryonten unter der Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops liegen, die bei ca. 260 nm liegt. Es ist weder im Medium eine Trübung erkennbar noch ein sichtbarer pH-Umschlag ins saure Milieu, bei dem das Medium sich gelb verfärbt. Auch sind keine morphologischen Veränderungen an den Zellen zu beobachten. Die Mykoplasmen greifen vielfältig in den Stoffwechsel der befallenen Zellen ein und verändern damit das Wachstum und die Eigenschaften der Zellen. Für diese Arbeit entscheidend ist die Tatsache, dass außer HBV-Antigenen keine anderen Immunstimulanzien im Medium sein sollen, die evtl. eine PRR-Aktivierung verursachen könnten. Daher sollte eine Mykoplasmenkontamination unbedingt vermieden werden. Mykoplasmen sind omnipräsent, daher sind routinemäßig Tests der Kulturen durchzuführen, um gegebenenfalls bei einer Infektion größeren Befall im Zellkulturlabor unterbinden zu können.

Zur Überprüfung einer möglichen Mycoplasmeninfektion wird eine PCR durchgeführt, die spezifisch Mycoplasmen-DNA im Medium der Zellkultur nachweist. Für den PCR-Ansatz werden PuReTaq Ready-to-go PCR Beads der Firma Amersham Pharmacia (Buckinghamshire, England) verwendet, in denen Taq-DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, MgCl₂ und dNTPs enthalten sind. Zum Ansetzen des Master-Mixes werden nur noch Primer und ddH₂O benötigt. Die Ansätze müssen steril pipettiert werden, um eine Kontamination durch freie Mycoplasmen auszuschließen.

PCR Ansatz:

0,8 µl	forward Primer Myco 1
0,8 µl	reverse Primer Myco 2
22,4 µl	ddH ₂ O

100 µl Medium werden 5 min auf 100°C erhitzt, kurz mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und auf Eis überführt. Anschließend werden 2 µl des Mediums in einen PCR Ansatz überführt und vorsichtig gemischt. Zusätzlich wird eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle vorbereitet.

Programm für die PCR:

1. Initiale Denaturierung	94°C	2 min
2. Initiales Primer Annealing	57°C	2 min
3. Initiale Elongation	72°C	2 min
4. Zyklische Denaturierung	94°C	30 sec
5. Primer Annealing	57°C	1 min

6. Elongation	72°C	1 min
Die Schritte 4. bis 6. werden in 34 Zyklen wiederholt.		
7. Elongation	72°C	4 min

Die PCR-Produkte können nun, wie im folgenden Schritt beschrieben, auf ein Agarosegel aufgetragen werden und die Länge der Produkte kontrolliert werden. Mycoplasmen-DNA im Medium resultiert in einem etwa 270 bp langen Fragment.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Inflammatorische Zytokine im Zellkulturüberstand werden mittels ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) bestimmt [273]. ELISA sind kommerziell erhältlich und wurden den Herstellerprotokollen folgend eingesetzt.

2.6.2 Messung der HBV-Antigensekretion

Die Sekretion von HBs und HBe Antigen durch HBV-infizierte Zellen ist ein Marker für HBV Replikation. Desweiteren kann die Konzentration von subviralen Partikeln und HBe-Protein, z.B. in Fraktionen von Gradienten, so quantifiziert werden.

Zellkulturproben und Gradient-Fraktionen werden verdünnt auf antikörperbeschichtete ELISA-Platten aufgetragen und gesuchte Antigene werden mit spezifischen Antikörpern gemäß dem Herstellerprotokoll detektiert. Dies erfolgt mit dem diagnostischen ELISA-Kit Murex-HBsAg. Unter Verwendung eines definierten Standards kann die Menge an viralen Partikeln berechnet werden. Zusätzlich wird eine Quantifizierung der in Zellkulturüberstand und Gradient-Fraktionen enthaltenen HBeAg Mengen durch die Mitarbeiter der Diagnostik des Instituts für Virologie (TUM) vorgenommen.

2.6.3 Aufreinigung von HBV Partikeln

2.6.3.1 Anreicherung viraler Partikel durch Heparin-Affinitäts-Chromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen Bindung des zu isolierenden Moleküls an einen immobilisierten Liganden in einer Gelsäule. Die Elution erfolgt in der Regel über eine kompetitive Verdrängung, eine Konformationsänderung, eine Änderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke. Die Heparin-Affinitäts-Chromatographie wird benutzt, um L-Protein tragende virale Partikel (Virionen und filamentöse SVP) gegenüber sphärischen

Partikeln, Kapsiden und HBe-Protein anzureichern. Hierzu wird das Medium der HepG2.2.15 Zellen zunächst gesammelt wie beschrieben (Siehe 2.4.1).

Die Heparin-Affinitätschromatographie ist eine relativ neue Methode, bei der das L-Protein von dem Glukosamin Heparin gebunden wird [274]. Heparin ist in einer Gelmatrix immobilisiert, sodass Partikel mit L-Protein getrennt werden. Durch eine Änderung der Ionenstärke im Elutionspuffer werden die wieder von der Säulenmatrix gelöst.

Über einen Adapter kann die Heparinsäule mit einem Schlauch verbunden werden, wie er auch für die Leberperfusion verwendet wird. Die 1 ml Säule wird mit 10 ml 20% Ethanol sterilisiert, die Durchflussgeschwindigkeit bei diesem und den folgenden Schritten beträgt standartmäßig 1.3 ml/min. Anschließend wird die Säule mit 10 ml PHH Medium äquilibriert. Danach kann das gesammelte Medium durch die Säule gepumpt werden. Ist das gesammelte Volumen durchgelaufen, werden Säule und Schlauch für 10 min mit sterilem PBS gespült. Die Elution der affinen Viruspartikel erfolgt mit 20 ml Elutionspuffer.

HBV Partikel werden uns freundlicherweise auch von Caroline Gaehler und Stephan Urban zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um Virionen, Filamente, SVP und Kapside aus HepAd-38 Zellen. Bei dieser Aufreinigung wird HepAd-38 ÜS über Affinitätschromatographie an Heparin, Gelfiltration, erneute Heparin-Chromatographie und schließlich einen Sucrose-Dichtegradienten aufgereinigt.

2.6.3.2 Aufreinigung von HBV Partikeln mittels einem Saccharose-Dichtegradienten

Virionen und Subvirale Partikel unterscheiden sich in ihrer Dichte (Sphärische Partikel: 1.16 g/ml; Filamente: 1.18 g/ml; Virionen: 1.22 g/ml) und können deshalb durch isopyknische Zentrifugation schonend voneinander getrennt werden. In dieser Arbeit wird dafür ein Sacharose-Dichtegradienten verwendet, durch den filamentöse und verbleibende sphärische Partikel, welche etwa dieselbe Dichte haben, in weniger dichten Fraktionen aufkonzentrieren als die Virionen [275].

Aufgrund der hohen Viskosität der Saccharoselösung ist die Sedimentationsgeschwindigkeit verbleibender, kleinerer Proteine aus dem Überstandsmedium deutlich geringer als die der viralen Partikel (mit Ausnahme des HBe-Proteins), sodass diese von den langsamer sedimentierenden Proteinen abgetrennt werden (vgl. Svedberg-Gleichung).

$$v = \frac{d^2(\rho_p - \rho_m)g}{18 \eta}$$

Svedberg-Gleichung

v: Sedimentationsgeschwindigkeit; ρ_p und ρ_m : Dichte des Teilchens bzw. der Flüssigkeit;
 η : Viskosität des Mediums; d: Durchmesser des Teilchens

In Ultrazentrifugen-Röhrchen werden in folgender Reihenfolge 3.3 ml 60%, 50%, 40%, 30% sowie 20% Saccharose in PBS 1mM EGTA vorsichtig aufgetragen. Als letztes werden die 20 ml Elutionspuffer aufgetragen, die Röhrchen werden austariert und im SW-28 Rotator mit 25000 g bei 10°C für 24h zentrifugiert.

Nach 24h werden die Röhrchen der Ultrazentrifuge entnommen. Das Fraktionierungsgerät wird zunächst mit 70% Ethanol sterilisiert und anschließend mit 10 ml sterilem PBS durchgespült. Die Röhrchen werden nach einander eingespannt und einzeln jeweils 1.1 ml in 1.5 ml Reaktionsgefäße ausgetropft.

Aufgrund der Dichteverhältnisse wird die Anreicherung der Kapside in Fraktion 2 und 3, die der Virionen in den Fraktionen 6 und 7 erwartet, die der SVP in den Fraktionen 10 und 11 und die des HBe-Proteins in den obersten Fraktionen (persönliche Mitteilung K. Esser).

2.6.4 Titerbestimmung und Charakterisierung der HBV-Stocks

Zur Bestimmung des Titers im Medium der HepG2.215 Zellen müssen die infektiösen Virionen von den Kapsiden und freier DNA getrennt werden, da auf dem Dot-Blot HBV-DNA detektiert wird ohne zu unterscheiden, in welcher Form diese im ÜS der HepG2.215 vorliegt. Da deren quantitatives Verhältnis zueinander variieren kann werden die Partikel zwecks genauer Analyse durch einen Dichtegradienten getrennt.

Die Gradienten werden in SW-60 Röhrchen pipettiert, jeweils 500 μ l folgender Lösungen unterschiedlicher Dichte werden in dieser Reihenfolge übereinander pipettiert: 1.4 g/l CsCl, 1.3 g/l CsCl, 1.15 g/l CsCl und 20% Saccharose. Auf diesen Gradienten werden 50 μ l der einzelnen HBV-Stocks bzw. anderer Fraktionen aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgt über 24h bei 55000 rpm und der Gradient wird anschließend in Fraktionen von 75 μ l in 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgetropft (7 Tropfen in das erste Loch, danach immer 6 Tropfen). Die Fraktionen werden anschließend auf eine Membran geblottet und mittels radioaktiv markierter Sonden analysiert. Anhand der Dichte der CsCl Fraktion kann überprüft werden, welche HBV Partikel sich in den Fraktionen befinden [276]. Für die Titerbestimmung der HBV Inokula werden nur die infektiösen Virionen bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Isolation primärer humaner Leberzellen

3.1.1 Isolation und Identifizierung

Die Isolation und Kultivierung von primären humanen Hepatozyten (PHH)-Mischkulturen und Nicht-Parenchym Zellen (NPC) wurde mehrfach beschrieben und ist in unserem Labor etabliert [277]. Für die Bestimmung der an der Erkennung von HBV beteiligten Zelltypen und der Signalkaskade war es notwendig, die leberständigen Zellpopulationen hochrein zu kultivieren. Zu diesem Zweck wurde das etablierte Protokoll um einige Schritte erweitert (siehe 2.4.3.3). NPC wurden von den PHH mittels spezifischer AK depletiert und verbleibende PHH und Erythrozyten von den NPC durch einen Dichtegradienten getrennt. Kupffer Zellen (KC) konnten über M Φ -typische Plastikadhärenz und Leber-sinusoidale Endothelzellen (LSEC) mittels spezifischer AK isoliert werden. Zur Überprüfung der Homogenität der verschiedenen Kulturen wurden diese auf Morphologie, Expression bzw. Lokalisation von spezifischen Genen und deren Produkten, sowie Funktionalität untersucht.

Kennzeichen von PHH sind die Lokalisation des Rezeptors HepPar1 sowie die Synthese von Albumin [278], [279]. Die Lokalisation von HepPar1 auf den kultivierten Zellen wurde mit Immunfluoreszenz (IF) durch Konfokalmikroskopie nachgewiesen (Abb. 12 A).

Ein Kennzeichen von KC ist die starke Adhärenz an Plastik, die auch für ihre Isolation genutzt wurde [280], [281]. Als Zellen der myeloiden Linie exprimieren sie CD11b sowie den M Φ -Marker CD68 [282], [283]. Die Morphologie der Zellen sowie die Lokalisation von CD68 wurde durch IF Mikroskopie untersucht (Abb. 12 B).

LSEC exprimieren als Endothelzellen den Rezeptor CD31 und wurden über spezifische CD31 AK isoliert [284]. Endothelzellen nehmen des Weiteren acetyliertes Low-Density-Lipoprotein (acLDL) sehr schnell auf [285], [286]. Fluoreszenz-markiertes acLDL wurde über 30 min *in vitro* mit LSEC inkubiert und die Aufnahme der Partikel durch Fluoreszenz-Mikroskopie überprüft (Abb. 12 C).

Die mikroskopischen Untersuchungen belegten die Lokalisation von HepPar1 auf PHH und CD68 auf KC, sowie die Phagozytose von acLDL durch LSEC. Die PHH Morphologie konnte durch Phasenkontrastaufnahmen bestätigt werden (nicht gezeigt) [268].

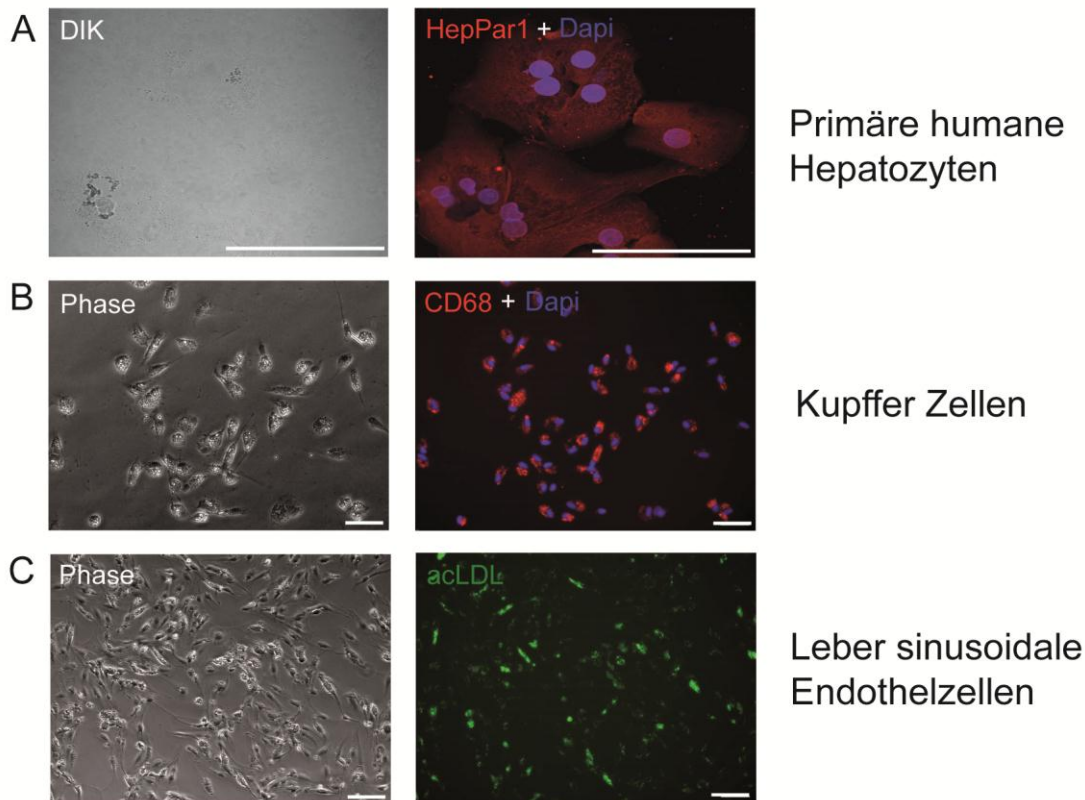


Abbildung 12: Identifizierung der isolierten humanen Leberzell-Populationen durch Morphologie, Immunfluoreszenz und Partikelaufnahme. 100µm Größenbalken, Dapi = Zellkerne. A) IF von fixierten, mit anti-HepPar1-AK markierten PHH, aufgenommen durch konfokale Mikroskopie. Links Differenzialinterferenzkontrast (DIK)-Aufnahme, rechts Fluoreszenz. B) IF von fixierten, mit anti-CD68-AK markierten KC, aufgenommen durch Phasenkontrastmikroskopie. Links Phasenkontrast, rechts Fluoreszenz. C) Aufnahme von acLDL (Alexa488) durch LSEC *in vitro* nach 30 min, aufgenommen durch Phasenkontrastmikroskopie. Links Phasenkontrast, rechts Fluoreszenz.

Des Weiteren wurde die Expression Zelltyp-spezifischer Gene, wie Albumin, CD11b und CD68, sowie L-SIGN, durch qPCR überprüft. Die Expression der Gene wurde unter den einzelnen Zellpopulationen verglichen (Abb. 13). Die Expression von Albumin in PHH wurde als mindestens 10-fach höher als in KC und LSEC gemessen. Die Expression von CD11b und CD68 konnte in PHH Kulturen nicht detektiert werden und war 10-fach bzw. 6-fach höher, wenn sie von KC zu LSEC verglichen wurde. Eine L-SIGN Expression konnte ebenso nicht in PHH detektiert werden, wurde jedoch 6-fach höher in LSEC als in KC gemessen.

Aus den dokumentierten Ergebnissen lässt sich schliessen, dass mittels eines neuen Protokolls in aufeinanderfolgenden Arbeitsschritten PHH, KC und LSEC hochrein aus einem Leberresektat isoliert werden konnten.

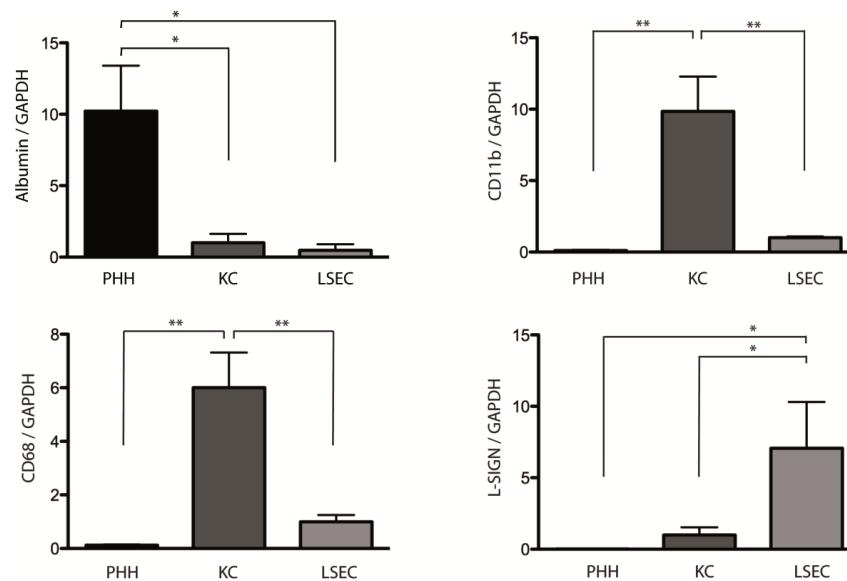


Abbildung 13: Expression ausgewählter Markergene in Leberzell-Kulturen. Albumin, CD11b, CD68 und L-SIGN Expression in isolierten Populationen, detektiert durch qPCR und normalisiert gegen GAPDH. Expression von Albumin und L-SIGN relativ zur Expression in KC, Expression von CD11b und CD68 relativ zur Expression in LSEC. PHH und KC je 5 Präparationen, LSEC 4 Präparationen, MW \pm SEM.

3.1.2 Charakterisierung der TLR in den Zellpopulationen

Unter den PRR sind die TLR am besten untersucht und beschrieben. Um einen ersten Einblick in die Rolle der verschiedenen Leberzelltypen im angeborenen Immunsystem zu erhalten, wurde die Expression der TLR sowie deren Funktionalität untersucht. Isolierte Leberzellen wurden an Tag 2 bzw. 3 in Kultur lysiert, aus der isolierten mRNA wurde cDNA synthetisiert und mittels qPCR quantifiziert. Als Vergleichswert für die Expressionslevel wurde parallel die mRNA von Leukozyten quantifiziert, für die TLR Expressionsmuster bereits beschrieben sind [287]. Diese Zellen dienten als Positivkontrolle für die Expression, und die Expression einzelner TLR in den Leberzellkulturen wurde in Relation zu den Positivkontroll-Zellen gesetzt. TLR 1, 2, 4, 5, 6 und 8 sind in Monozyten hoch exprimiert, weshalb die Expression dieser TLR in Leberzellen relativ zur Expression in Monozyten gesetzt wurde. Für TLR 3 und 10 wurde die Expression in mDC, für TLR 7 und 9 in pDC beschrieben, daher wurde mit diesen TLR wie beschrieben verfahren. Es zeigte sich eine sehr unterschiedliche Expression der verschiedenen TLR in den einzelnen Leberzellpopulationen (Abb. 14 A). Der dominante TLR war TLR 3, der in allen Populationen mindestens 4-fach höher exprimiert war als in mDC. PHH exprimierten fast ausschließlich TLR 3, KC und LSEC außerdem die TLR 1, 2, 4, 5, 6 und 8.

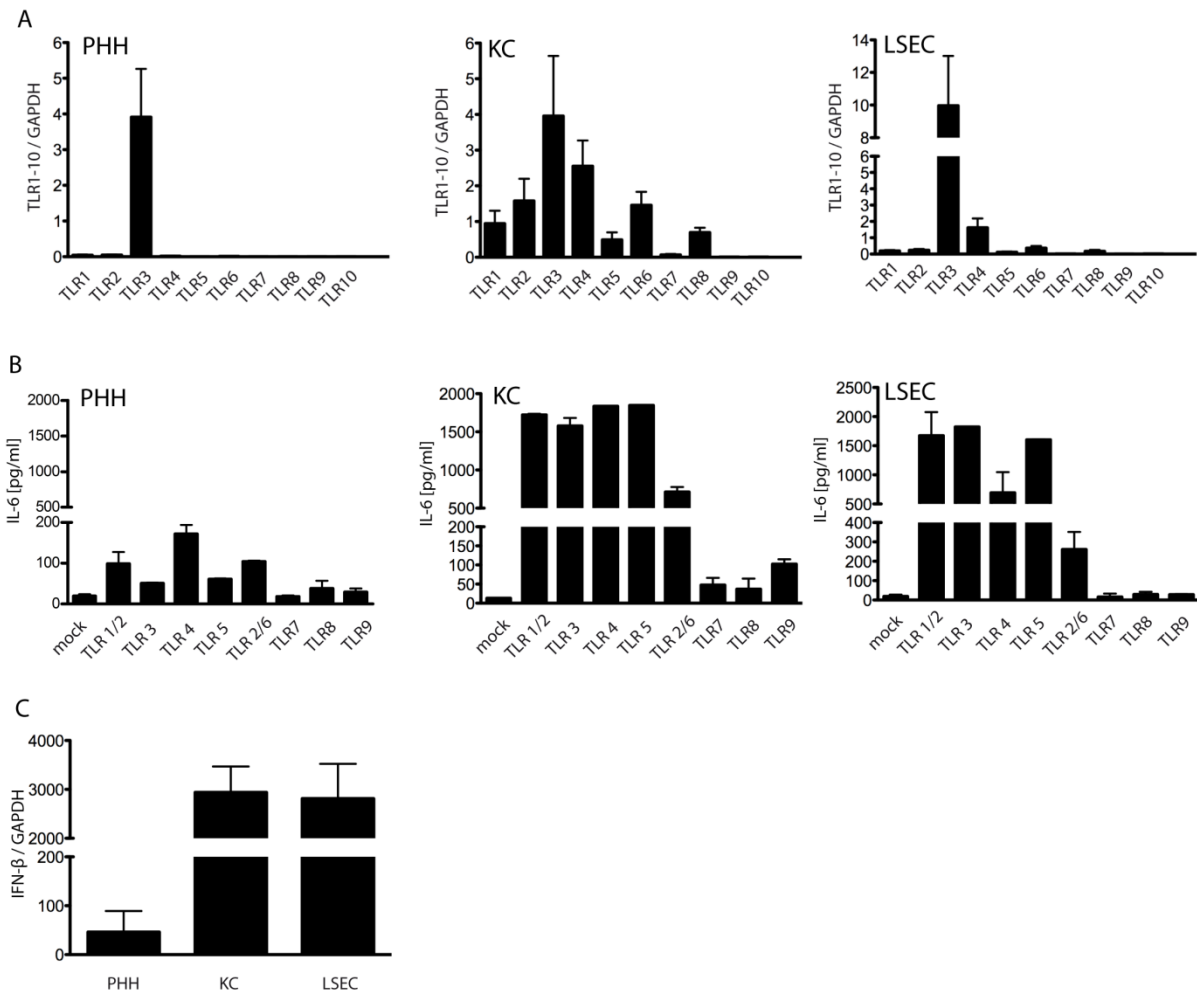


Abbildung 14: Expression und Funktionalität von TLR in isolierten Leberzell-Populationen.

A) TLR Expression wurde in PHH, KC und LSEC Kulturen durch qPCR quantifiziert und gegen GAPDH normalisiert. Die Expression wurde relativ zu Monozyten (TLR 1,2,4,5,6 und 8), mDC (TLR 3 und 10) und pDC (TLR 7 und 9) gesetzt. N=5, MW \pm SEM. B) Lebende Zellen wurden *in vitro* mit spezifischen Liganden stimuliert und die Rezeptor Funktionalität durch Messung von IL-6 im ÜS nach 20h (ELISA) überprüft. Duplikate n=2, MW \pm SD. C) Nach TLR 3 Stimulation mit Poly (I:C) wurde die IFN- β Induktion durch qPCR gemessen und gegen GAPDH normalisiert, die Werte sind relativ zur mock-Stimulation dargestellt. N=2, MW \pm SEM.

Um die korrekte Lokalisation der TLR sowie die Funktionalität der Signalkaskaden zu überprüfen wurden die Populationen mit spezifischen, kommerziell erwerblichen Liganden inkubiert. Die Konzentration der Liganden wurde entsprechend der gängigen Literatur gewählt, die Inkubation erfolgte über 20h (siehe Tab. 1). Eine Ligand-Bindung durch einen TLR, mit Ausnahme von TLR 3, führt zur Aktivierung von NF- κ B und zur Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, während eine TLR 3 Aktivierung zu einer Induktion von Typ-I IFN führt (siehe 1.4.1). Zur Überprüfung der NF- κ B Aktivierung wurde IL-6 im Überstand (ÜS) der Zellen gemessen (Abb. 14 B). Nach TLR 3 Stimulation wurde die Expression von IFN- β durch qPCR detektiert (Abb. 14 C). Für KC und LSEC konnte nach Stimulation der TLR 1 bis 6 eine größere Menge an IL-6 im Vergleich zur mock Kontrolle

gemessen werden. KC sekretierten außerdem minimale Mengen IL-6 nach Stimulation mit Liganden für TLR 7 bis 9. PHH sekretierten vergleichsweise geringe Mengen IL-6, und reagierten nur auf Liganden für TLR 1/2, 4 und 2/6 (Abb. 14 B). Alle drei Zellpopulationen induzierten IFN- β nach Inkubation mit dem TLR 3 Liganden Poly (I:C) (Abb. 14 C).

Die Ergebnisse zeigen, dass drei verschiedene Zellpopulationen, PHH, KC und LSEC, isoliert und kultiviert werden konnten. Diese konnten sowohl anhand ihrer Morphologie als auch spezifischer Rezeptoren und Funktionalität (Abb. 12) unterschieden und aufgrund der Expression spezifischer Markergene als hoch rein identifiziert werden (Abb. 13). Die einzelnen Populationen exprimierten ein Zelltyp-spezifisches Muster von TLR, welche im Fall der KC und LSEC auch alle funktional sind (Abb. 14 A, B). Passend zur niedrigen Expression resultierte die TLR Stimulation auf PHH in einer geringen Sekretion von IL-6. Interessanterweise war auch die Induktion von IFN- β nach Stimulation mit Poly (I:C) geringer als in KC, obwohl das Expressionsniveau vergleichbar war (Abb. 14 C).

3.2 Erkennung von Viren in Leberzellen

Anhand der etablierten Protokolle bestand die Möglichkeit, gemischte Kulturen von PHH und NPC sowie hochreine Kulturen von PHH, KC und LSEC mit viralen Antigenen zu inkubieren. Die Induktion von Zytokinen sollte einen Einblick verschaffen, ob es zu einer Erkennung und einer Aktivierung von Signalkaskaden kommt. HBV infiziert spezifisch die Leber, weshalb eine mögliche Aktivierung der angeborenen Immunantwort in Leberzellen untersucht werden sollte. AAV werden als Vektoren für Leber-dirigierte Gen-Therapien verwendet, deren Effizienz unter der T-Zell Antwort gegen das AAV Kapsid leidet. Da die adaptive Immunantwort gegen ein Antigen stark von einer Aktivierung durch das angeborene Immunsystem abhängt, sollte auch die Erkennung von AAV in Leberzellpopulationen untersucht werden.

3.2.1 Erkennung von HBV

Die Frage, ob HBV von der angeborenen Immunabwehr erkannt wird, ist in der Literatur umstritten. Um zu überprüfen ob HBV von kultivierten Leberzellen überhaupt erkannt werden kann, wurden Mischpopulationen aus angereicherten PHH, den Zielzellen des HBV, und angereicherten NPC wie beschrieben kultiviert (siehe 2.4.3.2). Drei Tage nach Isolation wurden die Populationen mit einem HBV Inokulum, der alle potenziellen Antigene (Virionen, SVP, Kapside, HBe-Protein) enthält, inkubiert. Die Kulturen wurden 24h mit einer MOI von 100 infektiösen Viruspartikeln (VP) pro Zielzelle inkubiert (Falls nicht anders hervorgehoben,

so wurde immer ein HBV Inokulum mit einer MOI von 100 VP/Zelle sowie ein mock Inokulum als Negativ-Kontrolle eingesetzt (siehe 2.4.1, 2.4.4.2 und 2.6.4)). Anschließend wurden ÜS abgenommen und die Zellen für eine RNA-Präparation lysiert. Die ÜS wurden freundlicherweise mittels Multi-Plex Cytokine Arrays von Christine Falk analysiert (Abb. 15). Die gemessenen Zytokine sind als Δ [pg/ml] dargestellt, wobei die in der mock Kontrolle gemessenen Zytokine von den durch HBV induzierten abgezogen wurden. HBV induzierte IL-6, IL-8 und TNF α deutlich über dem Niveau der mock Kontrolle. Für IL-8 wurde eine starke Hintergrundsekretion gemessen, weshalb in der gewählten Δ [pg/ml] Darstellung kein IL-8 bei NPC dargestellt wird.

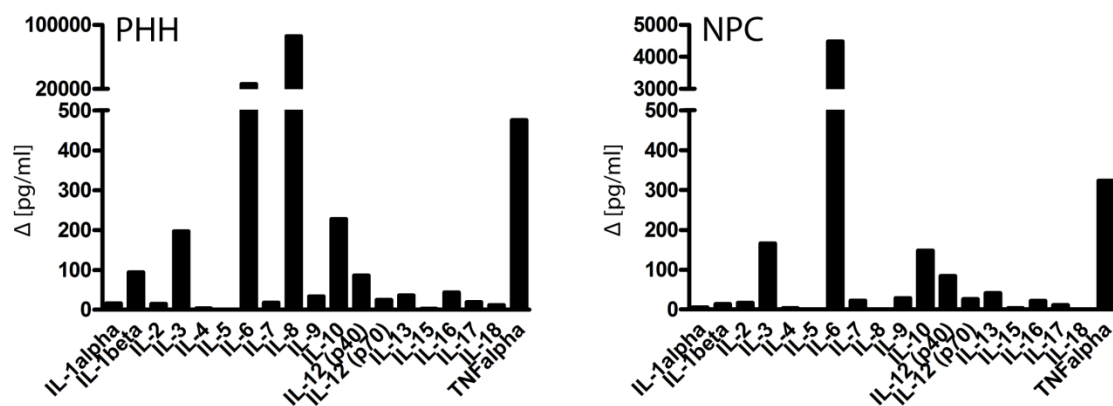


Abbildung 15: Sekretion von Zytokinen nach Inkubation mit HBV. Angereicherte PHH und NPC wurden 24h mit HBV Inokulum inkubiert. MOI = 100 VP/Zelle. Induzierte Zytokine wurden mittels Multi-Plex Cytokine Arrays gemessen und sind als Δ der mock Kontrolle gegen HBV dargestellt.

Um ein komplettes Bild der induzierten Immunantwort zu erhalten, wurde die mögliche Induktion von Typ-I IFN untersucht. Dafür wurde ein RT² Profiler PCR Array für Typ-I IFN und IFN-induzierte Gene verwendet. Die Veränderung der mRNA Expression in mit HBV inkubierten Kulturen wurde relativ zu Kulturen gemessen, die mit einem mock Inokulum inkubiert wurden, und in Tab. 2 dargestellt. Weder für Typ-I IFN noch für Moleküle der IFN-Signalkaskade konnte eine Induktion durch HBV auf mRNA Ebene festgestellt werden.

Tabelle 2: Veränderung der Gen-Expression verschiedener Typ-I IFN und IFN-abhängiger Gene durch HBV in angereicherten PHH und NPC Kulturen.

Funktionale Gen-Gruppen	Gen	Beschreibung	ID	Veränderung der Gen-Expression, HBV vs. mock	
				PHH	NPC
Liganden und Rezeptoren	IFNA1	Interferon, alpha 1	NM_024013	n.d.	n.d.
	IFNA2	Interferon, alpha 2	NM_000605	n.d.	n.d.
	IFNA4	Interferon, alpha 4	NM_021068	n.d.	n.d.
	IFNAR1	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1	NM_000629	1.1	1.0
	IFNAR2	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 2	NM_000874	0.9	1.0
	IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast	NM_002176	0.3	n.d.
Weiterleitende Moleküle	IRF3	Interferon regulatory factor 3	NM_001571	1.1	1.0
	IRF7	Interferon regulatory factor 7	NM_001572	0.5	1.4
	IRF9	Interferon regulatory factor 9	NM_006084	0.4	0.9
	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	NM_007315	0.8	0.7
	STAT2	Signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa	NM_005419	0.6	1.2
Auf IFN reagierende Gene	ADAR	Adenosine deaminase, RNA-specific	NM_001111	0.5	0.7
	ANXA11	Annexin A11	NM_001157	0.9	0.8
	CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	NM_033292	1.4	2.9
	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	NM_001565	0.2	1.3
	EIF2AK2	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	NM_002759	0.4	1.0
	GBP1	Guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	NM_002053	1.1	0.9
	GBP2	Guanylate binding protein 2, interferon-inducible	NM_004120	2.1	0.9
	IFI16	Interferon, gamma-inducible protein 16	NM_005531	0.4	0.5
	IRF1	Interferon regulatory factor 1	NM_002198	1.2	1.3
	IRF9	Interferon regulatory factor 9	NM_006084	0.4	0.9
	MX1	Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	NM_002462	0.2	0.9
	MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)	NM_002468	0.6	1.1
	NMI	N-myc (and STAT) interactor	NM_004688	0.9	0.6
	OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	NM_002534	0.2	0.5
	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	NM_002535	0.2	1.0
	PRKRA	Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator	NM_003690	1.0	0.9
	PSME2	Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)	NM_002818	1.4	1.2
	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	NM_007315	0.8	0.7
	TAP1	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	NM_000593	0.9	1.6
	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	NM_003810	0.9	0.7
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	NM_003300	0.9	1.2	

Die Experimente mit primären Mischkulturen gaben einen Überblick über die durch HBV induzierten Zytokine. Um eine präzisere Aussage über die Art der HBV Erkennung machen zu können, wurden nun hochreine Kulturen von PHH, KC und LSEC mit HBV inkubiert. Zusätzlich wurden HBV Aliquots mit 100 mJ UV-Licht behandelt, um zu untersuchen, ob die Zytokininduktion Abhängig von der Replikationsfähigkeit des Virus war. Dafür wurden die Zellen zwei Tage nach Isolation unter serumfreien Konditionen mit HBV Inokulum inkubiert. ÜS wurden 5 und 20h *post incubation* (p.i.) abgenommen und mRNA nach 20h für die qPCR Analyse isoliert. Die Sekretion von IL-6, TNF α und IL-1 β wurde durch ELISA bestimmt. In KC und LSEC konnte nach 20h nur IL-6 detektiert werden, wobei die Sekretion durch die UV Behandlung minimal beeinflusst wurde (Abb. 16, A). HBV induzierte interessanterweise kein IL-6 in PHH. Die Induktion von IFN- β wurde mittels qPCR untersucht. Während in allen Kulturen durch die Positiv-Kontrolle Poly (I:C) die Expression von IFN- β induziert wurde, konnte keine IFN- β Induktion durch HBV detektiert werden (Abb. 16, B).

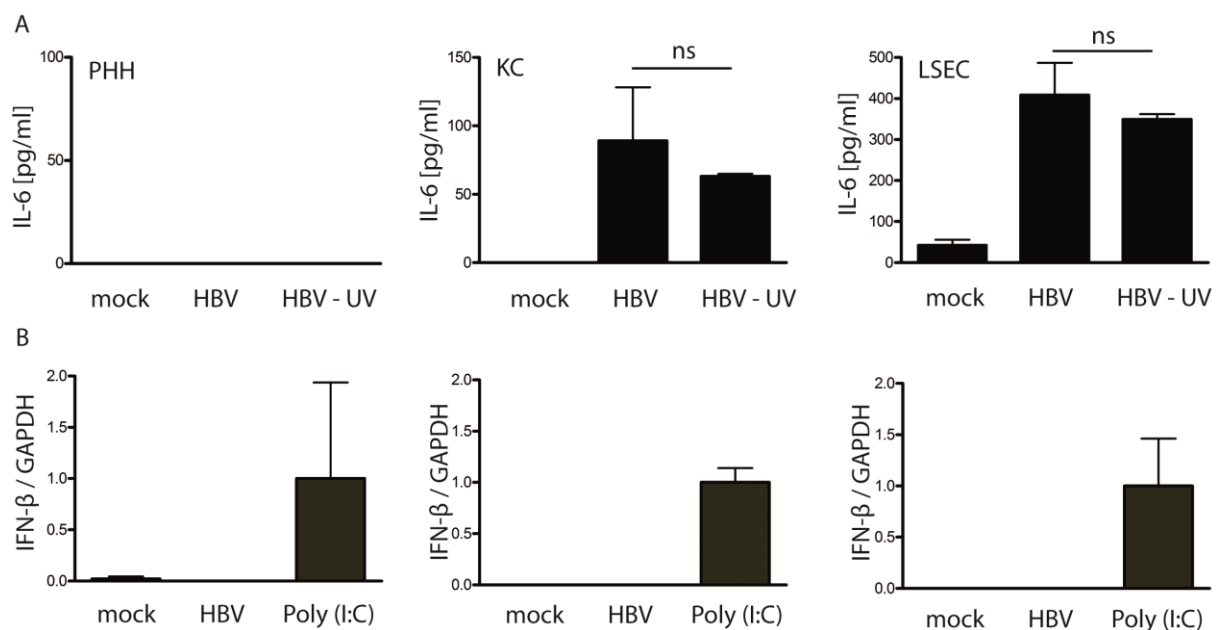


Abbildung 16: Induktion von Zytokinen durch HBV in humanen Leberzellen. PHH, KC und LSEC ($1,0 \times 10^5$ Zellen pro cm^2) wurden über 20h mit HBV Inokulum inkubiert. MOI = 100 VP/Zelle. UV = 100 mJ. A) IL-6 im ÜS, gemessen durch ELISA nach 20h. PHH und KC Triplikate n=3, LSEC Duplikate n=2. MW \pm SD. B) Induktion von IFN- β mRNA, gemessen durch qPCR nach 20h, normalisiert gegen GAPDH und relativ zur Poly (I:C) Kontrolle. KC und LSEC N=3, PHH N=2. MW \pm SEM.

Des Weiteren konnte kein prozessiertes IL-1 β im ÜS, aber eine Induktion von IL-1 β mRNA in KC und LSEC detektiert werden (Abb. 17). Dies weist darauf hin, dass Pro-IL-1 β zwar durch aktives NF- κ B transkribiert wurde, jedoch keine Aktivierung des Inflammasoms erfolgte (siehe 1.4.1 und 1.4.4).

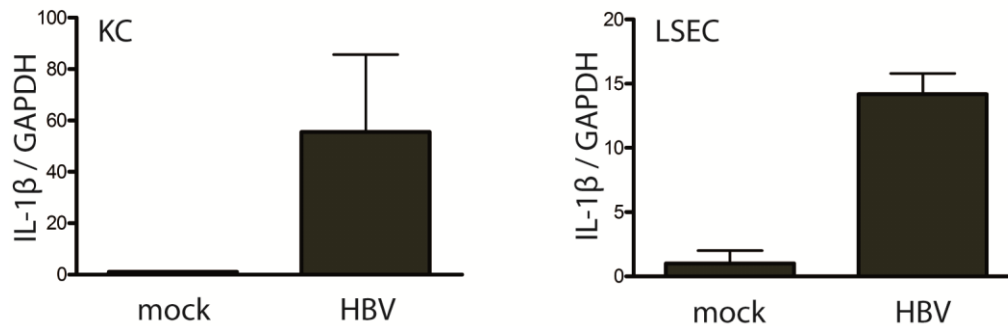


Abbildung 17: Induktion von IL-1 β mRNA durch HBV in KC und LSEC. KC und LSEC wurden mit HBV Inokulum über 20h inkubiert. MOI = 100 VP/Zelle. IL-1 β Expression wurde mittels qPCR gemessen, zu GAPDH normalisiert und relativ zur mock Kontrolle dargestellt, gemessen durch qPCR. N=3, MW \pm SEM.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus aufgereinigten Leberzellen, dass HBV in KC und LSEC, nicht jedoch in PHH, die Sekretion von IL-6 induziert. Die Transkription von IFN- β wird nicht induziert, was eine Beteiligung von RLR sowie zytosolischer DNA-Rezeptoren bei der Erkennung ausschließt (siehe 1.4.3). Weiterhin wurde eine Transkription von IL-1 β , jedoch keine Prozessierung des Proteins detektiert, was eine Beteiligung der NLR unwahrscheinlich macht (siehe 1.4.4).

3.2.2 Erkennung von AAV

AAV sind Kandidaten für Leber-spezifische Gentherapien. Um zu untersuchen ob AAV dabei eine angeborene Immunantwort in Leberzellen auslöst wurden Leberzellpopulationen mit AAV2 und AAV8 inkubiert. PHH, KC und LSEC wurden nach dem beschriebenen Protokoll isoliert und mit rAAV mit einer GOI (Genomische Partikel pro Zelle, *genomic-particle-per cell*) von 10^5 transduziert oder mit einer äquivalenten Menge leerer Kapside inkubiert. Als Positiv-Kontrolle wurden *E.coli*-Partikel verwendet, die TLR 4 aktivieren, sowie CpG ODN2395 mit einer Konzentration von 5 μ M. In PHH konnten nach 6h weder IL-8 noch TNF α detektiert werden (Daten nicht gezeigt), in KC und LSEC wurde IL-8 nach Inkubation sowohl mit rAAV als auch mit leeren Kapsiden detektiert (Abb. 18). Leere AAV Kapside und komplette rAAV induzierten in den einzelnen Zellepopulationen vergleichbare Zytokinsekretionen.

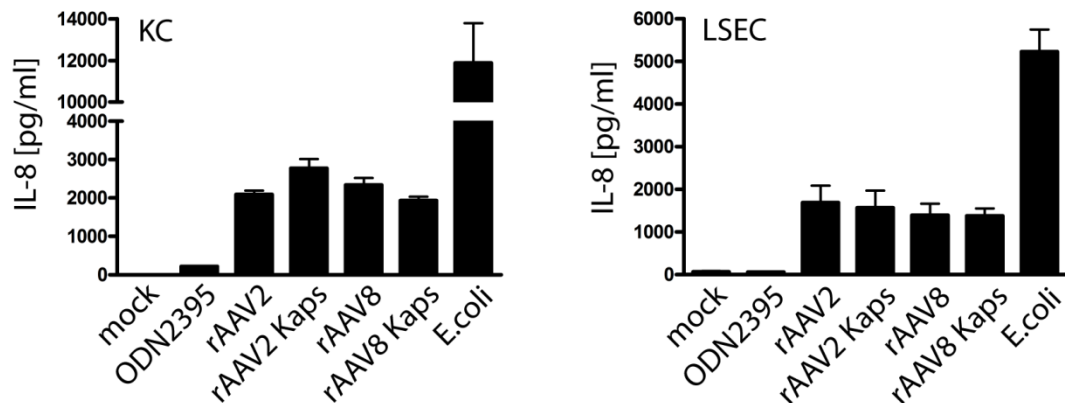


Abbildung 18: Sekretion von IL-8 in KC und LSEC nach Inkubation mit rAAV. 3×10^5 KC und 7×10^5 LSEC wurden 6h mit AAV bzw. einer äquivalenten Zahl leerer Kapside (Kaps) inkubiert. $GOI = 10^5$. IL-8 im ÜS von KC und LSEC 6h nach Inkubation mit rAAV bzw. Kapsiden des Genotyps AAV2 und AAV8, gemessen durch ELISA. ODN2395 [5 μ M], E.coli [100 Partikel pro Zelle] und mock Inokulum wurden als Kontrollen verwendet. Triplikate $n=3$, $MW \pm SD$.

Die Ergebnisse zeigen, dass komplettes AAV und leere Kapside, vergleichbar zu HBV, in KC und LSEC pro-inflammatorische Zytokine induzieren. Die Erkennung ist unabhängig vom Genotyp der AAV sowie von der AAV DNA.

3.3 Beteiligung von TLR und CLR an der Erkennung viraler Partikel

Primäre Leberzellkulturen sind ein wertvolles, aber auch kompliziertes Modell. Versuchsaufbau und Reproduzierbarkeit leiden unter der nicht planbaren Verfügbarkeit, der schlecht kalkulierbaren Quantität der Zellausbeute und den unterschiedlichen medizinischen Vorgeschichten der Spender. Es fehlen zudem die Möglichkeiten der genetischen Manipulation sowie etablierter siRNA Protokolle. Aus genannten Gründen wurden weitere Zelltypen auf ihre Immunantwort auf HBV untersucht, um die Möglichkeiten der Analyse zu erweitern.

Die Erkennung von rekombinanten HBV Kapsiden wurde für THP-1 Zellen, eine Monozyten-Zelllinie die zu $M\Phi$ differenziert werden kann, beschrieben [166], [263]. Um eine Zelllinie für die Versuche zu etablieren und zu überprüfen, ob die gemessenen Zytokine eine Immunantwort auf die in den HBV Stocks vorkommenden Kapside waren, wurden THP-1 Zellen mit dem publizierten Protokoll zu adhärenen $M\Phi$ differenziert [166]. Zusätzlich zu dem Protokoll mit 100 ng/ml PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) über 60h wurden zwei

weitere Protokolle mit 10 und 2,5 ng/ml getestet, da PMA selbst die Zellen aktivieren und eine Expression von Zytokinen induzieren kann [288].

Die differenzierten THP-1 wurden mit einem HBV Inokulum sowie einer mock und LPS Kontrolle über 20h inkubiert. Die ÜS wurden nach 5 und 20h abgenommen und analysiert. In keinem Versuchsansatz induzierte HBV IL-6, seltsamerweise wurde nach einer Differenzierung mit 2,5 ng/ml PMA eine starke Hintergrundaktivierung der Zellen sogar durch das HBV Inokulum inhibiert (Abb. 19). Aus diesem Grund wurde der Versuchsansatz mit THP-1 Zellen verworfen.

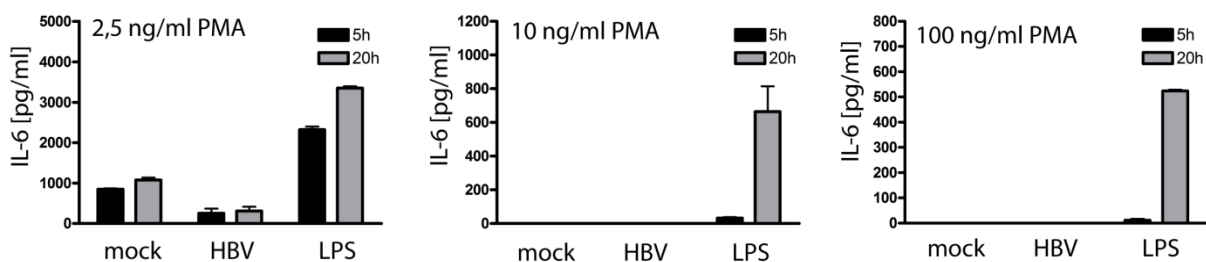


Abbildung 19: IL-6 im ÜS von differenzierten THP-1 Zellen nach Inkubation mit HBV. 2×10^5 THP-1 Zellen pro Ansatz wurden über 60h mit der angegebenen Konzentration von PMA differenziert. Nach Differenzierung wurden die Zellen mit einem HBV Inokulum inkubiert (MOI = 100 VP/Zelle). Ein mock Inokulum diente als Negativ-Kontrolle. ÜS wurden nach 5 und 20h abgenommen und IL-6 durch ELISA bestimmt. Duplikate $n=2$, MW \pm SD.

Um ein anderes, leicht verfügbares Modell zu etablieren, das die Möglichkeit zur Manipulation bietet, wurden Versuche mit primären humanen M Φ und murinen M Φ unternommen. Humane M Φ können aus Monozyten differenziert werden, die aus Blut isoliert wurden. Über 7 Tage können diese in Leukozyten-Vollmedium entweder mit GM-CSF zu M1 pro-inflammatorischen M Φ (Abb. 20, A) oder mit M-CSF zu M2 anti-inflammatorischen M Φ differenziert werden [126]. Murine M Φ wurden freundlicherweise von Kollegen aus der Mikrobiologie, Laura Helming und Ronny Müller, zur Verfügung gestellt. Zwei Modelle waren etabliert: Knochenmark-stämmige M Φ (*Bone marrow derived macrophages*, BMM) und Thioglykolat induzierte M Φ (TM) (Abb. 20, A) [289], [290].

Humane M Φ wurden nach 7 Tagen Differenzierung unter serumfreien Konditionen mit HBV Inokulum über 20h inkubiert (M Φ wurden immer mit einer Dichte von $1,0 \times 10^5$ M Φ pro cm^2 eingesetzt, also $1,9 \times 10^5$ M Φ pro Einzelansatz (siehe 2.4.3.5)). Die Sekretion und Expression von IL-6 wurde mittels ELISA und qPCR analysiert. Vergleichbar mit KC und LSEC induzierte das HBV Inokulum in M1 M Φ die Sekretion und Expression von IL-6 (Abb. 20, B und C). Eine Vorbehandlung der HBV Inokula mit 100 mJ UV-Licht bewirkte keine

signifikante Veränderung dieser Induktion. Die Ergebnisse in Versuchsansätzen mit M2 MΦ waren vergleichbar, weshalb die Daten hier nicht zusätzlich gezeigt werden.

Murine MΦ wurden ebenfalls mit HBV Inokulum inkubiert. Im Gegensatz zu humanen MΦ konnte keine Sekretion oder Expression von murinem IL-6 detektiert werden, obwohl eine klare Induktion durch die Positiv-Kontrolle LPS gemessen wurde (Abb. 20, B und C).

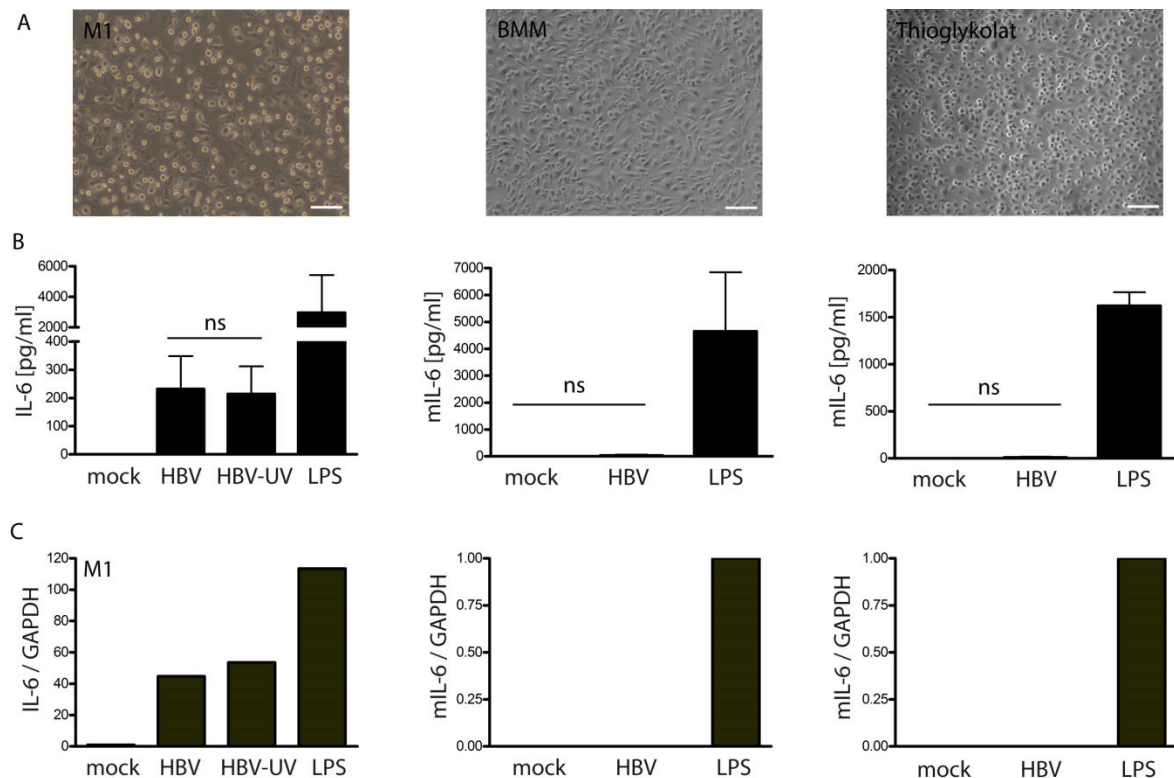


Abbildung 20: Erkennung von HBV durch humane und murine MΦ. Die verschiedenen MΦ wurden nach beschriebenen Protokollen differenziert. Pro Ansatz wurden $1,0 \times 10^5$ MΦ pro cm^2 ausgesät. A) Mikroskopische Phasenkontrastaufnahme von humanen M1 MΦ sowie murinen BMM und Thioglykolat MΦ. 100 μm Größenbalken. B) Die verschiedenen MΦ wurden mit einem HBV Inokulum über 20h inkubiert. MOI = 100 VP/Zelle. UV = 100 mJ. IL-6 im ÜS wurde mit ELISA bestimmt. M1 N=3, MW \pm SEM. BMM N=2, MW \pm SEM. TM 4-fach Ansatz n=4, MW \pm SD. C) Die Induktion von IL-6 mRNA durch HBV wurde nach 20h mittels qPCR gemessen, Werte sind gegen GAPDH normalisiert. N=1, MW.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass HBV in humanen KC, LSEC und MΦ IL-6 induziert, jedoch nicht die Sekretion von IL-1 β und die Expression von IFN- β . Die verwendeten HBV Stocks enthielten alle viralen Partikel und somit potenzielle Epitope (siehe 1.1.2 bzw. 2.4.1.2). Diese HBV Inokula werden interessanterweise nicht von murinen MΦ und humanen THP-1 Zellen erkannt. Aus genannten Gründen wurden M1 MΦ als leicht verfügbares Hauptmodell für die folgenden Versuche gewählt, in denen zuerst eingegrenzt werden sollte, welche HBV Partikel erkannt werden.

3.3.1 HBV Virionen und Kapside werden von humanen MΦ erkannt

Um erste Aussagen über die Erkennung von HBV Partikeln zu treffen, wurden M1 MΦ mit isolierten viralen Partikeln inkubiert. Dazu wurden infektiöse Virionen (VP), SVP, Kapside und HBe-Protein durch Heparin-Säulenchromatographie und Sucrose-Gradient aufgereinigt. Hochreine VP, Filamente, SVP und Kapside wurden zusätzlich von Dr. Stephan Urban und Stephanie Gaehler in Heidelberg isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

M1 MΦ wurden wie beschrieben differenziert und mit isolierten viralen Partikeln inkubiert. VP wurden mit einer MOI von 100 VP/Zelle eingesetzt, Kapside aufgrund einer geringen Konzentration mit einer MOI von 10 Kapsiden/Zelle. Filamente und SVP wurden mit einer MOP (Äquivalent zu MOI: *multiplicity of particles*) von 100 Partikeln/Zelle eingesetzt und HBe-Protein in einer Konzentration äquivalent zu der HBeAg-Konzentration in HBV Stocks. Die ÜS und RNA-Lysate wurden nach 5h abgenommen und analysiert. In Abb. 21 (A) ist die gemessene Konzentration von IL-6 und TNF α in den ÜS dargestellt. VP induzierten IL-6 und TNF α , Kapside nur TNF α . Filamente und SVP induzierten nur minimale Konzentrationen an Zytokinen, für das HBe-Protein wurden keine Zytokine detektiert (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der Genexpression zeigte eine deutliche Induktion von IL-6 durch VP, Kapside induzierten dominant TNF α (Abb. 21 B). IL-1 β mRNA wurde durch VP und Kapside induziert, prozessiertes IL-1 β wurde im ÜS nicht detektiert. Durch Filamente und SVP wurden keine pro-inflammatorischen Zytokine induziert. Keines der aufgereinigten HBV Partikel induzierte die Expression von IFN- β (Daten nicht gezeigt).

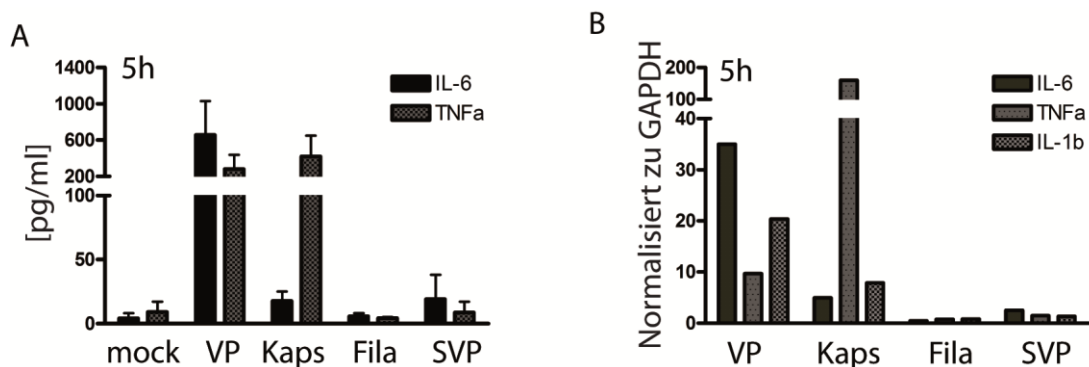


Abbildung 21: Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen durch aufgereinigte HBV Partikel. Differenzierte M1 MΦ ($1,0 \times 10^5$ MΦ pro cm^2) wurden mit Virionen (VP, MOI 100 VP/Zelle), Kapsiden (Kaps, MOI 10 Kaps/Zelle), Filamenten (Fila, MOP 100 Fila/Zelle) und SVP (MOP 100 SVP/Zelle) inkubiert. A) IL-6 und TNF α wurden nach 5h durch ELISA gemessen. N=2, MW \pm SEM. B) Die Expression von IL-6, TNF α und IL-1 β mRNA wurde durch qPCR gemessen, die Werte wurden gegen GAPDH normalisiert und sind relativ zur mock Kontrolle. N=1, MW.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass VP und Kapside von M1 MΦ erkannt werden. Die schnelle Zytokininduktion legt eine Aktivierung von PRR nahe. VP induzieren primär IL-6,

Kapside vor allem TNF α . Kapside sind ausserdem in deutlich geringeren Mengen stark immunogen. IL-1 β wurde nicht sekretiert, aber auf mRNA Ebene induziert, womit eine Aktivierung des Inflammasoms ausgeschlossen werden kann. IFN- β wurde, übereinstimmend mit den bisherigen Ergebnissen, nicht induziert. Filamente, SVP und HBe-Protein induzierten überhaupt keine bzw. minimale Mengen an Zytokine.

3.3.2 Erkennung viraler Partikel durch TLR

Die Aktivierung von NF- κ B durch HBV wurde in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen und publiziert [277]. Die nachgewiesenen Zytokine IL-6, TNF α und IL-1 β stehen auf Expressionsebene unter der Kontrolle von NF- κ B (siehe 1.4.1). IL-1 β kann im ÜS nicht nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass kein Pro-IL-1 β prozessiert wird. Eine Beteiligung von NLR wurde daher ausgeschlossen. Ebenso konnte keine Induktion der IFN- β Expression gemessen werden, was eine Erkennung durch RLR und TLR 3 unwahrscheinlich macht.

Aus genannten Gründen konzentrierten sich die Versuche auf die MyD88-abhängigen TLR und ihre Signalkaskaden.

3.3.2.1 Die Erkennung von HBV beansprucht die TLR Signalkaskade

Alle TLR-Signalkaskaden, außer TLR 3, sind NF- κ B und MyD88 abhängig (siehe 1.4.1). Da mein Hauptmodellsystem primäre humane M Φ waren standen *knock-out* Zellen, wie im Maus-Modell, nicht zur Verfügung. Kommerzielle chemische Inhibitoren wurden getestet und eingesetzt, um die zentralen Signalwege zu unterdrücken.

Celastrol ist ein Triterpen, isoliert aus der chinesischen Medizinpflanze *Tripterygium wilfordii*. Es besitzt anti-inflammatorische Funktionen und wurde kürzlich als Inhibitor von NF- κ B identifiziert [291]. Celastrol wurde eingesetzt, um die Relevanz von NF- κ B bei der HBV Erkennung zu untersuchen.

M1 M Φ wurden wie beschrieben differenziert. Celastrol wurde in verschiedenen Konzentration 1h vor Inkubation mit HBV den Zellen beigefügt. Mit LPS, das TLR 4 und NF- κ B aktiviert, wurde als Positiv-Kontrolle ebenso verfahren. Da isolierte HBV Partikel aufwendig aufzureinigen sind, wurden alle Versuche mit dem HBV Inokulum durchgeführt. Nach 20h wurden ÜS abgenommen und auf Zytokine analysiert.

Abbildung 22 (A) zeigt die Konzentration von IL-6 und TNF α nach Inkubation mit HBV über 20h sowie den Effekt verschiedener Konzentrationen des NF- κ B Inhibitors Celastrol. Die durch HBV induzierten Zytokine wurden durch die Inhibition von NF- κ B durch Celastrol in steigender Konzentration fast vollständig inhibieren. Dieser Effekt war auch nach Stimulation mit LPS zu beobachten (Abb. 22 B). Mit 10 μ M Celastrol ließ sich die Zytokininduktion fast vollständig unterdrücken.

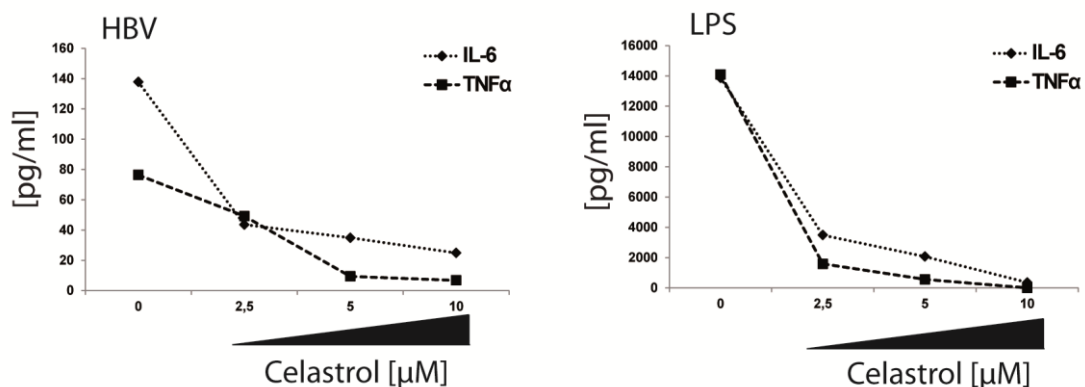


Abbildung 22: Effekt des NF- κ B Inhibitors Celastrol auf die HBV Erkennung. M1 M Φ ($1,0 \times 10^5$ M Φ pro cm^2) wurden über 5h mit HBV Inokulum mit einer MOI von 100 VP/Zelle oder LPS inkubiert. Celastrol wurde in Konzentrationen von 2,5 – 10 μ M 1h vor Inkubation mit HBV bzw. LPS eingesetzt. Quantifizierung von IL-6 und TNF α in den abgenommenen ÜS mittels ELISA. N=1, MW.

Das zentrale, namensgebende Molekül der MyD88-abhängigen Signalkaskade ist MyD88, welches bei allen TLR außer TLR 3 eine Rolle spielt [147]. Um zu zeigen, dass TLR involviert sind, wurde MyD88 inhibiert. Pepinh-MYD ist ein 26 AS Peptid, welches MyD88 durch Bindung an seine Homodimerisationsdomäne blockiert. Pepinh-MYD enthält eine Sequenz der MyD88 TIR Homodimerisationsdomäne (RDVLPQT), gefolgt von einer Protein Transduktionsdomäne (RQIKIWFQNRMKWKK), welche es dem Peptid ermöglicht, durch die Zellmembran einzudringen.

M1 M Φ wurden differenziert und 5h vor Inkubation mit 10 μ M Pepinh-MYD inkubiert. Die Zellen wurden mit dem HBV Inokulum inkubiert, nach 5 und 20h wurden die ÜS abgenommen und RNA-Lysate nach 20h präpariert. Als Negativ-Kontrolle wurde ein „Pep D2.3“ Peptid mit der nicht funktionellen Sequenz GSWRRGKQKIRRFVRVG eingesetzt, als Positiv-Kontrolle wurde LPS mit Pepinh-MYD inhibiert.

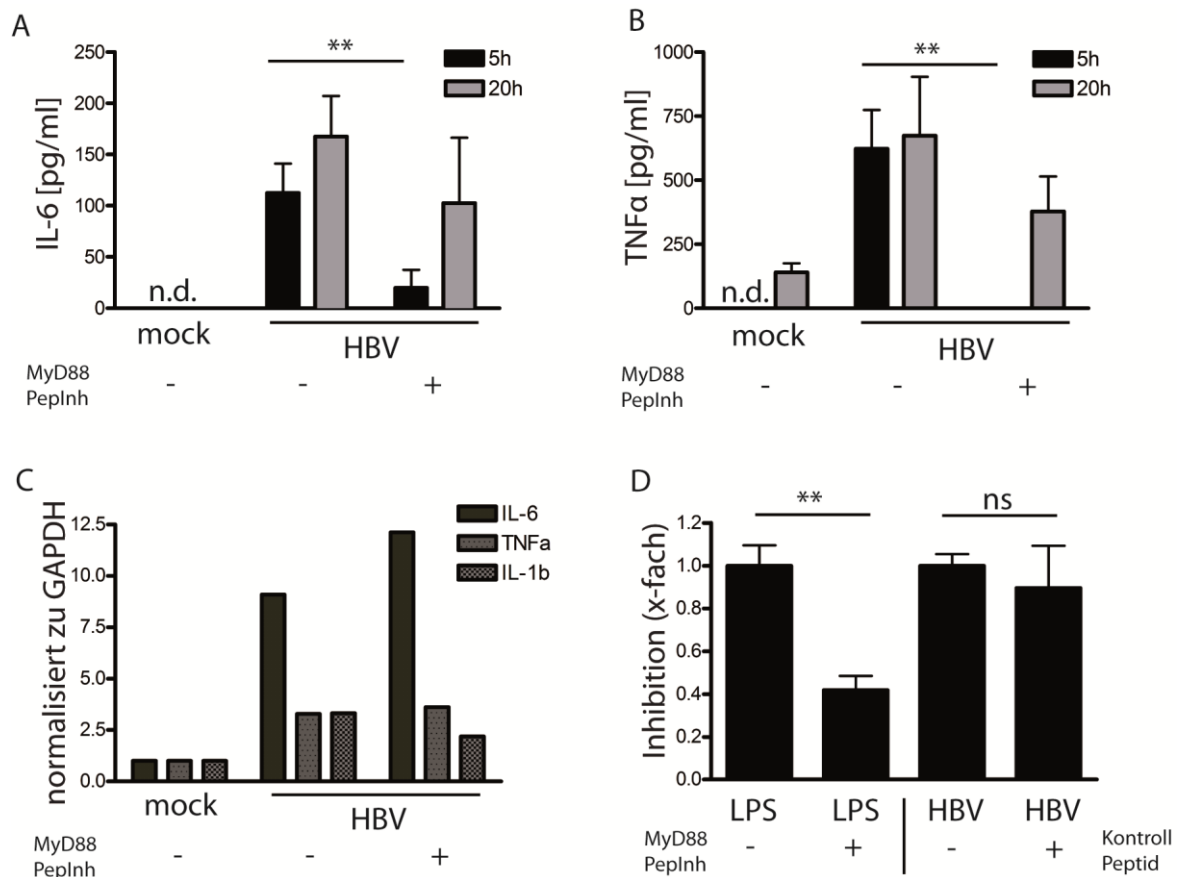


Abbildung 23: Abhängigkeit der HBV Erkennung von MyD88. M1 M Φ ($1,0 \times 10^5$ M Φ pro cm^2) wurden 5h vor Inkubation mit HBV mit Pepinh-MYD88 [$10 \mu\text{M}$] inkubiert. Die Inkubation mit HBV erfolgte mit einer MOI von 100 VP/Zelle, als Positiv-Kontrolle diente LPS. A) IL-6 im ÜS, 5 und 20h p.i. (ELISA). Triplikate $n=3$, MW \pm SD. B) TNF α im ÜS, 5 und 20h p.i. (ELISA). Triplikate $n=3$, MW \pm SD. C) Expression von Zytokinen, gemessen durch qPCR 20h nach Inkubation mit HBV. Normalisiert gegen GAPDH, relativ zu mock Inokulum. $N=1$, MW. D) Kontrolle der spezifischen Inhibition des TLR 4-Signalweges durch MyD88-inhibierendes Peptid, sowie Kontrolle des spezifischen Wirkung durch einen Test mittels eines unspezifischen Peptids bei HBV. Triplikate $n=3$, MW \pm SD.

Die Inkubation mit HBV induzierte die Sekretion von IL-6 und TNF α , die durch Pepinh-MYD88 inhibiert wurde (Abb. 23 A und B). Die Inhibition mit Pepinh-MYD88 war nach 5h stärker und signifikanter als nach 20h. IL-6 wurde um den Faktor 5 reduziert, TNF α komplett inhibiert. Eine qPCR Analyse nach 20h zeigte eine Induktion von IL-6, TNF α und IL-1 β durch HBV, aber interessanterweise nur eine schwache Inhibition von IL-1 β durch Pepinh-MYD88 (Abb. 23 C). Pepinh-MYD88 inhibierte erwartungsgemäß die Positiv-Kontrolle LPS, die Negativkontrolle Pep D2.3 zeigte keine Wirkung auf HBV induziertes IL-6 (Abb. 23 D).

Die erhaltenen Daten lassen den Schluss zu, dass die Erkennung von HBV durch M1 M Φ die MyD88-abhängige TLR Signalkaskade aktiviert. Die Ergebnisse veranschaulichten die komplette Abhängigkeit der Zytokininduktion von NF- κ B (Abb. 22) sowie die Abhängigkeit

von MyD88 (Abb. 23) zu einem frühen Zeitpunkt der Erkennung. Die schnelle Erkennung und das Fehlen einer Interferoninduktion lassen eine direkte Oberflächenerkennung viraler Proteine durch einen PRR, aufgrund der Abhängigkeit von MyD88 wahrscheinlich einen TLR, vermuten.

3.3.2.2 HBV induziert TLR2 Expression

Um das TLR Expressionsprofil zu erstellen wurde die Expression der TLR mittels qPCR quantifiziert, sowohl in den mock Inokulum Kontrollen als auch in mit HBV inkubierten Zellen. Dabei wurde eine Induktion des TLR 2 in Zellen, die auf HBV reagieren, detektiert (Abb. 24). Die Expression des TLR 2 wurde auch in M1 MΦ quantifiziert, und war ebenfalls nach Inkubation mit HBV erhöht (Abb. 24). Ein Vergleich mit TLR 4 ergab, dass dieser durch HBV Stimulation nicht induziert wurde (Daten nicht gezeigt). TLR 2 Expression wird nach spezifischer Ligandenbindung induziert [292]. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die Rolle von TLR 2 in der HBV Erkennung untersucht.

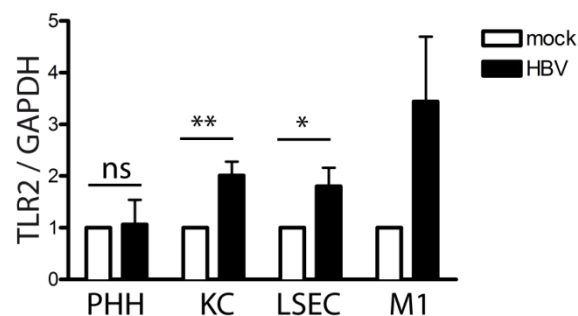


Abbildung 24: HBV induziert die Expression von TLR 2 in Zellen, die HBV erkennen. Induktion der mRNA Expression des humanen TLR 2 durch HBV in PHH, KC, LSEC und M1 MΦ, gemessen durch qPCR. Werte wurden gegen GAPDH normalisiert und sind relativ zur mock Kontrolle dargestellt. PHH N=2, andere Zellen N=3, MW ±SEM.

3.3.2.3 HBV-spezifische IL-8 Induktion in HEK293-TLR2

Um die Rolle von TLR 2 in der HBV Erkennung zu untersuchen wurden HEK293-TLR2 Zellen mit HBV inkubiert. Diese HEK293 Zelllinie ist stabil mit den humanen TLR 2 und CD14 transfiziert, eine Aktivierung des TLR 2 führt zu einer Aktivierung von NF-κB und zur Sekretion von IL-8.

HEK293-TLR2, und HEK293 als Negativkontrolle, wurden mit HBV und mock Inokulum inkubiert. Als Positiv-Kontrolle wurden *Heat killed Listeria monocytogenes* (HKLM) benutzt. Die ÜS wurden nach 5h abgenommen und analysiert. In Abbildung 25 ist die gemessene Menge IL-8 im ÜS dargestellt, da HEK293-TLR2 kein IL-6 oder TNFα sezernierten (Daten

nicht gezeigt). Die spezifische Aktivierung der TLR 2 exprimierenden Zellen durch HKLM war deutlich messbar. IL-8 wird durch HBV induziert, allerdings auch in TLR 2 negativen HEK293 Zellen. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den hohen IL-8 Werten in den mock Kontrollen von PHH und NPC (siehe 3.2.1) und der Detektion von IL-8 in mock Kontrollen von KC (Daten nicht gezeigt). Die TLR 2-abhängige IL-8 Induktion durch HBV, verglichen mit der Induktion in der HEK293 Kontrolle, ist messbar, aber nicht signifikant erhöht. Aus diesen Gründen wurden vermutet, dass IL-8 durch mock und HBV Inokulum auch unspezifisch induziert werden kann. Da HEK293-TLR2 Zellen nur IL-8 sezernieren konnte mit diesen Zellen nicht weiter gearbeitet werden.

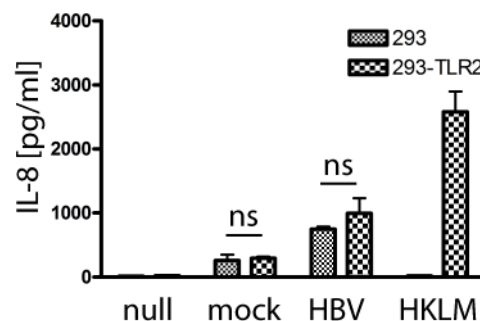


Abbildung 25: Sekretion von IL-8 in HEK293 und HEK293-TLR2 Zellen. Beide Zelllinien (2×10^5 Zellen pro Ansatz) wurden mit HBV Inokulum mit einer MOI von 100 VP/Zelle bzw. mock Inokulum und HKLM (100 Partikel pro Zelle) inkubiert. ÜS wurden 5h p.i. mittels ELISA analysiert. 4-fach Ansätze $n=4$, MW \pm SD.

3.3.2.4 Die Erkennung von HBV durch KC, LSEC und M Φ ist TLR 2-abhängig

Um eine Beteiligung des TLR 2 bei der HBV-Erkennung nachzuweisen, wurden weitere Methoden etabliert. Der murine, anti-humane TLR 2 (Klon TL2.1) AK hat in publizierten Studien eine inhibitorische Wirkung gegen TLR 2 [205]. Dieser AK (α TLR2) wurde zum Nachweis einer TLR 2 Erkennung von HBV eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde eine entsprechende Isotypkontrolle verwendet.

Erste Experimente wurden in KC und LSEC durchgeführt. KC und LSEC wurden wie beschrieben isoliert, kultiviert und mit HBV Inokulum inkubiert. Eine Stunde vor Inkubation mit HBV wurden die Zellen mit α TLR2 und der Isotypkontrolle mit einer Konzentration von 10 μ g/ml inkubiert. Nach 5 und 20h wurden ÜS zur Analyse entnommen, RNA-Lysate konnten leider aufgrund der geringen Zellausbeute nicht präpariert werden.

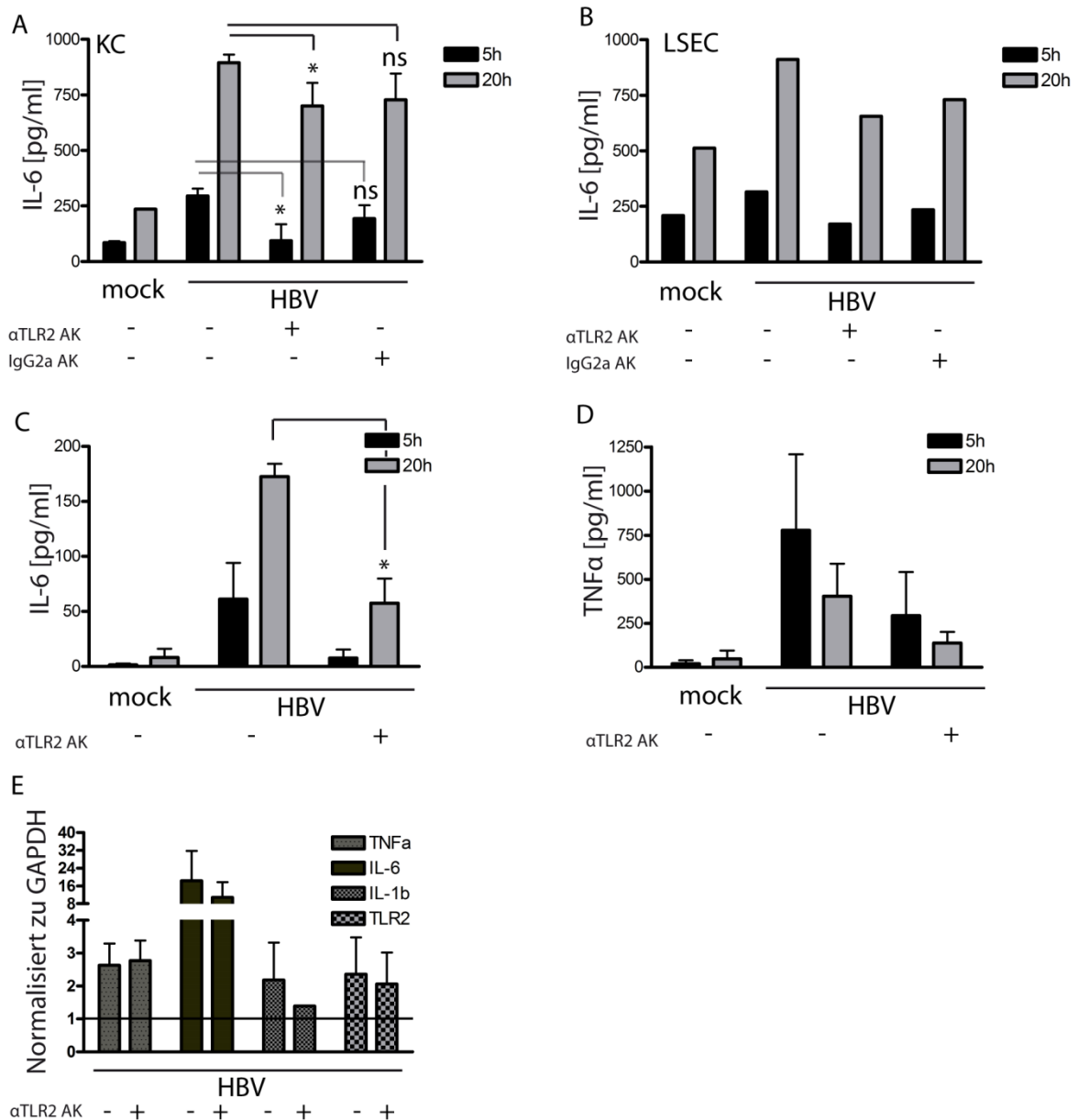


Abbildung 26: Wirkung der funktionalen Inhibition von TLR 2 in der HBV Erkennung. KC, LSEC oder M1 $\mu\Phi$ ($1,9 \times 10^5$ pro Ansatz in einem Experiment) wurden 1 h vor Inkubation mit HBV (MOI 100 VP/Zelle) mit α TLR2 bzw. Isotypkontrolle [10 μ g/ml] behandelt. A und B) IL-6 im ÜS von KC (A) und LSEC (B), 5 und 20h nach Inkubation, gemessen durch ELISA. KC Triplikate $n=3$, MW \pm SD. LSEC $n=1$. C und D) Quantifizierung von IL-6 (C) und TNF α (D) im ÜS von M1 $\mu\Phi$, 5 und 20h nach Inkubation, gemessen durch ELISA. $N=3$, MW \pm SEM. E) Expression von IL-6, TNF α , IL-1 β und TLR2 in M1 $\mu\Phi$, 20h nach Inkubation mit HBV, gemessen durch qPCR. Werte sind normalisiert zu GAPDH und relativ zur mock Kontrolle (Referenzbalken = 1). IL-6 $N=3$; TNF α , IL-1 β und TLR 2 $N=2$. MW \pm SEM.

Die Analyse der ÜS zeigte eine Sekretion von IL-6 durch KC und LSEC nach Inkubation mit HBV, die durch α TLR2 nach 5 und 20h inhibiert wurde (Abb. 26, A und B). Die Werte mit der eingesetzten Isotypkontrolle waren nicht signifikant verändert. TNF α und IL-1 β konnten

im ÜS nicht gemessen werden. Der α TLR2 AK hatte somit eine inhibitorische Wirkung auf die Erkennung von HBV durch humane KC und LSEC.

Die Experimente mit α TLR2 AK wurden in M1 M Φ wiederholt. Nach Differenzierung wurden die M Φ 1h vor Zugabe des HBV Inokulums mit α TLR2 und Isotypkontrolle inkubiert. Das HBV Inokulum wurde wie beschrieben eingesetzt und nach 5 bzw. 20h wurden ÜS abgenommen und RNA-Lysate präpariert.

In Abbildung 26 (C und D) stellt die gemessenen Mengen IL-6 und TNF α in den ÜS dar. IL-6 und TNF α wurden durch HBV induziert und durch α TLR2 deutlich inhibiert. Die Induktion von Zytokin-mRNA wurde mittels qPCR gemessen, und übereinstimmend mit den bisherigen Daten wurden pro-inflammatorische Zytokine durch HBV induziert. Durch α TLR2 AK konnte, außer für IL-6, nach 20h eine Inhibition dieser Induktion festgestellt werden, allerdings nur schwach detektierbar (Abb. 26 E).

Eine Erkennung von HBV Kapsiden durch TLR 2 wurde bereits beschrieben [166]. Hier vorgestellte Daten belegen, dass auch HBV Virionen durch das angeborene Immunsystem erkannt werden. Um die Rolle von TLR 2 in der Erkennung von Virionen zu überprüfen, wurden M1 M Φ mit aufgereinigten Virionen inkubiert und TLR 2 mit α TLR2 inhibiert. Abbildung 27 (A) zeigt die gemessenen Zytokine nach 5h. Durch Erkennung der HBV Virionen wurden IL-6 und TNF α induziert und diese Erkennung wurde durch α TLR2 inhibiert. IL-1 β wurde nicht im ÜS detektiert. Die Expression von IL-6, TNF α und IL-1 β blieb seltsamerweise unverändert (Abb. 27 B).

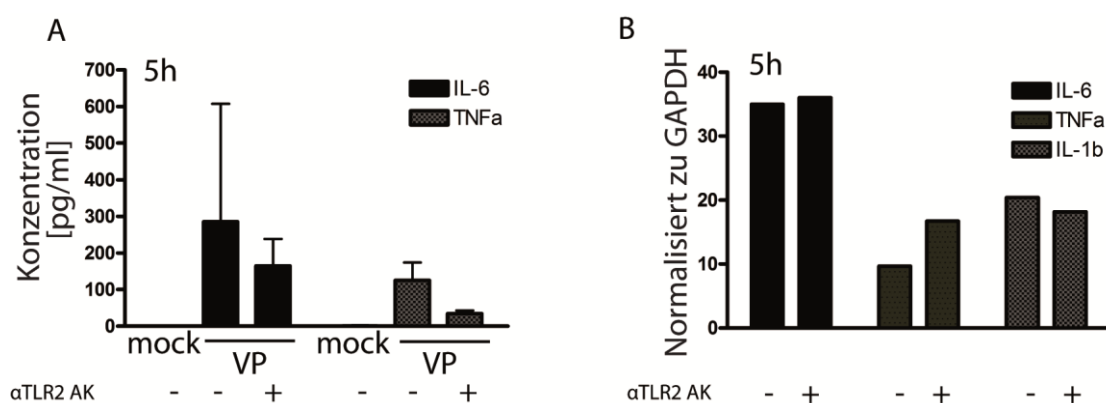


Abbildung 27: Effekt der Inhibition von TLR 2 bei der Erkennung von Virionen. Differenzierte M1 M Φ ($1,0 \times 10^5$ M Φ pro cm^2) wurden 1h vor Inkubation mit VP (MOI 100 VP/Zelle) mit α TLR2 [2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$] inkubiert. A) IL-6 und TNF α im ÜS wurden nach 5h, gemessen durch ELISA. Triplikate $n=3$, MW \pm SD. B) Die Expression von IL-6, TNF α und IL-1 β 5h p.i. wurde durch qPCR gemessen. Werte wurden gegen GAPDH normalisiert und relativ zur mock-Kontrolle dargestellt. N=1, MW.

Die erhobenen Daten weisen darauf hin, dass die Erkennung von HBV durch KC, LSEC und M1 MΦ abhängig von TLR 2 ist. Insbesondere scheint die Erkennung von infektiösen Virionen von TLR 2 abzuhängen.

3.3.2.5 Die Erkennung von AAV ist TLR 2-abhängig

Im Fall von leeren AAV2 und AAV8 Kapsiden fanden wir in Kollaboration mit Marianna Hösel (früher Postdoktorandin in unserer Arbeitsgruppe in Köln, jetzt bei Hildegard Büning) in primären humanen Leberzellkulturen ebenfalls eine Induktion der TLR 2 Expression (Daten nicht gezeigt). Die Beteiligung von TLR 2 an der Erkennung von AAV Kapsiden wurde daher mit Versuchsansätzen, die zu den bisher dargestellten vergleichbar sind, untersucht (siehe 3.3.2.3 und 3.3.2.4). Leere AAV Kapside wurden mit einer GOI von 1×10^5 mit HEK293-TLR2 Zellen inkubiert und die Expression und Sekretion von IL-8 gemessen, als Positiv-Kontrolle wurden HKLM (100 Partikel pro Zelle) verwendet. Die Expression von IL-8 nach 3h Inkubation war bei AAV2 und AAV8 Kapsiden um mindestens das Zweifache induziert (Abb. 28 A). Die gemessenen Mengen an sezerniertem IL-8 im ÜS 24h p.i. stimmten mit diesem Ergebnis überein und belegten, dass zwischen beiden Serotypen kein Unterschied in der Erkennung durch TLR 2 besteht (Abb. 28 B).

Um die Ergebnisse in primären Zellen zu überprüfen, wurden leere Kapside mit KC und LSEC inkubiert. Durch α TLR2 und eine Isotypkontrolle wurde versucht, die Zytokin-Induktion zu unterdrücken, vergleichbar mit den vorgestellten Experimenten mit HBV. Die erhobenen qPCR Daten zeigen eine 200-fache Induktion von TNF α und etwa 1500-fache Induktion der IL-1 β Expression in KC, verglichen zur mock Kontrolle (Abb. 28 C und E). Diese Induktion konnte durch α TLR2 um mehr als 70% inhibiert werden. TNF α wurde um das 200-fache und IL-1 β um das 300-fache in LSEC induziert (Abb. 28 D und F). Die Inhibition durch α TLR2 war vergleichbar zur Inhibition in KC.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Erkennung sowohl von HBV als auch von AAV abhängig von TLR 2 ist. Spezifische Inhibition von TLR 2 auf funktionaler Ebene führt zu einer mindestens 50% Reduzierung der sekretierten Zytokine. Da leere AAV Kapside erkannt wurden, konnte eine Erkennung von Nukleinsäuren ausgeschlossen werden. HBV Virionen enthalten das komplette Genom, was eine Erkennung durch TLR 9 vermuten lässt.

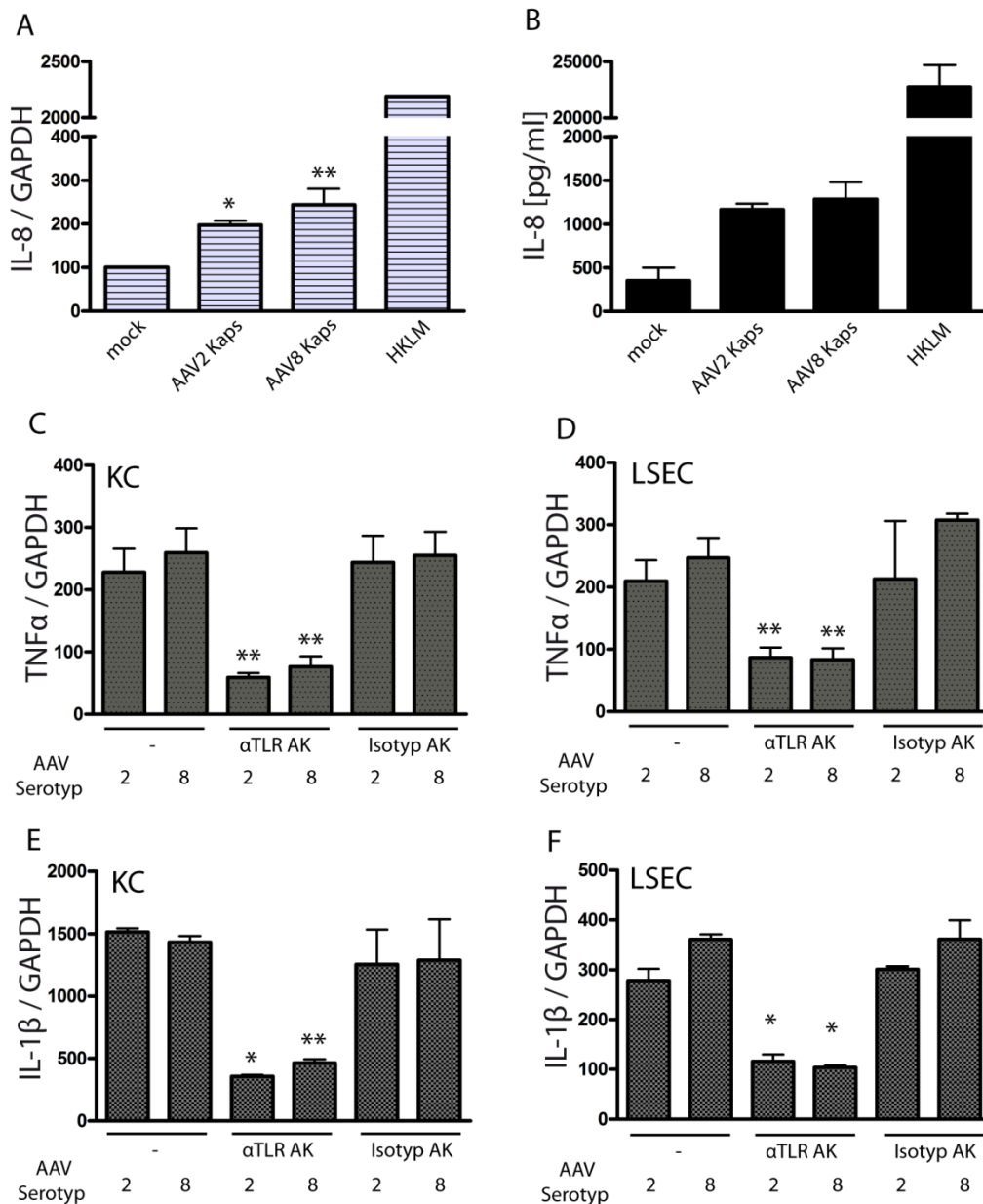


Abbildung 28: TLR 2 abhängige Erkennung von AAV Kapsiden. A und B) 3×10^5 HEK293-TLR2 Zellen wurden mit leeren Kapsiden (Kaps) in einer äquivalenten Konzentration zu einer Transduktion mit rAAV (GOI 1×10^5) inkubiert. Mock Inokulum und HKLM (100 Partikel pro Zelle) dienten als Negativ- bzw. Positiv-Kontrolle. A) IL-8 Expression wurde 3h p.i. durch qPCR gemessen und zu GAPDH normalisiert. Die Werte sind dargestellt als % der mock Kontrolle. B) Sezerniertes IL-8 wurde 24h p.i. durch ELISA gemessen. Ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. Triplikate $n=3$, MW \pm SD. C bis F) 5×10^5 humane KC (C und E) oder 5×10^5 LSEC (D und F) wurden α TLR2 [10 μ g/ml] AK oder der Isotypkontrolle 1h vor Addition der Kapside vorbehandelt. TNF α und IL-1 β Genexpression wurde 6h p.i. durch qPCR gemessen. Die Daten werden als % der mock Kontrolle nach Normalisation gegen GAPDH dargestellt. Triplikate $n=3$, MW \pm SD.

3.3.2.6 TLR 9 ist nicht an der Erkennung von HBV beteiligt

Ergebnisse aus Versuchen, die sich mit einer möglichen Beteiligung eines CLR befassen, ließen den Schluss zu, dass eine HBV Erkennung abhängig von einer Partikelaufnahme ist (siehe 3.3.3). Phago- bzw. endozytierte Partikel werden im reifenden Endosom denaturiert

und endosomalen Rezeptoren zugänglich gemacht [293]. Die TLR 3 und 7 bis 9 sind in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert [172]. Die schnelle Zytokinantwort auf HBV sowie die Experimente mit UV-bestrahlten HBV Inokula implizierten, dass die Erkennung von HBV unabhängig von der HBV Replikation ist. Eine Erkennung durch RNA-spezifische TLR 3, 7 und 8 war somit unwahrscheinlich. TLR 9 jedoch erkennt DNA in endosomalen Kompartimenten. HBV ist ein DNA-Virus, und die DNA könnte im Falle einer Desintegration des Kapsids im Endosom somit erkannt werden.

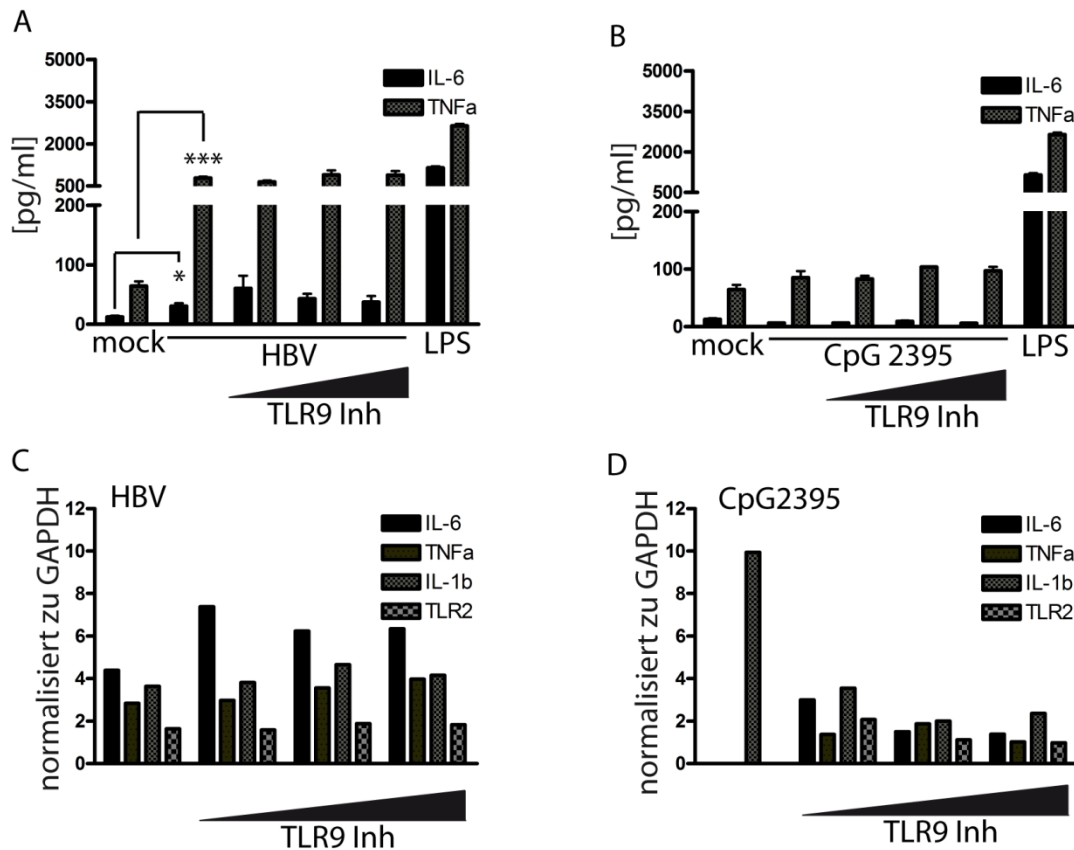


Abbildung 29: Effekt von TLR 9 Inhibitoren auf HBV induzierte Zytokine. M1 MΦ ($1,0 \times 10^5$ MΦ pro cm^2) wurden 1h vor Inkubation mit HBV Inokulum (MOI von 100 VP/Zelle) oder CpG2395 [$1,0 \mu\text{M}$] mit verschiedenen Konzentrationen des TLR 9 Inhibitors TTAGGG [$0,5$; $1,0$; $3,0 \mu\text{M}$] behandelt. Mock Inokulum und LPS dienten als Kontrollen. A) IL-6 und TNFα im ÜS 5h p.i. mit HBV, gemessen durch ELISA. Triplikate $n=3$, MW \pm SD. B) IL-6 und TNFα im ÜS 5h nach Behandlung mit CpG2395, gemessen durch ELISA. Triplikate $n=3$, MW \pm SD. C) Expression von IL-6, TNFα, IL-1β und TLR2 5 h p.i. mit HBV, gemessen durch qPCR. Werte relativ zur mock Kontrolle nach Normalisierung gegen GAPDH. N=1, MW. D) Expression von IL-6, TNFα, IL-1β und TLR 2 5h nach Behandlung mit CpG2395, gemessen durch qPCR. Werte relativ zur mock Kontrolle nach Normalisierung gegen GAPDH. N=1, MW.

M1 MΦ wurden differenziert und mit HBV Inokulum inkubiert. Mock Inokulum, CpG2395 und LPS dienten als Negativ- und Positiv-Kontrollen. M1 MΦ, die mit HBV sowie

dem TLR 9 Ligand CpG2395 inkubiert werden sollten, wurden mit einer Titrationsreihe des TLR 9 Inhibitors TTAGGG vorbehandelt.

In Abbildung 29 ist der Effekt des TLR 9 Inhibitors auf die HBV Erkennung dargestellt. HBV induzierte eine Sekretion von IL-6 und TNF α (Abb. 29 A), die nicht durch steigende Konzentrationen des TLR 9 Inhibitors unterbunden werden konnte. CpG2395 stimulierte keine Zytokinsekretion und konnte dementsprechend auch nicht inhibiert werden, was auf eine fehlende Expression des TLR 9 in M1 M Φ schließen ließ (Abb. 29 B).

Die Ergebnisse wurden weitgehend auf mRNA Ebene bestätigt. HBV induzierte die Expression von IL-6, TNF α , IL-1 β sowie TLR 2. Der Effekt konnte nicht durch den TLR 9 Inhibitor unterdrückt werden (Abb. 29 C). Der TLR 9 Ligand induzierte interessanterweise TNF α , aber keine anderen Zytokine (Abb. 29 D), weshalb hier ein Artefakt vermutet wurde. Eine konzentrationsabhängige Inhibition durch den Inhibitor konnte nicht gemessen werden. Minimale Expressionslevel von TLR 9 wurden durch qPCR gemessen, welche jedoch weder durch HBV noch durch CpG2395 reguliert wurden (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse implizierten, dass TLR 9 keine Rolle in der HBV Erkennung durch M1 M Φ hat. Eine mögliche Erkennung in pDC, welche TLR 9 funktional exprimieren, kann allerdings nicht absolut ausgeschlossen werden.

3.3.3 Erkennung von HBV durch CLR

Die Abhängigkeit der HBV Erkennung durch TLR 2 und die MyD88 Signalkaskade wurde durch die bisher erhobenen Daten belegt. Die Zytokin-Induktion konnte nur durch NF- κ B Inhibition vollständig unterdrückt werden, wohingegen die Inhibition von MyD88 bzw. TLR 2 nur zu einer unvollständigen Inhibitionen führte, die nach 20h teilweise wieder aufgehoben war. Die totale Abhängigkeit von NF- κ B, nicht aber von der TLR-Signalkaskade, sowie die Spezifität der Erkennung in humanen Zellen führte zu der Hypothese, dass ein weiterer Rezeptor an der Erkennung beteiligt sein muss.

Für HBsAg wurde die Bindung an Mannan-bindendes Lektin (MBL) und den M Φ Mannose Rezeptor (MR) beschrieben [294], [295]. Beide sind spezifisch für Mannose-Reste, die auch an Oberflächenproteinen von HBV lokalisiert sind [296]. MR ist Teil der Calcium-abhängigen Lektin Familie (*C-type lectin receptors*, CLR), welche die Phagozytose von Pathogenen induzieren. Über die Signalkaskaden der CLR ist weniger bekannt als über die der TLR (siehe 1.4.2). Bekannt ist, dass untersuchte CLR, welche wie Dectin-1 und 2 sowie Mincle pro-inflammatorische Zytokine induzieren, die Spleen Tyrosine Kinase (SYK) und

NF- κ B aktivieren [297]. Aus diesen Gründen wurden in den folgenden Experimenten CLR und die SYK- NF- κ B Signalkaskade untersucht.

3.3.3.1 Die Erkennung von HBV erfordert eine Clathrin-abhängige Phagozytose

Um die Beteiligung von CLR in der Erkennung von HBV zu überprüfen, wurde zunächst allgemein die Phagozytose und Endozytose inhibiert. Saccharose ist ein etablierter Inhibitor Clathrin-abhängiger Endozytose [298].

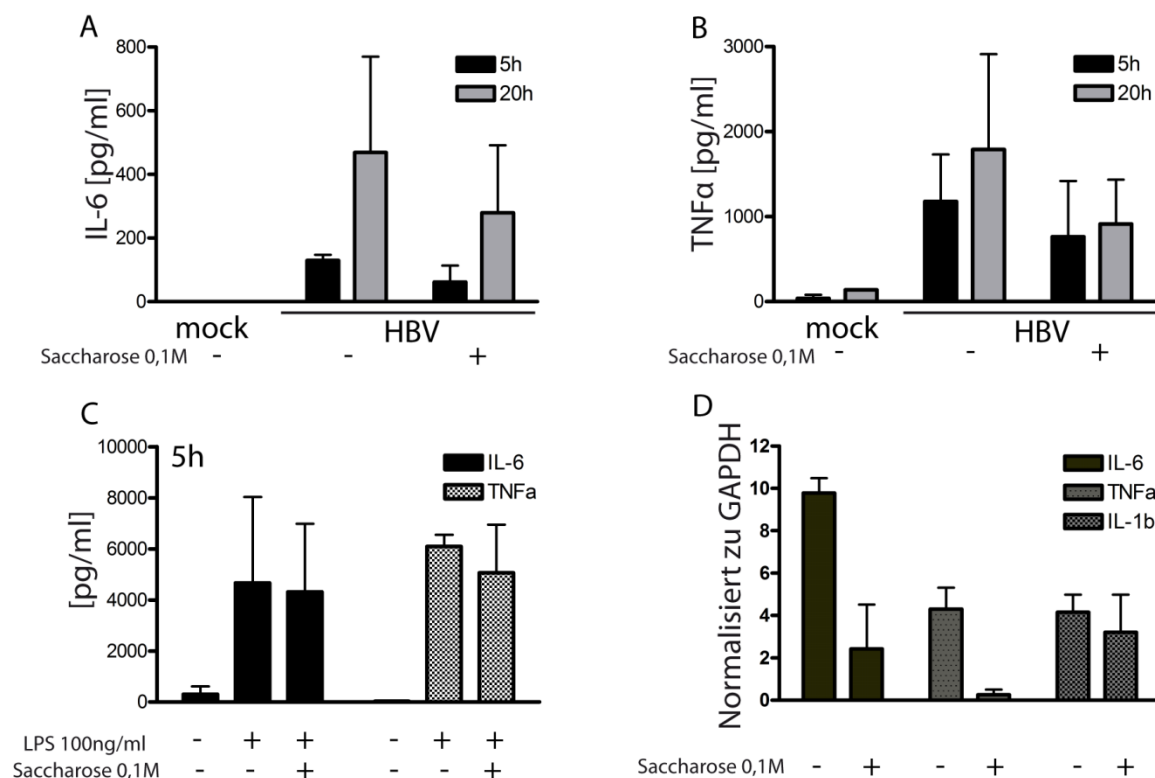


Abbildung 30: HBV-Erkennung nach Phagozytose-Inhibition mittels Saccharose. M1 M Φ ($1,0 \times 10^5$ M Φ pro cm^2) wurden 1h vor Inkubation mit HBV Inokulum (MOI 100 VP/Zelle) mit Saccharose [0.1 M] behandelt. LPS diente als Kontrolle der spezifischen Phagozytose-Inhibition durch Saccharose, mock Inokulum als Negativ-Kontrolle. A und B) Im ÜS gemessene Mengen IL-6 (A) und TNF α (B), 5 und 20h p.i. mit HBV (ELISA). N=2, MW \pm SEM. C) Durch LPS induziertes IL-6 und TNF α , im ÜS nach 20h durch ELISA gemessen (Kontrolle des Effekts von Saccharose). N=2, MW \pm SEM. D) Effekt von Saccharose auf die durch HBV 20h p.i. induzierte Expression von IL-6, TNF α und IL-1 β . Werte wurden gegen GAPDH normalisiert und sind relativ zur mock Kontrolle. N=2, MW \pm SEM.

Um zu zeigen dass eine Partikelaufnahme Teil der HBV Erkennung ist, wurden M1 M Φ differenziert und 1h vor Inkubation mit HBV Inokulum mit 0,1 M Saccharose behandelt. Nach Inkubation mit HBV wurden 5 und 20h später ÜS und RNA-Lysate entnommen und

analysiert. Die Analyse der ÜS zeigte eine unvollständige, aber detektierbare Inhibition der durch HBV induzierten IL-6 und TNF α Sekretion (Abb. 30, A und B). Die Aktivierung von TLR 4 durch LPS, die keine Phagozytose erfordert, wurde durch Saccharose nicht inhibiert (Abb. 30 C). Nach 20h war eine 80% Reduzierung der durch HBV induzierten Expression von IL-6, eine fast vollständige Inhibition von TNF α sowie eine schwache Reduzierung der IL-1 β Induktion mittels qPCR detektierbar (Abb. 30 D).

3.3.3.2 Die HBV-Erkennung ist Calcium-abhängig

Die mit Saccharose erhaltenen Ergebnisse bestätigten die Hypothese, dass zusätzlich zu TLR 2 eine Partikelaufnahme, und somit möglicherweise ein CLR (siehe 1.4.2), für eine HBV-Erkennung erforderlich sind. Mit dem MR als bereits beschriebenen Bindungspartner von HBsAg wurde nun spezifischer ein konkreter Kandidat untersucht. MR und andere CLR erkennen ihre Liganden nur in Gegenwart von Calcium [179]. Deshalb wurde Calcium durch Depletion mit EGTA vor der Inkubation mit HBV aus dem Zellkulturmedium entfernt.

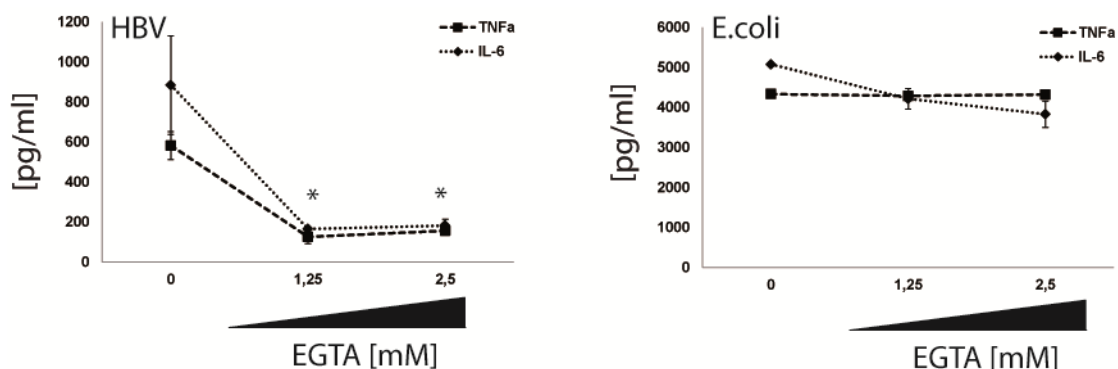


Abbildung 31: Calcium-Depletion und HBV Erkennung. M1 M Φ ($1,0 \times 10^5$ M Φ pro cm^2) wurden 1h vor Inkubation mit HBV Stock (MOI = 100VP/Zelle) oder *E.coli* (100 Partikel pro Zelle) mit EGTA [1,25 / 2,5 mM] behandelt. Dargestellt ist der Dosis-abhängige Effekt der Ca²⁺ Depletion auf durch HBV- und LPS-Erkennung sekretiertes IL-6 und TNF α im ÜS, gemessen 5h nach Inkubation durch ELISA. Triplikate n=3, MW \pm SD.

M1 M Φ wurden differenziert und 1h vor Inkubation mit HBV Stock mit zwei verschiedenen Konzentrationen EGTA behandelt. 5 und 20h nach Zugabe von HBV wurden ÜS abgenommen. Aufgrund der vielen physiologischen Rollen von Calcium waren die 20h Werte nicht verwendbar (Daten nicht gezeigt). Nach 5h ließ sich eine Reduzierung der durch HBV-induzierten Zytokine um den mehr als 70% feststellen (Abb. 31 A). Als Positiv-Kontrolle verwendete *E.coli* Partikel, die durch TLR 4 erkannt werden, induzierten dagegen Zytokine unabhängig von Calcium (Abb. 31 B).

3.3.3.3 Untersuchung der ITAM-Motiv-Rezeptor Signalkaskade

Soweit für CLR in der Literatur beschrieben, werden pro-inflammatorische Zytokine in der Regel über ITAM-vermittelte Aktivierung von SYK und NF- κ B aktiviert (siehe 1.4.2) [181]. Um der Bedeutung von CLR in der HBV Erkennung nachzugehen, wurde diese Signalkaskade spezifisch inhibiert. Piceatannol ist ein Zellwand-permeabler, Substrat-kompetitiver und reversibler Pflanzenmetabolit, der spezifisch SYK inhibiert [194].

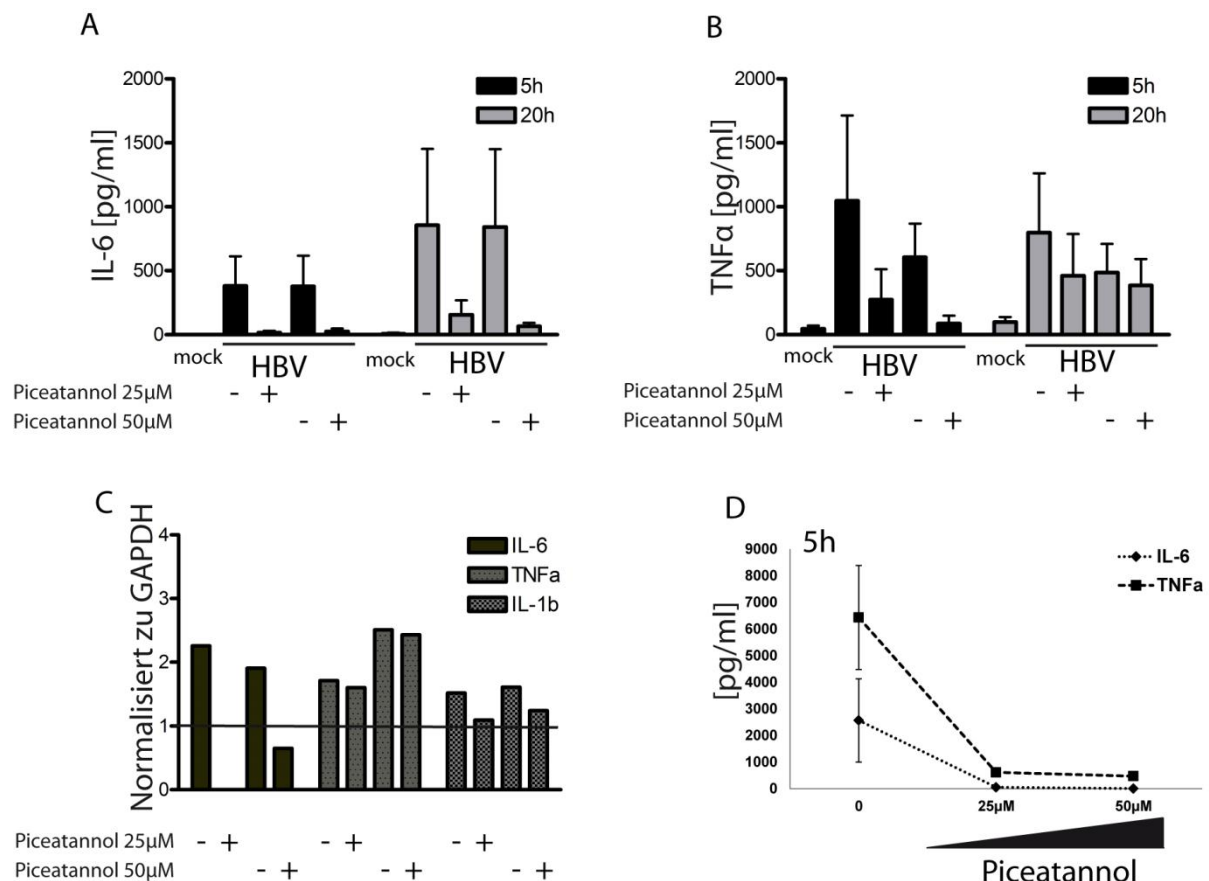


Abbildung 32: Effekt des SYK-Inhibitors Piceatannol auf die HBV-Erkennung. M1 M Φ ($1,0 \times 10^5$ M Φ pro cm^2) wurden 1h vor Inkubation mit HBV Inokulum (MOI 100) oder Curdlan mit Piceatannol [25 / 50 μM] behandelt. A und B) Im ÜS gemessene Zytokine IL-6 (A) und TNF α (B), 5 und 20h p.i. mit HBV, verglichen mit jeweiliger DMSO-Kontrolle (25 μM + indiziert 25 μM Piceatannol Endkonzentration, ursprünglich gelöst in DMSO; 25 μM – indiziert äquivalente DMSO-Konzentration ohne Piceatannol). Werte gemessen durch ELISA. N=3, MW \pm SEM. C) Expression von IL-6, TNF α und IL-1 β nach Inkubation mit HBV, ohne bzw. mit Piceatannol, gemessen durch qPCR. Werte normalisiert gegen GAPDH und relativ zum mock Inokulum. N=1, MW. D) Kontrolle der Dosis-abhängigen Wirkung von Piceatannol auf durch Curdlan induzierte Zytokinen. IL-6 und TNF α 5h nach Inkubation im ÜS, gemessen durch ELISA. Triplikate n=3, MW \pm SD.

Um die Beteiligung der ITAM-Motiv Signalkaskade zu überprüfen, wurde Piceatannol in zwei Konzentrationen (25 und 50 μM) 1h vor Inkubation mit HBV Inokulum den differenzierten M1 M Φ zugeführt. Piceatannol ist nur in DMSO und EtOH löslich, weshalb

entsprechende Kontrollen verwendet wurden. Die Negativkontrolle mock-Inokulum sowie die Positivkontrolle Curdlan, welches über Dectin-1 SYK-abhängig Zytokine induziert, wurden ebenso eingesetzt [194].

Die durch HBV induzierten Zytokine wurden durch die jeweiligen DMSO Kontrollen beeinflusst, weshalb der Effekt der Inhibitoren jeweils relativ zu den Kontrollen dargestellt ist. HBV induzierte IL-6 und TNF α , welche durch Piceatannol in einem dosisabhängigen Effekt inhibiert wurden (Abb. 32, A und B). IL-6 wurde um mehr als 80% nach 5 und 20h inhibiert, TNF α nach 5h um mehr als 60% und nach 20h schwächer. Die qPCR Expressionsanalyse nach 20h detektierte eine starke Reduktion von IL-6 durch Piceatannol, jedoch nur eine schwache Inhibition von HBV-induziertem TNF α und IL-1 β (Abb. 32 C). Die Positiv-Kontrolle Curdlan wurde durch Piceatannol um mindestens 80% inhibiert, was die spezifische Wirkung des Inhibitors bestätigte (Abb. 32 D).

Um eine präzisere Aussage bezüglich der bislang unbeschriebenen Erkennung der Virionen machen zu können, wurde ein Experiment mit aufgereinigten VP und dem hochspezifischen SYK Inhibitor R406 angesetzt, den wir freundlicherweise von unserem Kolaborationspartner Jürgen Ruland erhielten [299].

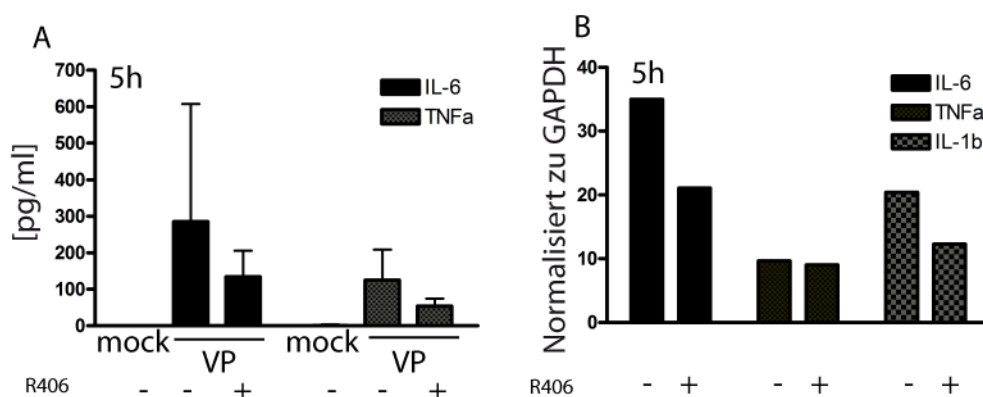


Abbildung 33: Effekt der Inhibition von SYK auf Erkennung von HBV Virionen. M1 M Φ ($1,0 \times 10^5$ M Φ pro cm^2) wurden 1h vor Inkubation mit VP (MOI 100 VP/Zelle) mit SYK Inhibitor R406 [$1 \mu\text{M}$] behandelt. A) IL-6 und TNF α im ÜS, 5h p.i. mit VP, gemessen durch ELISA. Triplikate $n=3$, MW \pm SD. B) Expression von IL-6, TNF α und IL-1 β nach Inkubation mit aufgereinigten VP und R406, gemessen durch qPCR. Werte wurden gegen GAPDH normalisiert und sind relativ zur mock Kontrolle. N=1, MW.

R406 wurde mit einer Konzentration von $1.0 \mu\text{M}$ 1h vor Inkubation mit VP mit den M1 M Φ inkubiert. Nach 5h wurden ÜS und RNA-Lysate entnommen und analysiert. Die durch Virionen induzierten Zytokine IL-6 und TNF α wurden durch R406 inhibiert (Abb. 33 A). Die

Ergebnisse wurden durch qPCR bestätigt, die eine Inhibition von IL-6 und IL-1 β zeigte (Abb. 33 B).

Zusammenfassend weisen die erhobenen Daten darauf hin, dass die ITAM-SYK-NF- κ B Signalkaskade, die von CLR zur Induktion pro-inflammatorischer Zytokine genutzt wird, für die Erkennung von HBV Virionen von Bedeutung ist.

3.3.3.4 HBV Erkennung erfordert endosomale Reifung

Die erhobenen Daten wiesen stark auf eine Beteiligung von Partikelaufnahme und Zytokininduktion durch CLR hin. Pathogene, die durch PRR vermittelte Phagozytose aufgenommen werden, werden im Lyso-Endosom degradiert und für weitere Rezeptoren zur Erkennung freigegeben [300]. Nachfolgende Experimente befassten sich daher mit der Fragestellung, ob eine endosomale Reifung für die Erkennung von HBV essentiell ist.

Chloroquin ist ein kommerziell erhältlicher Inhibitor der endosomalen Ansäuerung und inhibiert pH-abhängige Rezeptoren sowie die Verschmelzung von Lysosomen und Endosomen [301], [302]. Der Effekt von Chloroquin auf die HBV Erkennung wurde im etablierten Ansatz mit M1 M Φ untersucht. Chloroquin wurde mit einer Konzentration von 20 μ M 1h vor Inkubation mit HBV Inokulum den M1 M Φ zugeführt. Mock Inokulum sowie LPS und eine Kombination aus TLR 7 und 8 Liganden wurde als Negativ- und Positiv-Kontrollen für den Effekt von Chloroquin eingesetzt.

Chloroquin inhibierte durch HBV induzierte IL-6 und TNF α Sekretion nach 5h Inkubation (Abb. 34, A und B). Dieser Effekt konnte auch auf mRNA Ebene beobachtet werden, wobei auch die in diesem Experiment schwache Induktion der TLR 2 Expression inhibiert wurde (Abb. 34 C). Chloroquin inhibierte die starke Induktion pro-inflammatorischer Zytokine durch kombinierte TLR 7 und 8 Liganden, unerwartet aber auch LPS induzierte Zytokine (Abb. 34, D und E).

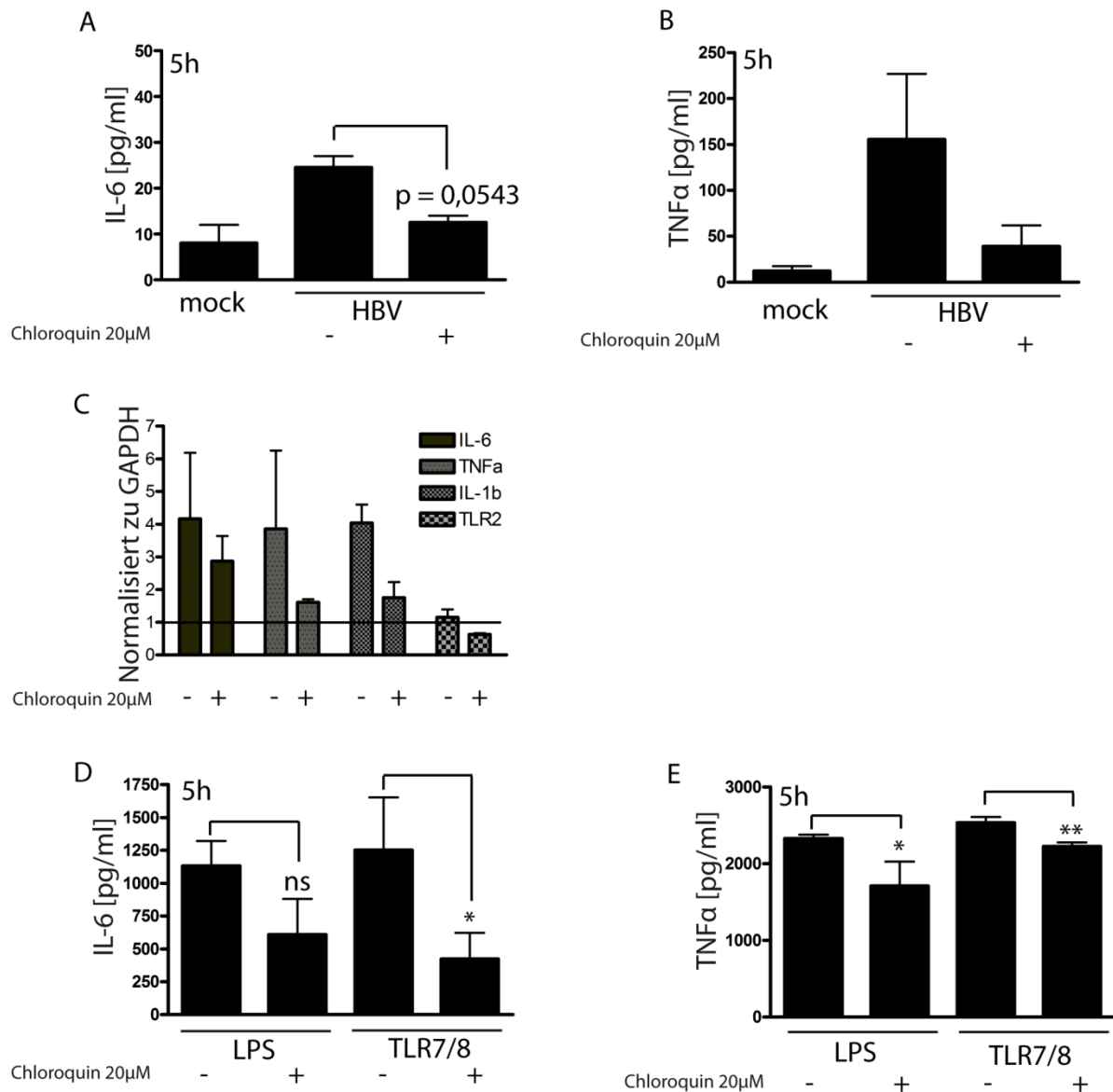


Abbildung 34: Effekt des Inhibitors Chloroquin auf die HBV Erkennung. M1 MΦ ($1,0 \times 10^5$ MΦ pro cm^2) wurden 1 h vor Inkubation mit HBV Inokulum (MOI = 100 VP/Zelle) mit Chloroquin [20 μM] behandelt. A und B) Quantifizierung von IL-6 (A) und TNFα (B) im ÜS nach 5h, gemessen durch ELISA. N=2, MW \pm SEM. C) Effekt von Chloroquin auf durch HBV induzierte Expression von IL-6, TNFα IL-1β und TLR 2, 5h p.i., gemessen durch qPCR. Werte normalisiert gegen GAPDH, relativ zur mock Kontrolle. N=2, MW \pm SEM. D und E) Effekt von Chloroquine auf durch LPS und Imiquimod/ssRNA40 induziertes IL-6 (D) und TNFα (E), 5h nach Inkubation, gemessen durch ELISA. Triplikate n=3, MW \pm SD.

3.3.3.5 Der Mannose Rezeptor und die Erkennung von HBV

Die erhobenen Daten unterstützten die Hypothese, dass der MR eine zentrale Rolle in der Erkennung von HBV hat. Diese Hypothese wurde mit zwei weiteren Versuchsansätzen getestet. Die Funktion des MR sollte, analog zur Inhibition des TLR 2, mittels inhibitorischer AK auf funktionaler Ebene unterbunden werden. Desweiteren sollte untersucht werden, ob

eine Überexpression des MR auch eine Steigerung der Zytokininduktion durch HBV nach sich zieht.

Inhibitorische AK gegen den MR (α MR) und Isotypkontrolle wurden, wie für die Inhibition des TLR 2 durch α TLR2 beschrieben, eingesetzt. Nach 5h wurden ÜS und RNA-Lysate analysiert. HBV induzierte IL-6 und TNF α , wobei IL-6 mit α MR um etwa 20% und TNF α gar nicht inhibiert wurde (Abb. 35 A). Diese Daten wurden durch die qPCR Daten bestätigt, die auf eine schwache Inhibition von IL-6, TNF α und IL-1 β , verglichen mit der Isotypkontrolle, hinweisen. Die TLR 2 Expression wurde nicht reguliert (Abb. 35 B).

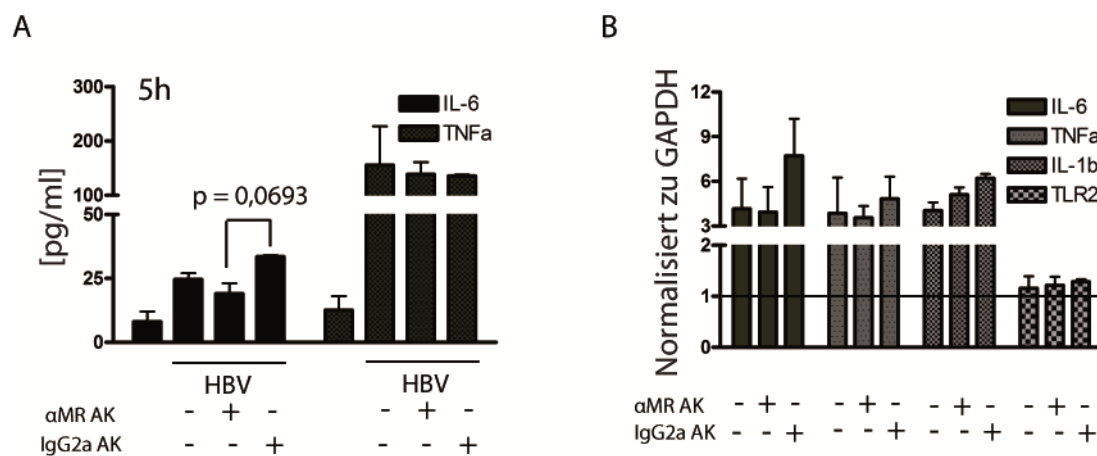


Abbildung 35: Effekt des anti-MR AK auf die HBV Erkennung. M1 MΦ ($1,0 \times 10^5$ MΦ pro cm^2) wurden 1h vor Inkubation mit HBV Inokulum (MOI 100 VP/Zelle) mit α MR [10 $\mu\text{g}/\text{ml}$] behandelt. A) IL-6 und TNF α im ÜS, 5h p.i., gemessen durch ELISA. N=2, MW \pm SEM. B) Expression von IL-6, TNF α , IL-1 β und TLR 2, 5h p.i. mit HBV \pm α MR und Isotypkontrolle, gemessen durch qPCR. Werte normalisiert gegen GAPDH und relativ zur mock Kontrolle. N=2, MW \pm SEM.

Für den zweiten Versuchsansatz wurden M1 MΦ differenziert, aber nach 7 Tagen wurden einige M1 MΦ zusätzlich mit 100 ng/ml IL-4 über 2 Tage inkubiert, was zu einer MR Überexpression führen sollte [303]. M1 MΦ und mit IL-4 stimulierte M1 MΦ wurden ansonsten exakt gleich behandelt. Nach 2 Tagen mit bzw. ohne IL-4 wurden die M1 MΦ mit einem HBV Inokulum sowie HKLM als Positiv-Kontrolle inkubiert. Abb. 36 A stellt die gemessenen IL-6 und TNF α Konzentrationen im ÜS nach 5 h dar. IL-6 blieb unverändert, während TNF α um 50% in den mit IL-4 behandelten M1 MΦ, verglichen mit unbehandelten, reduziert ist. Die qPCR Analyse nach 5h zeigte eine minimal reduzierte Zytokin-mRNA Induktion in IL-4 behandelten M1 MΦ (Abb. 36 B). Eine Überprüfung der Expression von TLR 2 und MR ergab, dass HBV den TLR 2 wie bereits beobachtet in M1 MΦ induzierte (Abb. 36 C). Wie erwartet fand sich eine erhöhte Expression des MR in IL-4 behandelten Zellen, zudem jedoch eine unerwartete Reduktion des TLR 2 in diesen Zellen um etwa 50%. Obwohl die Expression des MR erwartungsgemäß induziert wurde, wurden die durch HBV

induzierten Zytokine eher reduziert. Zusammen mit der Beobachtung, dass die Expression des TLR 2 durch IL-4 unterdrückt wurde, lässt sich vermuten, dass TLR 2 der wichtigere Rezeptor für die HBV Erkennung ist.

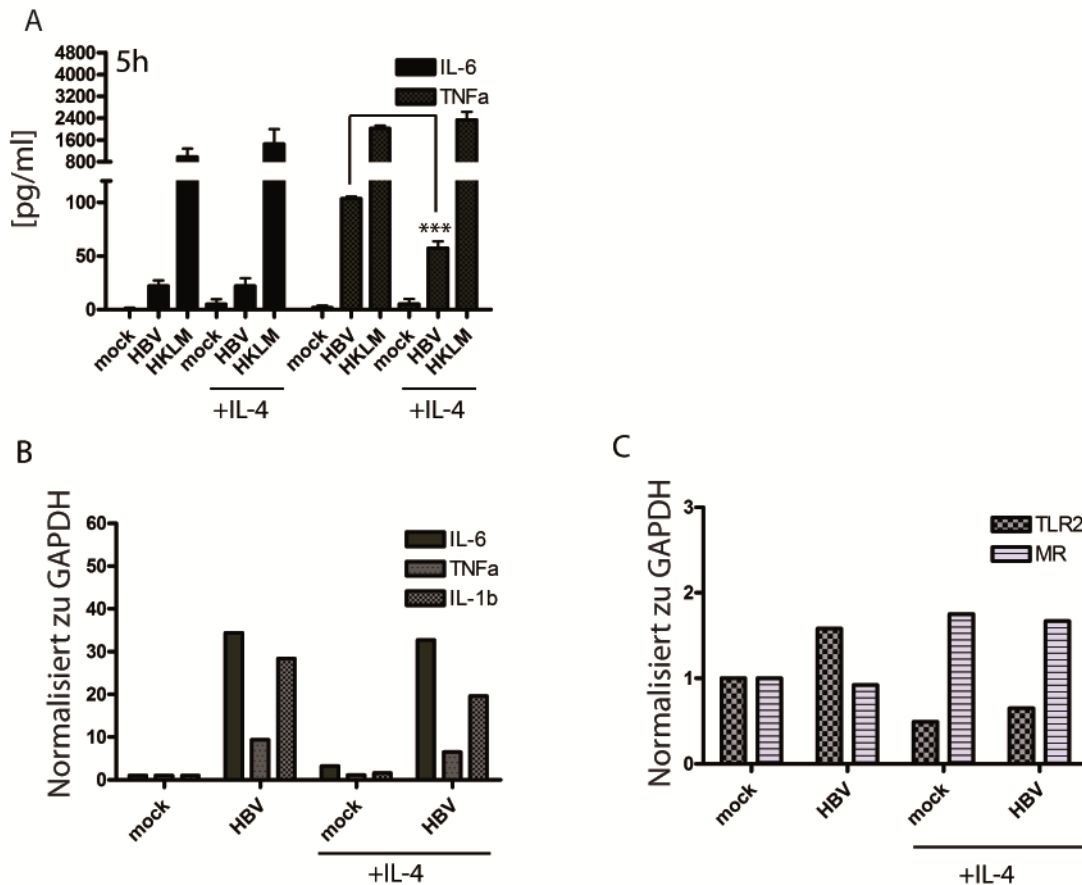


Abbildung 36: Erkennung von HBV in mit IL-4 differenzierten M1 MΦ. M1 MΦ ($1,0 \times 10^5$ MΦ pro cm^2) wurden 2 Tage teilweise mit IL-4 [100 ng/ml] behandelt, und an Tag 9 nach Isolation mit HBV (MOI 100 VP/Zelle) bzw. mock Inokulum und HKLM (100 Partikel/Zelle) als Kontrollen inkubiert. A) IL-6 und TNFα im ÜS, 5h p.i. mit HBV, gemessen durch ELISA. Triplikate $n=3$, MW \pm SD. B und C) Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen (B) sowie TLR 2 und MR (C) in M1 MΦ 5h p.i. mit HBV, gemessen durch qPCR. Werte wurden gegen GAPDH normalisiert, relativ zur mock Kontrolle (ohne IL-4). N=1, MW.

Die Frage, ob der MR an der Erkennung von HBV beteiligt ist, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Die funktionale Inhibition durch AK führt nur zu einer schwachen Inhibition von durch HBV induzierten Zytokinen. Eine Überexpression des MR durch IL-4 führte zu einer unerwarteten Inhibition der TLR 2 Expression und zu einer Reduktion der induzierten Zytokine. Die erhobenen Daten implizieren, dass der MR für die durch die Erkennung von HBV induzierten pro-inflammatorischen Zytokine nur eine sekundäre Bedeutung hat.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Viren, HBV und AAV, auf ihre mögliche Erkennung durch das angeborene Immunsystem untersucht. Im Falle von HBV erfolgte dies aufgrund der unvollständigen Aufklärung der Rolle des angeborenen Immunsystems bei der Kontrolle einer Infektion. Für AAV sollte untersucht werden, inwiefern die Effizienz einer Gentherapie mit AAV Vektoren durch eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems limitiert wurde.

Es ist weitgehend anerkannt, dass nicht HBV selbst für die Leberschädigung im Krankheitsverlauf verantwortlich ist, sondern die kontinuierliche Immunantwort, z.B. durch T-Lymphozyten [19], [304]. Im Falle einer chronischen Erkrankung wird im Allgemeinen eine schwache T-Zell-Antwort verantwortlich gemacht, die als Teil der adaptiven Immunantwort eine Folge der Aktivierung der angeborenen Immunantwort ist [305]. Dabei ist es bei HBV umstritten, ob das Virus durch PRR erkannt wird oder einer Erkennung entgeht und die antivirale Immunantwort unterbindet [166], [294], [306], [307].

Das zweite untersuchte Virus war AAV, das als Vektor in klinischen Gentherapie-Versuchen eingesetzt wurde. Die Therapieansätze werden allerdings durch die T-Zell Antwort des Patienten in ihrer Therapieeffizienz limitiert [308]. Bisher wurde die Erkennung durch TLR 9 in Mäusen beschrieben, im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde daher die mögliche Erkennung durch andere Rezeptoren im humanen System untersucht [309].

Zur Erforschung dieser angeborenen Immunantwort wurden primäre humane Zellen aus Leber und Blut isoliert und mit viralen Partikeln inkubiert, um eine mögliche Erkennung viraler Partikel zu untersuchen. Die erhobenen Daten ließen den Schluss zu, dass HBV Kapsid und Virion sowie AAV des Serotyps 2 und 8 vom humanen TLR 2 erkannt werden. Desweiteren nehmen wir die Beteiligung eines weiteren humanen Rezeptors, genauer eines CLR, bei der Erkennung des HBV Virions an. Die Erkennung ist im Fall von HBV auf primäre Zellen des humanen Wirtes beschränkt und abhängig von der MyD88 und SYK Signalkaskade sowie einer Aufnahme der viralen Partikel. Diese Arbeit bietet nicht nur ein neues Protokoll für die Aufarbeitung primärer humaner Leberzellen, sondern auch neue Daten bezüglich der Erkennung von HBV und AAV durch Rezeptoren.

4.1 Isolation primärer humaner Leberzellen

Für die Analyse der Erkennung von HBV durch Wirtszellen wurden primäre humane Leberzellen mit einem hierfür neu etablierten Protokoll isoliert. Für die Untersuchungen wurden gemischte PHH-Kulturen und NPC-Kulturen sowie hochreine PHH-, KC- und LSEC-

Kulturen verwendet. Das von mir etablierte Protokoll basiert auf publizierten Protokollen zur Isolation von PHH [286], [310]. Isolierte Mischkulturen enthielten im Falle der PHH-Kultur 85% oder mehr PHH und 3-15% NPC, NPC-Mischkulturen bestanden zu mindestens 85% aus NPC [277].

Die publizierten Protokolle für die Isolation von PHH erwähnten den Anteil verbleibender NPC entweder nicht oder kamen zu dem Schluss, dass die isolierten Kulturen nicht rein waren [286], [311]. Durch unser Protokoll gelang es, hochreine PHH mit typischer Hepatozyten-Morphologie sowie partieller Polyploidie, einem Merkmal terminal differenzierter PHH, zu isolieren [286], [311], [312]. Isolierte Zellen wurden mit dem hochspezifischen AK *Hepatocyte Paraffin 1* markiert, der nicht mit Gallengang- oder Nichtparenchym-Zellen reagiert [279]. Desweiteren exprimieren die Zellen, im Gegensatz zu den anderen hochreinen Kulturen, Albumin, welches spezifisch in Hepatozyten synthetisiert wird [278], [313]. Insofern kann von einer sehr homogenen Isolation terminal differenzierter PHH ausgegangen werden.

Ein Protokoll zur Isolation von KC wurde erstmalig von *Knook* und *Sleyster* 1976 für Rattenzellen publiziert [314]. Die erste Isolation humaner KC erfolgte 1994 durch *Heuff et al.* [315]. Ein neues Protokoll setzte ebenfalls einen Verdau, einen Dichtegradienten und einen Adhärenzschritt ein [284]. Die nach meinem Protokoll isolierten Zellkulturen adhärten an Plastik und zeigten die typische irreguläre, amöboide Morphologie von KC [316-318]. Der MΦ CD68 konnte als in den untersuchten Zellen lokalisiertes Protein und auf Expressionsebene nachgewiesen werden [283], [319]. Desweiteren exprimieren die Zellen CD11b, das in murinen und humanen KC nachgewiesen wurde [282], [320], [321]. CD68 und CD11b wurden auch im neuesten publizierten Protokoll als Marker verwendet, und die isolierten Zellen wurden als 98,33% CD68 positiv identifiziert [284]. An diesem Punkt war die Analyse in meiner Arbeit limitiert, da die Zellen an Plastik adhärten und nicht für eine FACS Analyse abgelöst werden konnten. Außerdem wurde CD68 mRNA auch in nicht-myeloiden Zellen nachgewiesen, allerdings passt die detektierte minimale Expression in LSEC zu den gemessenen Werten in primären humanen Endothelzellen (HUVEC) und ist somit kein Indiz für eine Kontamination [322]. Mit den verfügbaren Daten kann man zusammenfassend von einer hochreinen Isolation von KC sprechen.

LSEC wurden erst vor 38 Jahren als eigener Zelltyp beschrieben [323]. Seitdem wird über Fragen der Identifizierung, Isolation und Kultivierung dieses Zelltyps intensiv diskutiert [324]. Die Isolation über CD31, wie sie auch in dieser Arbeit erfolgte, wird kritisch betrachtet. CD31 wurde in Gewebeschnitten in humanen sowie in Ratten-LSEC detektiert

[325], [326]. Eine andere Studie kam dagegen zu dem Schluss, dass frisch isolierte Ratten-LSEC CD31 intrazellulär lokalisieren und erst nach Kultivierung an der Oberfläche, was gravierende Folgen für eine Isolation mit magnetischen AK hat [327]. Desweiteren wurde für myeloide Zellen, wie M Φ , die Expression von Endothelmarkern wie CD31 beschrieben [328]. Dennoch wird CD31 zur positiven Selektion sowie zur Detektion von Endothelzellen in Leberzellkulturen verwendet [284], [329]. Im verwendeten Protokoll wurde die CD31 Positiv-Selektion erst nach der Isolation der KC durchgeführt. Als weiterer Marker für LSEC gilt die Aufnahme von acetyliertem LDL, welches in mehreren Studien verwendet wird und auch in dieser Arbeit eingesetzt wurde [330], [331]. AcLDL bindet *Scavenger*-Rezeptoren, die auch auf KC exprimiert werden, sodass die Aufnahme nicht absolut spezifisch für Endothelzellen ist [324], [332]. Für Endothelzellen wurde allerdings berichtet, dass sie acLDL 7-15 mal schneller aufnehmen als andere Zelltypen, sodass die hier gezeigte schnelle Aufnahme in einem kurzen Zeitrahmen als spezifisch bewertet wurde [331]. Der auf mRNA Ebene detektierte Marker L-SIGN wird dagegen hoch und spezifisch auf LSEC, nicht aber auf anderen hepatischen Zellen exprimiert, was mit den Daten der Studie übereinstimmt [333-335]. Die isolierte Kultur kann somit als sehr reine LSEC Kultur betrachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein neues, hier erstmals beschriebenes Protokoll etabliert wurde, über das hochreine Kulturen von humanen PHH, KC und LSEC in aufeinanderfolgenden Arbeitsschritten aus einem Leberresektat isoliert werden können. Diese Kulturen wurden anschließend weiter charakterisiert und standen für die Versuche mit viralen Partikeln zur Verfügung.

In den isolierten Leberzellkulturen wurde die Expression von TLR 1 bis 10 quantifiziert und mit Referenzzellen verglichen. Die Funktionalität der Rezeptoren wurde mit spezifischen Liganden *in vitro* untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass PHH intensiv TLR 3 exprimieren, jedoch nur schwach auf Liganden für TLR 3 und auch die minimal exprimierten TLR 1/2, 4 und 2/6 reagierten. KC exprimierten hohe Level an TLR 1 bis 6 und 8, wobei eine Stimulation jedoch nur mit Liganden für TLR 1 bis 6 erfolgte. LSEC exprimierten TLR 1 bis 6 und TLR 8, davon aber nur TLR 3 und 4 hoch, wobei TLR 3 am höchsten exprimiert wurde. Stimuliert werden konnten allerdings nur TLR 1 bis 6. Generell fiel die hohe Expression von TLR 3 in allen Zellen und die schwache Antwort der PHH auf Stimuli auf, sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene.

Zwei Studien, welche die Expression der humanen TLR 1 bis 9 in adultem Gewebe untersuchten, kamen zu dem Schluss, dass die meisten TLR nur schwach exprimiert werden,

mit Ausnahme von TLR 3 und 5 beziehungsweise TLR 2 und 4 [336], [337]. Der Vollständigkeit halber sollte erwähnt werden, dass in beiden Studien nur jeweils eine Leberprobe verwendet wurde. Dies steht scheinbar im Widerspruch zu den Daten dieser Arbeit, da in den von mir isolierten Kulturen hohe Expressionswerte gemessen werden konnten, die gerade aus dem Grund der Vergleichbarkeit mit Referenzzellen abgeglichen wurden, welche bestimmte TLR hoch exprimieren.

In einer Veröffentlichung wurde in isolierten humanen PHH die mRNA aller TLR nachgewiesen und die Funktionalität des TLR 4 mit hohen Dosen LPS in primären Maus-Hepatozyten (PMH) verifiziert [338]. Ebenso wurde die Aktivierung von NF- κ B durch TLR 2-Liganden in PMH beschrieben [339]. Generell wird in der Literatur von einer schwachen Reaktion auf TLR Liganden in Hepatozyten ausgegangen [340]. Unter Entzündungsbedingungen wird allerdings die Expression von TLR 2 hochreguliert und die Hepatozyten auf diese Weise sensibilisiert [339]. Insofern decken sich unsere Ergebnisse bezüglich PHH mit der Literatur, was die schwache Reaktion der Zellen auf TLR-Stimuli angeht. Die hier vorgestellte relative Quantifizierung der TLR-Expression wurde so bisher nicht beschrieben, steht aber auch in keinem Widerspruch zur Literatur.

In isolierten Ratten-KC wurde eine Zytokinsekretion nach Stimulation mit LPS detektiert, was auf die Expression von TLR 4 schließen ließ [341]. Murine KC exprimieren TLR 1 bis 9 und reagieren ebenfalls auf Stimuli für TLR 2, 3, 4 und 9 [342], [343]. Diese Ergebnisse wurden kürzlich bestätigt und insofern präzisiert, als dass murine KC auf Liganden für die TLR 1 bis 9, mit Ausnahme von TLR 5, mit der Freisetzung von IL-6 reagieren. Wenig IL-6 wurde bei Liganden für TLR 7 bis 9 gemessen, und die Zellen reagierten auf TLR 3 Liganden durch Induktion von IFN- β [344]. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten über humane KC decken sich somit mit der vorhandenen Literatur über murine KC mit der Ausnahme, dass humane KC auch über einen funktionalen TLR 5 verfügen.

In kultivierten murinen LSEC wurde mRNA der TLR 1 bis 9 detektiert. Auf Stimuli für TLR 1 bis 9 reagierten die Zellen mit einer IL-6 Induktion, auf Inkubation mit TLR 3 und 4 Stimuli außerdem mit IFN- β Induktion. Zudem reagierten sie mit einer Induktion von TNF α auf Stimulation der TLR 1, 2, 6, 8 und 9 [344]. Diese Ergebnisse werden von anderen Studien bezüglich TLR 4 und 9 bestätigt [345], [346]. Im Gegensatz dazu reagierten humane LSEC sehr schwach oder gar nicht auf Stimulation der TLR 7 bis 9, deren mRNA bis auf TLR 8 auch kaum detektierbar war, dafür aber stärker im Falle der TLR 1 bis 6. TLR 3 und 4 scheinen in murinen und humanen LSEC ähnlich stark exprimiert zu sein und haben vergleichbare Effekte auf die Zytokinsekretion. Humane und murine LSEC scheinen sich

dagegen somit im Bezug auf die RNA/DNA-erkennenden TLR 7 bis 9 deutlich zu unterscheiden.

4.2 Erkennung viraler Partikel durch TLR

4.2.1 Erkennung von HBV Partikeln

In dieser Arbeit wurde die Erkennung von HBV Partikeln durch das angeborene Immunsystem untersucht. Ich konnte bestätigen, dass infektiöses HBV-Inokulum proinflammatorische Zytokine in primären humanen M Φ , KC sowie LSEC induziert. Es wurden keine Zytokine nach Inkubation mit murinen M Φ , mit der humanen, leukämischen Monozytenzelllinie THP-1, sowie PHH, den Wirtszellen von HBV, gemessen. HBV induzierte IL-6 in KC und LSEC sowie TNF α und IL-6 in M1 M Φ , aber keine Prozessierung von Pro-IL-1 β und kein IFN- β , wie man es bei einer anti-viralen Immunantwort erwarten würde [347-349]. Die Immunantwort auf HBV erfolgte innerhalb von 5 bis 20h und möglicherweise darüber hinaus, und war unabhängig von der Fähigkeit des Virus zu replizieren, wie durch UV-Behandlung gezeigt wurde [277]. Eine Erkennung durch differenzierte THP-1 Makrophagen konnte nicht nachgewiesen werden, obwohl dies für HBV Kapside publiziert ist [166]. Eine Trennung der verschiedenen HBV-Partikel ergab, dass infektiöse Virionen IL-6 und TNF α und Kapside vor allem TNF α induzieren, während angereicherte Filamente, SVP und HBe-Protein keine Zytokine induzierten. Die von uns publizierte Aktivierung von NF- κ B durch HBV wurde insofern bestätigt, als dass durch HBV induzierte Zytokine durch Inhibition von NF- κ B fast vollständig unterdrückt wurden [277]. Desweiteren wurde durch spezifische Inhibition die Beteiligung von MyD88 nachgewiesen, einem zentralen Molekül der TLR-Signalkaskade [147]. In durch HBV aktivierten Zelltypen wurde die spezifische Induktion von TLR 2-mRNA detektiert, wodurch auf eine Beteiligung von TLR 2 an der Erkennung geschlossen wurde [292]. Experimente mit blockierenden AK gegen TLR 2 bestätigten die Beteiligung des humanen TLR 2 an der Erkennung von HBV Inokulum und aufgereinigten Virionen. Eine TLR 9 Beteiligung wurde ausgeschlossen, da M1 M Φ nicht auf TLR 9 Liganden reagierten und durch HBV induzierte Zytokine nicht durch einen spezifischen TLR 9 Inhibitor unterdrückt werden konnten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde weiterhin die Beteiligung von RLR, NLR sowie zytosolischer, DNA-erkennender Rezeptoren wie DAI und AIM2 ausgeschlossen, da diese eine Sekretion von IL-1 β und IFN- β induzieren würden [135]. HBV Nukleinsäuren sind zudem gut vor zytosolischen Rezeptoren geschützt: Die DNA wird nach der Infektion als cccDNA im Kern verborgen [350]. Die mRNA des Virus ist der Struktur der Wirts-mRNA gleich und die prägenomische RNA wird

sofort in Kapside verpackt. So schützt HBV die einzelsträngigen RNA Intermediate vor einer Erkennung, die sonst ein starker Stimulus für IFN Typ I wären [30], [306], [351].

Die Interaktion von HBV mit dem angeborenen Immunsystem und seinen Rezeptoren ist ausgesprochen umstritten. In Arbeiten der Gruppe Chisari wurde anhand von Schimpansen mittels Microarray Analysen gezeigt, dass eine HBV Infektion in der ersten Phase keine anti-virale Antwort in Hepatozyten oder eine intrahepatische angeborene Immunantwort induziert [306]. Die Autoren folgerten daraus, dass HBV vom angeborenen Immunsystem nicht erkannt wird, woraufhin HBV als „Tarnkappen“ (*stealth*) Virus klassifiziert wurde [30]. Allerdings beschränkte sich die Studie auf die Interferone IFN- α , - β und - γ und analysierte nicht die Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen. Andere Arbeiten gehen darüber hinaus und implizieren, dass HBV die TLR-Signalkaskaden unterbindet. Für murine NPC wurde gezeigt, dass HBsAg, HBeAg und Virionen die TLR-abhängige anti-virale Immunantwort stark inhibieren [352]. Desweiteren wurde beschrieben, dass HBV keine anti-virale Antwort in Form von IFN- α in humanen pDC induziert, und dass HBeAg und HBsAg durch TLR 9-Aktivierung induziertes IFN- α und TNF- α stark inhibieren [307]. Die virale Polymerase wurde als Inhibitor der RIG-I/MDA5 und TLR 3 vermittelten IFN- β -Induktion identifiziert [353]. Auch für das X-Protein wurden inhibitorische Funktionen postuliert [354]. Generell ist auffällig, dass sich die Literatur auf die klassische anti-virale Immunantwort in Form von IFN- α und - β konzentriert.

Dennoch legen verschiedene Studien eine Beteiligung des angeborenen Immunsystems und von TLR bei der Erkennung von HBV oder in der Pathogenese nahe. Eine direkte Erkennung von HBV wird durch eine Studie belegt, welche die Erkennung des Kapsids durch TLR 2 nachweist [166]. In Patienten mit akuter Hepatitis wurden erhöhte Werte pro-inflammatorischer Zytokine im Blut festgestellt, und eine weitere Studie an infizierten Schimpansen, ebenfalls aus der Gruppe Chisari, detektierte den Verlust von HBV-DNA in Testsubjekten bevor eine effektive T-Zell Antwort aktiviert werden konnte, was die Beteiligung anderer Mechanismen impliziert [355], [356]. Anhand muriner Zellen konnte eine mögliche Rolle von TLR in der Pathogenese von HBV gezeigt werden: Eine Aktivierung von TLR 3 und 4 in KC bzw. TLR 3 in LSEC und TLR 3, 4 und 7 in mDC induzierte Zytokine, welche die Replikation von HBV stark inhibierten. Als Effektor wurde primär IFN- β identifiziert, wobei über TLR 4 aktivierte KC noch eine weitere, unbekannte Komponente induzierten [342]. Unterstützend zu diesem Ergebnis wurde in HBV transgenen Mäusen festgestellt, dass eine Stimulation von TLR 2 bis 5, 7 und 9 die HBV-Replikation inhibiert,

wobei der Effekt für TLR 2 nur schwach war [357]. Eine weitere Studie stellte einen Zusammenhang zwischen TLR 2 Expression und Signalkaskade und HBeAg in HBeAg-positiven und -negativen Patienten her, wobei gezeigt wurde dass TLR 2-Expression und Funktionalität durch HBeAg unterdrückt werden [358].

Da für TLR 2 und TLR 9 die Erkennung viraler Muster dokumentiert wurde und diese Rezeptoren bereits in Vorarbeiten in Form meiner Diplomarbeit als Kandidaten identifiziert wurden, befasste sich diese Arbeit intensiv mit diesen TLR [268]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen über die HBV-TLR-Interaktion die Folgerung zu, dass HBV Virionen und Kapside spezifisch vom humanen TLR 2 erkannt werden. Obwohl HBV ein DNA-Virus ist, erfolgt die Erkennung nicht durch TLR 9, und die Erkennung durch andere TLR ist nach Analyse der Experimentansätze und Ergebnisse hoch unwahrscheinlich.

Für die Erkennung von HBV Partikeln gibt es bislang nur eine Publikation: Die Erkennung von rekombinanten HBcAg und Kapsid durch den humanen TLR 2 [166]. Die publizierten Ergebnisse decken sich insofern mit den hier vorgestellten, als dass in M Φ die Induktion von TNF α durch HBcAg in Abhängigkeit von TLR 2 gemessen wurde. Weiterhin stimmen sie mit meiner Beobachtung überein, dass native Kapside in M1 M Φ vor allem TNF α und wenig IL-6 induzieren. *Cooper et al.* kamen weiterhin zu dem Schluss, dass diese HBV-Erkennung stark von der C-terminalen, Arginin-reichen Sequenz des HBcAg abhängt. Dies wiederum erklärt das fehlende Potenzial des HBe-Proteins, eine Immunantwort zu stimulieren, wie in dieser und anderen Studien mit DC belegt ist, da dem gereiften 17-kD HBeAg C-terminal 34 AS-Reste fehlen, welche zur Arginin-reichen Sequenz korrespondieren [166], [307]. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse widersprechen scheinbar in zwei Punkten den von *Cooper et al.* publizierten: Ich konnte keine Zytokine nach Inkubation mit THP-1 M Φ detektieren, welche in der Publikation verwendet wurden, und ich konnte nur eine schwache Aktivierung HEK293-TLR2 Zellen beobachten. In den verwendeten HBV Präparationen aus HepG2.2.15 Zellen sind auch Kapside, aber in geringerer Menge als Virionen, anhand derer die MOI berechnet wurde. *Cooper et al.* verwendeten ausschliesslich Kapside, woraus sich folgern liesse das THP-1 sich in einem entscheidenden, nicht genauer benennbaren Punkt von primären M1 M Φ unterscheiden und Virionen nicht erkennen. Desweiteren wurden die Kapside in *E.coli* produziert, was in der Literatur als Quelle möglicher LPS-Kontaminationen angesehen wird und die hohen Werte an TNF α in der Publikation, verglichen mit den in dieser Arbeit gemessenen Werten, erklären könnte [359]. Die von mir verwendeten HBV Präparationen enthalten zudem HBeAg, welches TLR 2 und die TLR-Signalkaskade generell

inhibiert, wie Studien über primäre murine Leberzellen, Patientendaten und humane Zelllinien implizieren [352], [358], [360]. Differenzierte THP-1 sind vorstimuliert, und für vorstimulierte murine Zellen wurde ein inhibitorisches Potenzial aller HBV-Partikel nachgewiesen [352], [361]. Es liesse sich also Schlussfolgern, dass THP-1 Zellen keine HBV Virionen erkennen bzw. dass HBV über das HBe-Protein einen inhibitorischen Effekt auf vorstimulierte Zellen ausübt. Dieselbe Problematik trifft auch auf HEK293-TLR2 Zellen zu, wobei hier noch hinzukommt, dass den hier vorgestellten Ergebnissen zufolge die Erkennung von Virionen von einer Phagozytose abhängig ist, welche für HEK293 Zellen bislang nur nach Transfektion mit MD2/TLR4 beschrieben wurde [362]. Ausserdem musste zum Auslesen IL-8 verwendet werden, welches auch physiologisch induziert werden kann (M. Hösel, persönliche Mitteilung) und unter der Kontrolle mehrerer Signalkaskaden steht, wodurch die unspezifische Aktivierung der als Negativ-Kontrolle verwendeten HEK293 Zellen erklärt werden kann [363].

Wie die vorgestellten Daten mit aufgereinigten Virionen demonstrieren ist TLR 2 auch an der Erkennung von Virionen beteiligt. Eine Inhibition mit TLR 2 blockierenden AK ergab nur eine unvollständige Inhibition, verglichen mit Experimenten bezüglich der Erkennung von *Pseudomonas aeruginosa* [205]. Zusammen mit der unvollständigen Unterdrückung von induzierten Zytokinen durch Inhibition von MyD88, verglichen mit der hohen Abhängigkeit von NF- κ B, ließen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass ein weiterer, ebenfalls NF- κ B abhängiger Signalweg involviert ist. Für TLR 2 ist die Detektion viraler PAMP gut dokumentiert: Die Virionen der DNA-Viren HSV, HCMV (B und H Protein) und Vaccinia Virus werden von TLR 2 erkannt [165], [364-367]. Oberflächenmoleküle von RNA Viren werden ebenfalls, unabhängig vom Genom, durch TLR 2 erkannt, was für das Hämagglutinin des Masernvirus, MMTV und das *Core*-Protein sowie NS3-Protein von HCV dokumentiert wurde [368-371].

Eine aktive Erkennung von HBV durch das angeborene Immunsystem wurde in kürzlichen Publikationen nunmehr als wahrscheinlich angenommen [351], [372]. Zu der erwähnten Studie aus der Gruppe Chisari an Schimpansen kommt eine weitere Studie an zwei akut infizierten Patienten zu dem Ergebnis, dass in beiden Fällen NK bzw. NKT Zellen vor einem maximalen HBV DNA Höchstwert aktiviert waren [356], [373]. Eine starke HBV-spezifische T-Zell-Antwort wurde erst gemessen, als der Wert an gemessener HBV DNA bereits rückläufig war, was demonstriert, dass HBV vom angeborenen Immunsystem erkannt wird. Zwei mögliche zelluläre Mechanismen wurden publiziert: Zum einen wurde in immunkompetenten HepaRG Zellen gezeigt, dass eine Transduktion mit HBV DNA über

einen Baculovirus-Vektor diese Zellen in einen antiviralen Status versetzt [374], [375]. Das Baculovirus-HBV Konstrukt induzierte IFN- β unabhängig vom Vektor und die Zellen kontrollierten die HBV Replikation. Ergebnisse aus unserer Gruppe weisen darauf hin, dass HBV in einer frühen Infektionsphase IL-6 in NPC induziert und dieses in der Lage ist, die HBV Replikation zu kontrollieren [277]. In der hier vorgestellten Arbeit konnte ich weiterhin den Signalweg sowie den Rezeptor, TLR 2, identifizieren, was auch zu den Studien passt, welche sich mit dem inhibitorischen Potenzial von HBV Partikeln befassen. *Lang et al.* publizierten jüngst eine Arbeit, welche sich detailliert mit dem HBeAg auseinandersetzte, und kamen zu dem Schluss, dass das HBeAg die TLR-Signalkaskade inhibiert [360]. *Lang et al.* zeigten, dass HBeAg mit dem TLR 2 sowie den Signalmolekülen Mal und TRAM interagiert und effektiv die Aktivierung von NF- κ B und IFN- β stört. Sie beschrieben weiterhin, dass dieser Effekt von einer N-terminalen Sequenz abhängt, die nur im gereiften HBeAg, nicht dem HBcAg, gefunden wurde. Diese Daten wurden durch die erwähnte Studie an chronisch infizierten Patienten von *Visvanathan et al.* vervollständigt, die zeigte, dass TLR 2-Expression und Funktionalität durch HBeAg inhibiert wurden [358]. Es besteht scheinbar ein „aktives Interesse“ des replizierenden Virus, den TLR 2 und die TLR-Signalkaskade zu stören. Diese Überlegung wird gestützt durch die Tatsache, dass das HBeAg sehr früh transkribiert, translatiert und sekretiert wird [376], [377]. *Lang et al.* untersuchten den Effekt nur in HBeAg produzierenden Zellen, der inhibitorische Effekt von HBeAg wurde allerdings auch an mit HBeAg-versetztem Medium behandelten PBMC gemessen [358]. In dieses neue Gesamtbild passt ebenfalls eine Publikation unserer Gruppe, in welcher beschrieben wurde das eine Apoptose keinerlei Vorteile für die Verbreitung von HBV birgt, da durch diese nur unreife, unumhüllte Partikel freigesetzt wurden [276]. Mit den gerade vorgetragenen Erkenntnissen erscheint eine Apoptose umso unvorteilhafter, da unumhüllte Kapside am Ort der Infektion pro-inflammatorische Zytokine induzieren würden, die nach *Hösel et al.* in der Lage sind, die HBV Replikation zu kontrollieren, was auch in Patienten gezeigt wurde [277], [355], [373]. Es wurde ausserdem gezeigt, dass HBsAg durch Interaktion mit einer nicht identifizierten, hitze-instabilen Serumkomponente Monozyten inhibiert [378].

Die Inhibition der TLR-Signalkaskade durch HBsAg und HBeAg sowie die Inhibition von TLR 2 in chronisch infizierten Patienten lassen darauf schliessen, dass TLR 2 für die Pathogenese eine wichtige Rolle spielt, und lassen die Erkennung von Virion und Kapsid, wie hier in dieser Arbeit dokumentiert, als wahrscheinlich erscheinen. Zu der bisherigen Erkenntnis, dass die Kontrolle einer HBV Infektion von der adaptiven Immunantwort abhängt, kommt nun die hier belegte Vermutung, dass diese Kontrolle ebenfalls von einer

schnellen Reaktion des angeborenen Immunsystems abhängt [22], [379]. Es erscheint wahrscheinlich, dass die HBV Replikation durch IL-6 kontrolliert werden kann, wenn diese Antwort stark genug ausfällt bevor HBeAg und HBsAg die Erkennung von HBV durch TLR Signalkaskaden inhibieren können.

Die Erkennung von HBV durch weitere TLR wurde dagegen weitgehend ausgeschlossen. TLR 2 heterodimerisiert mit TLR 1 und 6, welche allerdings mangels spezifischer Inhibitoren nicht untersucht wurden. Ihre Beteiligung kann daher nicht eindeutig ausgeschlossen werden. Bislang wurde keine direkte Beteiligung von TLR 1 und 6 an der Erkennung viraler Bestandteile publiziert.

Die endosomalen, RNA-erkennenden TLR 3, 7 und 8 wurden früh ausgeschlossen, da diese Rezeptoren Typ I IFN- α und - β induzieren [156], [172], [380-382]. Da Typ I IFN nicht detektiert wurde, und die Zytokine zeitlich vor einer möglichen HBV-Replikation mit RNA-Intermediaten gemessen wurden, ist eine Erkennung durch diese TLR auszuschliessen.

Auch für TLR 4 ist die Erkennung viraler Proteine, wie das Env-Protein von MMTV und das F-Protein von RSV, beschrieben [162], [163], [383]. Die direkte Beteiligung von TLR 4 konnte in dieser Arbeit nicht durch spezifische Inhibitoren belegt werden. Obwohl HBV-Oberflächenproteine glykosyliert sind, wurde nie eine Polysaccharid-Molekularstruktur identifiziert. Das starke Ansprechen von murinen M Φ auf LPS, nicht jedoch auf HBV, legt nahe, dass TLR 4 allein HBV nicht erkennt. LPS induziert TLR 2- und 4-Expression [384], [385], und eine neue Studie impliziert die Induktion von TLR 4 mRNA, nicht aber TLR 2 mRNA, durch LPS in humanen Monozyten [386]. TLR 4-Expression wurde durch HBV im Gegensatz zu TLR 2 in dieser Arbeit nicht induziert, was nahelegt, dass TLR 4 nicht beteiligt ist.

TLR 5 detektiert bakterielles Flagellin, und bisher wurde keinerlei Interaktion mit viralen Proteinen, oder irgendeinem weiteren Liganden, publiziert [155], [206], [347]. Aufgrund dieser hohen Spezifität wurde die Beteiligung von TLR 5 als möglicher Rezeptor ebenfalls als höchst unwahrscheinlich eingestuft. Ohne die Verfügbarkeit spezifischer Inhibitoren kann er aber auch nicht absolut ausgeschlossen werden.

DNA-Viren werden von TLR 9 erkannt und induzieren IFN- α in Abhängigkeit von TLR 9 in pDC [167], [168], [387]. HBV ist ein DNA-Virus, was die Möglichkeit einer Erkennung durch TLR 9 vermuten lässt. Die Notwendigkeit der Phagozytose und endosomaler Reifung für eine Zytokinsekretion durch HBV, wie in den Abbildungen 30 und 34 dargestellt, legt nahe, dass HBV im späten Endosom degradiert und somit die DNA von TLR 9 erkannt

werden kann. Die erhobenen Daten schliessen eine Beteiligung von TLR 9 in der Erkennung durch M Φ allerdings aus, was noch dadurch unterstützt wird, dass der humane TLR 9 mutmaßlich nur in pDC exprimiert wird und diese HBV nicht erkennen [287], [307]. Kürzlich erschienene Ergebnisse belegen andererseits, dass eine endosomale Reifung auch für die Erkennung von TLR 2 Liganden essentiell ist, und die durch Inhibition dieser Reifung reduzierte Sekretion von IL-6 um 53-37% in dieser Publikation stimmt mit den hier vorgestellten Daten überein [388].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass TLR 2 HBV erkennt. Virionen werden aufgenommen und degradiert, Kapside werden direkt an der externen Zellmembran erkannt. SVP und HBe-Protein induzieren keine pro-inflammatorischen Zytokine, und spielen eher in einer späteren Phase eine Rolle in der Inhibition der Immunantwort.

4.2.2 Erkennung von AAV Kapsiden

AAV wurden aufgrund fehlender Pathogenität und geringer Immunogenität in präklinischen Studien und humaner Gentherapie eingesetzt [59]. Trotz schwacher adaptiver Immunantwort versagte rAAV2 aber darin, eine längere Gen-Expression nach Transduktion der Leber zu etablieren [308]. In dieser ersten Untersuchung einer angeborenen Immunantwort gegen rAAV in primären humanen Leberzellen wurde die Erkennung von rAAV2 und rAAV8 durch KC und LSEC nachgewiesen. Die Inkubation dieser Zellen mit rAAV und leeren Kapsiden führte zu einer Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF α und IL-8. Die gegen rAAV gerichtete Immunantwort in humanen NPC waren vergleichbar mit dem Aktivierungsprofil in der humanen THP-1 Zelllinie durch rAAV1, rAAV2 und rAAV8 [389], [390].

Vergleichbar zu den in dieser Arbeit erhobenen Daten zu HBV wurde das Kapsid von AAV2 und AAV8 als PAMP identifiziert, welches pro-inflammatorische Zytokine in KC und LSEC induziert, wie die vergleichbare Induktion durch rAAV und leere Kapside zeigte. Der humane TLR 2 wurde als PRR für AAV in primären NPC und anhand der HEK293-TLR2 Zelllinie identifiziert. Bis jetzt war der einzige identifizierte PRR für rAAV TLR 9, der in murinen pDC nach Stimulation mit AAV IFN- α und - β induzierte [309]. Diese TLR9-MyD88 Aktivierung wurde *in vivo* als essentiell für die CD8-T-Zell-Antwort auf das Transgen und das virale Kapsid erachtet. In unserer Publikation zeigten wir dagegen, dass AAV2 und AAV8 Kapside TLR 2-Expression induzieren (nicht gezeigt) und HEK293-TLR2 Zellen aktivieren, nicht aber HEK-TLR9 (nicht gezeigt). Ebenso sind KC und LSEC nicht durch

TLR 9 Liganden aktivierbar und die Erkennung von Kapsiden ist durch gegen TLR 2 gerichtete AK inhibierbar.

Wie bereits erwähnt wurde TLR 2 erstmals als Rezeptor für Lipoproteine und Peptidoglykane identifiziert und als PRR für mehrere virale PAMP [135]. Als PRR mit der größten Bandbreite an PAMP ist es unwahrscheinlich, dass er alle Liganden mit derselben Affinität bindet, was die Differenz in der IL-8-Induktion zwischen Kapsiden und HKLM in HEK293-TLR2 Zellen erklärt.

Unsere Daten belegen, dass sowohl KC als auch LSEC AAV in Abhängigkeit von TLR 2 erkennen. Dies stimmt mit Studien in Mäusen überein, in denen KC eine Immunantwort gegen AAV induzierten [391]. Dagegen wurden LSEC noch nicht auf eine mögliche Erkennung von AAV untersucht. LSEC reagierten schwächer, aber klar detektierbar auf AAV, was mit den erhobenen Daten bezüglich der TLR 2 Expression in Leberzellen übereinstimmt. Es sind also drei Zelltypen, pDC, KC und LSEC, unter Beteiligung von zwei PRR, TLR 2 und TLR 9, an der Erkennung von AAV und einer anti-viralen Antwort, beteiligt. Somit wurde erstmalig gezeigt, dass AAV auch in Zellen des Ziel-Organs für Gentherapien effektiv erkannt wird.

Zusammenfassend wurde erstmals demonstriert, dass AAV Kapside des Serotyps 2 und 8 in primären humanen KC und LSEC eine TLR 2-abhängige Immunantwort induzieren. Da die Erkennung von AAV bislang in Mäusen erforscht wurde ist dies eine wichtige Erkenntnis die zeigt, dass murine Modellsysteme nicht immer repräsentativ für humane Patienten sind.

4.3 Erkennung viraler Partikel durch CLR

In dieser Arbeit wurde die Aktivierung einer Immunantwort durch HBV auch unter dem Gesichtspunkt untersucht, ob CLR das Virus erkennen. Wie bereits unter 4.2.1 ausgeführt wurden NLR, RLR sowie zytosolische DNA-Rezeptoren bereits für eine frühe HBV-Erkennung ausgeschlossen. CLR sind membranständige oder im Serum gelöste Proteine, welche in Ca^{2+} -abhängiger Weise PAMP erkennen, deren Phagozytose vermitteln und auch eine Immunantwort induzieren können [181], [201], [293]. Aufgrund der unvollständigen Unterdrückung von HBV induzierten Zytokine durch MyD88- und TLR 2-Inhibitoren wurde die Beteiligung eines weiteren, NF- κ B aktivierenden Signalweges angenommen. Aus diesem Grunde, und da HBV Oberflächenproteine Glykoproteine mit Mannoseresten sind, was eine Erkennung sehr wahrscheinlich macht, wurden die Phagozytose und Signalkaskade der CLR untersucht [296].

Aufgrund folgender in dieser Arbeit dokumentierter Ergebnisse wird eine Erkennung durch CLR angenommen: Durch HBV induzierte Zytokine werden durch Inhibition von Clathrin-vermittelter Endozytose mittels Saccharose unterdrückt. Dieser Befund deckt sich mit Ergebnissen, welche die Clathrin-abhängige Endozytose des West-Nil-Virus und des Hantaan Virus durch Inhibition mit Saccharose dokumentieren [298], [392]. Die Depletion von Ca^{2+} durch EGTA veranschaulichte die Abhängigkeit der Zytokininduktion von Ca^{2+} , einer generellen Eigenschaft der CLR. Dies steht in Übereinstimmung mit der dokumentierten Ca^{2+} -abhängigen Bindung der CLR LSECTin und DC-SIGN an Coronaviren und HIV-1 [393], [394]. Die spezifische Inhibition der SYK unterdrückte effektiv die Induktion von Zytokinen. Obwohl durch CLR induzierte Signalkaskaden scheinbar wenig einheitlich oder nicht beschrieben sind, ist die SYK in Signalkaskaden von den Rezeptoren eingebunden, welche pro-inflammatorische Zytokine induzieren [181]. Dectin-1, das mit TLR 2 synergisiert, besitzt ein intrazelluläres ITAM, über welches unabhängig von TLR die SYK und NF- κ B aktiviert werden können [192]. Dectin-2 und Mincle synergieren mit dem Adaptor FcR γ , über dessen ITAM SYK rekrutiert wird [195-198]. Der verwendete Inhibitor Piceatannol unterdrückt spezifisch die SYK-induzierte NF- κ B-Aktivierung und Zytokinsekretion, was die Hypothese einer durch HBV-Bindung aktivierten CLR-SYK-NF- κ B Signalkaskade unterstützt [194]. Letztendlich wurde in dieser Arbeit noch die Abhängigkeit der Zytokininduktion von einer Reifung und Ansäuerung der Endosomen belegt. Eine Erkennung von Pathogenen durch CLR leitet die Phagozytose von diesen ein, nach Internalisation reift das Phagosom zu einem Phagolysosom, was von einer sequenziellen Fusion von Endosomen und Lysosomen abhängt. Das Phagolysosom wird als sauer ($\text{pH} < 5.5$) und reich an hydrolytischen Enzymen charakterisiert. Es wird angenommen, dass der niedrige pH die Aktivität von degradativen Enzymen verbessert [300]. Chloroquin inhibiert die Ansäuerung des Endosoms und endosomständige Rezeptoren, besonders TLR [302], [395], [396]. Da eine Erkennung durch TLR 3 oder TLR 7 bis 9 bereits ausgeschlossen wurde, lässt dies nur den Schluss einer Erkennung durch TLR 2 oder CLR im Endosom zu [388]. Das Ergebnis steht dabei in Kontrast zu Studien mit HCMV, die eine Ansäuerung der Endosomen als nicht wichtig für die anti-virale Antwort ansehen [397]. Somit deutet dies auf einen neuen Erkennungsmechanismus des angeborenen Immunsystems hin, in dem HBV durch PRR im Endosom erkannt wird, diese Erkennung jedoch keine Nukleinsäure-spezifischen TLR involviert. In diesem Fall lässt sich eine Degradierung der Virushülle und des Kapsids und eine Erkennung der Kapsidproteine durch TLR 2 vermuten.

Aufgrund der molekularen Eigenschaften der HBV-Oberflächenproteine kamen für die Erkennung CLR mit Affinität zu Mannose in Frage: DC-SIGN, Langerin, Dectin-2, Mincle, Endo-180 und der Mannose Rezeptor (MR) [179], [181]. DC-SIGN wurde als Bindungspartner in Studien bereits ausgeschlossen [398]. Dieselbe Studie kam auch zu dem Schluss, dass artifiziell hoch mannosyliertes HBsAg durch DC-SIGN erkannt wird, was den Autor vermuten ließ, dass HBV eine intrazelluläre Mannose-Rest-Modifizierung für die Vermeidung einer Immunantwort ausnutzt. Der MR wurde als Bindungspartner von HBsAg in DC identifiziert und als Komponente für die Internalisation von HBsAg identifiziert [294]. Die Expression von MR korrelierte mit der Lokalisation von HBsAg in DC aus Patienten. Aufgrund dieser Untersuchungen wurde die Beteiligung des MR in unserem Modell als hochwahrscheinlich erachtet und die letzten Versuche auf den MR dirigiert.

Die Versuche, den MR mittels inhibierenden α MR AK zu blockieren resultierten in einer minimalen Inhibition der Zytokinantwort auf HBV. Eine Überexpression des MR führte gleichzeitig zu einer unerwarteten Reduktion der TLR 2-Expression und zu einer unveränderten bzw. reduzierten Zytokinantwort. Der MR rezykliert permanent zwischen Zelloberfläche und endosomalen Kompartimenten, und es wird angenommen, dass immer nur 10-30% der Rezeptoren an der Zelloberfläche sind, was erklären würde, warum nur eine minimale Blockierung erreicht wurde [201].

Dies steht im Gegensatz zu einer Arbeit, in der mit demselben AK eine effektive Inhibition der Zytokinantwort auf einen TLR 2/MR Liganden erreicht wurde [205]. In dieser Arbeit wurden THP-1 Zellen verwendet, welche in dieser Arbeit nicht auf HBV reagierten, was vermuten lässt, dass diese Zellen eine andere, in der Literatur nicht näher beschriebene Endosomen-Physiologie haben. Die abgeschwächte Zytokinantwort nach MR-Überexpression lässt weiterhin vermuten, dass TLR 2 und nicht der MR der zentrale Rezeptor für die Aktivierung von NF- κ B ist. Der MR besitzt selber kein Signal-Motiv, wurde jedoch in zahlreichen Studien als Teil von induzierten Signalkaskaden identifiziert [399-401]. Generell wird allerdings davon ausgegangen, dass MR einen Ko-Rezeptor für Signaltransduktion und Phagozytose benötigt [201], [402]. Die Synergie von MR und TLR 2 wurde mehrmals beschrieben, und mit unserer Erkenntnis, dass HBV durch TLR 2 erkannt wird, lässt dies den Schluss zu, dass die Zytokinantwort im letzten Versuch aufgrund der geringeren TLR 2-Expression gemindert ist, da der Ko-Rezeptor von MR fehlt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von einer Beteiligung eines CLR bei der HBV-Erkennung durch das angeborene Immunsystem ausgegangen werden kann. Eine Beteiligung des MR ist anzunehmen, konnte hier aber nicht eindeutig nachgewiesen werden.

4.4 Zusammenfassung

Das humane HBV ist der Erreger der Lebererkrankung Hepatitis B. Das Virus infiziert hochspezifisch humane Hepatozyten, in denen es repliziert. AAV wird als Vektor in Leber-dirigierten Gentherapieansätzen eingesetzt. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und in welchen Zellen HBV bzw. AAV durch PRR erkannt werden und welche Signalwege aktiviert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Isolation und Kultivierung von Sub-Populationen humaner Leberzellen etabliert. PHH, KC und LSEC konnten mit hoher Reinheit isoliert werden. Für diese Zellpopulationen konnte erstmals ein komplettes TLR-Genexpressionsprofil erstellt werden und durch Aktivitätstests mit TLR-spezifischen Agonisten bestätigt werden.

Die Versuche bezüglich der Erkennung von HBV und AAV durch das angeborene Immunsystem lassen folgende Schlüsse zu:

I. HBV wird von primären, myeloiden Zellen des humanen Immunsystems erkannt, nicht jedoch von seinen Wirtszellen, den PHH. Von den viralen Partikeln induzieren nur infektiöse Virionen und Kapside eine Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, nicht jedoch von Typ I Interferonen oder IL-1 β . Somit induziert HBV keine typische anti-virale Immunantwort. Zellen des murinen Immunsystems erkennen HBV nicht.

II. Die Erkennung von HBV erfolgt durch TLR 2 und die MyD88-abhängige Signalkaskade. Desweiteren sind Partikelaufnahme, Reifung des Endosoms sowie die ITAM-SYK Signalkaskade an der Erkennung beteiligt, was auf eine Beteiligung eines CLR, mutmaßlich des MR, schließen lässt. Eine Beteiligung Nukleinsäure-spezifischer TLR sowie zytosolischer Rezeptorklassen wie RLR und NLR wurde hingegen ausgeschlossen. Die Erkennung von Virionen erfolgt somit wahrscheinlich an der äusseren Zellmembran durch ein PRR-Heterodimer aus TLR und CLR, wodurch die Aufnahme der Partikel sowie die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine eingeleitet wird.

III. Für AAV2 und AAV8 wurde erstmals eine Erkennung des Kapsids durch TLR 2 dokumentiert. Leere AAV Kapside induzierten die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine in humanen KC und LSEC, nicht jedoch in PHH. Diese Erkennung von AAV kann in Gentherapien dazu führen, dass der virale Vektor eliminiert wird, bevor die Therapie erfolgreich ist.

Die in dieser Doktorarbeit erhobenen Daten lassen auf zwei neue Erkennungsmöglichkeiten von Viren durch das angeborene Immunsystem schliessen. Die Ergebnisse implizieren, dass die frühe Erkennung von HBV nicht nur möglich ist, sondern

auch wichtiger für die Pathogenese sein könnte als bislang angenommen. Für AAV können nach der Identifizierung des Erkennungsmechanismus nun Strategien getestet werden, welche diese Erkennung umgehen. Die bisherige Erforschung der angeborenen Immunantwort auf AAV im Mausmodell ist nicht repräsentativ für Studien in Patienten. Inwieweit diese Arbeit einen Einfluss auf anti-virale Therapien bzw. Gentherapieansätze hat, muss in weiteren Studien erörtert werden.

5 Abkürzungen & Abbildungen

5.1 Abkürzungen

α	alpha
A	Adenin
AAV	Adeno-Assoziierter Virus
Abb.	Abbildung
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
β	beta
Bir	<i>Baculovirus „inhibitor of apoptosis“ repeat</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
cccDNA	kovalent geschlossene zirkuläre DNA (<i>covalently closed circular DNA</i>)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
CLR	C-Typ Lektin Rezeptor
CMV	Cytomegalievirus
CRD	<i>Carbohydrate recognition domain</i>
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ds	doppelsträngig (<i>double stranded</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure

EMCV	Mengovirus (<i>Encephalomyocarditisvirus</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FCS	fötale Kälberserum
FGFR-1	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>
γ	gamma
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
G	Guanin
GM-CSF	Granulozyten und Makrophagen- Koloniestimulierende Faktoren
h	Stunde
HBcAg	<i>Hepatitis B core antigen</i>
HBeAg	<i>Hepatitis B e antigen</i>
HBsAg	<i>Hepatitis B surface antigen</i>
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HGFR	<i>hepatocyte growth factor receptor</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HSPG	<i>heparan sulphate proteoglycan</i>
HSV	Herpes-simplex-Virus
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
I κ B	<i>Inhibitor of NF-κB</i>
IKK	I κ B Kinase
IRAK	<i>IL-1R-associated kinase</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISG	<i>Interferon-stimulated genes</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation domain</i>
ITR	<i>Inverted terminal repeat</i>
k.A.	Keine Angaben
kb	Kilobasenpaar
KC	Kupferzelle (<i>Kupffer cell</i>)

kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LamR	Laminin Rezeptor
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucine-rich repeat</i>
LSEC	sinusoidale Leberendothelzellen (<i>liver sinusoidal endothelial cells</i>)
MΦ	Makrophage
M1	pro-inflammatorische MΦ
M2	anti- inflammatorische MΦ
MAC	Membran-Angriffskomplex
MBL	Mannan-bindendes Lektin
M-CSF	Makrophagen-Koloniestimulierende Faktoren
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>
mDC	myeloide dendritische Zellen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
μM	Mikromolar
mM	Millimolar
MMTV	<i>Mouse mammary-tumor virus</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i> (DNA-haltige Viruspartikel pro Zielzelle)
MOP	<i>multiplicity of particles</i>
MR	Mannose Rezeptor
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MW	Mittelwert
MyD88	<i>myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
NALP3	<i>NACHT-LRR-PYD-containing Apaf-1-like protein</i>
NEMO	<i>NF-κB essential Modulator</i>
NF-κB	Nuclear factor-kappaB
NK	natürliche Killerzelle
NLR	NOD-ähnlicher Rezeptor
NOD	<i>nucleotide binding and oligomerisation domain</i>
nM	Nanomolar

NPC	Nicht-Parenchym Zellen (<i>non parenchymal cells</i>)
N-Terminal	Amino-terminal
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
PAMP	Pathogentypisches Molekularmuster (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PBMC	Periphere Blut-Leukozyten (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pDC	plasmazytoide dendritische Zellen
pg	Picogramm
PGN	Peptidoglycan
PHH	primäre humane Hepatozyten
p.i.	<i>post infection / incubation</i>
PLA ₂	Phospholipase A ₂
Pol	Polymerase
PRR	Pathogenmuster erkennender Rezeptor (<i>pattern recognition receptor</i>)
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
rAAV	Rekombinante Adeno-Assoziierte virale Vektoren
rcDNA	virales Genom (<i>relaxed circular</i>)
Ref.	Referenznummer (Artikelnummer Produkt)
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
RIP	<i>receptor interacting protein</i>
RKI	Robert-Koch Institut
RLR	RIG-I-ähnlicher Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
rpm	Runden pro Minute
RSV	Respiratorischer Synzytialer Virus
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
ss	Einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
SVP	subvirale Partikel
SYK	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TAK	<i>transforming growth factor-β-activated kinase</i>

TANK	<i>TRAF family member-associated NF-κB activator</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TIR	Toll/IL-1R
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor inducing IFN-β</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)1,3-propanediol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
ÜN	über Nacht
ÜS	Überstand
V	Volt
VP	virale Partikel (infektiöse Virionen)

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der viralen Partikel.	5
Abbildung 2: Genom des HBV mit den RNA Transkripten und den kodierten Genen.	7
Abbildung 3: Replikationszyklus des Hepatitis B Virus in Hepatozyten.	9
Abbildung 4: Kapsid und Genom des AAV2.	11
Abbildung 5: Virale Vektoren und ihre Eintrittsmechanismen.	14
Abbildung 6: Ursprung der verschiedenen Zelllinien des Immunsystems.	15
Abbildung 7: TLR Lokalisation und spezifische Signalkaskaden.	23
Abbildung 8: SYK und CARD9 abhängige Signalkaskaden von CLR.	25
Abbildung 9: RLR und DAI Signalkaskade.	27
Abbildung 10: NLR Signalkaskaden und die Interaktion mit TLR.	30
Abbildung 11: Zellen in einem Lebersinus.	32
Abbildung 12: Identifizierung der isolierten humanen Leberzell-Populationen durch Morphologie, Immunfluoreszenz und Partikelaufnahme.	68
Abbildung 13: Expression ausgewählter Markergene in Leberzell-Kulturen.	69
Abbildung 14: Expression und Funktionalität von TLR in isolierten	

Leberzell-Populationen.	70
Abbildung 15: Sekretion von Zytokinen nach Inkubation mit HBV.	72
Abbildung 16: Induktion von Zytokinen durch HBV in humanen Leberzellen.	74
Abbildung 17: Induktion von IL-1β mRNA durch HBV in KC und LSEC.	75
Abbildung 18: Sekretion von IL-8 in KC und LSEC nach Inkubation mit rAAV.	76
Abbildung 19: IL-6 im ÜS von differenzierten THP-1 Zellen nach Inkubation mit HBV.	77
Abbildung 20: Erkennung von HBV durch humane und murine MΦ.	78
Abbildung 21: Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen durch aufgereinigte HBV Partikel.	79
Abbildung 22: Effekt des NF-κB Inhibitors Celastrol auf die HBV Erkennung.	81
Abbildung 23: Abhängigkeit der HBV Erkennung von MyD88.	82
Abbildung 24: HBV induziert die Expression von TLR 2 in Zellen, die HBV erkennen.	83
Abbildung 25: Sekretion von IL-8 in HEK293 und HEK293-TLR2 Zellen.	84
Abbildung 26: Wirkung der funktionalen Inhibition von TLR 2 in der HBV Erkennung.	85
Abbildung 27: Effekt der Inhibition von TLR 2 bei der Erkennung von Virionen.	86
Abbildung 28: TLR 2 abhängige Erkennung von AAV Kapsiden.	88
Abbildung 29: Effekt von TLR 9 Inhibitoren auf HBV induzierte Zytokine.	89
Abbildung 30: HBV-Erkennung nach Phagozytose-Inhibition mittels Saccharose.	91
Abbildung 31: Calcium-Depletion und HBV Erkennung.	92
Abbildung 32: Effekt des SYK-Inhibitors Piccatannol auf die HBV-Erkennung.	93
Abbildung 33: Effekt der Inhibition von SYK auf Erkennung von HBV Virionen.	94
Abbildung 34: Effekt des Inhibitors Chloroquin auf die HBV Erkennung.	96
Abbildung 35: Effekt des anti-MR AK auf die HBV Erkennung.	97
Abbildung 36: Erkennung von HBV in mit IL-4 differenzierten M1 MΦ.	98

5.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete PRR-Liganden und deren finale Konzentration.	53
Tabelle 2: Veränderung der Gen-Expression verschiedener Typ-I IFN und IFN- abhängiger Gene durch HBV in angereicherten PHH und NPC Kulturen.	73

6 Literaturverzeichnis

- [1] D. Lavanchy, "Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures.," *Journal of viral hepatitis*, vol. 11, no. 2, pp. 97-107, Mar. 2004.
- [2] D. S. Dane, C. H. Cameron, and M. Briggs, "Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis.," *Lancet*, vol. 1, no. 7649, pp. 695-8, Apr. 1970.
- [3] M. Vaudin, A. J. Wolstenholme, K. N. Tsiquaye, A. J. Zuckerman, and T. J. Harrison, "The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee.," *The Journal of general virology*, vol. 69 (Pt 6), pp. 1383-9, Jun. 1988.
- [4] K. S. Warren, J. L. Heeney, R. A. Swan, Heriyanto, and E. J. Verschoor, "A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*).," *Journal of virology*, vol. 73, no. 9, pp. 7860-5, Sep. 1999.
- [5] S. Grethe, J. O. Heckel, W. Rietschel, and F. T. Hufert, "Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates.," *Journal of virology*, vol. 74, no. 11, pp. 5377-81, Jun. 2000.
- [6] J. Summers, J. M. Smolec, and R. Snyder, "A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 75, no. 9, pp. 4533-7, Sep. 1978.
- [7] W. S. Mason, G. Seal, and J. Summers, "Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus.," *Journal of virology*, vol. 36, no. 3, pp. 829-36, Dec. 1980.
- [8] B. S. Blumberg, L. Melartin, R. A. Guint, and B. Werner, "Family studies of a human serum isoantigen system (Australia antigen).," *American journal of human genetics*, vol. 18, no. 6, pp. 594-608, Nov. 1966.
- [9] B. S. Blumberg, A. I. Sutnick, and W. T. London, "Australia antigen and hepatitis.," *JAMA : the journal of the American Medical Association*, vol. 207, no. 10, pp. 1895-6, Mar. 1969.
- [10] S. Schaefer, "Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes.," *World journal of gastroenterology : WJG*, vol. 13, no. 1, pp. 14-21, Jan. 2007.
- [11] D. Ganem and R. Schneider, "Hepadnaviridae: The viruses and their replication.," in *Field's Virology*, 2001, pp. 2923-2969.
- [12] S. Asabe et al., "The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection.," *Journal of virology*, vol. 83, no. 19, pp. 9652-62, Oct. 2009.
- [13] D. Ganem and A. M. Prince, "Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences.," *The New England journal of medicine*, vol. 350, no. 11, pp. 1118-29, Mar. 2004.
- [14] Robert Koch-institut, "Epidemiologisches Bulletin," *Epidemiologisches Bulletin*, vol. 2010, no. 20, 2010.

- [15] H. Wedemeyer, M. Cornberg, U. Protzer, T. Berg, and M. M. Dollinger, “[German guidelines on diagnosis and therapy of hepatitis B].,” *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, vol. 132, no. 34-35, pp. 1775-82, Aug. 2007.
- [16] J. F. Perz, G. L. Armstrong, L. a Farrington, Y. J. F. Hutin, and B. P. Bell, “The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide.,” *Journal of hepatology*, vol. 45, no. 4, pp. 529-38, Oct. 2006.
- [17] F. B. Hollinger, “Hepatitis B Virus.,” in *Field’s Virology*, 1996, pp. 2739-2807.
- [18] J. H. Hoofnagle, “Type B hepatitis: virology, serology and clinical course.,” *Seminars in liver disease*, vol. 1, no. 1, pp. 7-14, Feb. 1981.
- [19] F. V. Chisari and C. Ferrari, “Hepatitis B virus immunopathogenesis.,” *Annual review of immunology*, vol. 13, pp. 29-60, Jan. 1995.
- [20] D. Ganem, “Persistent infection of humans with hepatitis B virus: mechanisms and consequences.,” *Reviews of infectious diseases*, vol. 4, no. 5, pp. 1026-47.
- [21] C. Seeger and W. S. Mason, “Hepatitis B virus biology.,” *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, vol. 64, no. 1, pp. 51-68, Mar. 2000.
- [22] B. Rehermann and M. Nascimbeni, “Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection.,” *Nature reviews. Immunology*, vol. 5, no. 3, pp. 215-29, Mar. 2005.
- [23] K. H. Heermann and W. H. Gerlich, “Surface proteins of hepatitis B viruses.,” in *Molecular biology of the hepatitis B virus.*, 1991, pp. 109-144.
- [24] W. M. Lee, “Hepatitis B virus infection.,” *The New England journal of medicine*, vol. 337, no. 24, pp. 1733-45, Dec. 1997.
- [25] K. Takahashi et al., “Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum.,” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 130, no. 6, pp. 2903-7, Jun. 1983.
- [26] R. Bartenschlager and H. Schaller, “Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome.,” *The EMBO journal*, vol. 11, no. 9, pp. 3413-20, Sep. 1992.
- [27] K. Weinberger, “Mutationen im Hepatitis B Virus Oberflächenantigen – epidemiologische Erfassung und Charakterisierung der Auswirkungen auf die diagnostische Erkennung und die humorale Immunität gegen das Hepatitis B Virus.,” 2000.
- [28] E. Guerrero, F. Gavilanes, and D. L. Peterson, “Model for protein arrangement in HBsAg particles based on physical and chemical studies.,” in *Viral Hepatitis and liver Disease*, 1988, pp. 606-613.
- [29] C. M. Mangold and R. E. Streeck, “Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein.,” *Journal of virology*, vol. 67, no. 8, pp. 4588-97, Aug. 1993.
- [30] S. F. Wieland and F. V. Chisari, “Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses,” *Journal of virology*, vol. 79, no. 15, p. 9369, 2005.

- [31] A. Berting, J. Hahnen, M. Kröger, and W. H. Gerlich, "Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein.," *Intervirology*, vol. 38, no. 1-2, pp. 8-15, Jan. 1995.
- [32] D. L. Peterson, "Isolation and characterization of the major protein and glycoprotein of hepatitis B surface antigen.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 256, no. 13, pp. 6975-83, Jul. 1981.
- [33] B. E. Eble, V. R. Lingappa, and D. Ganem, "The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences.," *Journal of virology*, vol. 64, no. 3, pp. 1414-9, Mar. 1990.
- [34] K. H. Heermann, U. Goldmann, W. Schwartz, T. Seyffarth, H. Baumgarten, and W. H. Gerlich, "Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence.," *Journal of virology*, vol. 52, no. 2, pp. 396-402, Nov. 1984.
- [35] J. Summers, A. O'Connell, and I. Millman, "Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 72, no. 11, pp. 4597-601, Nov. 1975.
- [36] R. Bartenschlager and H. Schaller, "The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription.," *The EMBO journal*, vol. 7, no. 13, pp. 4185-92, Dec. 1988.
- [37] K. Kidd-Ljunggren, Y. Miyakawa, and A. H. Kidd, "Genetic variability in hepatitis B viruses.," *The Journal of general virology*, vol. 83, no. 6, pp. 1267-80, Jun. 2002.
- [38] R. Cattaneo, H. Will, and H. Schaller, "Hepatitis B virus transcription in the infected liver.," *The EMBO journal*, vol. 3, no. 9, pp. 2191-6, Sep. 1984.
- [39] M. Treinin and O. Laub, "Identification of a promoter element located upstream from the hepatitis B virus X gene.," *Molecular and cellular biology*, vol. 7, no. 1, pp. 545-8, Jan. 1987.
- [40] J. Huang and T. J. Liang, "A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products.," *Molecular and cellular biology*, vol. 13, no. 12, p. 7476, 1993.
- [41] C. Seeger, D. Ganem, and H. Varmus, "Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy," *Science*, vol. 2, pp. 477-485, 1986.
- [42] F. Zoulim, J. Saputelli, and C. Seeger, "Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo.," *Journal of virology*, vol. 68, no. 3, pp. 2026-30, Mar. 1994.
- [43] H. S. Chen et al., "The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks.," *Journal of virology*, vol. 67, no. 3, pp. 1218-26, Mar. 1993.
- [44] H. F. Maguire, J. P. Hoeffler, and A. Siddiqui, "HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 252, no. 5007, pp. 842-4, May 1991.
- [45] V. Bruss, X. Lu, R. Thomssen, and W. H. Gerlich, "Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein.," *The EMBO journal*, vol. 13, no. 10, pp. 2273-9, May 1994.

- [46] R. B. Vallee and H. S. Shpetner, "Motor proteins of cytoplasmic microtubules.," *Annual review of biochemistry*, vol. 59, pp. 909-32, Jan. 1990.
- [47] C. T. Yeh, Y. F. Liaw, and J. H. Ou, "The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport.," *Journal of virology*, vol. 64, no. 12, pp. 6141-7, Dec. 1990.
- [48] U. Protzer and H. Schaller, "Immune escape by hepatitis B viruses.," *Virus genes*, vol. 21, no. 1-2, pp. 27-37, Jan. 2000.
- [49] M. Kann, A. Bischof, and W. H. Gerlich, "In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome.," *Journal of virology*, vol. 71, no. 2, pp. 1310-6, Feb. 1997.
- [50] J. Köck and H. J. Schlicht, "Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity.," *Journal of virology*, vol. 67, no. 8, pp. 4867-74, Aug. 1993.
- [51] C. Brechot, C. Pourcel, A. Louise, B. Rain, and P. Tiollais, "Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma.," *Nature*, vol. 286, no. 5772, pp. 533-5, Jul. 1980.
- [52] J. E. Newbold et al., "The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes.," *Journal of virology*, vol. 69, no. 6, pp. 3350-7, Jun. 1995.
- [53] J. R. Pollack and D. Ganem, "Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis.," *Journal of virology*, vol. 68, no. 9, pp. 5579-87, Sep. 1994.
- [54] J. Summers and W. S. Mason, "Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate.," *Cell*, vol. 29, no. 2, pp. 403-15, Jun. 1982.
- [55] J. M. Lien, C. E. Aldrich, and W. S. Mason, "Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis.," *Journal of virology*, vol. 57, no. 1, pp. 229-36, Jan. 1986.
- [56] G. Moraleda, J. Saputelli, C. E. Aldrich, D. Averett, L. Condreay, and W. S. Mason, "Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus.," *Journal of virology*, vol. 71, no. 12, pp. 9392-9, Dec. 1997.
- [57] A. P. Huovila, A. M. Eder, and S. D. Fuller, "Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment.," *The Journal of cell biology*, vol. 118, no. 6, pp. 1305-20, Sep. 1992.
- [58] E. J. Patzer, G. R. Nakamura, C. C. Simonsen, A. D. Levinson, and R. Brands, "Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum.," *Journal of virology*, vol. 58, no. 3, pp. 884-92, Jun. 1986.
- [59] H. Büning, L. Perabo, and O. Coutelle, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology," *The Journal of Gene Medicine*, no. 2007, pp. 717-733, 2008.
- [60] S. Uhrig, "The Impact of Peptide Insertions on Adeno-Associated Viral Vector Fate," *Inaugural-Dissertation*, 2010.

- [61] R. Salo, "Adenovirus-associated virus polypeptides synthesized in cells coinfecting with either adenovirus or herpesvirus," *Virology*, vol. 93, no. 1, pp. 237-245, Feb. 1979.
- [62] U. Bantel-Schaal and H. zur Hausen, "Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site.," *Virology*, vol. 134, no. 1, pp. 52-63, Apr. 1984.
- [63] U. Bantel-Schaal, H. Delius, R. Schmidt, and H. zur Hausen, "Human adeno-associated virus type 5 is only distantly related to other known primate helper-dependent parvoviruses.," *Journal of virology*, vol. 73, no. 2, pp. 939-47, Feb. 1999.
- [64] M. D. Hoggan, N. R. Blacklow, and W. P. Rowe, "Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 55, no. 6, pp. 1467-74, Jun. 1966.
- [65] B. Georg-Fries, S. Biederlack, J. Wolf, and H. zur Hausen, "Analysis of proteins, helper dependence, and seroepidemiology of a new human parvovirus.," *Virology*, vol. 134, no. 1, pp. 64-71, Apr. 1984.
- [66] G.-P. Gao, M. R. Alvira, L. Wang, R. Calcedo, J. Johnston, and J. M. Wilson, "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 18, pp. 11854-9, Sep. 2002.
- [67] G. Gao et al., "Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues.," *Journal of virology*, vol. 78, no. 12, pp. 6381-6388, 2004.
- [68] E. a Rutledge, C. L. Halbert, and D. W. Russell, "Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2.," *Journal of virology*, vol. 72, no. 1, pp. 309-19, Jan. 1998.
- [69] J. L. Melnick, H. D. Mayor, K. O. Smith, and F. Rapp, "Association of 20-Millimicron Particles with Adenoviruses.," *Journal of bacteriology*, vol. 90, no. 1, pp. 271-4, Jul. 1965.
- [70] S. Mori, L. Wang, T. Takeuchi, and T. Kanda, "Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein.," *Virology*, vol. 330, no. 2, pp. 375-83, Dec. 2004.
- [71] M. a Lochrie et al., "Adeno-associated virus (AAV) capsid genes isolated from rat and mouse liver genomic DNA define two new AAV species distantly related to AAV-5.," *Virology*, vol. 353, no. 1, pp. 68-82, Sep. 2006.
- [72] P. J. Carter and R. J. Samulski, "Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles.," *International journal of molecular medicine*, vol. 6, no. 1, pp. 17-27, Jul. 2000.
- [73] R. J. Samulski, L. S. Chang, and T. Shenk, "A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication.," *Journal of virology*, vol. 61, no. 10, pp. 3096-101, Oct. 1987.
- [74] S. K. McLaughlin, P. Collis, P. L. Hermonat, and N. Muzyczka, "Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures.," *Journal of virology*, vol. 62, no. 6, pp. 1963-73, Jun. 1988.

- [75] D. M. McCarty, J. H. Ryan, S. Zolotukhin, X. Zhou, and N. Muzyczka, "Interaction of the adeno-associated virus Rep protein with a sequence within the A palindrome of the viral terminal repeat.," *Journal of virology*, vol. 68, no. 8, pp. 4998-5006, Aug. 1994.
- [76] R. O. Snyder, D. S. Im, T. Ni, X. Xiao, R. J. Samulski, and N. Muzyczka, "Features of the adeno-associated virus origin involved in substrate recognition by the viral Rep protein.," *Journal of virology*, vol. 67, no. 10, pp. 6096-104, Oct. 1993.
- [77] R. Snyder, R. Jude, and N. Muzyczka, "In Vitro Resolution of Covalently AAV Chromosome Ends," *Cell*, vol. 60, no. 1987, pp. 105-113, 1990.
- [78] R. Dubielzig, J. a King, S. Weger, a Kern, and J. a Kleinschmidt, "Adeno-associated virus type 2 protein interactions: formation of pre-encapsidation complexes.," *Journal of virology*, vol. 73, no. 11, pp. 8989-98, Nov. 1999.
- [79] J. a King, R. Dubielzig, D. Grimm, and J. a Kleinschmidt, "DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids.," *The EMBO journal*, vol. 20, no. 12, pp. 3282-91, Jun. 2001.
- [80] E. W. Lusby and K. I. Berns, "Mapping of the 5' termini of two adeno-associated virus 2 RNAs in the left half of the genome.," *Journal of virology*, vol. 41, no. 2, pp. 518-26, Feb. 1982.
- [81] S. R. Kyöstiö, R. a Owens, M. D. Weitzman, B. a Antoni, N. Chejanovsky, and B. J. Carter, "Analysis of adeno-associated virus (AAV) wild-type and mutant Rep proteins for their abilities to negatively regulate AAV p5 and p19 mRNA levels.," *Journal of virology*, vol. 68, no. 5, pp. 2947-57, May 1994.
- [82] R. H. Smith and R. M. Kotin, "The Rep52 gene product of adeno-associated virus is a DNA helicase with 3'-to-5' polarity.," *Journal of virology*, vol. 72, no. 6, pp. 4874-81, Jun. 1998.
- [83] S. Kronenberg, J. a Kleinschmidt, and B. Böttcher, "Electron cryo-microscopy and image reconstruction of adeno-associated virus type 2 empty capsids.," *EMBO reports*, vol. 2, no. 11, pp. 997-1002, Nov. 2001.
- [84] J. E. Rabinowitz and R. J. Samulski, "Building a better vector: the manipulation of AAV virions.," *Virology*, vol. 278, no. 2, pp. 301-8, Dec. 2000.
- [85] K. H. Warrington Jr, O. S. Gorbatyuk, J. K. Harrison, S. R. Opie, S. Zolotukhin, and N. Muzyczka, "Adeno-Associated Virus Type 2 VP2 Capsid Protein Is Nonessential and Can Tolerate Large Peptide Insertions at Its N Terminus †," *Journal of virology*, vol. 78, no. 12, pp. 6595-6609, 2004.
- [86] K. Lux et al., "Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking," *Journal of virology*, vol. 79, no. 18, pp. 11776-11787, 2005.
- [87] C. Summerford and R. J. Samulski, "Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions.," *Journal of virology*, vol. 72, no. 2, pp. 1438-45, Feb. 1998.
- [88] G. Seisenberger, M. U. Ried, T. Endress, H. Büning, M. Hallek, and C. Bräuchle, "Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 294, no. 5548, pp. 1929-32, Nov. 2001.

- [89] B. Akache, D. Grimm, K. Pandey, S. R. Yant, H. Xu, and M. a Kay, "The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9.," *Journal of virology*, vol. 80, no. 19, pp. 9831-6, Oct. 2006.
- [90] J. Cronin, X.-Y. Zhang, and J. Reiser, "Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping," *Current gene therapy*, vol. 5, no. 4, pp. 387-398, Jul. 2005.
- [91] S. Sanlioglu, P. K. Benson, J. Yang, E. M. Atkinson, T. Reynolds, and J. F. Engelhardt, "Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation.," *Journal of virology*, vol. 74, no. 19, pp. 9184-96, Oct. 2000.
- [92] D. Duan, Q. Li, a W. Kao, Y. Yue, J. E. Pessin, and J. F. Engelhardt, "Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection.," *Journal of virology*, vol. 73, no. 12, pp. 10371-6, Dec. 1999.
- [93] A. Asokan, J. B. Hamra, L. Govindasamy, M. Agbandje-McKenna, and R. J. Samulski, "Adeno-associated virus type 2 contains an integrin alpha5beta1 binding domain essential for viral cell entry.," *Journal of virology*, vol. 80, no. 18, pp. 8961-9, Sep. 2006.
- [94] E. Li, D. Stupack, G. M. Bokoch, and G. R. Nemerow, "Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases.," *Journal of virology*, vol. 72, no. 11, pp. 8806-12, Nov. 1998.
- [95] G. Odorizzi, M. Babst, and S. D. Emr, "Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body.," *Cell*, vol. 95, no. 6, pp. 847-58, Dec. 1998.
- [96] J. T. Parsons, "Integrin-mediated signalling: regulation by protein tyrosine kinases and small GTP-binding proteins," *Current opinion in cell biology*, vol. 8, no. 2, pp. 146-152, Apr. 1996.
- [97] W. Xiao, K. H. Warrington, P. Hearing, J. Hughes, and N. Muzyczka, "Adenovirus-Facilitated Nuclear Translocation of Adeno-Associated Virus Type 2," *Society*, vol. 76, no. 22, pp. 11505-11517, 2002.
- [98] K. Pajusola, M. Gruchala, H. Joch, T. F. Luscher, S. Yla-Herttuala, and H. Bueler, "Cell-type-specific characteristics modulate the transduction efficiency of adeno-associated virus type 2 and restrain infection of endothelial cells," *Journal of Virology*, vol. 76, no. 22, pp. 11530-11540, 2002.
- [99] A. M. Douar, K. Poulard, D. Stockholm, and O. Danos, "Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation," *Journal of Virology*, vol. 75, no. 4, pp. 1824-1833, 2001.
- [100] W. Ding, L. N. Zhang, C. Yeaman, and J. F. Engelhardt, "rAAV2 traffics through both the late and the recycling endosomes in a dose-dependent fashion," *Molecular Therapy*, vol. 13, no. 4, pp. 671-682, 2006.
- [101] J. S. Bartlett, R. Wilcher, and R. J. Samulski, "Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors.," *Journal of virology*, vol. 74, no. 6, pp. 2777-85, Mar. 2000.
- [102] F. Sonntag, S. Bleker, B. Leuchs, R. Fischer, and J. a Kleinschmidt, "Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus.," *Journal of virology*, vol. 80, no. 22, pp. 11040-54, Nov. 2006.

- [103] S. Kronenberg, B. Bottcher, C. W. Von Der Lieth, S. Bleker, and J. A. Kleinschmidt, "A conformational change in the adeno-associated virus type 2 capsid leads to the exposure of hidden VP1 N termini," *Journal of virology*, vol. 79, no. 9, pp. 5296-5303, 2005.
- [104] Z. Zádori et al., "A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity.," *Developmental cell*, vol. 1, no. 2, pp. 291-302, Aug. 2001.
- [105] D. Mudhakar and H. Harashima, "Learning from the viral journey: how to enter cells and how to overcome intracellular barriers to reach the nucleus.," *The AAPS journal*, vol. 11, no. 1, pp. 65-77, Mar. 2009.
- [106] S. Stahnke et al., "Intrinsic phospholipase A2 activity of adeno-associated virus is involved in endosomal escape of incoming particles.," *Virology*, vol. 409, no. 1, pp. 77-83, Jan. 2011.
- [107] J. Hansen, K. Qing, and a Srivastava, "Infection of purified nuclei by adeno-associated virus 2.," *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, vol. 4, no. 4, pp. 289-96, Oct. 2001.
- [108] J. C. Grieger, S. Snowdy, and R. J. Samulski, "Separate basic region motifs within the adeno-associated virus capsid proteins are essential for infectivity and assembly.," *Journal of virology*, vol. 80, no. 11, pp. 5199-210, Jun. 2006.
- [109] F. K. Ferrari, T. Samulski, T. Shenk, and R. J. Samulski, "Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors.," *Journal of virology*, vol. 70, no. 5, pp. 3227-34, May 1996.
- [110] K. J. Fisher, G. P. Gao, M. D. Weitzman, R. DeMatteo, J. F. Burda, and J. M. Wilson, "Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis.," *Journal of virology*, vol. 70, no. 1, pp. 520-32, Jan. 1996.
- [111] R. Kotin and R. Linden, "Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination.," *The EMBO journal*, vol. 11, no. 13, pp. 5071-8, Dec. 1992.
- [112] R. M. Kotin, J. C. Menninger, D. C. Ward, and K. I. Berns, "Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter.," *Genomics*, vol. 10, no. 3, pp. 831-4, Jul. 1991.
- [113] K. I. Berns and C. Giraud, "Biology of adeno-associated virus.," *Current topics in microbiology and immunology*, vol. 218, pp. 1-23, Jan. 1996.
- [114] D. V. Schaffer, J. T. Koerber, and K. Lim, "Molecular engineering of viral gene delivery vehicles," *Annual review of biomedical engineering*, vol. 10, no. 1, pp. 169-194, 2008.
- [115] A. Sharma, X. Li, D. S. Bangari, and S. K. Mittal, "Adenovirus receptors and their implications in gene delivery," *Virus research*, vol. 143, no. 2, pp. 184-194, 2009.
- [116] R. Waehler, S. J. Russell, and D. T. Curiel, "Engineering targeted viral vectors for gene therapy.," *Nature reviews. Genetics*, vol. 8, no. 8, pp. 573-87, Aug. 2007.
- [117] P. L. Leopold and R. G. Crystal, "Intracellular trafficking of adenovirus: many means to many ends.," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 59, no. 8, pp. 810-21, Aug. 2007.

- [118] C. J. Buchholz, M. D. Mühlebach, and K. Cichutek, "Lentiviral vectors with measles virus glycoproteins - dream team for gene transfer?," *Trends in biotechnology*, vol. 27, no. 5, pp. 259-65, May 2009.
- [119] A. Abbas and A. Lichtman, *Cellular and Molecular Immunology*, 6th ed. Saunders, 2003.
- [120] C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik, *Immunobiology*. 2001.
- [121] W. D. M. Cruvinel et al., "Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response.," *Revista brasileira de reumatologia*, vol. 50, no. 4, pp. 434-61, Aug. 2010.
- [122] A. Plüddemann, S. Mukhopadhyay, and S. Gordon, "Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry.," *Immunological reviews*, vol. 240, no. 1, pp. 11-24, Mar. 2011.
- [123] P. R. Taylor, L. Martinez-Pomares, M. Stacey, H.-H. Lin, G. D. Brown, and S. Gordon, "Macrophage receptors and immune recognition.," *Annual review of immunology*, vol. 23, pp. 901-44, Jan. 2005.
- [124] A. Plüddemann, S. Mukhopadhyay, and S. Gordon, "The interaction of macrophage receptors with bacterial ligands.," *Expert reviews in molecular medicine*, vol. 8, no. 28, pp. 1-25, Jan. 2006.
- [125] F. A. W. Verreck et al., "Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 13, pp. 4560-5, Mar. 2004.
- [126] A. Puig-Kröger et al., "Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages.," *Cancer research*, vol. 69, no. 24, pp. 9395-403, Dec. 2009.
- [127] D. M. Mosser and J. P. Edwards, "Exploring the full spectrum of macrophage activation.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 8, no. 12, pp. 958-69, Dec. 2008.
- [128] A. Mantovani, A. Sica, and M. Locati, "New vistas on macrophage differentiation and activation.," *European journal of immunology*, vol. 37, no. 1, pp. 14-6, Jan. 2007.
- [129] R. A. Ezekowitz and S. Gordon, "Alterations of surface properties by macrophage activation: expression of receptors for Fc and mannose-terminal glycoproteins and differentiation antigens.," *Contemporary topics in immunobiology*, vol. 13, pp. 33-56, Jan. 1984.
- [130] C. L. Langrish, B. S. McKenzie, N. J. Wilson, R. de Waal Malefyt, R. A. Kastelein, and D. J. Cua, "IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity.," *Immunological reviews*, vol. 202, pp. 96-105, Dec. 2004.
- [131] P. M. Kou and J. E. Babensee, "Macrophage and dendritic cell phenotypic diversity in the context of biomaterials.," *Journal of biomedical materials research. Part A*, vol. 96, no. 1, pp. 239-60, Jan. 2011.
- [132] M. Modolell, I. M. Corraliza, F. Link, G. Soler, and K. Eichmann, "Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines.," *European journal of immunology*, vol. 25, no. 4, pp. 1101-4, Apr. 1995.

- [133] J. P. Edwards, X. Zhang, K. A. Frauwirth, and D. M. Mosser, "Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 80, no. 6, pp. 1298-307, Dec. 2006.
- [134] R. N. Germain, "MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation," *Cell*, vol. 76, no. 2, pp. 287-299, Jan. 1994.
- [135] H. Kumar, T. Kawai, and S. Akira, "Pathogen recognition by the innate immune system.," *International reviews of immunology*, vol. 30, no. 1, pp. 16-34, Feb. 2011.
- [136] K. Shortman and Y.-J. Liu, "Mouse and human dendritic cell subtypes.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 2, no. 3, pp. 151-61, Mar. 2002.
- [137] S. H. E. Kaufmann, R. Medzhitov, and S. Gordon, *The innate immune response to infection*. Amer Society for Microbiology, 2004.
- [138] A. Cerwenka and L. L. Lanier, "Natural killer cells, viruses and cancer.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 1, no. 1, pp. 41-9, Oct. 2001.
- [139] W. M. Yokoyama, S. Kim, and A. R. French, "The dynamic life of natural killer cells.," *Annual review of immunology*, vol. 22, pp. 405-29, Jan. 2004.
- [140] J. Parkin and B. Cohen, "An overview of the immune system.," *Lancet*, vol. 357, no. 9270, pp. 1777-89, Jun. 2001.
- [141] R. Barrington, M. Zhang, M. Fischer, and M. C. Carroll, "The role of complement in inflammation and adaptive immunity.," *Immunological reviews*, vol. 180, pp. 5-15, Apr. 2001.
- [142] E. Pålsson-McDermott and L. O'Neill, "Building an immune system from nine domains.," *Biochemical Society Transactions*, vol. 35, no. 6, pp. 1437-1444, 2007.
- [143] C. Hashimoto, K. L. Hudson, and K. V. Anderson, "The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein.," *Cell*, vol. 52, no. 2, pp. 269-79, Jan. 1988.
- [144] K. V. Anderson, G. Jürgens, and C. Nüsslein-Volhard, "Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product.," *Cell*, vol. 42, no. 3, pp. 779-89, Oct. 1985.
- [145] S. Tauszig, E. Jouanguy, J. A. Hoffmann, and J. L. Imler, "Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 19, pp. 10520-5, Sep. 2000.
- [146] R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity.," *Nature*, vol. 388, no. 6640, pp. 394-7, Jul. 1997.
- [147] S. Akira and K. Takeda, "Toll-like receptor signalling.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 4, no. 7, pp. 499-511, Jul. 2004.
- [148] S. Akira, K. Takeda, and T. Kaisho, "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.," *Nature immunology*, vol. 2, no. 8, pp. 675-80, Aug. 2001.

- [149] S. Akira, S. Uematsu, and O. Takeuchi, "Pathogen recognition and innate immunity.," *Cell*, vol. 124, no. 4, pp. 783-801, Feb. 2006.
- [150] T. H. Mogensen and S. R. Paludan, "Reading the viral signature by Toll-like receptors and other pattern recognition receptors.," *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, vol. 83, no. 3, pp. 180-92, Mar. 2005.
- [151] O. Takeuchi et al., "Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 169, no. 1, pp. 10-4, Jul. 2002.
- [152] O. Takeuchi et al., "Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6.," *International immunology*, vol. 13, no. 7, pp. 933-40, Jul. 2001.
- [153] L. Alexopoulou, A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell, "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3.," *Nature*, vol. 413, no. 6857, pp. 732-8, Oct. 2001.
- [154] A. Poltorak et al., "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 282, no. 5396, pp. 2085-8, Dec. 1998.
- [155] F. Hayashi et al., "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5.," *Nature*, vol. 410, no. 6832, pp. 1099-103, 26-Apr-2001.
- [156] S. S. Diebold, T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, and C. Reis e Sousa, "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 303, no. 5663, pp. 1529-31, Mar. 2004.
- [157] H. Hemmi et al., "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway.," *Nature immunology*, vol. 3, no. 2, pp. 196-200, Feb. 2002.
- [158] K. Hattermann, S. Picard, M. Borgeat, P. Leclerc, M. Pouliot, and P. Borgeat, "The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B4, prostaglandin E2 and platelet-activating factor biosynthesis.," *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 21, no. 7, pp. 1575-85, May 2007.
- [159] H. Hemmi et al., "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.," *Nature*, vol. 408, no. 6813, pp. 740-5, Dec. 2000.
- [160] C. T. Baldari, "DNA methylation and TLR9 ligands: not only a matter of semantics.," *Immunology letters*, vol. 121, no. 1, pp. 84-5, Nov. 2008.
- [161] D. Zhang et al., "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 303, no. 5663, pp. 1522-6, Mar. 2004.
- [162] E. A. Kurt-Jones et al., "Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus.," *Nature immunology*, vol. 1, no. 5, pp. 398-401, Nov. 2000.
- [163] J. C. Rassa, J. L. Meyers, Y. Zhang, R. Kudaravalli, and S. R. Ross, "Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 4, pp. 2281-6, Feb. 2002.

- [164] T. Compton et al., "Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2.," *Journal of virology*, vol. 77, no. 8, pp. 4588-96, Apr. 2003.
- [165] E. Kurt-Jones et al., "Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 5, pp. 1315-20, Feb. 2004.
- [166] A. Cooper, G. Tal, O. Lider, and Y. Shaul, "Cytokine induction by the hepatitis B virus capsid in macrophages is facilitated by membrane heparan sulfate and involves TLR2.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 175, no. 5, pp. 3165-76, Sep. 2005.
- [167] J. Lund, A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov, and A. Iwasaki, "Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 198, no. 3, pp. 513-20, Aug. 2003.
- [168] A. Krug et al., "TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function.," *Immunity*, vol. 21, no. 1, pp. 107-19, Jul. 2004.
- [169] K. Tabeta et al., "Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 10, pp. 3516-21, Mar. 2004.
- [170] S. L. Doyle and L. A. J. O'Neill, "Toll-like receptors: from the discovery of NF-kappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity.," *Biochemical pharmacology*, vol. 72, no. 9, pp. 1102-13, Oct. 2006.
- [171] C. Nakanishi and M. Toi, "Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs.," *Nature reviews. Cancer*, vol. 5, no. 4, pp. 297-309, Apr. 2005.
- [172] S. Uematsu and S. Akira, "Toll-like receptors and innate immunity.," *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, vol. 84, no. 9, pp. 712-25, Sep. 2006.
- [173] K. Takeda and S. Akira, "TLR signaling pathways.," *Seminars in immunology*, vol. 16, no. 1, pp. 3-9, Feb. 2004.
- [174] K. A. Fitzgerald et al., "LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 198, no. 7, pp. 1043-55, Oct. 2003.
- [175] T. Horng, G. M. Barton, and R. Medzhitov, "TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway.," *Nature immunology*, vol. 2, no. 9, pp. 835-41, Sep. 2001.
- [176] T. B. H. Geijtenbeek, S. J. van Vliet, A. Engering, B. a 't Hart, and Y. van Kooyk, "Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells.," *Annual review of immunology*, vol. 22, pp. 33-54, Jan. 2004.
- [177] L. Peiser, S. Mukhopadhyay, and S. Gordon, "Scavenger receptors in innate immunity," *Current opinion in immunology*, vol. 14, no. 1, pp. 123-128, 2002.
- [178] T. Areschoug and S. Gordon, "Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis.," *Cellular microbiology*, vol. 11, no. 8, pp. 1160-9, Aug. 2009.

- [179] E. P. McGreal, J. L. Miller, and S. Gordon, "Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors.," *Current opinion in immunology*, vol. 17, no. 1, pp. 18-24, Feb. 2005.
- [180] L. East and C. M. Isacke, "The mannose receptor family.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1572, no. 2-3, pp. 364-86, Sep. 2002.
- [181] T. B. H. Geijtenbeek and S. I. Gringhuis, "Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 9, no. 7, pp. 465-79, Jul. 2009.
- [182] K. Drickamer, "Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein.," *Nature*, vol. 360, no. 6400, pp. 183-6, Nov. 1992.
- [183] T. B. Geijtenbeek et al., "Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses.," *Cell*, vol. 100, no. 5, pp. 575-85, Mar. 2000.
- [184] B. M. Curtis, S. Scharnawske, and a J. Watson, "Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 17, pp. 8356-60, Sep. 1992.
- [185] B. J. Appelmelk, I. van Die, S. J. van Vliet, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, T. B. H. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk, "Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 170, no. 4, pp. 1635-9, Feb. 2003.
- [186] Y. Guo et al., "Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR.," *Nature structural & molecular biology*, vol. 11, no. 7, pp. 591-8, Jul. 2004.
- [187] A. Engering et al., "The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 168, no. 5, pp. 2118-26, Mar. 2002.
- [188] T. B. Geijtenbeek et al., "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells.," *Cell*, vol. 100, no. 5, pp. 587-97, Mar. 2000.
- [189] I. S. Ludwig et al., "Hepatitis C virus targets DC-SIGN and L-SIGN to escape lysosomal degradation," *Journal of virology*, vol. 78, no. 15, pp. 8322-8332, 2004.
- [190] E. G. Cormier et al., "L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 39, pp. 14067-14072, 2004.
- [191] S. Mukhopadhyay, J. Herre, G. D. Brown, and S. Gordon, "The potential for Toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors.," *Immunology*, vol. 112, no. 4, pp. 521-30, Aug. 2004.
- [192] N. C. Rogers et al., "Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins.," *Immunity*, vol. 22, no. 4, pp. 507-17, Apr. 2005.
- [193] O. Gross et al., "Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity.," *Nature*, vol. 442, no. 7103, pp. 651-6, Aug. 2006.

- [194] S. I. Gringhuis et al., "Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk.," *Nature immunology*, vol. 10, no. 2, pp. 203-13, Feb. 2009.
- [195] K. Sato et al., "Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 50, pp. 38854-66, Dec. 2006.
- [196] N. Barrett, A. Maekawa, O. Rahman, K. Austen, and Y. Kanaoka, "Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells," *The Journal of Immunobiology*, vol. 182, pp. 1119-1128, 2009.
- [197] S. Yamasaki et al., "C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 6, pp. 1897-902, Feb. 2009.
- [198] S. Yamasaki, E. Ishikawa, M. Sakuma, H. Hara, K. Ogata, and T. Saito, "Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells.," *Nature immunology*, vol. 9, no. 10, pp. 1179-88, Oct. 2008.
- [199] M. R. Lennartz, T. E. Wileman, and P. D. Stahl, "Isolation and characterization of a mannose-specific endocytosis receptor from rabbit alveolar macrophages.," *The Biochemical journal*, vol. 245, no. 3, pp. 705-11, Aug. 1987.
- [200] M. C. Tan et al., "Mannose receptor mediated uptake of antigens strongly enhances HLA-class II restricted antigen presentation by cultured dendritic cells.," *Advances in experimental medicine and biology*, vol. 417, pp. 171-4, Jan. 1997.
- [201] U. Gazi and L. Martinez-Pomares, "Influence of the mannose receptor in host immune responses.," *Immunobiology*, vol. 214, no. 7, pp. 554-61, Jul. 2009.
- [202] J. Zhang et al., "Cdc42 and RhoB activation are required for mannose receptor-mediated phagocytosis by human alveolar macrophages.," *Molecular biology of the cell*, vol. 16, no. 2, pp. 824-34, Feb. 2005.
- [203] J. L. Miller et al., "The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages.," *PLoS pathogens*, vol. 4, no. 2, p. e17, Feb. 2008.
- [204] B. Kruskal, K. Sastry, A. Warner, C. Mathieu, and R. Ezekowitz, "Phagocytic chimeric receptors require both transmembrane and cytoplasmic domains from the mannose receptor.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 176, no. 6, pp. 1673-1680, 1992.
- [205] P. Xaplanteri, G. Lagoumintzis, G. Dimitracopoulos, and F. Paliogianni, "Synergistic regulation of *Pseudomonas aeruginosa*-induced cytokine production in human monocytes by mannose receptor and TLR2.," *European journal of immunology*, vol. 39, no. 3, pp. 730-40, Mar. 2009.
- [206] K. Brennan and A. G. Bowie, "Activation of host pattern recognition receptors by viruses.," *Current opinion in microbiology*, vol. 13, no. 4, pp. 503-7, Aug. 2010.
- [207] M. Yoneyama and T. Fujita, "RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors.," *Immunological reviews*, vol. 227, no. 1, pp. 54-65, Jan. 2009.

- [208] M. Yoneyama et al., "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses.," *Nature immunology*, vol. 5, no. 7, pp. 730-7, Jul. 2004.
- [209] R. Baccala et al., "Sensors of the innate immune system: their mode of action.," *Nature reviews. Rheumatology*, vol. 5, no. 8, pp. 448-56, Aug. 2009.
- [210] D.-chul Kang, R. V. Gopalkrishnan, Q. Wu, E. Jankowsky, A. M. Pyle, and P. B. Fisher, "mda-5: an interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 2, p. 637, Jan. 2002.
- [211] H. Kato et al., "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response.," *Immunity*, vol. 23, no. 1, pp. 19-28, Jul. 2005.
- [212] H. Kato et al., "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses.," *Nature*, vol. 441, no. 7089, pp. 101-5, May 2006.
- [213] L. Gitlin et al., "Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 22, pp. 8459-64, May 2006.
- [214] V. Hornung et al., "5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 314, no. 5801, pp. 994-7, Nov. 2006.
- [215] A. Pichlmair et al., "RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 314, no. 5801, pp. 997-1001, Nov. 2006.
- [216] K. Takahasi et al., "Nonsel self RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses.," *Molecular cell*, vol. 29, no. 4, pp. 428-40, Feb. 2008.
- [217] H. Kato et al., "Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 205, no. 7, pp. 1601-10, Jul. 2008.
- [218] F. Weber, V. Wagner, S. B. Rasmussen, R. Hartmann, and S. R. Paludan, "Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses," *Journal of virology*, vol. 80, no. 10, pp. 5059-5064, 2006.
- [219] T. Kawai et al., "IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction.," *Nature immunology*, vol. 6, no. 10, pp. 981-8, Oct. 2005.
- [220] L.-G. Xu, Y.-Y. Wang, K.-J. Han, L.-Y. Li, Z. Zhai, and H.-B. Shu, "VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling.," *Molecular cell*, vol. 19, no. 6, pp. 727-40, Sep. 2005.
- [221] R. B. Seth, L. Sun, C.-K. Ea, and Z. J. Chen, "Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3.," *Cell*, vol. 122, no. 5, pp. 669-82, Sep. 2005.
- [222] E. Meylan et al., "Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus.," *Nature*, vol. 437, no. 7062, pp. 1167-72, Oct. 2005.

- [223] Q. Sun et al., "The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses.," *Immunity*, vol. 24, no. 5, pp. 633-42, May 2006.
- [224] H. Kumar et al., "Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 203, no. 7, pp. 1795-803, Jul. 2006.
- [225] G. Oganessian et al., "Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response.," *Nature*, vol. 439, no. 7073, pp. 208-11, Jan. 2006.
- [226] S. K. Saha et al., "Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif.," *The EMBO journal*, vol. 25, no. 14, pp. 3257-63, Jul. 2006.
- [227] M. Karin and Y. Ben-Neriah, "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity.," *Annual review of immunology*, vol. 18, pp. 621-63, Jan. 2000.
- [228] K. A. Fitzgerald et al., "IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway.," *Nature immunology*, vol. 4, no. 5, pp. 491-6, May 2003.
- [229] H. Chi and R. A. Flavell, "Innate recognition of non-self nucleic acids.," *Genome biology*, vol. 9, no. 3, p. 211, Jan. 2008.
- [230] D. B. Stetson and R. Medzhitov, "Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response.," *Immunity*, vol. 24, no. 1, pp. 93-103, Jan. 2006.
- [231] K. J. Ishii et al., "A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA.," *Nature immunology*, vol. 7, no. 1, pp. 40-8, Jan. 2006.
- [232] A. Takaoka et al., "DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response.," *Nature*, vol. 448, no. 7152, pp. 501-5, Jul. 2007.
- [233] W. J. Kaiser, J. W. Upton, and E. S. Mocarski, "Receptor-interacting protein homotypic interaction motif-dependent control of NF-kappa B activation via the DNA-dependent activator of IFN regulatory factors.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 181, no. 9, pp. 6427-34, Nov. 2008.
- [234] V. Hornung, A. Ablasser, and M. Charrel-Dennis, "AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC," *Nature*, vol. 458, no. 7237, pp. 514-518, 2009.
- [235] T. Fernandes-Alnemri, J. Yu, P. Datta, and J. Wu, "AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA," *Nature*, vol. 458, no. 7237, pp. 509-513, 2009.
- [236] C. Werts, S. E. Girardin, and D. J. Philpott, "TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad.," *Cell death and differentiation*, vol. 13, no. 5, pp. 798-815, May 2006.
- [237] J. H. Fritz, R. L. Ferrero, D. J. Philpott, and S. E. Girardin, "Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease.," *Nature immunology*, vol. 7, no. 12, pp. 1250-7, Dec. 2006.
- [238] M. Chamaillard et al., "An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid.," *Nature immunology*, vol. 4, no. 7, pp. 702-7, Jul. 2003.
- [239] S. E. Girardin et al., "Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 300, no. 5625, pp. 1584-7, Jun. 2003.

- [240] S. E. Girardin et al., "Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 11, pp. 8869-72, Mar. 2003.
- [241] N. Inohara et al., "Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 8, pp. 5509-12, Feb. 2003.
- [242] F. S. Sutterwala et al., "Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1.," *Immunity*, vol. 24, no. 3, pp. 317-27, Mar. 2006.
- [243] S. Mariathasan et al., "Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP.," *Nature*, vol. 440, no. 7081, pp. 228-32, Mar. 2006.
- [244] M. H. Zaki, M. Lamkanfi, and T.-D. Kanneganti, "The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis.," *Trends in immunology*, vol. 32, no. 4, pp. 171-9, Apr. 2011.
- [245] J. Delaloye et al., "Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome.," *PLoS pathogens*, vol. 5, no. 6, p. e1000480, Jun. 2009.
- [246] D. A. Muruve et al., "The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response.," *Nature*, vol. 452, no. 7183, pp. 103-7, Mar. 2008.
- [247] T.-D. Kanneganti et al., "Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 48, pp. 36560-8, Dec. 2006.
- [248] L. Franchi et al., "Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages.," *Nature immunology*, vol. 7, no. 6, pp. 576-82, Jun. 2006.
- [249] E. A. Miao et al., "Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf.," *Nature immunology*, vol. 7, no. 6, pp. 569-75, Jun. 2006.
- [250] T. Ren, D. S. Zamboni, C. R. Roy, W. F. Dietrich, and R. E. Vance, "Flagellin-deficient Legionella mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity.," *PLoS pathogens*, vol. 2, no. 3, p. e18, Mar. 2006.
- [251] T. a Kufer, J. H. Fritz, and D. J. Philpott, "NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity.," *Trends in microbiology*, vol. 13, no. 8, pp. 381-8, Aug. 2005.
- [252] F. Martinon and J. Tschopp, "Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases.," *Cell*, vol. 117, no. 5, pp. 561-74, May 2004.
- [253] M. D. Maines, "Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications," *The FASEB journal*, vol. 2, no. 10, p. 2557, 1988.
- [254] G. J. C. G. M. Bosman, F. L. A. Willekens, and J. M. Werre, "Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis?," *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, vol. 16, no. 1-3, pp. 1-8, Jan. 2005.

- [255] M. J. Gómez-Lechón, A. Lahoz, L. Gombau, J. V. Castell, and M. T. Donato, "In vitro evaluation of potential hepatotoxicity induced by drugs.," *Current pharmaceutical design*, vol. 16, no. 17, pp. 1963-77, Jun. 2010.
- [256] R. Lüllmann-Rauch, *Histologie*, 2nd ed. Thieme, 2006.
- [257] I. N. Crispe, "The liver as a lymphoid organ.," *Annual review of immunology*, vol. 27, pp. 147-63, Jan. 2009.
- [258] W. S. Haubrich, "Kupffer of Kupffer cells.," *Gastroenterology*, vol. 127, no. 1, p. 16, Jul. 2004.
- [259] M. Naito, G. Hasegawa, and K. Takahashi, "Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells.," *Microscopy research and technique*, vol. 39, no. 4, pp. 350-64, Nov. 1997.
- [260] B. Smedsrød et al., "Hepatic sinusoidal cells in health and disease: update from the 14th International Symposium.," *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, vol. 29, no. 4, pp. 490-501, Apr. 2009.
- [261] M. a Sells, M. L. Chen, and G. Acs, "Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, no. 4, pp. 1005-9, Feb. 1987.
- [262] F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn, "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.," *The Journal of general virology*, vol. 36, no. 1, pp. 59-74, Jul. 1977.
- [263] S. Tsuchiya, M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, and K. Tada, "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).," *International journal of cancer. Journal international du cancer*, vol. 26, no. 2, pp. 171-6, Aug. 1980.
- [264] X. Xiao, J. Li, and R. J. Samulski, "Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus.," *Journal of virology*, vol. 72, no. 3, pp. 2224-32, Mar. 1998.
- [265] U. T. Hacker et al., "Adeno-associated virus serotypes 1 to 5 mediated tumor cell directed gene transfer and improvement of transduction efficiency.," *The journal of gene medicine*, vol. 7, no. 11, pp. 1429-38, Nov. 2005.
- [266] G. Gao et al., "Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues.," *Journal of virology*, vol. 78, no. 12, pp. 6381-8, Jun. 2004.
- [267] M. N. Berry, A. R. Grivell, M. B. Grivell, and J. W. Phillips, "Isolated hepatocytes--past, present and future.," *Cell biology and toxicology*, vol. 13, no. 4-5, pp. 223-33, Jul. 1997.
- [268] M. Broxtermann, "Die Interaktion von humanem Hepatitis B Virus mit Rezeptoren, die Pathogenmuster erkennen," Universität zu Köln, 2007.
- [269] A. Puig-Kröger et al., "Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages.," *Cancer research*, vol. 69, no. 24, pp. 9395-403, Dec. 2009.

- [270] M. S. Brown, S. K. Basu, J. R. Falck, Y. K. Ho, and J. L. Goldstein, "The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages.," *Journal of supramolecular structure*, vol. 13, no. 1, pp. 67-81, Jan. 1980.
- [271] M. S. Brown, J. L. Goldstein, M. Krieger, Y. K. Ho, and R. G. Anderson, "Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins.," *The Journal of cell biology*, vol. 82, no. 3, pp. 597-613, Sep. 1979.
- [272] N. Kosswig, S. Rice, A. Daugherty, and S. R. Post, "Class A scavenger receptor-mediated adhesion and internalization require distinct cytoplasmic domains.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 36, pp. 34219-25, Sep. 2003.
- [273] E. Engvall and P. Perlmann, "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.," *Immunochemistry*, vol. 8, no. 9, pp. 871-4, Sep. 1971.
- [274] A. Zahn and J.-P. Allain, "Hepatitis C virus and hepatitis B virus bind to heparin: purification of largely IgG-free virions from infected plasma by heparin chromatography.," *The Journal of general virology*, vol. 86, no. 3, pp. 677-85, Mar. 2005.
- [275] U. Klingmüller and H. Schaller, "Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor.," *Journal of virology*, vol. 67, no. 12, pp. 7414-22, Dec. 1993.
- [276] S. Arzberger, M. Hösel, and U. Protzer, "Apoptosis of hepatitis B virus-infected hepatocytes prevents release of infectious virus.," *Journal of virology*, vol. 84, no. 22, pp. 11994-2001, Nov. 2010.
- [277] M. Hösel et al., "Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 50, no. 6, pp. 1773-82, Dec. 2009.
- [278] R. C. Hughes and S. C. Stamatoglou, "Adhesive interactions and the metabolic activity of hepatocytes.," *Journal of cell science. Supplement*, vol. 8, pp. 273-91, Jan. 1987.
- [279] A. E. Wennerberg, M. A. Nalesnik, and W. B. Colemant, "Technical Advances Hepatocyte Paraffin 1 : A Monoclonal Antibody that Reacts with Hepatocytes and Can Be Used for Differential Diagnosis of Hepatic Tumors," *October*, vol. 143, no. 4, pp. 1050-1054, 1993.
- [280] J. P. Golder and W. F. Doe, "Isolation and preliminary characterization of human intestinal macrophages.," *Gastroenterology*, vol. 84, no. 4, pp. 795-802, Apr. 1983.
- [281] C. B. Wilson, J. E. Haas, and W. M. Weaver, "Isolation, purification and characteristics of mononuclear phagocytes from human placentas.," *Journal of immunological methods*, vol. 56, no. 3, pp. 305-17, Feb. 1983.
- [282] K. Y. Helmy et al., "CRIg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens.," *Cell*, vol. 124, no. 5, pp. 915-27, Mar. 2006.
- [283] C. L. Holness and D. L. Simmons, "Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins.," *Blood*, vol. 81, no. 6, pp. 1607-13, Mar. 1993.
- [284] E. B. Alabraba, S. M. Curbishley, W. K. Lai, S. J. Wigmore, D. H. Adams, and S. C. Afford, "A new approach to isolation and culture of human Kupffer cells.," *Journal of immunological methods*, vol. 326, no. 1-2, pp. 139-44, Sep. 2007.

- [285] H. Sunada, M. Masuda, and K. Fujiwara, "Preservation of differentiated phenotypes in cultured aortic endothelial cells by malotilate and phosphoascorbic acid.," *European journal of cell biology*, vol. 60, no. 1, pp. 48-56, Feb. 1993.
- [286] H. Schulze-Bergkamen et al., "Primary human hepatocytes – a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection," *Journal of Hepatology*, vol. 38, no. 6, pp. 736-744, Jun. 2003.
- [287] A. Iwasaki and R. Medzhitov, "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses.," *Nature immunology*, vol. 5, no. 10, pp. 987-95, Oct. 2004.
- [288] E. K. Park, H. S. Jung, H. I. Yang, M. C. Yoo, C. Kim, and K. S. Kim, "Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli.," *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, vol. 56, no. 1, pp. 45-50, Jan. 2007.
- [289] L. Helming et al., "1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 is a potent suppressor of interferon gamma-mediated macrophage activation.," *Blood*, vol. 106, no. 13, pp. 4351-8, Dec. 2005.
- [290] L. Helming and S. Gordon, "Macrophage fusion induced by IL-4 alternative activation is a multistage process involving multiple target molecules.," *European journal of immunology*, vol. 37, no. 1, pp. 33-42, Jan. 2007.
- [291] G. Sethi, K. S. Ahn, M. K. Pandey, and B. B. Aggarwal, "Celastrol, a novel triterpene, potentiates TNF-induced apoptosis and suppresses invasion of tumor cells by inhibiting NF-kappaB-regulated gene products and TAK1-mediated NF-kappaB activation.," *Blood*, vol. 109, no. 7, pp. 2727-35, Apr. 2007.
- [292] J. L. Cervantes et al., "Phagosomal signaling by *Borrelia burgdorferi* in human monocytes involves Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR8 cooperativity and TLR8-mediated induction of IFN-beta.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 9, pp. 3683-8, Mar. 2011.
- [293] A. M. Kerrigan and G. D. Brown, "C-type lectins and phagocytosis," *Immunobiology*, vol. 214, no. 7, pp. 562-575, 2009.
- [294] M. L. Op den Brouw, R. S. Binda, T. B. H. Geijtenbeek, H. L. a Janssen, and A. M. Woltman, "The mannose receptor acts as hepatitis B virus surface antigen receptor mediating interaction with intrahepatic dendritic cells.," *Virology*, vol. 393, no. 1, pp. 84-90, Oct. 2009.
- [295] W. P. Chong et al., "Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 42, no. 5, pp. 1037-45, Nov. 2005.
- [296] X. LU, A. MEHTA, R. DWEK, T. BUTTERS, and T. BLOCK, "Evidence that N-linked glycosylation is necessary for hepatitis B virus secretion," *Virology*, vol. 213, no. 2, pp. 660-665, 1995.
- [297] T. B. H. Geijtenbeek and S. I. Gringhuis, "Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 9, no. 7, pp. 465-79, Jul. 2009.
- [298] J. Chu and M. Ng, "Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway," *Journal of virology*, vol. 78, no. 19, p. 10543, 2004.

- [299] T. Lhermusier et al., "The Syk-kinase inhibitor R406 impairs platelet activation and monocyte tissue factor expression triggered by heparin-PF4 complex directed antibodies.," *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, vol. 9, no. 10, pp. 2067-76, Oct. 2011.
- [300] C. D. Blanchette, Y.-H. Woo, C. Thomas, N. Shen, T. a Sulchek, and A. L. Hiddessen, "Decoupling internalization, acidification and phagosomal-endosomal/lysosomal fusion during phagocytosis of In1A coated beads in epithelial cells.," *PloS one*, vol. 4, no. 6, p. e6056, Jan. 2009.
- [301] K. W. Boehme and T. Compton, "Innate sensing of viruses by toll-like receptors," *Journal of virology*, vol. 78, no. 15, p. 7867, 2004.
- [302] O. M. Hart, V. Athie-Morales, G. M. O'Connor, and C. M. Gardiner, "TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 175, no. 3, pp. 1636-42, Aug. 2005.
- [303] S. A. Linehan et al., "IL-4 receptor signaling is required for mannose receptor expression by macrophages recruited to granulomata but not resident cells in mice infected with *Schistosoma mansoni*," *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, vol. 83, no. 8, pp. 1223-31, Aug. 2003.
- [304] A. Bertoletti, M. K. Maini, and C. Ferrari, "The host-pathogen interaction during HBV infection: immunological controversies.," *Antiviral therapy*, vol. 15 Suppl 3, pp. 15-24, Jan. 2010.
- [305] A. Iwasaki and R. Medzhitov, "Regulation of adaptive immunity by the innate immune system.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 327, no. 5963, pp. 291-5, Jan. 2010.
- [306] S. Wieland, R. Thimme, R. H. Purcell, and F. V. Chisari, "Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 17, pp. 6669-74, Apr. 2004.
- [307] A. M. Woltman, M. L. Op den Brouw, P. J. Biesta, C. C. Shi, and H. L. a Janssen, "Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function.," *PloS one*, vol. 6, no. 1, p. e15324, Jan. 2011.
- [308] C. S. Manno et al., "Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response.," *Nature medicine*, vol. 12, no. 3, pp. 342-7, Mar. 2006.
- [309] J. Zhu, X. Huang, and Y. Yang, "The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice," *The Journal of clinical investigation*, vol. 119, no. 8, pp. 2388-2398, 2009.
- [310] U. Protzer, M. Nassal, P. W. Chiang, M. Kirschfink, and H. Schaller, "Interferon gene transfer by a hepatitis B virus vector efficiently suppresses wild-type virus infection.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 19, pp. 10818-23, Sep. 1999.
- [311] R. H. Bhogal et al., "Isolation of primary human hepatocytes from normal and diseased liver tissue: a one hundred liver experience.," *PloS one*, vol. 6, no. 3, p. e18222, Jan. 2011.
- [312] J.-E. Guidotti, O. Br gerie, A. Robert, P. Debey, C. Brechot, and C. Desdouets, "Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 21, pp. 19095-101, May 2003.

- [313] M. Papotti, D. Pacchioni, F. Negro, F. Bonino, and G. Bussolati, "Albumin gene expression in liver tumors: diagnostic interest in fine needle aspiration biopsies.," *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, vol. 7, no. 3, pp. 271-5, Apr. 1994.
- [314] D. L. Knook and E. C. Sleyster, "Separation of Kupffer and endothelial cells of the rat liver by centrifugal elutriation.," *Experimental cell research*, vol. 99, no. 2, pp. 444-9, May 1976.
- [315] G. Heuff, S. Meyer, and R. H. Beelen, "Isolation of rat and human Kupffer cells by a modified enzymatic assay.," *Journal of immunological methods*, vol. 174, no. 1-2, pp. 61-5, Sep. 1994.
- [316] J. Hammerstrøm, "Structure and function of human effusion macrophages from patients with malignant and benign disease. 1. Isolation, morphology, proliferation and phagocytosis.," *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section C, Immunology*, vol. 88, no. 4, pp. 191-200, Aug. 1980.
- [317] M. Naito, G. Hasegawa, Y. Ebe, and T. Yamamoto, "Differentiation and function of Kupffer cells.," *Medical electron microscopy: official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan*, vol. 37, no. 1, pp. 16-28, Mar. 2004.
- [318] H. Liu, H. Cao, and Z.-yong Wu, "Isolation of Kupffer cells and their suppressive effects on T lymphocyte growth in rat orthotopic liver transplantation," vol. 13, no. 22, pp. 3133-3136, 2007.
- [319] K. A. Pulford, A. Sipos, J. L. Cordell, W. P. Stross, and D. Y. Mason, "Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen.," *International immunology*, vol. 2, no. 10, pp. 973-80, Jan. 1990.
- [320] I. Klein et al., "Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages.," *Blood*, vol. 110, no. 12, pp. 4077-85, Dec. 2007.
- [321] N. Hinglais, M. D. Kazatchkine, C. Mandet, M. D. Appay, and J. Bariety, "Human liver Kupffer cells express CR1, CR3, and CR4 complement receptor antigens. An immunohistochemical study.," *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, vol. 61, no. 5, pp. 509-14, Nov. 1989.
- [322] E. Gottfried et al., "Expression of CD68 in non-myeloid cell types.," *Scandinavian journal of immunology*, vol. 67, no. 5, pp. 453-63, May 2008.
- [323] E. Wisse, "An ultrastructural characterization of the endothelial cell in the rat liver sinusoid under normal and various experimental conditions, as a contribution to the distinction between endothelial and Kupffer cells.," *Journal of ultrastructure research*, vol. 38, no. 5, pp. 528-62, Mar. 1972.
- [324] K. Elvevold, B. Smedsrød, and I. Martinez, "The liver sinusoidal endothelial cell: a cell type of controversial and confusing identity.," *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, vol. 294, no. 2, pp. G391-400, Feb. 2008.
- [325] M. P. Pusztaszeri, W. Seelentag, and F. T. Bosman, "Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues.," *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, vol. 54, no. 4, pp. 385-95, Apr. 2006.
- [326] S. a Mousa, "Expression of adhesion molecules during cadmium hepatotoxicity.," *Life sciences*, vol. 75, no. 1, pp. 93-105, May 2004.

- [327] L. D. DeLeve, X. Wang, L. Hu, M. K. McCuskey, and R. S. McCuskey, "Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation.," *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, vol. 287, no. 4, pp. G757-63, Oct. 2004.
- [328] N. Seta and M. Kuwana, "Human circulating monocytes as multipotential progenitors.," *The Keio journal of medicine*, vol. 56, no. 2, pp. 41-7, Jun. 2007.
- [329] P. F. Lalor, S. Edwards, G. McNab, M. Salmi, S. Jalkanen, and D. H. Adams, "Vascular adhesion protein-1 mediates adhesion and transmigration of lymphocytes on human hepatic endothelial cells.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 169, no. 2, pp. 983-92, Jul. 2002.
- [330] M. G. Irving, F. J. Roll, S. Huang, and D. M. Bissell, "Characterization and culture of sinusoidal endothelium from normal rat liver: lipoprotein uptake and collagen phenotype.," *Gastroenterology*, vol. 87, no. 6, pp. 1233-47, Dec. 1984.
- [331] J. C. Voyta, D. P. Via, C. E. Butterfield, and B. R. Zetter, "Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein.," *The Journal of cell biology*, vol. 99, no. 6, pp. 2034-40, Dec. 1984.
- [332] M. van Oosten, E. S. van Amersfoort, T. J. van Berkel, and J. Kuiper, "Scavenger receptor-like receptors for the binding of lipopolysaccharide and lipoteichoic acid to liver endothelial and Kupffer cells.," *Journal of endotoxin research*, vol. 7, no. 5, pp. 381-4, Jan. 2001.
- [333] W. K. Lai et al., "Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on Human Sinusoidal Endothelium: A Role for Capturing Hepatitis C Virus Particles," *American Journal Of Pathology*, vol. 169, no. 1, pp. 200-208, Jul. 2006.
- [334] A. A. Bashirova et al., "A Dendritic Cell-specific Intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human LSEC and promotes HIV-1 infection.pdf," *J Exp Med*, vol. 193, pp. 671-678, 2001.
- [335] E. J. Soilleux, L. S. Morris, S. Rushbrook, B. Lee, and N. Coleman, "Expression of human immunodeficiency virus (HIV)-binding lectin DC-SIGNR: Consequences for HIV infection and immunity.," *Human pathology*, vol. 33, no. 6, pp. 652-9, Jun. 2002.
- [336] K. a Zarembek and P. J. Godowski, "Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 168, no. 2, pp. 554-61, Jan. 2002.
- [337] M. Nishimura and S. Naito, "Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes.," *Biological & pharmaceutical bulletin*, vol. 28, no. 5, pp. 886-92, May 2005.
- [338] S. Liu et al., "Role of Toll-Like Receptors in Changes in Gene Expression and NF-kB Activation in Mouse Hepatocytes Stimulated with Lipopolysaccharide," *Infection and immunity*, vol. 70, no. 7, pp. 3433-3442, 2002.
- [339] T. Matsumura et al., "TRAF6-NF-kappaB pathway is essential for interleukin-1-induced TLR2 expression and its functional response to TLR2 ligand in murine hepatocytes.," *Immunology*, vol. 109, no. 1, pp. 127-36, May 2003.

- [340] E. Seki and D. a Brenner, "Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 48, no. 1, pp. 322-35, Jul. 2008.
- [341] G. L. Su et al., "Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats: role for lipopolysaccharide binding protein and toll-like receptor 4.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 31, no. 4, pp. 932-6, Apr. 2000.
- [342] J. Wu et al., "Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 46, no. 6, pp. 1769-78, Dec. 2007.
- [343] B. M. Thobe et al., "The Role of MAPK in Kupffer Cell Toll-Like Receptor Following Trauma-Hemorrhage," *Blood Pressure*, vol. 675, no. 2006, pp. 667-675, 2007.
- [344] J. Wu et al., "Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific.," *Immunology*, vol. 129, no. 3, pp. 363-74, Mar. 2010.
- [345] M. Martin-Armas, J. Simon-Santamaria, I. Pettersen, U. Moens, B. Smedsrød, and B. Sveinbjörnsson, "Toll-like receptor 9 (TLR9) is present in murine liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and mediates the effect of CpG-oligonucleotides.," *Journal of hepatology*, vol. 44, no. 5, pp. 939-46, May 2006.
- [346] A. Uhrig et al., "Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver thelial cells (LSEC) clear portal venous blood from TLR4 surface expression of LSEC is not altered by Isolation of murine LSEC," *Journal of Leukocyte Biology*, 2005.
- [347] K. J. Ishii, S. Koyama, A. Nakagawa, C. Coban, and S. Akira, "Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections.," *Cell host & microbe*, vol. 3, no. 6, pp. 352-63, Jun. 2008.
- [348] R. E. Randall and S. Goodbourn, "Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures.," *The Journal of general virology*, vol. 89, no. 1, pp. 1-47, Jan. 2008.
- [349] F. Martinon, A. Mayor, and J. Tschopp, "The inflammasomes: guardians of the body.," *Annual review of immunology*, vol. 27, pp. 229-65, Jan. 2009.
- [350] T. Pollicino et al., "Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones.," *Gastroenterology*, vol. 130, no. 3, pp. 823-37, Mar. 2006.
- [351] T. Bauer, M. Sprinzl, and U. Protzer, "Immune control of hepatitis B virus.," *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*, vol. 29, no. 4, pp. 423-33, Jan. 2011.
- [352] J. Wu et al., "Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 49, no. 4, pp. 1132-40, Apr. 2009.
- [353] H. Wang and W.-S. Ryu, "Hepatitis B virus polymerase blocks pattern recognition receptor signaling via interaction with DDX3: implications for immune evasion.," *PLoS pathogens*, vol. 6, no. 7, p. e1000986, Jan. 2010.

- [354] C. Wei et al., "The hepatitis B virus X protein disrupts innate immunity by downregulating mitochondrial antiviral signaling protein.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 185, no. 2, pp. 1158-68, Jul. 2010.
- [355] D. Torre et al., "Serum levels of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor in patients with acute viral hepatitis.," *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 18, no. 2, pp. 194-8, Feb. 1994.
- [356] L. G. Guidotti, "Viral Clearance Without Destruction of Infected Cells During Acute HBV Infection," *Science*, vol. 284, no. 5415, pp. 825-829, Apr. 1999.
- [357] M. Isogawa, M. D. Robek, Y. Furuichi, and F. V. Chisari, "Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo," *Journal of virology*, vol. 79, no. 11, p. 7269, 2005.
- [358] K. Visvanathan et al., "Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 45, no. 1, pp. 102-10, Jan. 2007.
- [359] P. Vanlandschoot, F. Van Houtte, P. Ulrichs, J. Tavernier, and G. Leroux-Roels, "Immunostimulatory potential of hepatitis B nucleocapsid preparations: lipopolysaccharide contamination should not be overlooked.," *The Journal of general virology*, vol. 86, no. 2, pp. 323-31, Mar. 2005.
- [360] T. Lang, C. Lo, N. Skinner, S. Locarnini, K. Visvanathan, and A. Mansell, "The hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway.," *Journal of hepatology*, vol. 55, no. 4, pp. 762-9, Oct. 2011.
- [361] H. Schwende, E. Fitzke, P. Ambs, and P. Dieter, "Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1, 25-dihydroxyvitamin D3," *Journal of leukocyte biology*, vol. 59, no. 4, p. 555, 1996.
- [362] M. D. Neal et al., "Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier," *The Journal of Immunology*, vol. 176, no. 5, p. 3070, 2006.
- [363] E. Hoffmann, O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann, and M. Kracht, "Multiple control of interleukin-8 gene expression.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 72, no. 5, pp. 847-55, Nov. 2002.
- [364] A. Sato, M. M. Linehan, and A. Iwasaki, "Dual recognition of herpes simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 46, pp. 17343-8, Nov. 2006.
- [365] E. Kurt-Jones et al., "The role of toll-like receptors in herpes simplex infection in neonates.," *The Journal of infectious diseases*, vol. 191, no. 5, pp. 746-8, Mar. 2005.
- [366] R. N. Aravalli, S. Hu, T. N. Rowen, J. M. Palmquist, and J. R. Lokensgard, "Cutting edge: TLR2-mediated proinflammatory cytokine and chemokine production by microglial cells in response to herpes simplex virus.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 175, no. 7, pp. 4189-93, Oct. 2005.
- [367] J. Martinez, X. Huang, and Y. Yang, "Direct TLR2 signaling is critical for NK cell activation and function in response to vaccinia viral infection.," *PLoS pathogens*, vol. 6, no. 3, p. e1000811, Mar. 2010.

- [368] A. Dolganiuc et al., "Hepatitis C virus (HCV) core protein-induced, monocyte-mediated mechanisms of reduced IFN-alpha and plasmacytoid dendritic cell loss in chronic HCV infection.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 177, no. 10, pp. 6758-68, Nov. 2006.
- [369] A. Dolganiuc et al., "Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation," *Gastroenterology*, vol. 127, no. 5, pp. 1513-1524, Nov. 2004.
- [370] J. Rassa, "Viruses and Toll-like receptors," *Microbes and Infection*, vol. 5, no. 11, pp. 961-968, Sep. 2003.
- [371] K. Bieback et al., "Hemagglutinin Protein of Wild-Type Measles Virus Activates Toll-Like Receptor 2 Signaling," *Society*, vol. 76, no. 17, pp. 8729-8736, 2002.
- [372] D. Durantel and F. Zoulim, "Innate response to hepatitis B virus infection: observations challenging the concept of a stealth virus.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 50, no. 6, pp. 1692-5, Dec. 2009.
- [373] P. Fiscaro et al., "Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection.," *Gut*, vol. 58, no. 7, pp. 974-82, Jul. 2009.
- [374] M. Maire et al., "Characterization of the double-stranded RNA responses in human liver progenitor cells.," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 368, no. 3, pp. 556-62, May 2008.
- [375] J. Lucifora, D. Durantel, B. Testoni, O. Hantz, M. Levrero, and F. Zoulim, "Control of hepatitis B virus replication by innate response of HepaRG cells.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 51, no. 1, pp. 63-72, Jan. 2010.
- [376] D. R. Milich, J. E. Jones, J. L. Hughes, J. Price, a K. Raney, and a McLachlan, "Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero?," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 17, pp. 6599-603, Oct. 1990.
- [377] S. J. Hadziyannis and D. Vassilopoulos, "Immunopathogenesis of hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B infection.," *Antiviral research*, vol. 52, no. 2, pp. 91-8, Dec. 2001.
- [378] P. Vanlandschoot, F. Van Houtte, A. Roobrouck, A. Farhoudi, and G. Leroux-Roels, "Hepatitis B virus surface antigen suppresses the activation of monocytes through interaction with a serum protein and a monocyte-specific receptor.," *The Journal of general virology*, vol. 83, no. 6, pp. 1281-9, Jun. 2002.
- [379] A. Bertoletti and A. J. Gehring, "The immune response during hepatitis B virus infection.," *The Journal of general virology*, vol. 87, no. 6, pp. 1439-49, Jun. 2006.
- [380] A. G. Bowie and I. R. Haga, "The role of Toll-like receptors in the host response to viruses.," *Molecular immunology*, vol. 42, no. 8, pp. 859-67, May 2005.
- [381] J. M. Lund et al., "Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 15, pp. 5598-603, Apr. 2004.

- [382] F. Heil et al., "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 303, no. 5663, pp. 1526-9, Mar. 2004.
- [383] D. Burzyn, J. C. Rassa, D. Kim, I. Nepomnaschy, S. R. Ross, and I. Piazzon, "Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by a retrovirus," *Journal of virology*, vol. 78, no. 2, pp. 576-584, 2004.
- [384] E. M. Ibeagha-Awemu, J. W. Lee, A. E. Ibeagha, D. D. Bannerman, M. J. Paape, and X. Zhao, "Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells," *Veterinary research*, vol. 39, no. 2, pp. 11-11, 2007.
- [385] M. Taraktsoglou et al., "Transcriptional profiling of immune genes in bovine monocyte-derived macrophages to bacterial antigens," *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 140, pp. 130-139, 2011.
- [386] M. Muzio et al., "Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 164, no. 11, pp. 5998-6004, Jun. 2000.
- [387] A. Krug, G. D. Luker, W. Barchet, D. A. Leib, S. Akira, and M. Colonna, "Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9," *Blood*, vol. 103, no. 4, p. 1433, 2004.
- [388] M. L. Marre, T. Petnicki-Ocwieja, A. S. DeFrancesco, C. T. Darcy, and L. T. Hu, "Human integrin $\alpha(3)\beta(1)$ regulates TLR2 recognition of lipopeptides from endosomal compartments," *PloS one*, vol. 5, no. 9, p. e12871, Jan. 2010.
- [389] M. Hösel et al., "TLR2-mediated innate immune response in human non-parenchymal liver cells towards adeno-associated viral (AAV) vectors," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, pp. 2-35, Aug. 2011.
- [390] A. K. Zaiss and D. A. Muruve, "Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge," *Gene therapy*, vol. 15, no. 11, pp. 808-16, Jun. 2008.
- [391] A. K. Zaiss, Q. Liu, G. P. Bowen, N. C. W. Wong, J. S. Bartlett, and D. A. Muruve, "Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors," *Journal of virology*, vol. 76, no. 9, p. 4580, 2002.
- [392] M. Jin et al., "Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis," *Virology*, vol. 294, no. 1, pp. 60-9, Mar. 2002.
- [393] T. B. H. Geijtenbeek et al., "Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1," *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 13, pp. 11314-20, Mar. 2002.
- [394] T. Gramberg et al., "LSECTin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus," *Virology*, vol. 340, no. 2, pp. 224-36, Sep. 2005.
- [395] M. Rutz et al., "Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner," *European journal of immunology*, vol. 34, no. 9, pp. 2541-50, Sep-2004.
- [396] R. M. Steinman, I. S. Mellman, W. a Muller, and Z. a Cohn, "Endocytosis and the recycling of plasma membrane," *The Journal of cell biology*, vol. 96, no. 1, pp. 1-27, Jan. 1983.

-
- [397] L. K. Juckem, K. W. Boehme, A. L. Feire, and T. Compton, "Differential initiation of innate immune responses induced by human cytomegalovirus entry into fibroblast cells.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 180, no. 7, pp. 4965-77, Apr. 2008.
- [398] M. L. Op den Brouw et al., "Branched oligosaccharide structures on HBV prevent interaction with both DC-SIGN and L-SIGN.," *Journal of viral hepatitis*, vol. 15, no. 9, pp. 675-83, Sep. 2008.
- [399] S. D. Tachado, J. Zhang, J. Zhu, N. Patel, M. Cushion, and H. Koziel, "Pneumocystis-mediated IL-8 release by macrophages requires coexpression of mannose receptors and TLR2.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 81, no. 1, pp. 205-11, Jan. 2007.
- [400] J. Zhang et al., "Pneumocystis Activates Human Alveolar Macrophage NF- B Signaling through Mannose Receptors," *Society*, vol. 72, no. 6, pp. 3147-3160, 2004.
- [401] Y. Yamamoto, T. W. Klein, and H. Friedman, "Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC responses, caused by atta," *Infection and immunity*, vol. 65, no. 3, p. 1077, 1997.
- [402] L. Cabec, L. J. Emorine, and I. Toesca, "The human macrophage mannose receptor is not a professional phagocytic receptor Abstract : The macrophage mannose receptor," *Journal of Leukocyte Biology*, 2005.

Ich möchte an dieser Stelle einer Reihe von Kollegen und Freunden Danken, ohne deren Hilfe ich diese Arbeit nicht fertiggestellt hätte.

Zuallererst möchte ich Ulrike Protzer herzlich danken, die mir die Möglichkeit gab, das spannende Thema meiner Diplomarbeit im München fortzusetzen. Ich möchte mich für die nunmehr insgesamt fast fünfjährige Betreuung meiner Projekte bedanken sowie die Möglichkeit, zu zahlreichen Fortbildungsmaßnahmen und Kongressen reisen zu können, bei denen ich mich auch persönlich weiterbilden konnte.

Desweiteren möchte ich Professor Mewes sowie Professor Durner danken, die freundlicherweise die Betreuung am WZW sowie den Vorsitz über meine Prüfungskommission übernommen haben.

Ich möchte ausserdem Caroline Gaehler, Stefan Urban sowie Jürgen Ruland und seiner Gruppe danken, von denen ich einige hilfreiche Ratschläge sowie Substanzen erhalten habe, ohne die viele Versuche nicht hätten durchgeführt werden können. Desweiteren danke ich Laura Helming und Ronny Müller aus der MiBi, die mir freundlicherweise ihre Mauszellen zur Verfügung gestellt haben.

Ich möchte ein großes Dankeschön an Knud Esser und Marianna Hösel aussprechen, die mich seit meiner Diplomarbeit begleiten und mich immer wieder auf neue Ideen gebracht haben. Knud möchte ich besonders für die vielen Abende danken, an denen wir bis in die Nacht Leberzellen präpariert haben und trotzdem am nächsten Tag noch lachen konnten. Marianna möchte ich für das AAV Projekt danken, welches wir inzwischen erfolgreich publiziert haben.

Ein großes Dankeschön geht an unsere Techniker, die mir viel Arbeit abgenommen haben und für alle Fragen offen waren. Ich danke Theresa Asen, Andi Weicht und Raindy Tedjokusumo für die langjährige Hilfe und all die analysierten Proben...

Desweiteren möchte ich noch Martin Sprinzl, Julia Graf, Katrin Singethan, Karin Krebs, Christian Bach, Gregor Ebert, Silke Arzberger sowie Julie Lucifora für die vielen Gespräche, Hilfestellungen, zur Verfügung gestellten Viren, Hilfen bei diversen Methoden, die hier keinen Einzug mehr gefunden haben, sowie Unterstützung bei Software-Problemen danken.

Ausserdem nochmal ein ganz herzliches Denkeschön an alle, die meine Arbeit nochmal gelesen und auf Fehler untersucht haben.

An dieser Stelle möchte ich auch noch meine tapferen Praktikanten, Catharina von Nicolai und Jochen Wettengel, hervorheben. Manchmal tut es ganz gut, wenn man sein Thema nochmal rekapitulieren und vernünftig erklären muss, und ich hoffe ihr habt auch was gelernt!

Ich würde gerne erwähnen, dass aus vielen Kollegen inzwischen auch Freunde geworden sind, was nicht immer selbstverständlich ist. Ich danke euch allen von Herzen für diese tolle Zeit in München!

An Ende, aber nicht zuletzt, möchte ich noch meinen Eltern, Marion und Klaus, und meinen Geschwistern, Pia und Felix, danken, ohne die ich bestimmt nicht hier stände. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Lebenslauf

Mathias Broxtermann

Landwehrstr. 44
80336 München
Mobil 0178-3316462
broxtermann@googlemail.com

Persönliche Daten

Geburtstag und -ort: 06.09.1980 in Köln, NRW
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung und berufliche Erfahrung

- 06/2012 – heute **Promovierter wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Virologie**
Technische Universität München / Helmholtz-Zentrum München
- 01/2008 – 06/2012 **Doktorand am Institut für Virologie**
Technische Universität München / Helmholtz-Zentrum München
- Thema: „Die Erkennung viraler Partikel durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems am Beispiel des HBV und AAV“
- Abschlussnote: „magna cum laude“
- 10/2001 - 10/2007 **Studium Biologie mit Hauptfach Genetik**
Universität zu Köln
- Diplomarbeit: „Die Interaktion von humanem Hepatitis B Virus mit Rezeptoren, die Pathogenmuster erkennen“ am Zentrum für Molekulare Medizin (ZMMK) in der Nachwuchsforschungsgruppe „Molekulare Infektiologie“.
- Abschlussnote: „sehr gut“
- 10/2000 - 09/2001 Studium der Rechtswissenschaften an der rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- 07/1999 - 04/2000 Wehrdienst in Daun und Köln
- 05/1999 **St-Ursula Gymnasium Brühl**
Abschluss Abitur (2,3), Leistungskurse Biologie und Geschichte