
**Analyse potenzieller therapeutischer Zielstrukturen, die mit
Replikation und Persistenz von
Hepatitis-B-Viren und Hepatitis-D-Viren interferieren**

*Analysis of potential therapeutic targets that interfere with
replication and persistence of
hepatitis B viruses and hepatitis D viruses*

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs 08 Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Lena Soppa (M. Sc.)

Gießen, Dezember 2024

Die vorliegende Dissertation wurde am **Institut für Medizinische Virologie** des Fachbereichs 11 Medizin der **Justus-Liebig-Universität Gießen** unter der Leitung von apl. Prof. Dr. Dieter Glebe angefertigt.

1. Gutachter (intern):

Prof. Dr. Andreas Krueger
Professur für Immunologie
Fachbereich 08 Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter (extern):

apl. Prof. Dr. Dieter Glebe
Institut für Medizinische Virologie
Fachbereich 11 Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Zusammenfassung.....	IX
<i>Abstract</i>	X
Aus der Promotion hervorgegangene Publikationen.....	XI
1. Einleitung	1
1.1. Morphologie von HBV und HDV	1
1.2. Virale Replikationsmechanismen.....	3
1.2.1. Replikationszyklus des HBV	3
1.2.2. Replikationszyklus des HDV	5
1.3. Epidemiologie von HDV, HBV und HBV nicht-humaner Primaten	7
1.3.1. Genetische Variabilität und Verbreitung von HDV	7
1.3.2. Prävalenz und Variabilität von HBV.....	8
Zielsetzung und Fragestellungen.....	11
2. Material	13
2.1. Verwendete Geräte.....	13
2.2. Verbrauchsmaterial	14
2.3. Zelllinien und Zellkulturbedingungen.....	14
2.3.1. Medien, Antibiotika, sowie weitere Zusätze und Substanzen	16
2.3.2. Reagenzien für die Transfektion	18
2.3.3. Reagenzien und Material für die Produktion von Lentiviren durch transiente Transfektion von HEK293T Zellen.....	18
2.3.4. Substanzen für NTCP/Ntcp-Bindungs- und -Transportanalysen	19
2.4. Bakterienstämme und Kulturbedingungen.....	20
2.5. Expressionsvektoren und weitere Oligonukleotide	20
2.5.1. Kommerzielle und bereits in der AG Glebe vorhandene Expressionsvektoren	20
2.5.2. Verwendete Primer und Sonden für Klonierungen, PCR und Northern Blot	25
2.5.3. Verwendete sgRNAs (als Oligonukleotide) zur Klonierung in lentiCRISPRv2 zum induzierten gezielten <i>Gen-Knock-Out</i>	26
2.6. Verwendete siRNAs und passende Hydrolysesonden (TaqMan) für den gezielten <i>Knock-Down</i> von Wirtsfaktoren und dessen Verifizierung	27

2.7. Enzyme und gebrauchsfertige Enzym-Reaktionslösungen	30
2.8. Antikörper für Western Blot Analysen, Indirekte Immunfluoreszenz und Immunpräzipitation	31
Primärantikörper.....	31
Sekundärantikörper	33
2.9. Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	34
2.10. Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und weitere Materialien	36
3. Methoden.....	39
3.1. Eukaryotische Zellkultur-Methoden.....	39
3.1.1. Kultivieren, Passagieren und Aussäen von Hepatomzelllinien und primären humanen Hepatozyten.....	39
3.1.2. Transiente Transfektion von Hepatomzelllinien	39
3.1.3. Transiente Transfektion von siRNAs zum gezielten <i>Knock-Down</i> von Wirtsfaktoren..	40
3.1.4. Generierung von pseudotypisierten HDV <i>in-vitro</i>	41
3.1.5. Generierung von rekombinanten HBV <i>in-vitro</i>	42
3.2. Zellbiologische Methoden	42
3.2.1. Infektion mit rekombinanten pseudotypisierten HDV <i>in-vitro</i>	42
3.2.2. Produktion von Lentiviren durch transiente Transfektion von HEK293T Zellen mittels Calciumphosphat-Methode und Transduktion von Huh7-NTCP ^{MPL} Zellen.....	43
3.2.3. Indirekte Immunfluoreszenz (IF).....	44
3.2.4. Nitrobenzoxadiazol-Taurocholat (NBD-TC) Transport-Assay	44
3.2.5. Bestimmung der Transfektionseffizienz (SEAP-Assay)	45
3.3. Mikrobiologische Methoden	45
3.3.1. Transformation von Bakterien (<i>E. coli</i> Stellar TM Competent Cells).....	45
3.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakteriensuspensionen.....	46
3.3.3. Produktion (Transformation von <i>E. coli</i> ZYCY10P3S2T) und Aufreinigung von MiniCircle HBV cccDNA	46
3.4. Molekularbiologische Methoden.....	48
3.4.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Generierung von rekombinanter HBV cccDNA (rcccDNA).....	48
3.4.2. Isolierung von RNA, genomischer DNA und Gesamtprotein aus Zellen	50
3.4.3. Northern Blot zur Detektion genomischer und antigenomischer HDV-RNA.....	51
3.4.4. Isolierung viraler Nukleinsäuren aus Zellkulturüberständen und humanem Serum.....	53
3.4.5. Quantifizierung rekombinanter HBV und pseudotypisierter HDV	53
3.4.6. Vektor-Klonierungen (FastCloning nach Li et al., 2011).....	55
3.4.7. Klonierung von Gen-spezifischen sgRNA-Sequenzen in lentiCRISPRv2.....	56
3.4.8. Analyse rekombinanter HBV mittels linearer CsCl-Gradienten	57
3.5. Proteinbiochemische Methoden	58

3.5.1. Lysieren von Zellen und Vorbereitung von Proben für Western Blot Analysen	58
3.5.2. Diskontinuierliche SDS-PAGE, Western Blot (<i>semi-dry</i>) und Immundetektion von Proteinen	58
3.5.3. Diagnostische Nachweisverfahren: Bestimmung von HBsAg (quantitativ) und HBeAg (qualitativ)	60
3.5.4. Immunpräzipitation zum Nachweis von HBV in Zellkulturüberständen.....	60
3.6. Bioinformatische Methoden.....	61
4. Ergebnisse	63
4.1. Analyse von molekularbiologischen und mikrobiologischen Methoden zur Generierung rekombinanter HBV <i>in-vitro</i>	63
4.2. Untersuchungen zur Spezies-übergreifenden Infektiosität von Hepatitis-B-Virus-Isolaten nicht-humaner Primaten	74
4.3. Detektion und Charakterisierung von Wirtsfaktoren, die mit Replikation und Persistenz von Hepatitis-B-Viren und Hepatitis-D-Viren interferieren	81
5. Diskussion	99
5.1. Die Generierung rekombinanter HBV und die Kontrolle der HBV cccDNA als Forschungsschwerpunkte zur Entwicklung neuer Therapien für die vollständige Heilung von chronischen HBV-Infektionen	99
5.2. Die Spezies-übergreifende Infektiosität von Hepatitis-B-Virus-Isolaten nicht-humaner Primaten und ihre Fähigkeit, das humane Hepatitis-D-Virus zu umhüllen und so zu dessen Infektiosität beizutragen.....	106
5.3. Wirtsfaktoren und deren potenzieller Einfluss auf die Replikation und die Persistenz von Hepatitis-B-Viren und Hepatitis-D-Viren.....	110
Literaturhinweise.....	117
Anhang	131
Eidesstattliche Selbstständigkeitserklärung	135
Danksagung.....	137

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i>
cccDNA	<i>covalently closed circular deoxyribonucleic acid</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CsCl	Caesiumchlorid
ct	<i>cycle treshold</i>
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
(dd)H ₂ O	(doppelt destilliertes) Wasser
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	<i>Dulbecco 's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
ds	<i>double-stranded</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	und andere (lat. <i>et alia</i>)
FKS	Fötales Kälberserum
fmol	Femtomol
g	Gramm
GE	Genomäquivalente
Gt	Genotyp
h	Stunden
HBS	<i>HEPES Buffered Saline</i>
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
HDAg	Humanes Deltaantigen
HDV	Hepatitis-Delta-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGM	<i>Hepatocyte Growth Medium</i>

HHMM	<i>Human Hepatocyte Maintenance Medium</i>
HPM	<i>Human Hepatocyte Plating Medium</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSPG	Heparan Sulfat Proteoglykane
HTM	<i>Human Hepatocyte Thawing Medium</i>
HWM	<i>Human Hepatocyte Washing Medium</i>
Hygro	Hygromycin
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IU	<i>international unit</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LHBs	<i>large Hepatitis B surface protein</i>
LV	Leervektor
m	Meter
M	Molar (in mol/l)
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MHBs	<i>middle Hepatitis B surface protein</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
myr	myristoyliert
n	Anzahl
Na	Natriumchlorid
Neo	Neomycin/Geneticin
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
NTCP/Ntcp	<i>Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide</i>
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
pH	lat. <i>potentia hydrogenii</i>
PHH	primäre humane Hepatozyten
pmol	Pikomol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkription
qRT-PCR	<i>Real-Time quantitative Reverse Transcription PCR</i>

s	Sekunden
S/CO	<i>Signal/Cut-Off</i> Verhältnis
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEAP	<i>secreted alkaline phosphatase</i>
sgRNA	<i>single guide ribonucleic acid</i>
SHBs	<i>small Hepatitis B surface protein</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
ss	<i>single-stranded</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA(-Puffer)
TBS(-T)	<i>Tris-buffered saline</i> (mit Tween 20)
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin (-hydrochlorid)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
WT	Wildtyp
WHO	<i>World Health Organization</i>
WME	<i>Williams' Medium E</i>
xg	Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
μ	Mikro

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der HBV- und HDV- Virionen	2
Abb. 2: Schematische Übersicht des Replikationszyklus von HBV und HDV	4
Abb. 3: Schematische Darstellung des HBV-Genoms mit den entsprechenden offenen Leserahmen	5
Abb. 4: Schematische Darstellung der HDV-RNA-Synthese	6
Abb. 5: Globale Verbreitung von HDV, HBV und nicht-humaner HBV	9
Abb. 6: Generierung von MiniCircle HBV cccDNA aus dem parentalen MiniCircle-Plasmid.....	47
Abb. 7: Schemata zur Generierung der Fragmente für die Klonierung von pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HBV_Gt.D3-3091_M125T_1.5mer und pMC_HBV_Gt.D3-3091_M125T_cccDNA (parental) mittels PCR.....	55
Abb. 8: Analyse der transienten Transfektion von HepG2 Tet-On® Advanced Zellen mit 1.1mer- und 1.5mer-Expressionsvektoren verschiedener HBV-Genotypen.....	64
Abb. 9: Präparation von MiniCircle HBV cccDNA - Entfernung von bakterieller genomischer DNA und parentaler Plasmid-DNA-Kontamination.....	65
Abb. 10: Vergleich der transienten Transfektion von Huh7 Zellen mit verschiedenen HBV-Expressionsvektoren und rekombinanter cccDNA	66
Abb. 11: Analyse der durch PCR generierten und zirkularisierten rekombinanten HBV cccDNA.	67
Abb. 12: Vergleich der transienten Transfektion von Huh7 Zellen mit verschiedenen HBV-Expressionsvektoren, sowie rekombinanter cccDNA auch nach Ligation / Zirkularisierung	68
Abb. 13: Generierung von HBV-1.0meren aus Seren HBV-positiver PatientInnen mittels PCR....	69
Abb. 14: Vergleich der transienten Transfektion von Huh7 Zellen mit verschiedenen HBV-Expressionsvektoren, sowie rekombinanter cccDNA, des HBV-Gt.D3-Wildtyps, sowie der M125T-Mutante	70
Abb. 15: Analyse von sekretiertem HBeAg und HBsAg bei der Produktion rekombinanter HBV mittels transienter Transfektion von HepG2 Tet-On® Advanced Zellen mit verschiedenen HBV-Expressionsvektoren, sowie rekombinanter cccDNA, des HBV-Gt.D3 mit M125T-Austausch.....	71
Abb. 16: CsCl-Gradienten zur Analyse generierter rekombinanter HBV des Genotyps D3-3091 mit M125T-Austausch.....	72
Abb. 17: Analyse der Expression und Sekretion des HBsAg von HBV oder HBV-Isolaten nicht-humaner Primaten nach transienter Transfektion von Huh7 Zellen mit entsprechenden Expressionskonstrukten.....	75
Abb. 18: Analyse der Sekretion des HBsAg von HBV oder HBV-Isolaten nicht-humaner Primaten und HDV-Quantifizierung in Folge der Produktion pseudotypisierter HDV verschiedener Genotypen	77

Abb. 19: Infektion von NTCP/Ntcp-exprimierenden Huh7 Zellen mit rekombinanten pseudotypisierten HDV	78
Abb. 20: Alignment des LHBs von HBV und HBV-Isolaten nicht-humaner Primaten.....	79
Abb. 21: Alignment des humanen NTCP und der Ntcp nicht-humaner Primaten	80
Abb. 22: Einfluss des IFITM3- <i>Knock-Downs</i> auf die HBV/HDV-Rezeptor-Funktion von NTCP.	82
Abb. 23: Einfluss des siRNA-vermittelten <i>Knock-Downs</i> verschiedener Wirtsfaktoren auf die HDV-Infektion	83
Abb. 24: Sequenzvergleich der Sequenzierdaten zur Überprüfung der Klonierung von verschiedenen sgRNA-Sequenzen in das Plasmid lentiCRISPRv2	85
Abb. 25: Screening aller generierten Huh7-NTCP ^{MPL} Gen- <i>Knock-Out</i> -Zellen anhand der Infektion mit rekombinanten pseudotypisierten HDV.....	87
Abb. 26: Überprüfungsscreening der generierten Huh7-NTCP ^{MPL} Gen- <i>Knock-Out</i> -Zellen anhand der Infektion mit rekombinanten pseudotypisierten HDV	90
Abb. 27: Western Blot Analysen zur Überprüfung des Gen- <i>Knock-Out</i> der generierten Huh7-NTCP ^{MPL} Gen- <i>Knock-Out</i> -Zellen	92
Abb. 28: Western Blot Analysen zur Detektion des S/L-HDAg nach Infektion der generierten Huh7-NTCP ^{MPL} Gen- <i>Knock-Out</i> -Zellen	93
Abb. 29: Northern Blot Analysen zur Detektion der antigenomischen und genomischen HDV-RNA nach Infektion der generierten Huh7-NTCP ^{MPL} Gen- <i>Knock-Out</i> -Zellen	94
Abb. 30: Einzelaufnahmen der Northern Blot Analysen zur Detektion der antigenomischen und genomischen HDV-RNA nach Infektion der generierten Huh7-NTCP ^{MPL} Gen- <i>Knock-Out</i> -Zellen	96
Abb. 31: Überprüfung der NTCP-Funktionalität der generierten Huh7-NTCP ^{MPL} Gen- <i>Knock-Out</i> -Zellen.....	97
Abb. 32: Darstellung der offenen Leserahmen der verwendeten HBV-Expressionskonstrukte (HBV-1.1mer, HBV-1.5mer), sowie der generierten HBV cccDNA.....	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gegenüberstellung der HBV-DNA-Quantifizierung der Fraktionen mit Core-Partikeln und HBV-Virionen.....	73
Tabelle 2: Kategorisierung der im ersten Screening analysierten Wirtsfaktoren mit hier beobachteten potenziell pro- oder anti-viralen Eigenschaften	88

Zusammenfassung

Mit einer von der WHO geschätzten Prävalenz von 254 Millionen chronischen Infektionen, sowie weltweit 1,1 Millionen Todesfällen, im Jahre 2022, stellt das Hepatitis-B-Virus (HBV), sowie das in Koinfektion auftretende Satelliten-Virus, das Hepatitis-D-Virus (HDV), eine große gesundheitliche Gefährdung für den Menschen dar. Trotz Vorhandensein eines protektiven Impfstoffs, bleibt die Forschung an neuen spezifischen Analyse-Methoden ein bedeutender Aspekt für die Entwicklung von Therapien zur vollständigen Heilung von chronischen HBV-Infektionen.

Im Zentrum dieser Herausforderung steht die HBV cccDNA, die als Transkriptionsvorlage der viralen RNAs fungiert. Diese wird jedoch mit keiner der derzeit zugelassenen Therapien gezielt adressiert. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Generierung von rekombinanter HBV cccDNA *in-vitro* anhand der ‚MiniCircle Technologie‘ eine zeitsparende und kosteneffiziente Methode zur Erforschung der HBV cccDNA Persistenz darstellt. Für eine schnelle Charakterisierung von HBV-Genomen aus Patientenseren ist dagegen die Amplifikation des gesamten Genoms mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) am geeignetsten, da aufwändige Klonierungen vermieden werden. Soll die Funktion spezieller Mutationen oder Gen-Abschnitte des HBV-Genoms untersucht werden, erweist sich die klassische Klonierung und nachfolgende Transfektion mit Plasmid-basierten HBV-Überlängkonstrukten weiterhin als sinnvoll. Für *in-vitro* Untersuchungen, die dem natürlichen Infektionsprozess möglichst nahekommen, stellte sich die Generierung rekombinanter Virionen als überlegene Methodik heraus.

Da HBV-ähnliche Varianten in nicht-humanen Primaten der Überfamilie *Hominoidea* (Menschenartige) zirkulieren, ist die Untersuchung einer möglichen Spezies-übergreifenden oder zoonotischen Infektiosität dieser HBV-Isolate ein wichtiger Aspekt für die Eingrenzung der durch HBV-Infektionen hervorgerufenen globalen Risiken. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Kreuzübertragung von pseudotypisierten HDV mit Hüllproteinen von humanem HBV oder HBV-Isolaten aus Orang-Utans und Schimpansen über den humanen HBV-Rezeptor NTCP oder den Ntcp verschiedener nicht-humaner Primaten (Gibbon, Gorilla, Orang-Utan und Schimpanse) *in-vitro* möglich ist. Diese Befunde stehen im Einklang mit Berichten über die Übertragung des HBV vom Menschen auf nicht-humane Primaten sowie über die Kreuzübertragung von HBV zwischen Primaten. Derzeit ist jedoch weder ein Primaten-spezifisches HDV-Isolat noch eine Übertragung von humanem HDV auf nicht-humane Primaten in ihrem natürlichen Lebensraum bekannt.

Im Rahmen der Entwicklung von Therapiemöglichkeiten ist es erforderlich auch die Seite des Wirts, in diesem Fall des Menschen, zu berücksichtigen. In der hier vorgelegten Arbeit wurden daher 64 Wirtsfaktoren auf potenzielle pro- oder anti-virale Funktionen in der HDV-Infektion *in-vitro* untersucht. Hierbei konnte klar gezeigt werden, dass IFITM3 eine pro-virale Funktion bei der HDV-Infektion einnimmt und somit einen möglichen Angriffspunkt für die Behandlung von HBV-/HDV-koinfizierten PatientInnen darstellt.

Abstract

The hepatitis B virus (HBV) and its co-infecting satellite virus, the hepatitis D virus (HDV), pose a serious threat to humankind, causing 1.1 million deaths and 254 million chronic infections worldwide in 2022, according to WHO estimates. Although a protective vaccine is available, research into novel, targeted analytic techniques is critical to the development of treatments that will completely eradicate chronic HBV infections.

A key aspect of this challenge is the HBV cccDNA, which serves as a transcription template for the viral RNAs. However, none of the currently approved treatments specifically target it. This thesis analysis demonstrates that *in-vitro* generation of recombinant HBV cccDNA using MiniCircle technology is a time-saving and cost-effective method for investigating HBV cccDNA persistence. However, for rapid characterisation of HBV genomes from patient sera, whole genome amplification by polymerase chain reaction (PCR) is the most appropriate method, as it avoids time-consuming cloning. When studying the function of specific mutations or gene segments of the HBV genome, conventional cloning and subsequent transfection with plasmid-based HBV overlength constructs is still useful. The generation of recombinant virions has proven to be a preferable method for *in vitro* experiments that most closely represent the natural infection process.

As HBV-like variants are circulating in non-human primates of the superfamily *Hominoidea*, the investigation of possible cross-species or zoonotic infectivity of these HBV isolates is an important aspect in the containment of global risks caused by HBV infections. In this thesis, cross-transmission of pseudotyped HDV with envelope proteins of human HBV or HBV isolates from orangutans and chimpanzees via the human HBV receptor NTCP or the Ntcp of various non-human primates (chimpanzee, gibbon, gorilla and orangutan) was found to be possible *in-vitro*. These findings are consistent with reports of transmission of HBV from humans to non-human primates and cross-transmission of HBV among primates. However, neither a primate-specific HDV isolate nor transmission of human HDV to non-human primates in their natural habitat is currently known.

As part of the development of therapeutic strategies, it is also necessary to take the host, in this case the human, into a wider consideration. In the work presented here, 64 host factors were investigated *in-vitro* for potential pro- or anti-viral functions in HDV infection. It was clearly demonstrated that IFITM3 has a pro-viral function in HDV infection and therefore represents a potential target for future treatments of HBV/HDV co-infected patients.

Aus der Promotion hervorgegangene Publikationen

Erschienen in peer-reviewed Journals:

1. Palatini, M., Müller, S. F., Kirstgen, M., Leiting, S., Lehmann, F., **Soppa, L.**, Goldmann, N., Müller, C., Lowjaga, K. A. A. T., Alber, J., Ciarimboli, G., Ziebuhr, J., Glebe, D., & Geyer, J. (2022). *IFITM3 Interacts with the HBV/HDV Receptor NTCP and Modulates Virus Entry and Infection*. **Viruses**, 14(4), 727.
<https://doi.org/10.3390/v14040727>
2. Khalfi, P., Denis, Z., McKellar, J., Merolla, G., Chavey, C., Ursic-Bedoya, J., **Soppa, L.**, Szirovicza, L., Hetzel, U., Dufourt, J., Leyrat, C., Goldmann, N., Goto, K., Verrier, E., Baumert, T. F., Glebe, D., Courgnaud, V., Gregoire, D., Hepojoki, J., & Majzoub, K. (2024). *Comparative analysis of human, rodent and snake deltavirus replication*. **PLOS Pathogens**, 20(3), e1012060.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012060>

1. Einleitung

Die Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV), sowie auch die Koinfektion mit seinem Satelliten-Virus, dem Hepatitis-D-Virus (HDV), stellen trotz der Verfügbarkeit eines Impfstoffs und antiviraler Behandlungsmöglichkeiten immer noch eine große Bedrohung für die menschliche Gesundheit dar. Im Jahr 2022 verursachte die Infektion mit HBV weltweit 1,1 Millionen Todesfälle bei einer Prävalenz von 254 Millionen chronischen Infektionen. Etwa 4,5 % der chronisch HBV-infizierten Personen leiden unter einer Koinfektion mit HDV, der aggressivsten Form der viralen Hepatitis, die ein beschleunigtes Fortschreiten in die Entwicklung von Leberzirrhose oder -krebs zur Folge hat (WHO Global Hepatitis Report, 2024).

1.1. Morphologie von HBV und HDV

Das HBV gehört zur Gattung der Orthohepadnaviren innerhalb der Familie der *Hepadnaviridae* (Magnius et al., 2020). Erstmal entdeckt wurde HBV, genauer seine Hüllproteine (auch als HBsAg bezeichnet, *Hepatitis B surface antigen*), im Serum eines australischen Aborigines, woraufhin dieses zunächst als *Australia antigen* (*AuAg*) bezeichnet wurde. Eine pathophysiologische Verbindung zur akuten und chronischen Hepatitis B wurde jedoch schnell hergestellt (Blumberg, 1964; Millman et al., 1970). Schließlich wurde HBV anhand von elektronenmikroskopischen Analysen als Virus mit einem Virion-Durchmesser von 42 nm identifiziert (Dane et al., 1970). Woraufhin das vollständige HBV-Virion bis heute oft auch, nach seinem Entdecker, als ‚Dane-Partikel‘ bezeichnet wird (Abb. 1 links oben).

Das HBV-Genom besteht aus einer partiell doppelsträngigen zirkulären DNA (*relaxed circular DNA*, rcDNA) mit einer Genomgröße von 3,2 kb. Der einzelstränge Bereich der rcDNA umfasst ungefähr ein Drittel des Genoms. Zudem beinhaltet das HBV-Virion eine virale DNA Polymerase (Kaplan et al., 1973; Landers et al., 1977; Robinson & Greenman, 1974), welche kovalent an das 5'-Ende des Minusstrangs der rcDNA gebunden ist (Beck & Nassal, 2007). Zum Schutz des viralen Genoms ist dieses von einem ikosaedrischen Kapsid aus Core-Proteinen (HBc) verpackt (Birnbaum & Nassal, 1990). Diese Nukleokapside sind von HBsAg in einer Lipiddoppelschicht umschlossen. Hierbei wird zwischen drei co-terminalen Hüllproteinen unterschieden: (*small*) SHBs, (*middle*) MHBs und (*large*) LHBs (Berting et al., 1995; Heermann et al., 1984; McLachlan, 2018). Nicht-umhüllte Nukleokapside wurden bisher nur *in-vitro* beobachtet (Lucifora & Delphin, 2020). Während der viralen Replikation werden zudem auch subvirale Partikel (SVP), bestehend lediglich aus HBsAg in einer Lipiddoppelschicht, als Sphären oder auch Filamente, gebildet und sekretiert (Abb. 1 links unten). Diese enthalten keine virale Nukleinsäure und sind daher auch nicht infektiös sind. Dennoch werden diese SVP in enormen Mengen (50 - 300 µg HBsAg pro 1 ml Serum) synthetisiert und können so vom Wirt generierte neutralisierende Antikörper abfangen (Ganem & Varmus, 1987). Die

Menge an subviralen Partikeln im Serum von hochvirämischen PatientInnen ist meist um 1.000 bis 10.000 mal höher als die Virionen-Konzentration (Glebe & Bremer, 2013).

Aktuell verfügbare Impfstoffe als Schutz gegen eine potenzielle Infektion mit HBV, basieren auf rekombinant generiertem SHBs. Therapie-Ansätze für bereits chronisch HBV-infizierte Personen beruhen auf der kurzfristigen Verabreichung von pegyliertem Interferon- α oder einer Langzeitbehandlung mit Nukleosidanaloga, wie Entecavir und Tenofovir (Krause et al., 2018; Roggendorf et al., 2024).

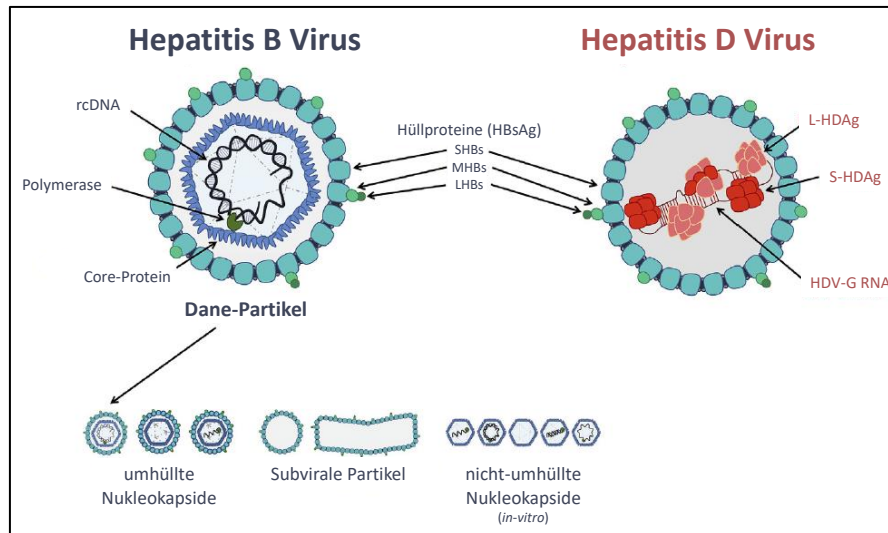


Abb. 1: Schematische Darstellung der HBV- und HDV- Virionen

Links: infektiöses HBV-Virion (Dane-Partikel) (oben) und nicht-infektiöse HBV-Partikel, einschließlich umhüllter Nukleokapside, die unreife DNA/RNA enthalten, subvirale Partikel (Sphäre und Filament) und nicht-umhüllte Nukleokapside (unten). Rechts: infektiöses HDV-Virion, dessen Hülle identisch mit der von infektiösem HBV ist. Entnommen aus (Lucifora & Delphin, 2020), übersetzt.

Das HDV, welches zur Virusfamilie der *Kolmioviridae* gehört (Kuhn et al., 2024), wurde erstmals 1977, zunächst als HBV-spezifisches Antigen in PatientInnen mit schwerwiegender chronischer HBsAg-seropositiver Hepatitis B, beschrieben (Rizzetto et al., 1977). Erst später konnte analysiert werden, dass hier ein eigenständiges Pathogen vorlag, welches jedoch auf HBV als Helfervirus angewiesen ist (Canese et al., 1984; Rizzetto, Canese, et al., 1980). So kann HDV nicht eigenständig replizieren, sondern nutzt die Hüllproteine des HBV um infektiöse Partikel zu bilden (Rizzetto, Hoyer, et al., 1980). Weitere Untersuchungen zeigten schließlich, dass es sich um ein Satelliten-Virus mit einem einzelsträngigen und zirkulären RNA-Genom bestehend aus ca. 1,7 kb handelt (Abb. 1 rechts). Hierbei liegen ca. 61 % der Nukleotide als gepaarte Basen vor, was vermutlich zu einer stäbchenförmigen Struktur des HDV-Genoms führt (K.-S. Wang et al., 1986). Auch konnte hier in experimentell mit HDV infizierten Schimpansen bereits ein zum Genom komplementäres Antigenom detektiert werden. Dies zeigte demnach, dass HDV auch in Schimpansen replizieren kann (Bonino et al., 1981; Chen et al., 1986).

Ein einziger ORF auf dem HDV-Genom codiert für zwei Formen des Deltaantigens (*hepatitis delta virus antigen*, HDAg) (Weiner et al., 1988). Die genomische HDV-RNA und das HDAg bilden im

Virion einen stabilen Ribonukleoproteinkomplex, wobei hier ca. 70 HDAG-Moleküle pro HDV-RNA-Molekül beobachtet wurden (Ryu et al., 1993).

Die beiden Formen des Deltaantigens unterscheiden sich in ihrer Proteingröße, sowie in ihrer Funktion. Das S-HDAG (*small hepatitis delta virus antigen*) ist essenziell für die HDV-Replikation. Das am C-Terminus um 19 Aminosäuren verlängerte L-HDAG (*large hepatitis delta virus antigen*) hingegen, ist entscheidend für die Virionen-Assemblierung, genauer die Interaktion mit den HBV-Hüllproteinen (F. L. Chang et al., 1991; J. M. Taylor, 2015). Zur Assemblierung der HDV-Virionen interagiert das L-HDAG (*large hepatitis delta virus antigen*), mit einem Tryptophan-reichen Motiv am C-Terminus des SHBs (*small HBsAg*) (Jenna & Sureau, 1999; Komla-Soukha & Sureau, 2006). Wobei eine C-terminale postranslationale Isoprenylierung des L-HDAG, hier speziell eine Farnesylierung, essenziell ist (Hwang & Lai, 1993; Otto & Casey, 1996).

1.2. Virale Replikationsmechanismen

1.2.1. Replikationszyklus des HBV

Zunächst interagiert das HBV-Virion niedrig-affin mit den Glykosaminoglykan-Seitenketten der Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGs) an der Plasmamembran der Hepatozyten (Schulze et al., 2007) (Abb. 2, links). Durch die hoch-spezifische Bindung der präS1-Domäne des LHBs an den Rezeptor NTCP (*sodium / taurocholate co-transporting polypeptide*) (Yan et al., 2012), gelangt das HBV-Virion mittels NTCP- und EGFR-vermittelter Endozytose in die Zelle (Iwamoto et al., 2019). Hierbei ist für die HBV-Infektiosität eine N-terminale Myristoylierung des präS1 essenziell, wenn auch diese nicht für die Produktion von Virionen notwendig ist (Glebe et al., 2005; Gripon et al., 1995). Nach Freisetzung des HBV-Nukleokapsids wird dieses zum Nukleus transportiert. Das hier freigesetzte teilweise doppelsträngige HBV-Genom, die rcDNA (*relaxed circular DNA*), wird schließlich durch zelluläre Wirtsfaktoren in cccDNA (*covalently closed circular DNA*) konvertiert. Von dieser episomalen HBV cccDNA werden alle HBV-mRNAs, sowohl die prägenomische, als auch alle subgenomischen, durch die RNA-Polymerase II der Wirtszelle transkribiert. Anschließend werden die transkribierten mRNAs in das Zytoplasma exportiert, wo die Translation der viralen Proteine stattfindet (Glebe & Bremer, 2013; Nassal, 2015). Die Hüllproteine des HBV werden am endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und die ins Zytoplasma translatierten Core-Proteine assemblieren zu Core-Partikeln (Birnbaum & Nassal, 1990; Jenna & Sureau, 1998), in welchen die prägenomische RNA, sowie die HBV-Polymerase verpackt sind (Bartenschlager et al., 1990; Beck & Nassal, 2007). Anhand HBV-Polymerase-vermittelter reverser Transkription wird aus der in den Core-Partikeln befindlichen prägenomischen RNA schließlich rcDNA erzeugt (J. Hu & Seeger, 2015; Kaplan et al., 1973). Diese reifen Core-Partikel werden entweder zurück zum Nukleus transportiert, um hier das cccDNA-Reservoir aufrecht zu erhalten, oder sie werden mit den Hüllproteinen des HBV umhüllt und schließlich als HBV-Virionen durch multivesikuläre Partikel

(MVP) aus der Zelle freigesetzt. Hierbei werden auch, wie bereits erwähnt, subvirale Partikel durch den konstitutiven sekretorischen Weg sekretiert (Glebe & Bremer, 2013; Lucifora & Delphin, 2020).

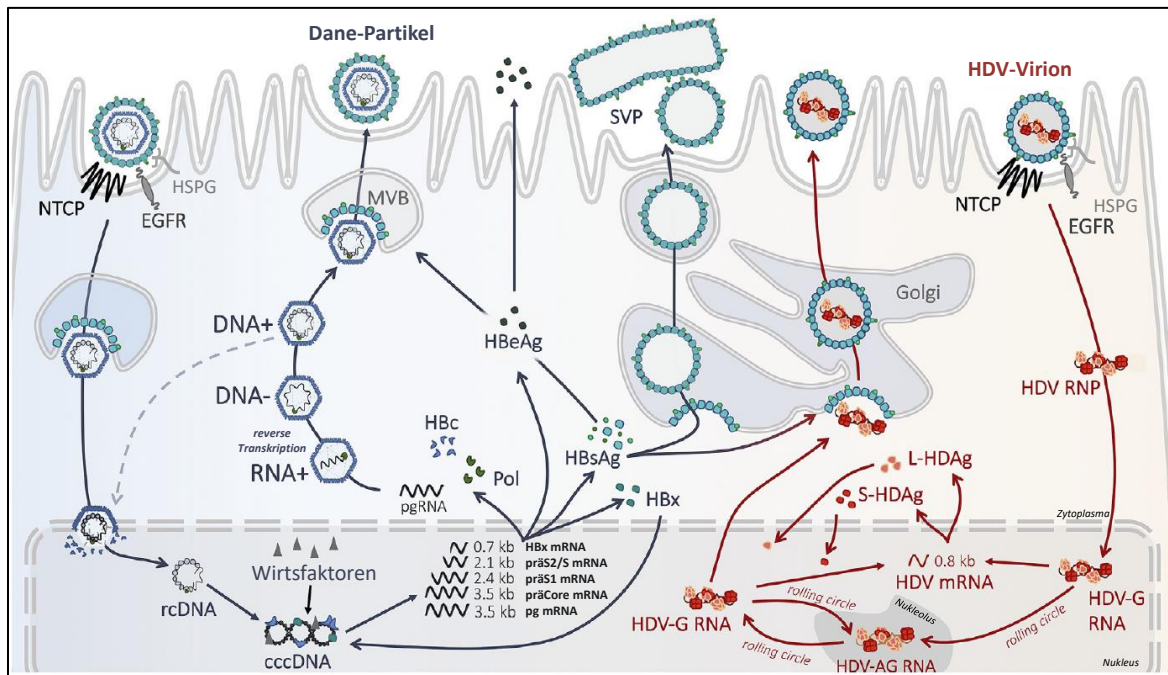


Abb. 2: Schematische Übersicht des Replikationszyklus von HBV und HDV

Links, HBV-Replikationszyklus: Infolge der niedrig-affinen Adsorption des HBV-Virions an die Zellmembran, anhand der Interaktion mit Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGs), und der NTCP- und EGFR-vermittelten Endozytose, gelangt das HBV-Nukleokapsid in den Nucleus, wo die rcDNA in cccDNA umgewandelt wird. Letztere verbindet sich mit Virus- und Wirtsfaktoren und dient als Vorlage für die Synthese aller HBV-RNAs. Die prägenomische (pg) RNA und die virale Polymerase (Pol) werden durch Multimerisierung von Core-Proteinen (HBc) verpackt. Nach der reversen Transkription der pgRNA in rcDNA werden die generierten reifen HBV-Nukleokapside umhüllt, und die infektiösen Viruspartikel, die so genannten Dane-Partikel, werden sezerniert. Subvirale Partikel (SVPs, als Sphären und Filamente) werden über den Golgi-Apparat zusammengesetzt und sekretiert. Rechts, HDV-Replikationszyklus: Infolge entsprechender Endozytose gelangt das HDV-Ribonukleoprotein in den Nucleus, wo die genomische HDV-RNA (HDV-G RNA) als Vorlage für die Transkription der HDV-mRNA dient und die Synthese von S-HDAg ermöglicht. Die antigenomische (HDV-AG RNA) und die genomische HDV-RNA werden durch einen Rolling-Circle-Mechanismus gegenseitig synthetisiert. Das L-HDAg wird später, nach der Editierung von HDV-AG RNA und der anschließenden Transkription von editierten HDV-mRNAs, synthetisiert. Dessen Assoziation mit HDV-G RNA ermöglicht den Transport generierter HDV-Ribonukleoproteine aus dem Nucleus und die Assemblierung von HDV-Virionen durch die Interaktion von L-HDAg und HBsAg. Entnommen aus (Lucifora & Delphin, 2020), übersetzt und modifiziert.

Das HBV-Genom hat vier offene Leserahmen (ORFs): Core-, Polymerase-, S- und X-ORF (Abb. 3). Hierbei gibt es eine teilweise Überschneidung dieser ORFs, wobei jedoch eine Regulation der Transkription anhand von vier Promotoren, sowie zwei Enhancern, gewährleistet ist (K.-Q. Hu & Siddiqui, 1991; Moolla et al., 2002). Zudem wird die leberspezifische Transkription auch durch ein GRE (*glucocorticoid response element*) und ein posttranskriptionelles regulatorisches Element reguliert. So werden schließlich anhand der HBV cccDNA fünf mRNAs transkribiert. Diese fünf viralen Transkripte tragen sowohl eine Cap-Struktur, als auch einen Poly(A)-Schwanz, ähneln also zellulären mRNAs, und codieren für sieben virale Proteine (Glebe & Bremer, 2013) (Abb. 2, Abb. 3).

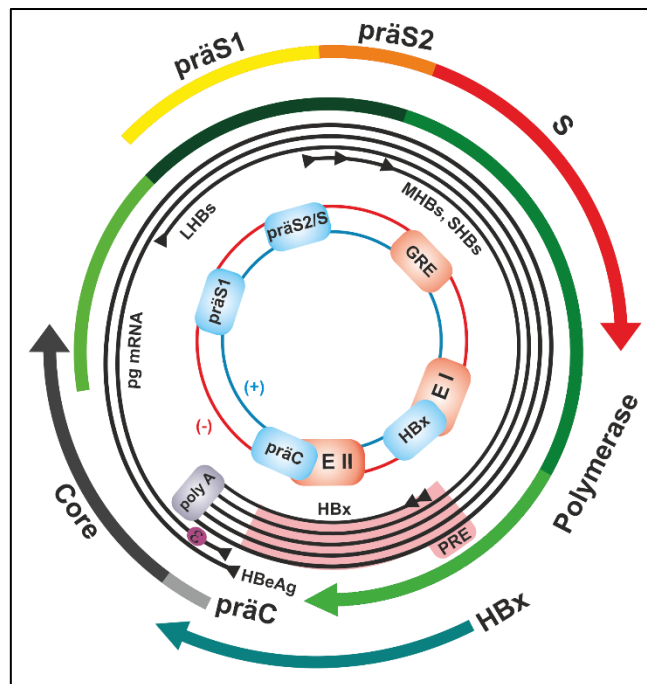


Abb. 3: Schematische Darstellung des HBV-Genoms mit den entsprechenden offenen Leserahmen

Die doppelsträngige HBV cccDNA enthält Promotoren (blau) und Enhancer (rot: EI und EII, einschließlich eines GRE (*glucocorticoid response element*) für die (leberspezifische) Expression der vier offenen Leserahmen. Die spezifischen Transkripte (schwarze Kreise) sind mit der entsprechenden 5'-Cap-Struktur und der ihnen gemeinsamen 3'-Polyadenylierung versehen, so dass sie zellulären mRNAs ähneln. Während der Genomreplikation wird eine mRNA mit Genomüberlänge generiert (prägenomische RNA), welche unter Verwendung eines überlappenden offenen Leserahmens in das Core-Protein (grau) und in die virale Polymerase (grün) translatiert wird. Eine weitere generierte mRNA mit Genomüberlänge führt zur Expression des präC/Core-Proteins dessen anschließender Prozessierung zum nicht-strukturellen HBV-e-Antigen (HBeAg). Die HBV-Hüllproteine (*large* (LHBs), *middle* (MHBs) und *small* (SHBs) HBsAg) und das nicht-strukturelle HBx werden von subgenomischen mRNAs translatiert. PRE: posttranskriptionelles regulatorisches Element. Entnommen aus (Glebe & Bremer, 2013), übersetzt und modifiziert.

Die prägenomischen mRNA dient nicht nur zur Generierung von rcDNA, sondern auch zur Translation des Core-Proteins (*Hepatitis B core protein*, HBC), sowie der Polymerase. Die nur um wenige Nukleotide längere präCore-mRNA hingegen dient zur Translation eines Nicht-Strukturproteins, dem HBeAg (*Hepatitis B e antigen*), welches sekretiert wird und nachweislich dazu beiträgt die Immunantwort des Wirtes zu modulieren (Locarnini et al., 2005; Nassal et al., 1990). SHBs und MHBs werden durch ein Transkript (präS2/S-mRNA), demnach co-lineare mRNAs, generiert, wohingegen zur Translation von LHBs eine separate mRNA (präS1-mRNA) dient (Heermann et al., 1984; Seeger & Mason, 2015). Die HBx-mRNA ist das kürzeste HBV-Transkript und dient zur Translation des X-Proteins, welches durch seine Interaktion mit nuklearen Transkriptionsfaktoren auch zytoplasmatische Signaltransduktionswege modelliert und essenziell für die virale Replikation ist (Kew, 2011; Lucifora et al., 2011).

1.2.2. Replikationszyklus des HDV

Da das HDV, als Satelliten-Virus von HBV, dessen Hüllproteine zur Assemblierung von Virionen nutzt, erfolgt auch hier das Eindringen des Virions über NTCP- und EGFR-vermittelte Endozytose (siehe 1.1. Morphologie von HBV und HDV, sowie 1.2.1. Replikationszyklus des HBV und Abb. 2,

rechts). Nach Freisetzung des Ribonukleoproteinkomplex innerhalb der Wirtszelle, wird dieser, aufgrund des *nuclear localization signal* (NLS) im HDAG, in den Zellkern transportiert (Chou et al., 1998). Dort fungiert die genomische HDV-RNA als Vorlage für die Transkription der HDV-mRNA und erlaubt die Synthese von S-HDAg. Mithilfe eines Rolling-Circle-Mechanismus werden die antigenomische und die genomische HDV-RNA gegenseitig synthetisiert (Lucifora & Delphin, 2020; J. M. Taylor, 2015) (Abb. 4). ADAR 1 (*Adenosine Deaminase Acting on RNA 1*) ist ein Enzym, welches, Interferon-vermittelt, die Deaminierung von Adenosin zu Inosin katalysiert. Einige HDV-Antigenome werden so während der Virusinfektion an einer Nukleotidposition editiert. Diese Deaminierung an der Nukleotidposition 1012, führt dazu, dass die nachfolgend vom editierten Genom transkribierte HDV-mRNA schließlich nicht mehr für das Amber-Stoppocodon (UAG), sondern für das Codon UGG (Tryptophan) codiert. Hierbei ergibt sich demnach ein erweiterter ORF, welcher nun für das 19 Aminosäuren längere L-HDAg codiert (Hartwig et al., 2006).

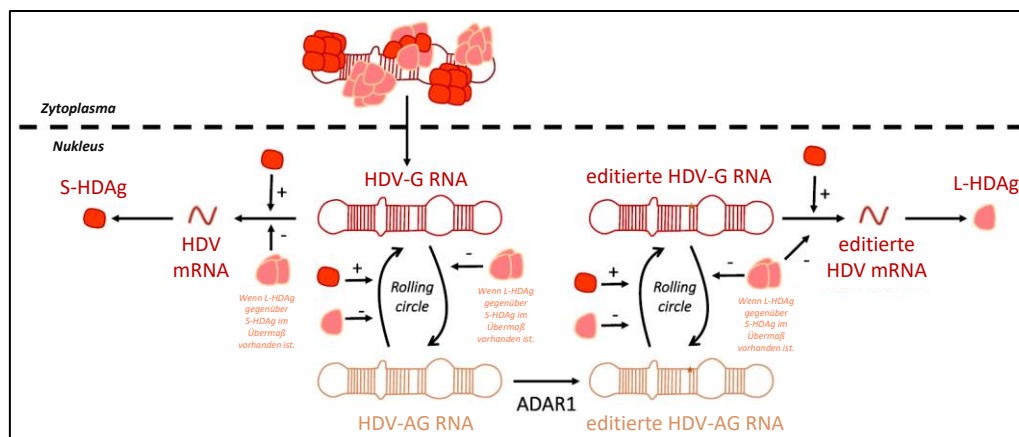


Abb. 4: Schematische Darstellung der HDV-RNA-Synthese

Die genomische HDV-RNA (HDV-G RNA) dient als Template für die Synthese von HDV-mRNAs und die anschließende Synthese von S-HDAg. Die antigenomische (HDV-AG RNA) und die genomische HDV-RNA werden durch einen Rolling-Circle-Mechanismus gegenseitig synthetisiert. Die Editierung eines Stoppcodons in der HDV-AG RNA durch ADAR1 führt zur Generierung von ebenfalls editierter HDV-G RNA und HDV-mRNAs, sowie zur L-HDAg-Synthese. Das Vorhandensein von S-HDAg ist notwendig, um die Transkription von HDV-mRNAs aus zirkulärer HDV-RNA zu initiieren. Die Synthese von HDV-G RNA kann durch das Vorkommen von geringen Mengen L-HDAg gehemmt werden, während die Synthese von HDV-AG RNA und HDV-mRNA nur gehemmt wird, wenn L-HDAg im Überschuss gegenüber S-HDAg vorhanden ist. Entnommen aus (Lucifora & Delphin, 2020), übersetzt.

Zur Assemblierung der HDV-Virionen wird schließlich nur das HDV-Genom, nicht das komplementäre Antigenom, mit den Hüllproteinen des HBV umhüllt (Rizzetto, Hoyer, et al., 1980; J. M. Taylor, 2015). Wie bereits erwähnt, ist hierzu das L-HDAg, mitsamt seiner C-terminalen Farnesylierung (Hwang & Lai, 1993; Otto & Casey, 1996), für die Interaktion mit dem Tryptophanreichen Motiv am C-Terminus des HBsAg essenziell (Jenna & Sureau, 1999; Komla-Soukha & Sureau, 2006).

1.3. Epidemiologie von HDV, HBV und HBV nicht-humaner Primaten

1.3.1. Genetische Variabilität und Verbreitung von HDV

Bisher konnten acht HDV-Genotypen (1-8) identifiziert werden, die sich durch eine spezifische geografische Verteilung sowie eine hohe genetische Variabilität auszeichnen. Diese Faktoren stehen auch in Zusammenhang mit der jeweiligen Pathogenese (Le Gal et al., 2006).

Das HDV des Genotyp 1 ist weltweit verbreitet (Abb. 5 A) und zeigt zudem die höchste Prävalenz. Auch weist dieser Genotyp intragenotypisch die höchste genetische Variabilität auf (11 - 14 %) (Le Gal et al., 2017). Der HDV-Genotyp 2 hingegen wurde überwiegend in Ost- und Nordasien, darunter Taiwan, Japan und Sibirien, gefunden. Bislang wurde der HDV-Genotyp 3 fast ausschließlich in Südamerika entdeckt und stellt zudem den Genotyp dar, welcher genetisch am weitesten von allen anderen Genotypen entfernt ist. Der HDV-Genotyp 4 konnte bislang in Taiwan, sowie in Okinawa, gefunden werden. Die HDV-Genotypen 5 bis 8 treten in Zentral- und Westafrika auf (Casey et al., 1993; Le Gal et al., 2017; Rizzetto & Ciancio, 2012).

Die Behandlungsmöglichkeiten für chronisch HDV-infizierte PatientInnen sind begrenzt. Lange Zeit zeigte nur die Behandlung mit Interferon- α eine antivirale Wirksamkeit gegen HDV, die zu einer dauerhaften Unterdrückung der HDV-Replikation führt. Bei der Verabreichung in Verbindung mit Polyethylenglykol (PEG) konnte zudem die Pharmakokinetik deutlich verbessert werden (Heidrich et al., 2013; Krause et al., 2018; Sandmann & Wedemeyer, 2023). In der Europäischen Union wurde im Juli 2020, für die Behandlung chronischer HDV-Infektionen bei erwachsenen PatientInnen mit kompensierter Lebererkrankung, das Medikament Bulevirtid (Hepcludex®; ehemals Myrcludex B) zugelassen. Hierbei handelt es sich um ein synthetisch hergestelltes Peptid, welches identisch zu den ersten 47 Aminosäuren des präS1 aus dem LHBs von HBV (Genotyp C) ist. Demnach bindet dieses an den NTCP und hemmt dadurch kompetitiv den Eintritt von HDV und HBV in die Hepatozyten. Diese Inhibition kann so die Regeneration von Hepatozyten unterstützen, indem eine HDV/HBV-Reinfektion und -Neuinfektion von nicht-infizierten Zellen verhindert wird. Dies führt klinisch zu einem Rückgang HDV-infizierter Hepatozyten in der Leber (Blank et al., 2016; Kang & Syed, 2020).

Zurzeit sind keine spezifischen Präferenzen der Interaktion zwischen den einzelnen HDV- und HBV-Genotypen bekannt. Zwar wurde in früheren Studien festgestellt, dass der HDV-Genotyp 3 im östlichen Amazonasbecken hauptsächlich mit dem HBV-Genotyp F assoziiert vorkam, allerdings konnte dieser folgend auch bereits in Kombination mit dem HBV-Genotyp A detektiert werden (Rizzetto & Ciancio, 2012).

Auch haben neuere Untersuchungen bereits HDV-ähnliche Viren in diversen Vertebraten, und auch Invertebraten, beobachten können. Dies, unter anderem, in Schlangen, Stachelratten, Sperlingsvögeln, Waldmurmeltieren, Weißwedelhirschen und verschiedenen Fledermausarten (Bergner et al., 2021; Iwamoto et al., 2021; Khalfi et al., 2024; Kuhn et al., 2024; Paraskevopoulou et al., 2020; Szivovicza

et al., 2020), jenes zudem ohne Vorhandensein eines HBV-ähnlichen Erregers. So ist bereits bekannt, dass HDV auch weitere behüllte Viren, wie das Hepatitis-C-Virus oder Flaviviren, bspw. das Dengue- und das West-Nil-Virus, zur Übertragung *in-vitro* nutzen kann (Perez-Vargas et al., 2019; Pérez-Vargas, Pereira de Oliveira, et al., 2021). Diese HDV-ähnlichen Viren sollen jedoch in der hier vorgelegten Arbeit zunächst keine Rolle spielen.

1.3.2. Prävalenz und Variabilität von HBV

Die phylogenetische Einteilung des HBV in neun Genotypen (A-I) basiert auf einer Nukleotid-Divergenz des gesamten Genoms von mehr als 8 %. Darüber hinaus werden die Genotypen A-D, F, H und I zusammen in mindestens 35 Subgenotypen unterteilt. Hierbei liegt die Nukleotid-Divergenz im Genom zwischen diesen Subgenotypen bei etwa 4 - 8 %. Der Genotyp I ist das Resultat einer Rekombination der Genotypen A, C und G. Zusätzlich scheint ein weiterer, bisher unbestimmter Genotyp involviert zu sein (Kramvis, 2014; Kramvis et al., 2005). Ein zehnter Genotyp (J) wurde bisher nur von einer einzigen Person isoliert (Tatematsu et al., 2009). Vor der Definition der HBV-Genotypen erfolgte eine Einteilung in neun HBV-Subtypen, auch als HBV-Serotypen bezeichnet, anhand serologischer Analysen. Diese Einteilung basierte auf der Variabilität der Antikörperbindung an unterschiedliche Aminosäuresequenzen des HBsAg verschiedener klinischer Isolate (Magnius & Norder, 1995; Norder et al., 2004; Okamoto et al., 1987).

Der HBV-Genotyp A ist vor allem in Nordeuropa, den USA und Subsahara-Afrika verbreitet, wohingegen die HBV-Genotypen B und C hauptsächlich im Fernen Osten und Südostasien lokalisiert wurden. Der HBV-Genotyp D ist weltweit am weitesten verbreitet, und im Mittelmeerraum, im Nahen Osten und in Südasien der dominierende Genotyp. Der HBV-Genotyp E wurde bisher hauptsächlich im westlichen Subsahara-Afrika bis nach Angola gefunden (Arauz-Ruiz et al., 1997; Norder et al., 1993). Da die HBV-Genotypen A, B, C und D in Asien, den USA und Europa vorherrschend sind, erklärt dies, weshalb die meisten Forschungsdaten auf Informationen zu diesen basieren. Die HBV-Genotypen F und H hingegen, sind in Süd- und Zentralamerika verbreitet (Abb. 5 B). Oft geht die chronische Infektion mit HBV des Genotyps F mit einem gravierenden Verlauf der HBV-vermittelten viralen Hepatitis einher, was durch höhere histologische Indizes, ein höheres Risiko für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms und eine höhere Sterblichkeitsrate festzustellen war (Marciano et al., 2013). Neuere Daten haben gezeigt, dass der HBV-Genotyp G keine spezifische geographische Verbreitung aufweist, jedoch weltweit eine geringe Prävalenz zeigt (Araujo & Osioy, 2022; Z. Liu et al., 2021).

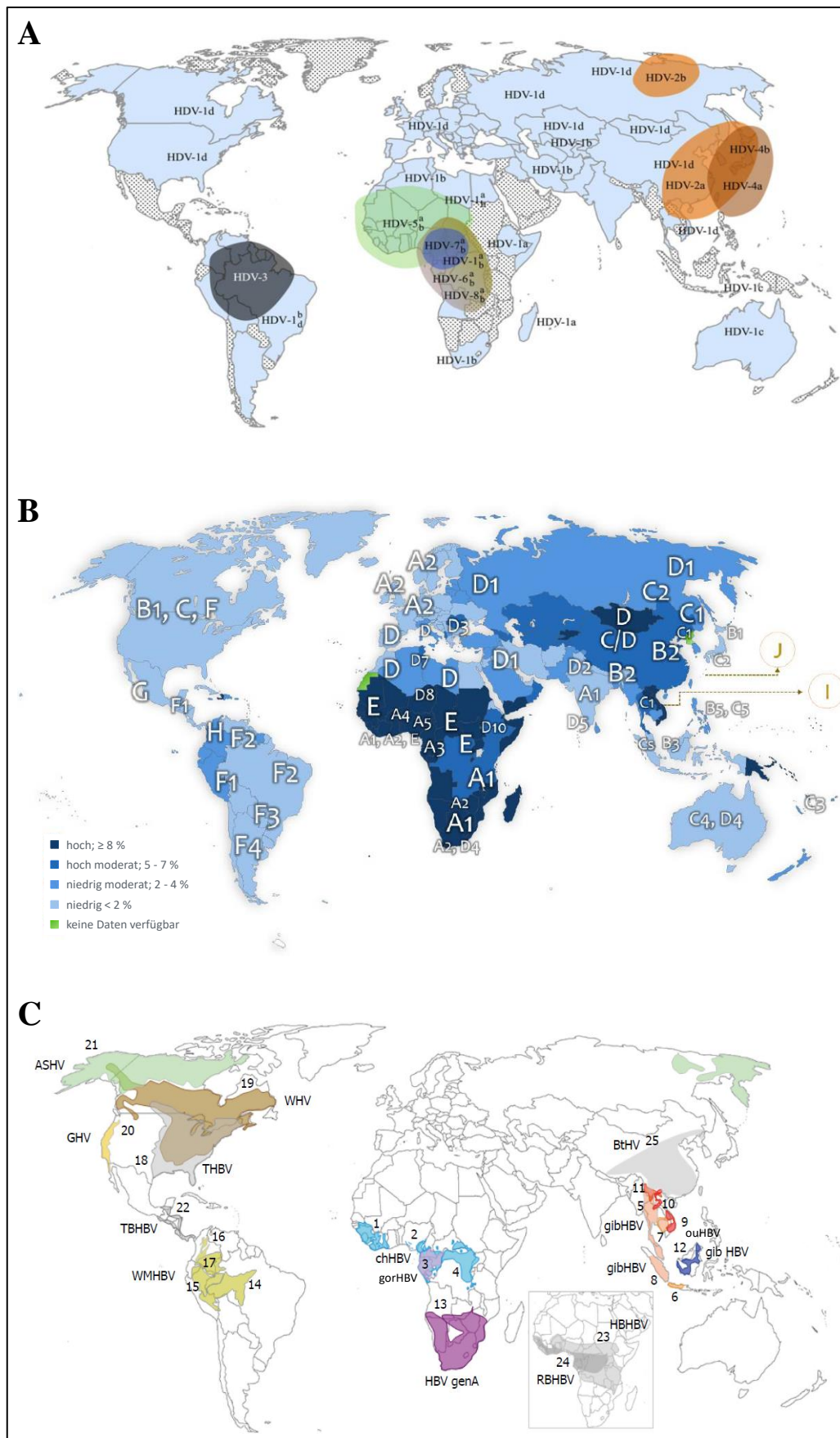


Abb. 5: Globale Verbreitung von HDV, HBV und nicht-humaner HBV
 (A) Weltweite Verteilung von HDV-Genotypen und -Subgenotypen. Kennzeichnung der Länder, in denen HDV-1 vorkommt in hellblau. HDV-2 (orange) kommt in Asien vor HDV-3 (schwarz) kommt im Norden von Südamerika vor. HDV-4a und HDV-4b (hellbraun) sind im Fernen Osten verbreitet. HDV-5, HDV-6, HDV-7 und HDV-8 (grün, violett,

blau, braun) kommen in West-, Sub-Sahara- und Zentralafrika vor. Gestrichelte Bereiche kennzeichnen Regionen, für die noch keine Daten vorliegen. Entnommen aus (Le Gal et al., 2017). (B) Globale Prävalenz und Verteilung von HBV-Genotypen und -Subgenotypen. Man beachte die Dominanz der Genotypen A und E in der afrikanischen Hochrisikoregion. Entnommen aus (Hudu, 2022), übersetzt. (C) Geografische Verteilung von HBV-Wirten. Primaten: 1, *Pan troglodytes verus*; 2, *P. t. vellerosus*; 3, *P. t. troglodytes* und *Gorilla gorilla gorilla*; 4, *P. t. schweinfurthii*; 5, *Hylobates lar*; 6, *H. moloch*; 7, *H. pileatus*; 8, *H. agilis*; 9, *Nomascus gabriellae*; 10, *N. leucogenys*; 11, *N. concolor*; 12, *Pongo pygmaeus*; 13, *Papio ursinus*; 14, *Lagothrix cana*; 15, *L. poeppigii*; 16, *L. lugens*; 17, *L. lagothericha*. Nagetiere: 18-21; Fledertiere: 22-25; ASHV: *Arctic squirrel HBV*; BtHV: *Bat hepatitis viruses*; chHBV: Schimpansen-HBV; gibHBV: Gibbon-HBV; gorHBV: Gorilla-HBV; GSHV: *Californian ground squirrel HBV*; HBV genA: Humanes HBV Gt.A; HBHBV: *Horseshoe bat HBV*; ouHBV: Orang-Utan-HBV; RBHBV: *Roundleaf bat HBV*; TBHBV: *Tent-making bat HBV*; THBV: *Tree squirrel HBV*; WHV: *Woodchuck HBV*; WMHBV: *Woolly monkey HBV*. Entnommen aus (Bonvicino, 2014), modifiziert.

Die Übertragung von HBV erfolgt in den wesentlichen Fällen perkutan, sexuell oder perinatal (Francis et al., 1981). Die Inzidenz aktiver HBV-Infektionen ist in Süd- und Ostasien, in Subsahara-Afrika, sowie bei indigenen Völkern in Zentral- und Südamerika, sehr hoch (Abb. 5 B). Eine perinatale Übertragung von Mutter zu Kind und die Entwicklung eines hochinfektiösen Trägerstatus, der die HBV-Infektion leicht auf die nächste Generation überträgt, sind die Hauptursachen für dieses endemische Muster der HBV-Infektionen in Asien. In Afrika hingegen stellt die horizontale Übertragung den dominierenden Übertragungsmechanismus dar (Hudu, 2022; Starkman et al., 2003).

Neben dem Menschen zirkulieren Varianten des HBV auch in weiteren Primatenarten. Dazu zählen vier nicht-humane Primaten (Gibbons, Gorillas, Orang-Utans und Schimpansen) der Überfamilie *Hominoidea* (Menschenartige) (Grethe et al., 2000; MacDonald et al., 2000; Warren et al., 1999) (Abb. 5 C). Die Genome von HBV des Menschen und diese von HBV nicht-humaner Primaten weisen lediglich eine Variabilität von ca. 10 % auf und gehören demnach zu einer Virusspezies. Diese hohe Sequenzidentität (Abb. 20), weist auf eine enge evolutionäre Beziehung dieser Viren hin (Sa-Nguanmoo et al., 2009, 2011). Demnach sind auch die Genomorganisation, wie die offenen Leserahmen (ORFs), von HBV und HBV nicht-humaner Primaten genetisch ähnlich. So nutzen diese entsprechend auch ähnliche Mechanismen für die virale Replikation. Dennoch konnte, selbst bei einem HBV-Ausbruch unter Schimpansen in einem Zoo in London im Jahr 1978, keine Virus-Übertragung auf Mitarbeitende des Zoos beobachtet werden, obwohl diese zuvor in sehr engem Kontakt mit den Schimpansen arbeiteten (Vaudin et al., 1988; Zuckerman et al., 1978).

Auch wurde bereits 1998 in Wollaffen, einem Mitglied der Neuweltaffen (*Platyrrhini*), eine HBV-Spezies (*woolly monkey hepatitis B virus*, WMHBV) beschrieben (Grethe et al., 2000; Lanford et al., 1998). Eine weitere HBV-Spezies wurde 2018 bei brasilianischen Kapuzineraffen identifiziert (*capuchin monkey hepatitis B virus*, CMHBV). Die Hüllproteine des CMHBV banden an den humanen NTCP, interagierten aber bevorzugt mit dem Rezeptorhomolog des Kapuzineraffen. Pseudotypisierte HDV mit Hüllproteinen von CMHBV sowie WMHBV konnten humane Leberkarzinomzellen über den humanen NTCP infizieren, was darauf hindeutet, dass speziesübergreifende Infektionen möglich sind (De Carvalho Dominguez Souza et al., 2018).

Zielsetzung und Fragestellungen

Eine Infektion mit HBV kann akut, aber auch chronisch, verlaufen. Bei einer chronischen HBV-Infektion besteht das Risiko einer schweren Leberschädigung. Eine Koinfektion mit dem Satelliten-Virus HDV kann den Krankheitsverlauf zusätzlich negativ beeinflussen. Es ist von essenzieller Bedeutung, limitierende Faktoren für eine solche Infektion sowie erweiterte Therapiemöglichkeiten zu erforschen und zu evaluieren. Dabei sind verschiedene Aspekte zu beachten, wobei in der hier vorgelegten Arbeit auf drei unterschiedliche Themenkomplexe eingegangen werden sollte:

1) Analyse von molekularbiologischen und mikrobiologischen Methoden zur Generierung rekombinanter HBV *in-vitro*

- Wie kann eine HBV-Infektion *in-vitro* bestmöglich untersucht werden?
- Durch welche Methodik können unterschiedliche Schritte im HBV-Replikationszyklus separat betrachtet werden?
- Wie kann kosten- und zeiteffizient rekombinante HBV cccDNA generiert werden?

2) Untersuchungen zur Spezies-übergreifenden Infektiosität von Hepatitis-B-Virus-Isolaten nicht-humaner Primaten

- Ist es möglich pseudotypisierte HDV, mit Hüllproteinen von HBV nicht-humaner Primaten, *in-vitro* zu generieren? Bestehen dabei HDV-Genotyp-spezifische Unterschiede in der Effizienz der viralen Sekretion?
- Können pseudotypisierte HDV, mit Hüllproteinen von HBV und von HBV nicht-humaner Primaten, Zellen infizieren, welche den humanen NTCP oder den Ntcp verschiedener nicht-humaner Primaten exprimieren?

3) Detektion und Charakterisierung von Wirtsfaktoren, die mit Replikation und Persistenz von Hepatitis-B-Viren und Hepatitis-D-Viren interferieren

- Können für die in dieser Arbeit analysierten Wirtsfaktoren pro- oder anti-virale Eigenschaften beobachtet werden?
- Handelt es sich bei diesen analysierten Wirtsfaktoren um Faktoren, die für die HDV-Infektion essenziell sind?
- Auf welchen molekularen Mechanismen oder Funktionen der Wirtsfaktoren könnten die potenziell beobachteten pro- oder anti-virale Eigenschaften dieser beruhen?

2. Material

2.1. Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Inkubationsschüttler und Rollenmischer	
Kipp-/Rollenmischer RS-TR 5	Phoenix Instrument GmbH (Garbsen, DE)
Kompaktschüttler KS 10 DIGI	Edmund Bühler GmbH (Bodelshausen, DE)
New Brunswick Innova™	44 Eppendorf SE (Hamburg, DE)
Inkubationsschüttler	
Taumelschüttler TL-10	Edmund Bühler GmbH (Bodelshausen, DE)
VorTemp™ 56 Schüttelinkubator	Labnet (Cary, US)
Vortexschüttler Mini MS2	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, DE)
Vortexschüttler VF2 Shaker	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, DE)
Mikroskope	
BZ-X810 Fluoreszenzmikroskop	KEYENCE DEUTSCHLAND GmbH (Neu-Isenburg, DE)
DMI6000 B Inversmikroskop	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, DE)
Wilovert 30 Inversmikroskop	Helmut Hund GmbH (Wetzlar, DE)
Northern Blot	
Amersham™ Typhoon™ Biomolecular Imager	Amersham / Cytiva (Marlborough, US)
BRL Horizon 11-14 Horizontal-Elektrophorese-System	Life Technologies Inc. (Carlsbad, US)
DIVAC 2.4L Vakuumpumpe	Leybold GmbH (Köln, DE)
Hybridisierungsöfen OV 2000	Analytik Jena GmbH+Co. KG (Jena, DE)
Phosphor Screen Image Eraser	Amersham / Cytiva (Marlborough, US)
Stratalinker UV 2400 Crosslinker	Stratagene / Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, US)
VacuGene XL Vacuum Blotting System	Cytiva (Marlborough, US)
PCR und Gelelektrophorese	
Elektrophorese-Kammern MINI / MIDI	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)
LightCycler® 480 Instrument II	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, DE)
MiniAmp™ Thermocycler	Applied Biosystems™ / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)
Spektralphotometer	Picodrop Ltd. (Cambridge, GB)
TFX-20.M UV-Lampe	Vilber Lourmat Deutschland GmbH (Eberhardzell, DE)
SDS-PAGE und Western Blot	
ChemoCam Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen, DE)
Fastblot B33 Elektrophoresezelle	Biometra GmbH (Göttingen, DE)
Mini-PROTEAN Tetra Cell Vertikal-Elektrophorese-Set	Bio-Rad Laboratories, Inc (Feldkirchen, DE)
Zellkultur	
CBF 170 CO ₂ Inkubator	BINDER GmbH (Tuttlingen, DE)
Herasafe™ KS Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)
ImageXpress® Pico automatisiertes Zell-Imaging-System	Molecular Devices, LLC. (San Jose, US)

MCO-19AIC(UV) CO ₂ Inkubator	Panasonic Healthcare Co., Ltd. / PHC Holdings Corporation (Tokyo, JP)
VACUSAFE (158 3xx) Vakuumsystem Wasserbad WB7	INTEGRA Biosciences AG (Zizers, CH) Mettler GmbH + Co.KG (Schwabach, DE)
Zentrifugen	
Mikrozentrifuge 5417C / 5417R / 5430	Eppendorf SE (Hamburg, DE)
Mikrozentrifuge HF-120 Capsule™	Tomy Kogyo Co., Ltd. (Tokyo, JP)
ROTINA 420 R Tischzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, DE)
Optima™ L-70K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, DE)
Sonstige	
Abbe Refraktometer	Carl Zeiss AG (Oberkochen, DE)
EL808 Absorptions-Mikrotiterplatten-Lesegerät	BioTek Instruments, Inc. (Vermont, US)
EPS-601 Elektrophorese-Netzgerät	Amersham Pharmacia Biotech / GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, GB)
EV 231 Elektrophorese-Netzgerät	Consort BVBA (Turnhout, BE)
Masterflex™ L/S Peristaltikpumpe mit Masterflex™ L/S Easy-Load II Pumpenkopf	Cole-Parmer Instrument Company / Antylia Scientific (Vernon Hills, US)
Reaktionsgefäß-Heizblock	Eigenbau JLU-Werkstatt
Wärmeschrank 100-800	Mettler GmbH + Co.KG (Schwabach, DE)

2.2. Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Biozym Scientific GmbH, Carl Roth GmbH + Co. KG, Eppendorf SE, Greiner Bio-One, Merck KGaA, Nerbe plus GmbH & Co. KG, Roche Diagnostics GmbH, SARSTEDT AG & Co. KG, Sartorius AG und Schott AG bezogen.

2.3. Zelllinien und Zellkulturbedingungen

In dieser Arbeit wurde mit ausschließlich humanen, immortalisierten, adhärent wachsenden Zelllinien, sowie mit primären Hepatozyten, gearbeitet.

Zelllinie	Zellart und Herkunft	Kulturmedium (siehe 2.3.1.)
HepG2	humane Leberkarzinomzellen (Aden et al., 1979) (M. Ocker, Institut für Chirurgische Forschung, Philipps-Universität Marburg, Marburg, DE)	DMEM
HepG2 Tet-On®	humane Leberkarzinomzellen	DMEM ^G
Advanced	Exprimieren einen Tetracyclin-regulierten Transaktivator.	

Takara Bio Inc. (Kusatsu, JP; #631150)

HepG2 Tet-On-hNTCP	<p>urspr. HepG2 Tet-On® Advanced (s.o.)</p> <p>Durch einen Tetracyclin-regulierten Transaktivator gesteuerte Expression des stabil transfizierten humanen NTCP.</p> <p>(AG Glebe, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE)</p>	DMEM ^{DGP1}
Huh7	<p>humane Leberkarzinomzellen (Nakabayashi et al., 1982)</p> <p>(S. Becker, Institut für Virologie Philipps-Universität Marburg, Marburg, DE)</p>	DMEM
Huh7-NTCP	<p>humane Leberkarzinomzellen</p> <p>Durch einen CMV-Promoter gesteuerte konstitutive Expression des stabil transfizierten humanen NTCP. Generiert unter Verwendung des Flp-In™ Systems. (Invitrogen / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #K6010)).</p> <p>(AG Geyer, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE)</p>	DMEM ^H
HEK293T	<p>humane embryonale Nierenkarzinomzellen</p> <p>HEK293 transfiziert mit einem Plasmid, welches für das große SV40-T-Antigen codiert.</p> <p>(K. Majzoub, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier; CNRS-UMR 5535, Montpellier, FR)</p>	DMEM
Huh7-NTCP^{MPL}	<p>humane Leberkarzinomzellen</p> <p>Konstitutive Expression des humanen NTCP.</p> <p>(K. Majzoub, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier; CNRS-UMR 5535, Montpellier, FR)</p>	<p>DMEM</p> <p>(nach Transduktion: DMEM ^{P3,5})</p>
Primäre humane Hepatozyten (PHHs)	<p>Primacyt Cell Culture Technology GmbH (Schwerin, DE) Charge: BHuf16029</p>	HHMM

2.3.1. Medien, Antibiotika, sowie weitere Zusätze und Substanzen

Zellkulturmedien und Zusätze

Kulturmedien	Hersteller und Zusätze
DMEM <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	DMEM, high glucose, pyruvate Gibco / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #41966029) 10 % FKS 100 U/ml Penicillin & 100 µg/ml Streptomycin
WME <i>Williams' Medium E</i>	William's E Medium, ohne Phenolrot Gibco / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #A1217601) 2 % FKS 100 U/ml Penicillin & 100 µg/ml Streptomycin 1x GlutaMAX™ Supplement 10 mM HEPES
HGM <i>Hepatocyte Growth Medium</i>	William's E Medium, ohne Phenolrot Gibco / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #A1217601) 0,2 % BSA 1x GlutaMAX™ Supplement 10 mM HEPES 1 mM Natriumpyruvat 1x Insulin-Transferrin-Selen 0,1 mg/ml Gentamicin 0,01 µM Dexamethason 5 µg/ml Caspofungin 1 µg/ml Fungizone
Infektions-HGM (I-HGM)	Für Infektion zzgl. Zugabe: 1 - 2 % DMSO (je nach Zelllinie/-typ) PEG-Lösung (final: 4 %; 1:10)
HHMM <i>Human Hepatocyte Maintenance Medium</i>	HHMM-Basalmedium Primacyt Cell Culture Technology GmbH (Schwerin, DE) HHMM-Zusätze nach Herstellerangaben 1,5 % DMSO 5 µg/ml Caspofungin 1 µg/ml Fungizone

Transfektionsmedium

Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	Gibco / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #31985047)
----------------------------------	---

Angaben über die Zusätze der Zellkulturmedien, sowie weitere Substanzen für die Zellkultur

Substanz	Hersteller / Artikelnr.
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE; #1ET4.2)
Collagen Typ I, Rat Tail	Corning Inc. (Corning, US; #354236)
Dexamethason	Sigma-Aldrich / Merck KGaA (Darmstadt, DE; #D4902)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE; #A994.2)
Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #10270106)
GlutaMAX™ Supplement (100x)	Gibco / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #35050038)
HEPES (1M)	Gibco / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #15630056)
Insulin-Transferrin-Selen (ITS-G) (100x)	Gibco / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #41400045)
Natriumpyruvat (100 mM)	Gibco / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #11360070)
Polyethylenglykol-Lösung (PEG) (40 % (w/w) in H ₂ O)	Sigma-Aldrich / Merck KGaA (Darmstadt, DE; #P1458)
Trypsin-EDTA (0,5 %), ohne Phenolrot	Gibco / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #15400054)

Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration	Hersteller / Artikelnr.
Carbenicillin	100 µg/ml	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE; #6344.2)
Caspofungin	^c 5 µg/ml	Hexal AG / Sandoz (Holzkirchen, DE)

Doxycyclin-hyclat	^D	6 µg/ml	Merck KGaA (Darmstadt, DE; #D9891)
Fungizone / Amphotericin B		1 µg/ml	Gibco / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #15290018)
Geneticin G418	^G	150 µg/ml	Life technologies / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #10131035)
Gentamicin		0,1 mg/ml	Gibco / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; # 15750045)
Hygromycin B	^H	100 µg/ml	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE; #1287.2)
Kanamycin		50 µg/ml	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE; #T832.1)
Penicillin / Streptomycin		100 U/ml // 100 µg/ml	Gibco / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #15140-122)
Puromycin Dihydrochlorid	^{P1} ^{P3,5}	1 µg/ml oder 3,5 µg/ml	Gibco / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #A1113803)

2.3.2. Reagenzien für die Transfektion

Reagenz	Hersteller / Artikelnr.
FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega GmbH (Fitchburg, US; #E2311)
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #11668019)
Lipofectamine™ 3000	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #L3000001)
X-tremeGENE™ HP DNA-Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, DE; #06366236001)

2.3.3. Reagenzien und Material für die Produktion von Lentiviren durch transiente Transfektion von HEK293T Zellen

Reagenz	Hersteller / Artikelnr.
DMEM	DMEM, high glucose, pyruvate
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	Gibco / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #41966029)
	10 % FKS oder 2 % FKS
	100 U/ml Penicillin & 100 µg/ml Streptomycin

HBS (<i>HEPES Buffered Saline</i>)	siehe 2.9. Chemikalien, Lösungen und Puffer
Millex®-HA-Filtereinheit (steril)	Millipore / Merck KGaA (Darmstadt, DE; # Millipore / Merck KGaA (Darmstadt, DE; #SLHA033)
Polybren	Sigma-Aldrich / Merck KGaA (Darmstadt, DE; #TR-1003)
2 M CaCl ₂	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #349615000)

2.3.4. Substanzen für NTCP/Ntcp-Bindungs- und -Transportanalysen

Substanz	Sequenz	Endkonz.	Hersteller / Bezugsquelle
synthetisches	Myr - GQNLSTSNPL	1 µM	Bio-Synthesis Inc
myristoyliertes HBV-	GFFPDHQLDP AFRANTANPD		(Lewisville, US)
Gt.D3-präS1 ²⁻⁴⁸ -Peptid (mit <i>Strep-Tag</i>)	WDFNPNKDTW PDANKVG SA <i>WSHPQFEK</i>		
Fluorophor-markiertes Nitrobenzoxadiazol- Taurocholat (NBD-TC)	-	5 µM	Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Justus- Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE

2.4. Bakterienstämme und Kulturbedingungen

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller / Artikelnr.
<i>Stellar</i> TM	F-, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96,	Takara Bio Inc.
<i>Competent Cells</i>	phoA, Φ 80d lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)	(Kusatsu, JP; #636763)
<i>E. coli</i> HST08	U169, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Δ mcrA, λ -	
<i>ZYCY10P3S2T</i>	erzeugt aus <i>E.coli</i> BW27783, exprimiert	System Biosciences,
<i>E. coli</i> Minicircle	induzierbar Φ C31 Integrase und I-SceI	LLC (Palo Alto, US;
<i>producer strain</i>	Endonuclease	#MN920A-1) (Kay et al., 2010)

Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten:

LB-Medium	25 g LB-Medium (Luria/Miller) add 1 l ddH ₂ O, anschließend autoklavieren Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE; #X968.4)
SOC Outgrowth Medium	New England Biolabs (Ipswich, US; #B9020S)
LB-Agar-Platten	15 g Agar-Agar add 1 l LB-Medium, autoklavieren, anschließend Platten gießen Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE; #6494.3)
Einfriermedium für Glycerolstocks	Bakterienkultur in LB-Medium zzgl. Glycerol [50%]

ggf. entsprechende Antibiotika-Zugabe zur Selektion siehe 2.3.1.
100 µg / ml Carbenicillin oder 50 µg/ml Kanamycin

2.5. Expressionsvektoren und weitere Oligonukleotide

2.5.1. Kommerzielle und bereits in der AG Glebe vorhandene Expressionsvektoren

	Verwendung und weitere Informationen	Quelle / Klonierung durch
Plasmide zur Produktion pseudotypisierter HDV		
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HBV_Gt.D3-3091_LHBs	LHBs HBV Gt..D3 Sequenz aus (Nassal et al., 1990), endogener Promotor	AG Glebe (F. Lehmann), Institut für Medizinische
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HBV_Gt.D3-3091_M125T_LHBs	LHBs HBV Gt..D3 Sequenz aus (Nassal et al., 1990), endogener Promotor Mutation für HB01-Bindung	Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _ChHBV_LHBs	LHBs Schimpansen HBV GenBank accession number: AB032433	AG Glebe, Institut für Medizinische
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _GiHBV_LHBs	LHBs Gibbon HBV	Virologie, Justus-

	GenBank accession number: HQ603061	Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _GoHBV_LHBs	LHBs Gorilla HBV GenBank accession number: AJ131567	
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _OuHBV_LHBs	LHBs Orang-Utan HBV GenBank accession number: EU155824	
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HDV_Gt.1-WHO_2.0mer (CHD_WHO)	Dimer HDV Genom Gt. 1 Sequenz nach (Pyne et al., 2017)	AG Glebe (N. T.
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HDV_Gt.1- WHO_ΔHDAg_2.0mer	Dimer HDV Genom Gt. 1 Sequenz nach (Pyne et al., 2017) Stop-Mutation: keine Expression von HDAg	Goldmann), Institut für Medizinische Virologie, Justus- Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HDV_Gt.1- Taylor_2.0mer (pHDV_T)	Dimer HDV Genom Gt. 1 Sequenz nach pSVL(D3) (Kuo et al., 1989)	
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HDV_Gt.2_2.0mer	Dimer HDV Genom Gt. 2 GenBank accession number: X60193	
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HDV_Gt.3_2.0mer	Dimer HDV Genom Gt. 3 GenBank accession number: AB037947	
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HDV_Gt.4_2.0mer	Dimer HDV Genom Gt. 4 GenBank accession number: AF018077	AG Glebe (A. Giese), Institut für Medizinische
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HDV_Gt.5_2.0mer	Dimer HDV Genom Gt. 5 GenBank accession number: LT594482	Virologie, Justus- Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HDV_Gt.6_2.0mer	Dimer HDV Genom Gt. 6 GenBank accession number: JX888102	
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HDV_Gt.7_2.0mer	Dimer HDV Genom Gt. 7 GenBank accession number: LT604972	

pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HDV_Gt.8_2.0mer	Dimer HDV Genom Gt. 8 GenBank accession number: AJ584849	
pSEAP2-Control	Kontrollvektor zur Expression der SEAP unter der Kontrolle des SV40-Promotors und des SV40-Enhancers	Takara Bio Inc. (Kusatsu, JP; #631717)

Plasmide für die NTCP/Ntcp-Expression

pcDNA5/FRT/TO_hNTCP	<i>Homo sapiens</i> humaner NTCP RefSeq: NM_003049	AG Geyer (B.
pcDNA5/FRT/TO_Pabe_Ntcp	<i>Pongo abelii</i> (Sumatra-Orang- Utan) Ntcp RefSeq: XM_002824890 (Müller et al., 2018)	Döring, S. F. Müller), Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Justus-
pcDNA5/FRT/TO_Ptro_Ntcp	<i>Pan troglodytes</i> (Schimpanse) Ntcp RefSeq: XM_510035 (Müller et al., 2018)	Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _Ggor_Ntcp	<i>Gorilla gorilla</i> (Westlicher Gorilla) Ntcp RefSeq: XM_031002037	AG Glebe, Institut für Medizinische
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _Nleu_Ntcp	<i>Nomascus leucogenys</i> (Nördlicher Weißwangen- Schopfgibbon) Ntcp RefSeq: XM_030812638	Virologie, Justus- Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE

HDV-1.0mere zur Detektion von HDV-RNA im Northern Blot

pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HDV_Gt.1-WHO_1.0mer (CHD_WHO)	Monomer HDV Genom Gt. 1 Sequenz nach HDV-RNA WHO Standard (Pyne et al., 2017)	AG Glebe (N. T. Goldmann), Institut für Medizinische
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HDV_Gt.1- Taylor_1.0mer (pHDV_T)	Monomer HDV Genom Gt. 1 Sequenz aus (Kuo et al., 1989)	Virologie, Justus- Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HDV_Gt.3_1.0mer	Monomer HDV Genom Gt. 3	

GenBank accession number:

AB037947

HBV-Genotypen-Panel

pZFN	Leervektor	
pZFN_HBV_Gt.A1-4407_1.1mer	1.1mer HBV Genom Gt. A1	
pZFN_HBV_Gt.A2-4879_1.1mer	1.1mer HBV Genom Gt. A2	AG Glebe (C.
pZFN_HBV_Gt.A2-4879_1.5mer	1.5mer HBV Genom Gt. A2	Bremer, F. Rinker, A.
pZFN_HBV_Gt.B2-4214_1.1mer	1.1mer HBV Genom Gt. B2	Geipel), Institut für
pZFN_HBV_Gt.B2-4214_1.5mer	1.5mer HBV Genom Gt. B2	Medizinische
pZFN_HBV_Gt.C1-3825_1.1mer	1.1mer HBV Genom Gt. C1	Virologie, Justus-
pZFN_HBV_Gt.C1-3825_1.5mer	1.5mer HBV Genom Gt. C1	Liebig-Universität
pZFN_HBV_Gt.D1-4203_1.1mer	1.1mer HBV Genom Gt. D1	Gießen, Gießen, DE
pZFN_HBV_Gt.D1-4203_1.5mer	1.5mer HBV Genom Gt. D1	(WHO-Referenz-
pZFN_HBV_Gt.D3-3091_1.1mer	1.1mer HBV Genom Gt. D3	Panel (Chudy et al.,
pZFN_HBV_Gt.F2-4494_1.1mer	1.1mer HBV Genom Gt. F2	2012))
pZFN_HBV_Gt.F3-F2-15/6834_1.1mer	1.1mer HBV Genom Gt. F3 <i>immune escape</i> Variante aus (Schlabe et al., 2018)	

Plasmide zur Produktion von Lentiviren

lentiCRISPRv2	SpCas9 exprimierender lentiviraler Vektor (Sanjana et al., 2014)	Addgene (Watertown, US; #52961)
pMD2.G	VSV-G Env Expressionsvektor	Didier Trono / Addgene (Watertown, US; #12259)
psPAX2	Gag-Pol Expressionsvektor	Didier Trono / Addgene (Watertown, US; #12260)

Plasmide zur Untersuchung von HBV cccDNA

pCH9_HBV_Gt.D3-3091_1.1mer	1.1mer HBV Genom Gt. D3	(Nassal, 1992; Nassal et al., 1990)
----------------------------	-------------------------	--

pCH9_HBV_Gt.D3-3091_M125T_1.1mer	1.1mer HBV Genom Gt. D3 Sequenz aus (Nassal et al., 1990) Mutation für HB01-Bindung	AG Glebe (J. Heger), Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HBV_Gt.D3-3091_1.5mer	1.5mer HBV Genom Gt. D3 Sequenz aus (Nassal et al., 1990)	AG Glebe (F. Lehmann), Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HBV_Gt.D3-3091_M125T_1.5mer	1.5mer HBV Genom Gt. D3 Sequenz aus (Nassal et al., 1990) Mutation für HB01-Bindung	diese Arbeit *
pCH9_200	Leervektor	(Nassal, 1992; Nassal et al., 1990)
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾	Leervektor	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #V79020)
pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40polyA	Leervektor für MiniCircle Technologie	System Biosciences, LLC (Palo Alto, US; #MN511A-1)
pMC_HBV_Gt.D3-3091_cccDNA (parental)	HBV Gt. D3 Sequenz aus (Nassal et al., 1990), Plasmid zur Produktion von MiniCircle HBV cccDNA, Kloniert nach (Guo et al., 2016)	V. Chulanov / D. S. Kostyushev; I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moskau, RU (Kostyushev et al., 2023)
pMC_HBV_Gt.D3-3091_M125T_cccDNA (parental)	HBV Gt. D3 Sequenz aus (Nassal et al., 1990), Mutation für HB01-Bindung, Plasmid zur Produktion von MiniCircle HBV cccDNA,	diese Arbeit *

Kloniert nach (Guo et al.,
2016)

Plasmide zur Überexpression untersuchter Gene / cDNA Klone

pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _DDX17_C-(K)-DYK	DDX17 cDNA OHu12607D	synthetisiert durch
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _HSPA4_C-(K)-DYK	HSPA4 cDNA OHu27271D	GenScript Biotech
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _NKTR_C-(K)-DYK	NKTR cDNA OHu04935D	Corporation
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _PAPOLA_C-(K)-DYK	PAPOLA cDNA OHu27950D	(Piscataway
pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ _RBM15_C-(K)-DYK	RBM15 cDNA OHu03916D	Township, US)

*Die Sequenzen der in dieser Arbeit klonierten Vektoren und die Sequenzierergebnisse liegen als digitale Kopie der Arbeit bei. Die Plasmidkarten sind zudem ebenfalls im Anhang aufgeführt.

2.5.2. Verwendete Primer und Sonden für Klonierungen, PCR und Northern Blot

Die Synthese der hier als Primer oder Sonden verwendeten Oligonukleotide erfolgte durch Integrated DNA Technologies, Inc. (Iowa, US).

Name Sequenz 5' → 3'

HDV qRT-PCR: Quantifizierung pseudotypisierter HDV

HDV-F	TGG CTC TCC CTT AGC CAT CCG
HDV-F1378-wobble	KGG MWY TCC CTT WGC CAT CMG
HDV-R	TTC CTC TTC GGG TCG GCA TG
HDV-P	FAM - CTC CTW CGG ATG CCC AGG TCG GAC - BHQ1

HBV qPCR: Quantifizierung rekombinanter HBV

cdbs1	CAA CCT CTT GTC CTC CAA CTT GT
cdbs2	AAC CTC CTG TCC TCC AAC TTG
cdbs3	CAA CCT GTT GTC CTC CAA TTT GT
cdba	GAT GAG GCA TAG CAG CAG GAT
cdq380	FAM - ATC GCT GGA TGT GTC TGC GGC GTT - BMN-Q535

Northern Blot: Detektion genomischer HDV-RNA

WHO_HDV_FWD	CAT GAG CCA TAG TTC CGA G
T7_WHO_HDV_REV	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G CTC GAA CTT GGG CGG
Taylor_HDV_FWD	CCT GAG CCA AGT TCC GAG C
T7_Taylor_HDV_REV	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G CTC GGG CTC GGG CGG
Gt.3_HDV_FWD	TGG GCC GCT TCC GGC AAG
T7_Gt.3_HDV_REV	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G TCC GAG CGG TCG GG

Vektor-Klonierungen:

pMC_HBV_Gt.D3-3091_M125T_cccDNA (parental)

pcDNA3.1⁽⁺⁾_HBV_Gt.D3-3091_M125T_1.5mer

MC_fw	CAC CTC TGC CTA AGT CGC GCC CGG GGA GCC C
MC_rev	GAA AAA GTT GCA TCC CCA ACT GGG GTA ACC TTT G
D3_fw	CCA GTT GGG GAT GCA ACT TTT TCA CCT CTG
D3_rev	CTC CCC GGG CGC GAC TTA GGC AGA GGT GAA AAA G
M125T_fw	GGA CCT GCA CGA CTA CTG CTC AAG
M125T_rev	CAG TAG TCG TGC AGG TCC GGC
LEFT_fw	GCG CAG AAA AAA AGG ATC TCA AGA AG
LEFT_rev	CTT GAG ATC CTT TTT TTC TGC GCG

HBV-Vollgenom-Amplifikation ((Günther et al., 1998), verkürzt und phosphoryliert)

phos_Will-P1-11_fw Phos - TTT CAC CTC TGC CTA ATC ATC

phos_Will-P2-11_rev Phos - AAG TTG CAT GGT GCT GG

2.5.3. Verwendete sgRNAs (als Oligonukleotide) zur Klonierung in lentiCRISPRv2 zum induzierten gezielten Gen-Knock-Out

Die hier verwendeten sgRNAs wurden der ‚Human KO Library‘ aus (Shalem et al., 2014) ^S entnommen oder mittels des CHOPCHOPweb tools ^C (Labun et al., 2016, 2019; Montague et al., 2014) generiert.

Zielgen	Sequenz Oligonukleotide 5' → 3'
ACSL3	^S CACCGCTGTGCAGCTATCATCCACT
	^S CACCGGTTACATTATATGCCACTCT
Cactin	^S CACCGACGAGCGTGCGCGCCGTCGC
	^S CACCGACCAACACCGACAACCCCTT
CBX3	^C CACCGGGCCTCCAACAAAACACTACAT
	^C CACCGTTTTCCACGACAAATTCTTC
C5orf34	^C CACCGATCTTATCCTGCCGTTGTAA
	^S CACCGGTCCTTTGACGAATTCTTTC
DDX17	^S CACCGTGATGAGCTACGCCGAAAGA
	^S CACCGACCAACTCCAATTCAGTGCC
DDX3X	^S CACCGAACTCTTCAGATAATCAGAG
	^S CACCGACCTACCTTTAGTAGCTTCT
EIF4H	^C CACCGACTTCGACACCTACGACGAT
	^S CACCGCCTAGGTCCC GCGGCAGTGC
ELAVL1	^S CACCGACCACATGGCCGAAGACTGC
	^S CACCGTGTGAACTACGTGACCGCGA
FSTL1	^C CACCGGCCACTGGATGATGCGACGT
	^C CACCGGCCGGCTCCACAAAACACAT

HNRNPA B	S	CACCG CCCTCTTGACCGTCCAGTGT	AAAC ACACTGGACGGTCAAGAGGGC
	S	CACCG CCCAACTGGACGGTCAAG	AAAC CTTGACCGTCCAGTGTGGGC
IDE	S	CACCG ATACAGCTATGAGCAAACCT	AAAC AAAGTTTGCTCATAGCTGTATC
	S	CACCG TCAAAGTTGAGACAAGCCTT	AAAC AAGGCTTGTCTCAACTTTGAC
KNTC1	S	CACCG TGTCAAGCAATATCACTGAT	AAAC ATCAGTGATATTGCTTGACAC
	S	CACCG AAGCTGCATGCCTGTATCTT	AAAC CAAGATACAGGCATGCAGCTTC
NKTR	S	CACCG CTCGGTCGCGATGGGGGCGC	AAAC GCGCCCCATCGCGACCGAGC
	S	CACCG TCGATGTCGAAGTGGCACTG	AAAC CAGTGCCACTTCGACATCGAC
NSUN2	C	CACCG AGGCTACCCGAGATCGTCA	AAAC TGACGATCTCGGGGTAGCCTC
	S	CACCG TCGACTTAAATTTGTGTGCC	AAAC GGCACACAAATTTAAGTCGAC
RBM15	S	CACCG CCGATAGCGGCGGTGGGTGC	AAAC CGACCCACCGCCGCTATCGGC
	S	CACCG CCGCGACCCACCGCCGCTAT	AAAC ATAGCGGCGGTGGGTCCGCGC
TMPO	C	CACCG CAATGTGACGCTGCCGGCCG	AAAC CGGCCGGCAGCGTCACATTGC
	S	CACCG AACTTACCACAATAGGACC	AAAC GGTCTATTGTGGGTAAAGTTC
WDR6	C	CACCG TATAGTGCCCGATGGGAGCA	AAAC TGCTCCCATCGGGCACTATAC
	C	CACCG CGACGAATCAGTGGGCATGT	AAAC ACATGCCCACTGATTTCGTCG

N = ergänzte Nukleotide für die Restriktion mittels BsmBI

2.6. Verwendete siRNAs und passende Hydrolysesonden (TaqMan) für den gezielten *Knock-Down* von Wirtsfaktoren und dessen Verifizierung

Zur Untersuchung von IFITM3 und dessen gezieltem *Knock-Down* mittels RNA-Interferenz wurden Silencer® Select siRNAs inkl. Silencer™ Negative Control No. 1 von Invitrogen / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #AM16706 und #AM4635) verwendet (Palatini et al., 2022). Bei allen weiteren für diese Arbeit verwendeten siRNAs handelt es sich um Dicer-Substrate Short Interfering RNAs (DsiRNAs), welche von Integrated DNA Technologies, Inc. (Iowa, US) vorgefertigt, synthetisiert und als TriFECTa® RNAi Kit, welches je Wirtsfaktor drei DsiRNAs enthält, bezogen wurden. Hierzu wurde jeweils die entsprechende *Reference Sequence (RefSeq) accession number* angegeben. Die hier nach Transfektion zur *Knock-Down*-Überprüfung verwendeten Hydrolysesonden sind FAM-MGB-markiert und stammen aus dem TaqMan® Gene Expression Assay von Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #4448892).

Wirtsfaktor	siRNA Nr.	DsiRNA Duplex Sequenzen 5' → 3'	RefSeq.	TaqMan® Assay-ID
DDX17		<i>DEAD-box helicase 17</i>	NM_006386	Hs00428757_m1
	1	rCrCrArArCrUrUrCrUrUrGrCrArUrGrUrUrGrArArGrArU AT rArUrArUrCrUrUrCrArArCrArUrGrCrArArGrArArGrUrUrGrGrGrG		
	2	rGrUrUrCrUrArGrArUrUrGrArArGrArGrUrArCrUrUrGrU AT rArUrArCrArArGrUrArCrUrCrUrUrCrArArUrCrUrArGrArArCrArU		
	3	rArArUrCrArGrGrCrUrArUrCrArArUrCrCrArArArArCrU GA rUrCrArGrUrUrUrGrGrArUrUrGrArUrArGrCrCrUrGrArUrUrGrG		

- DDX3X** *DEAD-box helicase 3 X-linked* NM_001356 Hs00606179_m1
1 rArUrGrUrArArArGrArUrUrGrArArCrCrUrCrArArGrUrCAC
rGrUrGrArCrUrUrGrArGrGrUrUrCrArArUrCrUrUrUrArCrArUrUrC
2 rArGrArArUrCrArGrArCrArArArCrGrGrUrCrArUrUrUrCTG
rCrArGrArArArUrGrArCrCrGrUrUrUrGrUrCrUrGrArUrUrCrUrUrC
3 rGrCrArGrUrArCrArGrArUrCrUrArCrGrArGrGrArArGrCCA
rUrGrGrCrUrUrCrCrUrCrGrUrArGrArUrCrUrGrUrArCrUrGrCrCrA
- DDX46** *DEAD-box helicase 46* NM_014829 Hs01557620_m1
1 rGrCrArGrUrUrGrUrGrGrArUrUrCrUrGrArUrArArGrArAGA
rUrCrUrUrCrUrUrArUrCrArGrArArUrCrCrArCrArArCrUrGrCrUrU
2 rArGrArUrUrUrArCrUrUrGrGrCrArArUrUrGrArArArGrUGC
rGrCrArCrUrUrUrCrArArUrUrGrCrCrArArGrUrArArArUrCrUrUrC
3 rArArCrUrGrGrArUrCrArCrUrUrUrGrArGrArUrUrCrArGTT
rArArCrUrGrArArUrCrUrCrArArArGrUrGrArUrCrCrArGrUrUrGrG
- DHX9** *DExH-box helicase 9* NM_001357 Hs05594413_s1
1 rArCrArUrCrArUrUrCrArArGrArGrCrUrArArArUrCrUrUGA
rUrCrArArGrArUrUrUrArGrCrUrCrUrUrGrArArUrGrArUrGrUrUrU
2 rGrCrCrArArCrUrUrGrArArGrGrArUrUrArCrUrArCrUrCAA
rUrUrGrArGrUrArGrUrArArUrCrCrUrUrCrArArGrUrUrGrGrCrUrC
3 rCrCrArGrCrUrArCrArUrCrUrGrUrUrGrArUrUrUrUrArAAT
rArUrUrUrArArArArUrCrArArCrArGrArUrGrUrArGrCrUrGrGrCrA
- HNRNPAB** *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B* NM_031266 Hs00954054_g1
1 rCrCrArCrArArCrCrUrGrGrArUrArUrUrGrArArGrCrUrATC
rGrArUrArGrCrUrUrCrArArUrArUrCrCrArGrGrUrUrGrUrGrGrCrA
2 rUrCrArGrArArUrArArCrUrArCrArArGrCrCrArUrArCrUGA
rUrCrArGrUrArUrGrGrCrUrUrGrUrArGrUrUrArUrUrCrUrGrArUrG
3 rCrGrUrGrUrCrArUrUrGrArCrCrCrUrArArArArArGrGrCCA
rUrGrGrCrCrUrUrUrUrUrArGrGrGrUrCrArArUrGrArCrArCrGrGrC
- HNRNPC** *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C* NM_004500 Hs01028910_g1
1 rGrArUrGrArArUrArUrArUrUrArArArCrArGrCrUrArCrCAG
rCrUrGrGrUrArGrCrUrGrUrUrUrArArUrArUrArUrCrArUrCrUrU
2 rGrUrGrArGrArArArCrCrUrUrArCrCrArUrCrArArArCrACG
rCrGrUrGrUrUrUrGrArUrGrGrUrArArGrGrUrUrUrCrUrCrArCrArA
3 rGrCrGrUrGrUrArUrCrArGrGrArArArCrArCrUrUrCrArCGA
rUrCrGrUrGrArArGrUrGrUrUrUrCrCrUrGrArUrArCrArCrGrCrUrG
- HNRNPD** *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D* NM_031370 Hs01086912_m1
1 rGrArUrArArGrGrUrCrArUrGrGrArUrCrArArArArGrAAC

- rGrUrUrCrUrUrUrUrUrGrArUrCrCrArUrGrArCrCrUrUrArUrCrUrA
- ² rGrArGrGrUrGrGrUrCrArUrCrArArArUrArGrCrUrArCAA
rUrUrGrUrArGrCrUrArUrUrUrGrArUrGrArCrCrArCrCrUrCrGrC
- ³ rArArArUrUrGrUrCrArUrGrGrArUrUrCrArArGrUrUrArUTA
rUrArArUrArArCrUrUrGrArArUrCrCrArUrGrArCrArArUrUrUrUrU
- HNRNPL** *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L* NM_001533 Hs00704853_s1
- ¹ rCrUrGrArArGrArUrCrGrArArUrArCrGrCrArArArGrCrCTA
rUrArGrGrCrUrUrUrGrCrGrUrArUrUrCrGrArUrCrUrUrCrArGrArG
- ² rArCrUrCrUrUrGrGrCrArCrArUrUrUrCrArArUrArArArATT
rArArUrUrUrUrArUrUrGrArArArUrGrUrGrCrCrArArGrArGrUrArC
- ³ rUrCrArArGrArArUrGrArUrCrArGrGrArUrArCrUrUrGrGGA
rUrCrCrCrArArGrUrArUrCrCrUrGrArUrCrArUrUrCrUrUrGrArArC
- IFITM3** *interferon induced transmembrane protein 3* NM_021034 Hs03057129_s1
- ¹ Silencer® Select siRNA: Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #AM16706)
- KNTC1** *kinetochore associated 1* NM_014708 Hs00938554_m1
- ¹ rGrGrArCrUrArGrArUrGrUrUrGrArGrCrUrUrGrUrUrUrACA
rUrGrUrArArArCrArArGrCrUrCrArArCrArUrCrUrArGrUrCrCrArA
- ² rArGrUrCrUrArArGrArArUrUrArUrUrGrArCrCrUrGrArUTG
rCrArArUrCrArGrGrUrCrArArUrArArUrUrCrUrUrArGrArCrUrGrU
- ³ rCrUrCrUrGrUrArUrUrArUrArGrCrUrArUrUrUrGrUrCrUAA
rUrUrArGrArCrArArArUrArGrCrUrArUrArArUrArCrArGrArGrArU
- NKTR** *natural killer cell triggering receptor* NM_005385 Hs00234637_m1
- ¹ rCrUrUrCrArCrArGrUrArArArUrArUrGrUrCrArArArGrGTA
rUrArCrCrUrUrUrGrArCrArUrArUrUrArCrUrGrUrGrArArGrUrG
- ² rGrArGrGrArCrCrUrUrUrCrArGrGrUrArArArCrArUrGrATA
rUrArUrCrArUrGrUrUrUrArCrCrUrGrArArArGrGrUrCrCrUrCrUrU
- ³ rUrGrArCrArGrUrCrUrGrUrUrGrUrUrCrUrArUrUrUrCrAAT
rArUrUrGrArArArUrArGrArArCrArArCrArGrArCrUrGrUrCrArUrU
- RBM15** *RNA binding motif protein 15* NM_022768 Hs00368498_s1
- ¹ rGrUrCrArUrCrArCrArGrArArGrUrArGrArUrArUrCrArAGA
rUrCrUrUrGrArUrArUrCrUrArCrUrUrCrUrGrUrGrArUrGrArCrUrC
- ² rArGrCrUrArArUrCrUrGrUrUrUrArGrUrArUrUrUrGrUrGCA
rUrGrCrArCrArArArUrArCrUrArArArCrArGrArUrUrArGrCrUrUrU
- ³ rArGrArCrUrArGrUrArCrUrUrArCrGrGrCrUrUrUrCrUrCAA
rUrUrGrArGrArArArGrCrCrGrUrArArGrUrArCrUrArGrUrCrUrGrG
- WDR5** *WD repeat domain 5* NM_017588 Hs00424605_m1
- ¹ rCrGrUrUrCrUrGrUrArUrCrUrUrUrUrUrGrArUrArUrUrCCA

	rUrGrGrArArUrArUrCrArArArArArGrArUrArCrArGrArArCrGrUrU		
2	rUrCrCrCrCrArGrUrCrCrArArCrCrUrUrArUrUrGrUrCrUCA		
	rUrGrArGrArCrArArUrArArGrGrUrUrGrGrArCrUrGrGrGrArUrU		
3	rArGrUrGrCrCrUrGrArArGrArCrGrCrUrCrArUrCrGrArUGA		
	rUrCrArUrCrGrArUrGrArGrCrGrUrCrUrUrCrArGrGrCrArCrUrGrG		
XRN2	<i>5'-3' exoribonuclease 2</i>	NM_012255	Hs01082225_m1
1	rGrUrArArUrCrArGrUrUrUrGrGrArCrArUrGrArGrGrUrCAA		
	rUrUrGrArCrCrUrCrArUrGrUrCrCrArArArCrUrGrArUrUrArCrArA		
2	rGrGrArArCrUrGrArArUrUrCrArUrGrGrArCrArArUrCrUTG		
	rCrArArGrArUrUrGrUrCrCrArUrGrArArUrUrCrArGrUrUrCrCrUrG		
3	rGrGrArArArCrArUrUrUrCrArUrUrArArUrGrUrArCrUrUGT		
	rArCrArArGrUrArCrArUrUrArArUrGrArArArUrGrUrUrUrCrCrArA		
GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>	NM_002046	Hs02786624_g1
HBB	<i>hemoglobin subunit beta</i>	NM_000518	Hs00758889_s1
HPRT1	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>	NM_000194	Hs02800695_m1

rN = RNA-Basen, N = chimäre DNA-Basen

2.7. Enzyme und gebrauchsfertige Enzym-Reaktionslösungen

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Enzyme und Enzym-Reaktionslösungen gemäß den Herstellerangaben verwendet, einschließlich der entsprechenden mitgelieferten Puffer und Zusätze.

Enzym	Hersteller / Artikelnr.
BamHI	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #FD0054)
BsmBI / Esp3I	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #ER0451)
DNase I, RNase-frei	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #EN0521)
DpnI	New England Biolabs, (Ipswich, US; #R0176)
EcoRI	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #FD0274)
KpnI	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #FD0524)
Minicircle-safe DNase	System Biosciences, LLC (Palo Alto, US; #MN920A-1)

Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, US; #M0530S)
Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, DE; #E3101K)
Platinum™ SuperFi II PCR Mastergemisch (2x)	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #12368250)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, (Ipswich, US; #M0202S)
T4-Polynukleotid-Kinase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #EK0031)
T7 DNA Ligase	New England Biolabs, (Ipswich, US; #M0318S)
T7 RNA Polymerase	New England Biolabs, (Ipswich, US; #M0251S)
GoTaq® G2 DNA Polymerase Master Mix	Promega GmbH (Fitchburg, US; #M7822)
Takyon™ No ROX Probe 2X MasterMix Blue dTTP	Eurogentec (Seraing, BE; #UF-NPMT- B0701)
TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #4444432)
Q5® Hot Start High-Fidelity Master Mix (2x)	New England Biolabs, (Ipswich, US; #M0494S)

2.8. Antikörper für Western Blot Analysen, Indirekte Immunfluoreszenz und Immunpräzipitation

Primärantikörper

Die hier verwendeten Primärantikörper wurden für Western Blot Analysen in Milchpulver (^{MP}) oder BSA (^{BSA}) gelöst in TBS-T, sowie für Immunfluoreszenz-Färbungen in PBS, verdünnt.

Gerichtet gegen (anti-)	Verdünnungsfaktor		Spezies	Hersteller, Artikelnr.
	Western Blot	IF		
anti-HBc (Dako)	-	1:200	Kaninchen	Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, US; #B0586)
anti-HBc (SYC953)	-	1:800	Meerschweinchen	AG Glebe, Institut für Medizinische Virologie,

HDV-Antiserum (HBV/HDV ⁺ -Patient)	1:200 ^{1% MP}	1:200	Mensch	Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE AG Glebe, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE
HDV-IgBAB-Antiserum (HBV/HDV ⁺ -Patient)	-	1:1000	Mensch	K. Majzoub, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier; CNRS-UMR 5535, Montpellier, FR
anti-RBM15	1:1000 ^{5% MP}	-	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Inc. (Cambridge, GB; #25261)
anti-präS1 (MA18/7) (Sominskaya et al., 1992)	-	-	Maus	AG Glebe, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE
anti-präS1 ²⁰⁻⁴⁸ (SY6965) (Bichko et al., 1985; Seiz et al., 2016)	-	1:200	Kaninchen	AG Glebe, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE
anti-S (C20/02) (Abou El Nasr, 2011)	-	1:200	Maus	AG Glebe, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE
anti-HBs (SA8045)	-	1:200	Kaninchen	AG Glebe, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE
anti-DDX17 (C-9)	1:2000 ^{1% MP}	-	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, US; #sc-271112)
anti- HSPA4/Apg-2	1:1000 ^{1% BSA}	-	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Inc. (Cambridge, GB; #3303)
anti-NKTR	1:500 ^{1% MP}	-	Kaninchen	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #PA5-67992)
anti-PAP- $\alpha/\beta/\gamma$ (D-1)	1:250 ^{1% MP}	-	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, US; #sc-365607)

anti- β -Aktin (C4)	1:1000 ^{5 % MP}	-	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, US; #sc-47778)
anti- α -Tubulin	1:1000 ^{1 % MP}	-	Maus	Sigma-Aldrich / Merck KGaA (Darmstadt, DE; #T9026)

alle zzgl. NaN₃ [0,02 %]

Sekundärantikörper

Die hier verwendeten Sekundärantikörper wurden für Western Blot Analysen in Milchpulver (^{MP}) gelöst in TBS-T, sowie für Immunfluoreszenz-Färbungen in PBS, verdünnt.

Gerichtet gegen (anti-)	Verdünnungsfaktor		Spezies	Hersteller, Artikelnr.
	Western Blot	IF		
anti-Human-IgG (A488)	-	1:500	Ziege	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #A11013)
anti-Human-IgG (A568)	-	1:400	Ziege	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #A21090)
anti-Kaninchen-IgG (A488)	-	1:400	Ziege	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #A11034)
anti-Kaninchen-IgG (A568)	-	1:400	Ziege	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #A11036)
anti-Maus-IgG (A568)	-	1:400	Ziege	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #A11031)
anti-Meerschweinchen-IgG (A488)	-	1:400	Ziege	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #A11073)
anti-Human-IgG (HRP)	1:4000 ^{1 % MP}	-	Ziege	Nordic-MUbio (Susteren, NL; #GAHu/Ig/PO)
anti-Kaninchen-IgG (HRP)	1:2000 ^{1 % MP}	-	Ziege	Cell Signaling Technology, Inc. (Cambridge, GB; #7074)
anti-Maus-IgG (HRP)	1:2000 ^{1 % MP}	-	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, US; #sc-516102)

2.9. Chemikalien, Lösungen und Puffer

Die hier verwendeten Chemikalien, sowie Lösungsmittel, wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE), Fluka Chemie GmbH (Buchs, CH), Honeywell International Inc (Morristown, US), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, DE) und Sigma-Aldrich / Merck KGaA (Darmstadt, DE) bezogen.

Agarose-Gelelektrophorese

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	40 mM Tris
	20 mM Ethansäure
	1 mM EDTA pH 8

Zellyse

OPT-Lysepuffer (Kopec et al., 2017)	20 mM EDTA
	140 mM NaCl
	5 % SDS [w/v]
	100 mM Tris pH 8
erst vor Gebrauch zugeben:	1x Halt™ Protease-Inhibitor-Cocktail

SDS-PAGE und Western Blot

Laemmli-Laufpuffer	25 mM Tris pH 8,3
	192 mM Glycin
	0,1% (w/v) SDS

Transferpuffer für Western Blot (<i>semi-dry</i>)	45 mM Tris pH 8,3
	39 mM Glycin
	0,5 mM EDTA
erst vor Gebrauch zugeben:	20% (v/v) Methanol

TBS	20 mM Tris
	150 mM NaCl
	pH 7,6

TBS-T	0,1% (v/v) Tween 20 in TBS
-------	----------------------------

Northern Blot

Hier ansetzen aller Lösungen und Puffer mit autoklaviertem DEPC-H₂O [0,9 ml/l].

MOPS (10x)	0,2 M MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH 7
Gel-Denaturierungspuffer	50 mM NaOH 150 mM NaCl
Gel-Neutralisierungspuffer	100 mM Tris pH 7,5 10 mM NaCl
SSC (20x)	3M NaCl 300 mM tri-Natriumcitrat Dihydrat pH 7
Waschpuffer	
Low Stringency	2x SSC 0,1 % SDS [w/v]
High Stringency	0,5x SSC 0,1 % SDS [w/v]
Ultra High Stringency	0,1x SSC 0,1 % SDS [w/v]
SEAP-Assay	
SEAP-Assay-Puffer (2x)	2 M Diethanolamin (100%) 1 mM Magnesiumchlorid Hexahydrat 20 mM L-Homoarginin -hydrochlorid
SEAP-Assay-Substrat	50 mM 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat (para-Nitrophenylphosphat, pNPP)
Sonstige	
PBS (autoklaviert)	540 μ M KCl 360 μ M KH_2PO_4 27,4 mM NaCl 1,6 mM Na_2HPO_4 pH 7,4

HBS (steril-filtriert)	140 mM NaCl 25 mM HEPES 0,75 mM Na ₂ HPO ₄ 5 mM KCl 6 mM D-Glucose pH 7,05
TNE	140 mM NaCl 1 mM EDTA 20 mM Tris-HCl pH 7,4

2.10. Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und weitere Materialien

	Hersteller / Artikelnr.
Kommerzielle Kits	
DNA Clean & Concentrator®-5	Zymo Research Europe GmbH (Freiburg, DE; #D4013)
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, DE; #11858874001)
innuPREP PCRpure Kit	Analytik Jena GmbH+Co. KG (Jena, DE; #845-KS-5010250)
innuPREP Virus DNA/RNA Kit	Analytik Jena GmbH+Co. KG (Jena, DE; #845-KS-4800250)
MC-Easy™ Minicircle DNA Production Kit (with Competent Cells)	System Biosciences, LLC (Palo Alto, US; #MN920A-1)
Monarch DNA Gel Extraction Kit	New England Biolabs, (Ipswich, US; #T1020S)
Monarch PCR & DNA Cleanup Kit	New England Biolabs, (Ipswich, US; #T1030S)
Monarch Plasmid Miniprep Kit	New England Biolabs, (Ipswich, US; #T1010S)
OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit	Zymo Research Europe GmbH (Freiburg, DE; #D6030)
Plasmid <i>Plus</i> Midi Kit	QIAGEN GmbH (Hilden, DE; #12945)
TriFECTa® RNAi Kit	Integrated DNA Technologies, Inc. (Iowa, US)
Gebrauchsfertige Reagenzien und weitere Materialien	
Adhäsive Folie, optisch klar, DNase- / RNase-frei	Kisker Biotech GmbH & Co. KG (Steinfurt, DE; #GK480-OS)
Amersham Hybond-N+ Nylonmembran	Cytiva (Marlborough, US; #RPN203B)

Autoradiographiefilm BAS 2025 Cassette 2	FUJIFILM Europe GmbH (Ratingen, DE)
Clarity Max Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories, Inc (Feldkirchen, DE; #1705062)
DMEM, hoher Glukosegehalt, HEPES, kein Phenolrot	Gibco™ / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; # 21063029)
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE; #6335.1)
dNTP-Set	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #R0181)
Dynabeads™ M-280 Schaf Anti-Maus IgG	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #11201D)
Gel Loading Dye, Purple (6X)	New England Biolabs, (Ipswich, US; #B7024S)
GelRed® Nucleic Acid Stain (10.000x)	Millipore / Merck KGaA (Darmstadt, DE; #SCT123)
Halt™ Protease-Inhibitor-Cocktail (100x)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #78429)
Hoechst 33342, Trihydrochlorid, Trihydrat	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #H1399)
Immobilon®-P PVDF-Membran	Merck KGaA (Darmstadt, DE; #IPVH00010)
4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories, Inc (Feldkirchen, DE; #1610747)
LightCycler 480 Multiwell Plate 96, white	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, DE; #04729692001)
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, DE; #A840004)
Magermilchpulver	Saliter Milchwerk GmbH & Co. KG (Obergünzburg, DE)
MicroSpin™ G-25 Columns	Cytiva (Marlborough, US; #27532501)
OPEN-TOP POLYCLEAR™ TUBES	Seton Scientific (Petaluma, US; #7010)
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE; #0335.2)
PerfectHyb™ Plus Hybridisierungspuffer	Sigma-Aldrich / Merck KGaA (Darmstadt, DE; #H7033)
Ribonucleotide Solution Set	New England Biolabs, (Ipswich, US; #N0450S)
RNA Loading Dye, (2X)	New England Biolabs, (Ipswich, US; #B0363S)
RNase Inhibitor, Murine	New England Biolabs, (Ipswich, US; #M0314S)
ROTIPHORESE®Gel 30 (37,5:1) Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung Sigmacote®	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE; #3029.1) Sigma-Aldrich / Merck KGaA (Darmstadt, DE; #SL2)
Tris(2-carboxyethyl)phosphin –hydrochlorid (TCEP)	Sigma-Aldrich / Merck KGaA (Darmstadt, DE; # 75259)
TRIzol™ Reagenz	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #15596026)
UltraPure™ DNase/RNase-freies destilliertes Wasser	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #10977035)
Vivaspin 20, 300.000 MWCO PES	Sartorius AG (Göttingen, DE; #VS2052)
Whatman™ 3MM CHR Cellulose-Chromatographie-Papiere	Cytiva (Marlborough, US; #3030-917)

96-Well-Platte Nunc-Immuno F96 MaxiSorp	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #442404)
[α -32P] rUTP, 3000 Ci/mmol	Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig, DE; #SRP-210)

Größen- und Molekulargewichtsmarker

Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10-250 kDa)	New England Biolabs, (Ipswich, US; #P7719S)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US; #26616)
Quick-Load® 1 kb DNA Ladder	New England Biolabs, (Ipswich, US; #N0468S)
ssRNA Ladder	New England Biolabs, (Ipswich, US; #N0362S)

3. Methoden

3.1. Eukaryotische Zellkultur-Methoden

3.1.1. Kultivieren, Passagieren und Aussäen von Hepatomzelllinien und primären humanen Hepatozyten

Kultivieren und Passagieren von Hepatomzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten adhärent wachsenden Hepatomzelllinien wurden mit entsprechendem Kulturmedium ggf. versetzt mit. entsprechenden Selektionsantibiotika (siehe 2.3.1. Medien, Antibiotika, sowie weitere Zusätze und Substanzen) bei 37 °C und 5 % CO₂ im CO₂ Inkubator kultiviert. Zum Passagieren wurden diese mit sterilem PBS gewaschen, mittels Trypsin-EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und nach Resuspendieren in Kulturmedium mit entsprechendem Volumen umgesetzt oder für einen experimentellen Versuchsteil ausgesät. Hierbei wurden Zellkulturgefäße für HepG2 Zelllinien zuvor collagenisiert (Collagen Typ I, Rat Tail [0,35 mg/ml]).

Aussäen und Kultivieren von primären humanen Hepatozyten

Die in dieser Arbeit verwendeten primären humanen Hepatozyten (PHHs) wurden nach Herstellerangaben (Primacyt Cell Culture Technology GmbH (Schwerin, DE)) in collagenisierten 24-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ im CO₂ Inkubator kultiviert. Sieben Stunden nach Aussaat wurden die PHHs mit erwärmtem sterilem PBS vorsichtig gewaschen und weiter in HHMM (300 µl/Well, siehe 2.3.1. Medien, Antibiotika, sowie weitere Zusätze und Substanzen) kultiviert. Am Folgetag wurden die Zellen erneut mit erwärmtem sterilem PBS vorsichtig gewaschen, anschließend zunächst weiter in HHMM (300 µl/Well) kultiviert und für die transiente Transfektion und anschließende Infektion mit pseudotypisierten HDV vorbereitet (siehe auch (Palatini et al., 2022) und 3.2.1. Infektion mit rekombinanten pseudotypisierten HDV *in-vitro*).

3.1.2. Transiente Transfektion von Hepatomzelllinien

Um eine transiente Transfektion durchzuführen, wurden die zu transfizierenden Zellen ein bis zwei Tage vor Transfektion mit Kulturmedium (siehe 2.3.1. Medien, Antibiotika, sowie weitere Zusätze und Substanzen) ausgesät, sodass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 70 - 90 % aufwiesen, und bis zur Transfektion bei 37 °C und 5 % CO₂ im CO₂ Inkubator kultiviert.

In einem entsprechenden Reaktionsgefäß wurden nun je Transfektionsansatz, gesamt 300 ng oder, bei sich unterscheidenden DNA-Molekülgrößen im selben experimentellen Ansatz, 300 fmol

Plasmid-DNA oder PCR-Produkt pro cm² Kulturfläche in Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium für mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das entsprechende Transfektionsreagenz (siehe 2.3.2. Reagenzien für die Transfektion; Verhältnis 1 µg DNA : 3 µl Transfektionsreagenz) hinzugefügt. Folgend wurde die Transfektionslösung nun gevortext und für weitere 10 - 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischenzeitlich wurden die zu transfizierenden Zellen nun mit sterilem PBS gewaschen, frisches Kulturmedium (s.o.) auf die Zellen gegeben und nach Ende der Inkubationszeit die Transfektionslösung tropfenweise auf den Zellen verteilt. Durch leichtes Schwenken wurde nun das letztlich gleichmäßige Verteilen der Transfektionslösung auf den Zellen gewährleistet, woraufhin diese nun über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im CO₂ Inkubator kultiviert wurden. Am Folgetag wurden die Zellen nun einmal mit sterilem PBS gewaschen und in WME oder bei einer folgend geplanten Infektion mit rekombinanten HBV oder pseudotypisierten HDV in HGM (siehe 2.3.1. Medien, Antibiotika, sowie weitere Zusätze und Substanzen; inkl. Zusätze und ggf. zzgl. 1 % (Huh7 Zellen) oder 2 % DMSO (HepG2 Zellen)) weiter bei 37 °C und 5 % CO₂ im CO₂ Inkubator kultiviert.

3.1.3. Transiente Transfektion von siRNAs zum gezielten *Knock-Down* von Wirtsfaktoren

Zur transienten Transfektion von Huh7-NTCP Zellen mit DsiRNAs oder Silencer® Select siRNAs (siehe 2.6. Verwendete siRNAs und passende Hydrolysesonden (TaqMan) für den gezielten *Knock-Down* von Wirtsfaktoren und dessen Verifizierung) wurden diese mit einer Konfluenz von 70 - 80 % in collagenisierten (Collagen Typ I, Rat Tail [0,35 mg/ml]) 24-Well- Mikrotiterplatten Kulturmedium (siehe 2.3.1. Medien, Antibiotika, sowie weitere Zusätze und Substanzen) ausgesät und acht bis neun Stunden nach Aussaat transfiziert. Hierfür wurden je siRNA 50 pmol/Well transfiziert (siehe auch (Palatini et al., 2022)). Entsprechend wurden hier je Well entweder gleichzeitig drei DsiRNAs, welche zur Ausschaltung derselben spezifischen mRNA dienen (jeweils [50 pmol]), die TYE 563 Transfection Control DsiRNA [50 pmol], die HPRT-S1 Positive Control DsiRNA [50 pmol] oder die Negative Control DsiRNA [50 pmol] allein, oder eine Silencer® Select siRNA [50 pmol] in 50 µl Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium für mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel dazu wurden je Transfektionsansatz in einem separaten 0,5-ml-Reaktionsgefäß je 1 µl Lipofectamine™ 2000 pro 50 pmol siRNA in 50 µl Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium für ebenfalls mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Folgend wurden die beiden Transfektionslösungen nun vereinigt, gevortext und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischenzeitlich wurden die zu transfizierenden Zellen nun mit sterilem PBS gewaschen, 300 µl frisches Kulturmedium (s.o., ohne Zugabe von Selektionsantibiotika) auf die Zellen gegeben und nach Ende der Inkubationszeit die Transfektionslösung tropfenweise auf den Zellen verteilt. Durch leichtes Schwenken wurde nun das letztlich gleichmäßige Verteilen der

Transfektionslösung auf den Zellen gewährleistet, woraufhin diese nun über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im CO₂ Inkubator kultiviert wurden. Hierbei wurden je siRNA Doppelansätze transfiziert um den entsprechenden *Knock-Down* der jeweiligen mRNA zu überprüfen. Am Folgetag wurden die Zellen nun zweimal mit sterilem PBS gewaschen und aufgrund einer folgend geplanten Infektion mit rekombinanten HBV oder pseudotypisierten HDV in HGM (siehe 2.3.1. Medien, Antibiotika, sowie weitere Zusätze und Substanzen; inkl. Zusätze und ggf. zzgl. 1 % DMSO) weiter bei 37 °C und 5 % CO₂ im CO₂ Inkubator kultiviert.

Zwei Tage nach transienter Transfektion mit entsprechenden siRNAs wurden die Zellen nun mit rekombinanten HBV oder pseudotypisierten HDV infiziert (siehe 3.2.1. Infektion mit rekombinanten pseudotypisierten HDV *in-vitro*). Zeitgleich wurden transient transfizierte Zellen des jeweiligen Transfektionsduplikats verwendet, um den *Knock-Down* der entsprechenden mRNA zu überprüfen. Hierfür wurden diese entweder mittels Immunfluoreszenz-Färbung (TYE 563 Transfection Control DsiRNA; siehe 3.2.3. Indirekte Immunfluoreszenz (IF)) oder mittels RNA-Isolierung (3.4.2. Isolierung von RNA, genomischer DNA und Gesamtprotein aus Zellen) und anschließender RT-qPCR unter Verwendung von spezifischen Hydrolysesonden (siehe 2.6. Verwendete siRNAs und passende Hydrolysesonden (TaqMan) für den gezielten *Knock-Down* von Wirtsfaktoren und dessen Verifizierung) nach Herstellerangaben und -protokoll analysiert.

3.1.4. Generierung von pseudotypisierten HDV *in-vitro*

Zur Generierung von rekombinanten pseudotypisierten HDV wurden drei 10cm-Zellkulturschalen ($\varnothing = 10$ cm) Huh7 Zellen in 10 ml DMEM (siehe 2.3.1. Medien, Antibiotika, sowie weitere Zusätze und Substanzen) ausgesät, sodass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70 - 90 % aufwiesen. Unmittelbar vor der Transfektion wurden die Zellen nun einmal mit sterilem PBS gewaschen und anschließend mit 5 - 7 ml DMEM (s.o.) bedeckt. Für die Transfektion wurden nun 15 µg Expressionsplasmid, codierend für entsprechende HBsAg, sowie 30 µg Expressionsplasmid, codierend für das jeweilige HDV-Genom (Dimer), (siehe 2.5. Expressionsvektoren und weitere Oligonukleotide) in 1,05 ml Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden diesem Transfektionsansatz 135 µl FuGENE® HD Transfection Reagent hinzugefügt, gevortext und für weitere 10 - 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz gleichmäßig auf die Huh7 Zellen getropft (ca. 395 µl / Zellkulturschale), die Zellkulturschalen leicht geschwenkt und die Huh7 Zellen nun über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im CO₂ Inkubator kultiviert. Am Folgetag wurden die Zellen nun mittels Trypsin-EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und nach Resuspendieren in WME (zzgl. Caspofungin [5 µg/ml], 20 ml / Zellkulturschale) auf je eine collagenisierte (Collagen Typ I, Rat Tail [0,35 mg/ml]). 15cm-Zellkulturschale ($\varnothing = 15$ cm) überführt. In den darauffolgenden zwei Wochen wurde nun alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt, hierbei wurde der

Zellkulturüberstand der transfizierten Huh7 Zellen gesammelt und zwischenzeitig bei 4 °C gelagert, sowie je Zellkulturschale erneut 20 ml WME (zzgl. Caspofungin [5 µg/ml] hinzugegeben. Anschließend wurde der gesamte gesammelte nun die pseudotypisierten HDV enthaltende Zellkulturüberstand vereinigt und mittels Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren nach Herstellerangaben einkonzentriert und anschließend bei -20°C gelagert. Die Quantifizierung der enthaltenen Virusgenome (HDV) erfolgte mittels RT-qPCR (siehe 3.4.5. Quantifizierung rekombinanter HBV und pseudotypisierter HDV).

3.1.5. Generierung von rekombinanten HBV *in-vitro*

HepG2 Tet-On® Advanced Zellen wurden in vier 15cm-Zellkulturschalen ($\varnothing = 15$ cm) so ausgesät, dass sie für eine transiente Transfektion eine Konfluenz von 80 % aufwiesen. Anschließend wurden sie nun mit 8 pmol / 15cm-Zellkulturschale ($\varnothing = 15$ cm) pCH9_HBV_Gt.D3-3091_M125T_1.1mer, pcDNA3.1⁽⁺⁾_HBV_Gt.D3-3091_M125T_1.5mer, MiniCircle HBV Gt.D3-3091 cccDNA (mit Mutation M125T) oder einem linearen HBV Gt.D3-3091 1.0mer (mit Mutation M125T) als PCR-Produkt (siehe 3.4.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Generierung von rekombinanter HBV cccDNA (rcccDNA)) unter Verwendung des X-tremeGENE™ HP DNA-Transfektionsreagenz transfiziert (wie siehe 3.1.2. Transiente Transfektion von Hepatomzelllinien). Am Folgetag wurden die Zellen nun einmal mit sterilem PBS gewaschen und 30 ml / 15cm-Zellkulturschale ($\varnothing = 15$ cm) WME (siehe 2.3.1. Medien, Antibiotika, sowie weitere Zusätze und Substanzen, zzgl. 2 % DMSO) zugegeben. Fünf Tage nach transienter Transfektion wurde der Zellkulturüberstand gesammelt und zwischenzeitig bei 4 °C gelagert, sowie je Zellkulturschale erneut 30 ml WME (zzgl. 2 % DMSO) hinzugegeben. An Tag 10 nach transienter Transfektion wurde letztlich der nun die rekombinanten HBV enthaltende Zellkulturüberstand gesammelt, vereinigt, mittels Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren nach Herstellerangaben einkonzentriert (100-fach) und anschließend bei -20°C gelagert, sowie die Zellen verworfen. Die Quantifizierung der enthaltenen Virusgenome (HBV) erfolgte mittels qPCR (siehe 3.4.5. Quantifizierung rekombinanter HBV und pseudotypisierter HDV).

3.2. Zellbiologische Methoden

3.2.1. Infektion mit rekombinanten pseudotypisierten HDV *in-vitro*

Transient oder stabil NTCP/Ntcp-exprimierende HepG2 oder Huh7 Zellen, sowie primäre humane Hepatozyten, wurden so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Infektion eine Konfluenz von 80 - 90 % aufwiesen, bzw. bei Untersuchung der Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zellen als Screen im 96-Well-Mikrotiterplatten-Format mit 3×10^3 oder 1×10^4 Zellen / 96-Well ausgesät, und wurden vor Infektion über Nacht mit WME (zzgl. 1 % (Huh7 Zellen) oder 2 % DMSO (HepG2 Zellen)) oder

HHMM (PHHs) bei 37 °C und 5 % CO₂ im CO₂ Inkubator kultiviert. Ggf. wurden die Zellen unmittelbar vor Infektion für eine Stunde mit einem synthetischen myristoylierten HBV-Gt.D3-präS1²⁻⁴⁸-Peptid ([1 µM] in HGM inkl. DMSO [s.o.]) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen nun über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im CO₂ Inkubator mit rekombinanten pseudotypisierten HDV angesetzt in I-HGM (ggf. ebenfalls zzgl. synthetisches myristoyliertes HBV-Gt.D3-präS1²⁻⁴⁸-Peptid [1 µM], siehe 2.3.1. Medien, Antibiotika, sowie weitere Zusätze und Substanzen) inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen und weiter in HGM (zzgl. 1 % (Huh7 Zellen), 2 % DMSO (HepG2 Zellen)) oder HHMM (PHHs) (ggf. zzgl. synthetisches myristoyliertes HBV-Gt.D3-präS1²⁻⁴⁸-Peptid [1 µM], s.o.) bei 37 °C und 5 % CO₂ im CO₂ Inkubator kultiviert. Die Zellen wurden nun alle zwei bis drei Tage einmal mit sterilem PBS gewaschen und anschließend erneut mit HGM (zzgl. 1 % (Huh7 Zellen), 2 % DMSO (HepG2 Zellen)) oder HHMM (PHHs) bedeckt und so für 6 - 11 Tage weiter bei 37 °C und 5 % CO₂ im CO₂ Inkubator kultiviert. Es folge die Analyse der Zellen mittels Immunfluoreszenz-Färbung (siehe 3.2.3. Indirekte Immunfluoreszenz (IF)), Western Blot (siehe 3.5.2. Diskontinuierliche SDS-PAGE, Western Blot (*semi-dry*) und Immundetektion von Proteinen) und / oder Northern Blot (siehe 3.4.3. Northern Blot), sowie die Analyse der Zellkulturüberstände (siehe 3.5.3. Diagnostische Nachweisverfahren: Bestimmung von HBsAg (quantitativ) und HBeAg (qualitativ)).

3.2.2. Produktion von Lentiviren durch transiente Transfektion von HEK293T Zellen mittels Calciumphosphat-Methode und Transduktion von Huh7-NTCP^{MPL} Zellen

Für die Produktion von Lentiviren wurden HEK293T Zellen mittels der Calciumphosphat-Methode transient transfiziert (siehe auch 2.3.3. Reagenzien und Material für die Produktion von Lentiviren durch transiente Transfektion von HEK293T Zellen und 2.5. Expressionsvektoren und weitere Oligonukleotide ‚Plasmide zur Produktion von Lentiviren‘). Hierfür wurden HEK293T Zellen in Kulturmedium (siehe 2.3.1. Medien, Antibiotika, sowie weitere Zusätze und Substanzen) mit einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen in 6-Well-Mikrotiterplatten einen Tag vor transienter Transfektion ausgesät. Zuvor wurden unterschiedliche sgRNA-Sequenzen in den Vektor lentiCRISPRv2 kloniert (siehe 3.4.7. Klonierung von Gen-spezifischen sgRNA-Sequenzen in lentiCRISPRv2). Je 3 µg des entsprechenden sgRNA-Sequenz-tragenden lentiCRISPRv2 Vektors, sowie je 1,5 µg pMD2.G und 1,5 µg psPAX2, wurden in 150 µl HBS vereinigt und für 30 s gevortext. Anschließend wurden diesem Transfektionsansatz nun 10 µl 2 M CaCl₂ hinzugefügt und dieser erneut sofort für 30 s gevortext. Zwischenzeitlich wurden die zu transfizierenden Zellen nun mit sterilem PBS gewaschen, 2 ml frisches Kulturmedium (s.o.) auf die Zellen gegeben und nun die Transfektionslösung tropfenweise auf den Zellen verteilt. Durch leichtes Schwenken wurde das letztlich gleichmäßige Verteilen der Transfektionslösung auf den Zellen gewährleistet, woraufhin die diese nun über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im CO₂ Inkubator kultiviert wurden. Am Folgetag wurden die Zellen nun

einmal mit sterilem PBS gewaschen und anschließend je Well 2 ml DMEM zzgl. 2 % FKS, sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, zugegeben. Drei Tage nach Transfektion wurden die nun die Lentiviren enthaltenden Zellkulturüberstände abgenommen und mittels Millex®-HA-Filtereinheit (steril; 0,45 µm) filtriert, sowie die Zellen verworfen. Die somit produzierten Lentiviren konnten nun unmittelbar für die Transduktion von Huh7-NTCP^{MPL} Zellen verwendet werden oder zunächst bei -80 °C gelagert werden.

Für die Transduktion von Huh7-NTCP^{MPL} Zellen wurden diese mit einer Zellzahl von 8×10^4 Zellen in 24-Well-Mikrotiterplatten mit frischem Kulturmedium (siehe 2.3.1. Medien, Antibiotika, sowie weitere Zusätze und Substanzen) ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im CO₂ Inkubator inkubiert. Am Folgetag wurden die Huh7-NTCP^{MPL} Zellen einmal mit frischem PBS gewaschen und je Well mit 2 ml frischem Kulturmedium (s.o.) bedeckt. Anschließend wurden je Transduktionsansatz 500 µl des gefilterten die Lentiviren enthaltenden Zellkulturüberstands mit weiteren 500 µl frischem DMEM, sowie mit 1 µl Polybren, vereinigt und ebenfalls auf die Zellen gegeben. Diese wurden für die Transduktion nun für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im CO₂ Inkubator inkubiert. Dem folgend wurden die Zellen nun in Kulturmedium (s.o.) zzgl. in 3,5 µg/ml Puromycin weiter selektiert und weiter kultiviert (siehe auch (Khalfi et al., 2024)).

3.2.3. Indirekte Immunfluoreszenz (IF)

Zur Durchführung von Immunfluoreszenz-Färbungen von Zellen wurden diese zunächst mit 3,7% Paraformaldehyd und 0,2 % Triton-X-100 in PBS fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit 10 % FKS in PBS bei Raumtemperatur inkubiert, um später die unspezifische Bindung des primären Antikörpers zu vermeiden. Es folgte nun die Inkubation für 1,5 Stunden bei 37°C mit dem primären Antikörper (siehe Primärantikörper, in PBS), zur spezifischen Detektion ausgewählter Proteine. Nach fünfmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese nun mit dem sekundären Antikörper (siehe Sekundärantikörper, in PBS), sowie DAPI [10 µg/ml], für mindestens 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem fünfmaligem Waschen der Zellen mit PBS, konnten diese nun kurzzeitig bei 4 °C gelagert oder mittels DMI6000 B Inversmikroskop, BZ-X810 Fluoreszenzmikroskop und ImageXpress® Pico Zell-Imaging-System analysiert werden.

3.2.4. Nitrobenzoxadiazol-Taurocholat (NBD-TC) Transport-Assay

Bevor eine Infektion der Zellen mit rekombinanten HBV oder pseudotypisierten HDV *in-vitro* durchgeführt werden sollte, bei transienter Transfektion von NTCP/Ntcp mindestens 48 Stunden nach Transfektion, wurde demnach die Funktion des Rezeptors NTCP/Ntcp überprüft. Dies diente auch der Überprüfung, ob NTCP/Ntcp, ausreichend zur Durchführung von Infektionsexperimenten, auf den Zellen exprimiert wurde. So wurden zunächst die entsprechenden NTCP-/Ntcp-tragenden

Zellen zweimal mit auf 37°C erwärmtem DMEM ohne Phenolrot gewaschen und anschließend für 20 Minuten mit entsprechend Fluorophor-markiertem Nitrobenzoxadiazol-Taurocholat (NBD-TC) [5 µM in DMEM ohne Phenolrot], sowie Hoechst 33342 [1 µg/ml], im CO₂ Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Unmittelbar nach erneutem zweimaligem Waschen der Zellen mit DMEM ohne Phenolrot, wurden diese nun mittels DMI6000 B Inversmikroskop, BZ-X810 Fluoreszenzmikroskop oder ImageXpress® Pico Zell-Imaging-System analysiert.

3.2.5. Bestimmung der Transfektionseffizienz (SEAP-Assay)

Um ggf. die Effizienz einer durchgeführten transienten Transfektion (siehe 3.1.2. Transiente Transfektion von Hepatomzelllinien) zu überprüfen, wurde hier, neben den für das entsprechende Experiment benötigten Plasmiden, im selben Schritt auch das Plasmid pSEAP2-Control in geringer Konzentration (Verhältnis 1:25) transfiziert. Die infolgedessen exprimiert und sekretierte SEAP (*secreted alkaline phosphatase*) kann so im Kulturmedium nachgewiesen werden und ist konzentrationsbezogen direkt proportional zu den Veränderungen der intrazellulären Menge von SEAP-mRNA und des ebenfalls nach transienter Transfektion exprimierten untersuchten Proteins. Die SEAP ist im Gegensatz zur endogenen alkalischen Phosphatase resistent gegen den im SEAP-Assay-Puffer enthaltenen Phosphatase-Inhibitor L-Homoarginin und kann Temperaturen von bis zu 65°C standhalten (Berger et al., 1988; Yang et al., 1997). Dementsprechend wurden die zu untersuchenden Zellkulturüberstände zunächst für 30 min bei 65 °C erhitzt. Anschließend wurden je 50 µl dieses Zellkulturüberstands und auch ein *in-house* SEAP-Referenzstandard auf einer 96-Well-Platte Nunc-Immuno F96 MaxiSorp aufgetragen und je 100 µl SEAP-Assay-Puffer (2x) hinzugefügt. Es folgte die Zugabe von je 50 µl frisch vorbereitetem SEAP-Assay-Substrat und eine Inkubation der Proben für 15 bis 90 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Intensität des entsprechenden Farbumschlags wurde anschließend als OD bei 450 nm Wellenlänge im EL808 Absorptions-Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

3.3. Mikrobiologische Methoden

3.3.1. Transformation von Bakterien (*E. coli* Stellar™ Competent Cells)

Zur Vervielfältigung gewählter Plasmid-DNA wurden je Konstrukt 50 µl einer Suspension chemisch-kompetenter Bakterien (*E. coli* Stellar™ Competent Cells) zunächst auf Eis aufgetaut. Je nach Transformationsansatz wurden 0,5 - 1 µg Plasmid-DNA oder ein entsprechender Reaktionsansatz nach DpnI-Restriktionsverdau (siehe 3.4.6. Vektor-Klonierungen (FastCloning nach Li et al., 2011)) hinzugefügt und dieser Ansatz vorsichtig resuspendiert. Nach einer Inkubation des Transformationsansatzes für 30 min auf Eis folgte die Durchführung eines Hitzeschocks im Reaktionsgefäß-Heizblock bei 42 °C für 45 s. Es folgte erneutes Abkühlen der Bakteriensuspension

für 2 min auf Eis, sowie die anschließende Zugabe von 250 µl warmem SOC Outgrowth Medium. Diese Vorkultur wurde nun für eine Stunde bei 37 °C schüttelnd (220 rpm) inkubiert, wonach letztlich 20 µl dieser auf eine LB-Agar-Platte (zzgl. entsprechendem Selektionsantibiotikum (Carbenicillin [100 µg/ml] oder Kanamycin [50 µg/ml])) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Inkubator kultiviert wurden.

3.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakteriensuspensionen

Nach Inkubation der frisch transformierten Bakterien auf einer LB-Agar-Platte zur Selektion über Nacht, wurde aus je einer erzeugten Bakterienkolonie eine entsprechende Kultur mit LB-Medium (zzgl. entsprechendem Selektionsantibiotikum (Carbenicillin [100 µg/ml] oder Kanamycin [50 µg/ml])) zur Vervielfältigung der gewünschten Plasmid-DNA ebenfalls über Nacht schüttelnd (220 rpm) bei 37°C angesetzt. Um die bakteriell vervielfältigte Plasmid-DNA nun zu isolieren wurde, je nach Volumen der angefertigten Kultur, das Monarch Plasmid Miniprep Kit (5 ml) oder das Plasmid Plus *Midi* Kit (40 ml) nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei wurde die Plasmid-DNA mit 30 µl oder 220 µl auf 50 °C erwärmtem DNase/RNase-freiem destilliertem Wasser eluiert und die entsprechende DNA-Konzentration mittels Picodrop Spektralphotometer ermittelt.

3.3.3. Produktion (Transformation von *E. coli* ZYCY10P3S2T) und Aufreinigung von MiniCircle HBV cccDNA

Um MiniCircle HBV cccDNA (ggf. mit Mutation M125T) zu generieren wurden *E. coli* ZYCY10P3S2T mit pMC_HBV_Gt.D3-3091_cccDNA (parental) oder pMC_HBV_Gt.D3-3091_M125T_cccDNA (parental) (siehe 2.5. Expressionsvektoren und weitere Oligonukleotide) methodisch gleich wie auch *E. coli* Stellar™ Competent Cells zur Vervielfältigung gewählter Plasmid-DNA (siehe 3.3.1. Transformation von Bakterien (*E. coli* Stellar™ Competent Cells)) transformiert. Die verwendeten Konstrukte sind hier an die in (Guo et al., 2016) beschriebene Methodik angelehnt und das entsprechende Protokoll aus (Kostyushev et al., 2023) wurde angewendet. Hierbei wurden letztlich nach Transformation 20 µl der Vorkultur auf eine LB-Agar-Platte (zzgl. Kanamycin [50 µg/ml]) ausgestrichen und diese über Nacht bei 37 °C im Inkubator kultiviert. Am Folgetag wurden ca. 3 selektierte Bakterienkolonien in 2 ml LB-Medium (zzgl. Kanamycin [50 µg/ml]) für 4 - 6 Stunden bei 37 °C schüttelnd (250 rpm) kultiviert. Anschließend wurden 1 ml dieser Vorkultur mit 200 ml LB-Medium über Nacht erneut bei 37 °C schüttelnd (250 rpm) kultiviert. Am nächsten Tag sollte die Bakterienkultur eine OD bei 600nm Wellenlänge 4 - 6 und einen pH-Wert von ca. 7 aufweisen. Infolgedessen wurden den 200 ml Bakterienkultur nun 200 ml MC-Easy™ Induction Medium (1x) aus dem MC-Easy™ Minicircle DNA Production Kit hinzugefügt und diese Kultur nun für drei Stunden bei 30 °C und daraufhin für eine Stunde bei 37°C

je schüttelnd (250 rpm) kultiviert. Dieses MC-Easy™ Induction Medium enthält nun Arabinose, welche die Abspaltung der MiniCircle HBV cccDNA und den Abbau des bakteriellen Backbones induziert (siehe Abb. 6).

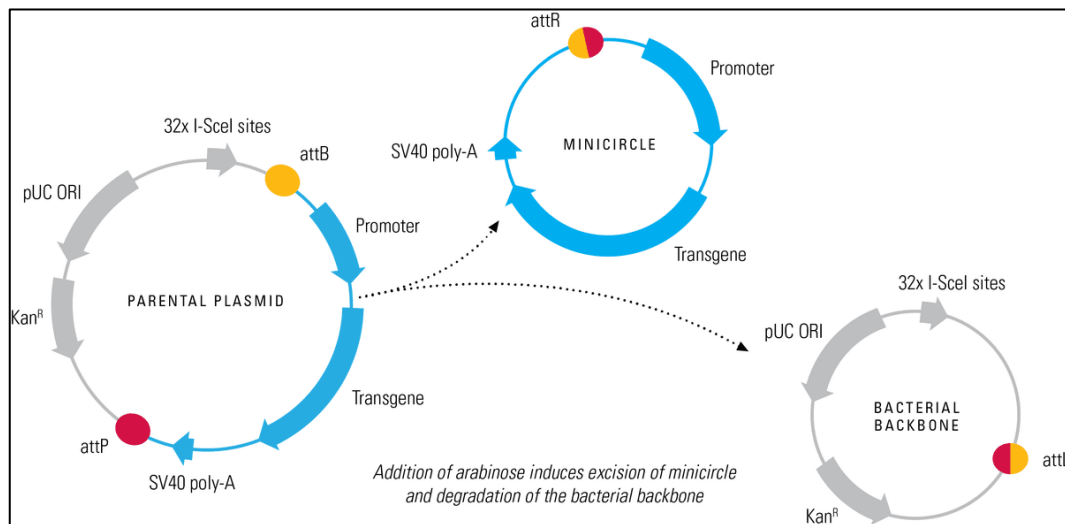


Abb. 6: Generierung von MiniCircle HBV cccDNA aus dem parental MiniCircle-Plasmid.

Der ZYCY10P3S2T *E. coli* MiniCircle producer strain exprimiert induzierbar durch Zugabe von Arabinose ins Kulturmedium Φ C31 Integrase und I-SceI Endonuclease. Dies führt zur Rekombination von attB und attP und so der Spaltung des parental Plasmids in bakterielles Backbone und die einzelnen MiniCircle (Φ C31 Integrase), sowie zum Abbau des übrigen parental Plasmids und des bakteriellen Backbones (I-SceI Endonuclease). (System Biosciences, LLC; Palo Alto, US)

Um nun die entsprechende MiniCircle HBV cccDNA aufzureinigen wurden viermal 100 ml Bakteriensuspension pelletiert und jeweils mittels Plasmid Plus Midi Kit (dementsprechend vier Aufreinigungssäulen) aufgereinigt. Hierbei wurde die MiniCircle HBV cccDNA mit 300 μ l auf 50 °C erwärmtem DNase/RNase-freiem destilliertem Wasser eluiert, die vier Aufreinigungsansätze vereinigt und die entsprechende DNA-Konzentration mittels Picodrop Spektralphotometer ermittelt.

Die entsprechende Entfernung von genomischer und parental Plasmid-DNA-Kontamination mittels Restriktionsenzym KpnI und Minicircle-safe DNase, sowie die anschließende Rezipitation von MiniCircle HBV cccDNA und auch Entfernung von Minicircle-safe DNase und Restriktionsenzymen erfolgte nach Herstellerangaben (MC-Easy™ Minicircle DNA Production Kit, sowie siehe 2.7. Enzyme und gebrauchsfertige Enzym-Reaktionslösungen). Hierbei wurden letztlich freie Nukleotide anhand von MicroSpin™ G-25 Columns nach Herstellerangaben entfernt und die entsprechende DNA-Konzentration mittels Picodrop Spektralphotometer ermittelt. Zu Analysezwecken

3.4. Molekularbiologische Methoden

3.4.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Generierung von rekombinanter HBV cccDNA (rcccDNA)

Generierung von rekombinanter HBV cccDNA für transiente Transfektionen

Zur Generierung von rekombinanter HBV cccDNA (rcccDNA) für die transiente Transfektion wurden zunächst mittels PCR HBV-1.0mere mittels PCR, unter Verwendung von das Vollgenom amplifizierenden bereits phosphorylierten Primern (siehe 2.5.2. Verwendete Primer und Sonden für Klonierungen, PCR und Northern Blot und (Günther et al., 1998), sowie Abb. 32) generiert. Hierbei wurde ein HBV-1.1mer-Plasmid (HBV-Genotyp D3) als Template, sowie folgender Reaktionsansatz und Temperaturprofil, verwendet.

Reagenz	Menge	Temperatur	Zeit
pZFN_HBV_Gt.D3-3091_1.1mer	10 ng	98 °C	30 s
phos_Will-P1-11_fw [10 µM]	1,25 µl	98 °C	10 s
phos_Will-P2-11_rev [10 µM]	1,25 µl	63 °C	30 s
Q5® Hot Start High-Fidelity Master Mix (2x)	12,5 µl	72 °C	90 s
dH ₂ O	add 25 µl	72 °C	2 min
		4 °C	∞

30
Zyklen

Außerdem wurden ebenfalls mittels PCR und den oben genannten das Vollgenom amplifizierenden bereits phosphorylierten Primern HBV-1.0mere aus humanem Serum HBV-positiver Patienten generiert. Hierzu wurden zunächst die viralen Nukleinsäuren (siehe 3.4.4. Isolierung viraler Nukleinsäuren aus Zellkulturüberständen und humanem Serum) isoliert und das HBV-Vollgenom anschließend mittels Platinum™ SuperFi II PCR Mastergemisch (2x), mit folgendem Reaktionsansatz und Temperaturprofil, amplifiziert.

Reagenz	Volumen	Temperatur	Zeit
isolierte HBV-DNA / virale Nukleinsäuren	7 µl	98 °C	30 s
phos_Will-P1-11_fw [10 µM]	2,5 µl	98 °C	10 s
phos_Will-P2-11_rev [10 µM]	2,5 µl	60 °C	10 s
Platinum™ SuperFi II PCR Mastergemisch (2x)	25 µl	72 °C	90 s
dH ₂ O	add 50 µl	72 °C	5 min
		4 °C	∞

35
Zyklen

Schließlich wurden die PCR-Amplifikate auf ein Ethidiumbromid-Agarosegel (1 %) aufgetragen und nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA nach Größe, das entsprechende ca. 3,2 kbp große Vollgenom ausgeschnitten und mittels Monarch DNA Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben gereinigt. Zunächst wurden die so gewonnenen HBV-1.0mere nun direkt für die transiente

Transfektion verwendet (siehe 3.1.2. Transiente Transfektion von Hepatomzelllinien) oder zuvor vorerst noch mittels T4 DNA Ligase ligiert. Hierbei wurde das Protokoll aus (Tu et al., 2020) etwas abgewandelt und folgender Reaktionsansatz, sowie das entsprechende Temperaturprofil, verwendet.

Reagenz	Menge	Temperatur	Zeit
lineare phosphorylierte HBV-1.0mere	20 μ l	16 °C	2 h
rCutSmart® Buffer (10x)	3 μ l	80 °C	20 min
T4 DNA Ligase	500 U	4 °C	5 min
ATP [10 mM]	3 μ l		
dH ₂ O	add 30 μ l		

Um schließlich noch ggf. vorkommende lineare DNA-Fragmente zu entfernen, wurde hier der jeweilige Reaktionsansatz noch mittels Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase nach Herstellerangaben inkubiert.

Generierung von rekombinanter HBV cccDNA für die Virusproduktion

Zur Generierung von HBV rcccDNA für die Virusproduktion (siehe 3.1.5. Generierung von rekombinanten HBV *in-vitro*) wurden auch hier zunächst mittels PCR HBV-1.0mere, ebenfalls unter Verwendung der oben genannten das Vollgenom amplifizierenden bereits phosphorylierten Primer, generiert. Hierbei wurde so auch ein HBV-1.1mer-Plasmid (HBV-Genotyp D3, ggf. mit Mutation für die HB01-Antikörperbindestelle) als Template, sowie folgender Reaktionsansatz und Temperaturprofil, verwendet.

Reagenz	Menge	Temperatur	Zeit
pCH9_HBV_Gt.D3-3091_1.1mer oder pCH9_HBV_Gt.D3-3091_M125T_1.1mer	1,6 μ g	95 °C	2 min
phos_Will-P1-11_fw [10 μ M]	200 μ l	98 °C	10 s
phos_Will-P2-11_rev [10 μ M]	200 μ l	63 °C	30 s
GoTaq® G2 DNA Polymerase Master Mix	2 ml	72 °C	3 min
dH ₂ O	add 4 ml	72 °C	5 min
		4 °C	∞

30
Zyklen

Anschließend wurden diesem Reaktionsansatz nun 80 μ l DpnI hinzugefügt und dieser entsprechend für 2,5 Stunden bei 36 °C inkubiert. Es folgte die Aufreinigung des Reaktionsansatzes mittels innuPREP PCRpure Kit nach Herstellerangaben, sowie anschließend die transiente Transfektion von HepG2 Tet-On® Advanced Zellen zur Virusproduktion (siehe 3.1.5. Generierung von rekombinanten HBV *in-vitro*).

3.4.2. Isolierung von RNA, genomischer DNA und Gesamtprotein aus Zellen

Zur Aufreinigung von RNA für Northern Blot Analysen, genomischer DNA und Gesamtprotein für Western Blot Analysen aus Zellen wurde das TRIzol™ Reagenz verwendet. Hierbei wurden die adhärenen Zellen mit PBS gewaschen und anschließend (je Well einer 6-Well-Mikrotiterplatte) 500 µl TRIzol™ Reagenz auf den Zellrasen getropft. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert, in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und das Lysat weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Chloroform zugeben und die Proben bei gelegentlichem Invertieren weitere 15 min bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 15 min bei 12.000 xg und 4°C konnten die Proben so in eine obere, wässrige und farblose Phase, welche die RNA enthielt, sowie, noch schwer zu trennend, eine untere, rötliche, organische Phase und eine Interphase, welche Protein und DNA enthielten, aufgeteilt werden.

Nach Abnahme der wässrigen Phase wurden dieser nun 250 µl Isopropanol zugegeben, die Probe mehrfach invertiert und für 30 bis 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten anschließend eine Zentrifugation für 15 min mit 12.000 xg bei 4°C zum pelletieren der ausgefällten RNA, sowie zweimaliges Waschen des daraus resultierenden Pellets mit 75 % Ethanol (reinst.). Langfristig konnte nun die RNA als Pellet in 75 % Ethanol (reinst.) bei -20 °C gelagert werden oder das RNA-Pellet in ca. 40 µl DNase/RNase-freiem destilliertem Wasser gelöst und die gelöste RNA anschließend bei -70 °C gelagert werden. Die entsprechende RNA-Konzentration wurde mittels Picodrop Spektralphotometer ermittelt.

Um zwischenzeitlich nun Gesamtprotein und genomische DNA der Zellen zu isolieren wurde entsprechend den noch nicht separierten Phasen (Interphase und organische Phase) 150 µl Ethanol (reinst.) zugegeben, die Probe mehrfach invertiert und für fünf Minuten bei 2.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Zur Aufreinigung des Gesamtproteins wurde der nach Zentrifugation verbliebene Überstand separiert und so in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Das entstandene Pellet, bestehend aus ausgefällter DNA, konnte nun nochmals mit Ethanol (reinst.) gewaschen und anschließend in 100 µl DNase/RNase-freiem destilliertem Wasser gelöst bei -20 °C gelagert werden. Hierbei wurde Die entsprechende DNA-Konzentration mittels Picodrop Spektralphotometer ermittelt. Um das noch im Überstand enthaltene Gesamtprotein auszufällen wurden diesem nun 1 ml Isopropanol hinzugefügt, die Proben invertiert und für 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgte die Zentrifugation der Proben für 10 min mit 12.000 xg bei 4°C. Das entstandene Pellet wurde nun dreimal für 15 min bei Raumtemperatur in 300 mM Guanidinhydrochlorid 2,5 % Glycerol [v/v] in 95 % Ethanol (reinst.) inkubiert und anschließend jeweils für 5 min mit 8.000 xg bei 4 °C zentrifugiert. Darauffolgend wurde das Protein-Pellet nun für 15 min bei Raumtemperatur in Ethanol (reinst.) inkubiert und anschließend jeweils für 5 min mit 8.000 xg bei 4 °C zentrifugiert. Letztlich wurde das Pellet nun für 20 min im Reaktionsgefäß-Heizblock bei 50 °C getrocknet und

anschließend in 140 µl OPT-Lysepuffer über Nacht bei 50 °C schüttelnd (120 rpm) gelöst (siehe auch 3.5.1. Lysieren von Zellen und Vorbereitung von Proben für Western Blot Analysen). Die entsprechende Protein-Konzentration konnte ggf. mittels Picodrop Spektralphotometer ermittelt werden.

3.4.3. Northern Blot zur Detektion genomischer und antigenomischer HDV-RNA

Zunächst wurde ein denaturierendes Agarosegel (1 % (w/v) Agarose und 6 % (v/v) Formaldehyd in 1x MOPS, zzgl. 1x GelRed® Nucleic Acid Stain) angefertigt. Alle Agarosegele, Lösungen, Verdünnungen und Puffer wurden auch folgend zur Durchführung von Northern Blot Analysen mit autoklaviertem DEPC-H₂O [0,9 ml/l] angesetzt (siehe auch 2.9. Chemikalien, Lösungen und Puffer). Nun wurden 5-10 µg isolierte RNA (siehe 3.4.2. Isolierung von RNA, genomischer DNA und Gesamtprotein aus Zellen) HDV-infizierter Zellen (siehe 3.2.1. Infektion mit rekombinanten pseudotypisierten HDV *in-vitro*) mit RNA Loading Dye (2x, Verhältnis 1:1 (v/v)) vereinigt und für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis folgte der Probenauftrag. In 1x MOPS und mittels BRL Horizon 11-14 Horizontal-Elektrophorese-System erfolgte nun die elektropoetische Auftrennung bei 25 V für ca. 16 Stunden oder bei 105 V für drei Stunden. Hierbei wurde der 1x MOPS stets mittels Masterflex™ L/S Peristaltikpumpe umverteilt. Anschließend folgte die Inkubation des Agarosegels zunächst für 30 min in Gel-Denaturierungspuffer, sowie für ebenfalls 30 min in Gel-Neutralisierungspuffer. Zwischenzeitig wurde mittels TFX-20.M UV-Lampe die Qualität der RNA anhand der so sichtbaren (16S- und) 28S rRNA fotografisch dokumentiert. Letztlich wurde das Agarosegel, sowie die Hybond-N+ Nylonmembran, für 10 Minuten mit 10x SSC inkubiert. Der RNA-Transfer erfolgte ebenfalls in 10x SSC mittels VacuGene XL Vacuum Blotting System bei 0,2 bar für 2 Stunden. Zur Fixierung der RNA auf der Hybond-N+ Nylonmembran erfolgte die Belichtung im Stratalinker UV 2400 Crosslinker (dreimal 1200 µJ x [100]). Anschließend wurde die Hybond-N+ Nylonmembran für eine Stunde bei 68 °C in PerfectHyb™ Plus Hybridisierungspuffer im Hybridisierungsöfen OV 2000 prähybridisiert.

Zur Detektion von antigenomischer HDV-RNA wurde zunächst das dem für die Infektion verwendeten HDV-Genotyp entsprechende 1.0mer-Plasmid (siehe 2.5. Expressionsvektoren und weitere Oligonukleotide) mittels BamHI Restriktionsenzym nach Herstellerangaben linearisiert und anschließend mittels Monarch PCR & DNA Cleanup Kit aufgereinigt.

Wohingegen zur Detektion von genomischer HDV-RNA zunächst ebenfalls das dem für die Infektion verwendeten HDV-Genotyp entsprechende 1.0mer-Plasmid verwendet wurde, hierbei jedoch eine PCR zur Amplifikation des HDV-Genoms sowie der Anfügung eines T7-Promoters in Richtung des HDV-Antigenoms durchgeführt (Primer siehe ‚Northern Blot: Detektion genomischer HDV-RNA‘ in 2.5.2. Verwendete Primer und Sonden für Klonierungen, PCR und Northern Blot). Hierbei wurde das Platinum™ SuperFi II PCR Mastergemisch unter Herstellerangaben verwendet.

Anschließend wurde hier ein Agarosegel (1 %) angefertigt und nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA nun, um nach PCR verbleibendes 1.0mer-Plasmid zu entfernen, das entsprechende ca. 1680 bp große PCR-Produkt ausgeschnitten und mittels Monarch DNA Gel Extraction Kit aufgereinigt. Folgend wurde jeweils eine *in-vitro* Transkription mit entsprechendem Reaktionsansatz durchgeführt.

Reagenz	Menge
linearisiertes 1.0mer-Plasmid (Detektion antigenomischer HDV-RNA) oder gereinigtes PCR-Produkt (Detektion genomischer HDV-RNA)	500 ng
rNTP-Mix (low rUTP) (rATP, rCTP, rGTP [25 mM]; rUTP [5 mM])	2 µl
[α - ³² P] rUTP	3 µl
RNAPol Reaction Buffer (10x)	2 µl
RNase Inhibitor, Murine	0,5 µl
T7 RNA Polymerase	2 µl
dH ₂ O	add 20 µl

Die Inkubation des Reaktionsansatzes zur *in-vitro* Transkription erfolgte bei 37 °C für mindestens vier Stunden (Detektion antigenomischer HDV-RNA) oder über Nacht (Detektion genomischer HDV-RNA), anschließend wurden verbliebene freie Nukleotide mittels MicroSpin™ G-25 Columns nach Herstellerangaben entfernt.

Nach Zugabe der entsprechenden die antigenomische oder genomische HDV-RNA detektierenden Sonde zum Hybridisierungspuffer, wurden entsprechend die auf der Hybond-N+ Nylonmembran befindliche RNA so über Nacht bei 68°C hybridisiert. Der Hybridisierung folgend wurde die Hybond-N+ Nylonmembran nun einmal für fünf Minuten in Low Stringency Waschpuffer bei Raumtemperatur, anschließend einmal für 10 Minuten und ein weiteres Mal für 30 Minuten in High Stringency Waschpuffer bei 68 °C, sowie schließlich einmal für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit Ultra High Stringency Waschpuffer gewaschen. Letztlich wurde der Northern Blot nun über Nacht in einer Autoradiographiefilm BAS 2025 Cassette 2 positioniert und der entsprechende Autoradiographiefilm am nächsten Tag mittels Amersham™ Typhoon™ Biomolecular Imager entwickelt. Hierbei wurde eine Quantifizierung der ermittelten densitometrischen Signalstärke des im Northern Blot detektierten Signals für genomische oder antigenomische HDV-RNA, sowie der im Agarosegel sichtbaren ribosomalen 28S rRNA, mittels Image Studio Lite Software (Version 5.2) durchgeführt.

3.4.4. Isolierung viraler Nukleinsäuren aus Zellkulturüberständen und humanem Serum

Um Nukleinsäuren aus viralen Partikeln enthalten in Zellkulturüberständen oder humanem Serum aufzureinigen wurde das High Pure Viral Nucleic Acid Kit nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei wurden die viralen Nukleinsäuren mit 50 µl auf 70 °C erwärmtem DNase/RNase-freiem destilliertem Wasser eluiert. Bis zur weiteren Verwendung (siehe 3.4.5. Quantifizierung rekombinanter HBV und pseudotypisierter HDV) wurden die nun isolierten viralen Nukleinsäuren bei -70 °C gelagert.

3.4.5. Quantifizierung rekombinanter HBV und pseudotypisierter HDV

Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) zur Quantifizierung rekombinanter HBV

Um die generierten rekombinanten HBV (3.1.5. Generierung von rekombinanten HBV *in-vitro*) zu quantifizieren, wurden aus den produzierten die rekombinanten HBV enthaltenden Zellkulturüberständen oder -Konzentraten die viralen Nukleinsäuren isoliert (siehe 3.4.4. Isolierung viraler Nukleinsäuren aus Zellkulturüberständen und humanem Serum) und anschließend eine quantitative PCR (qPCR) nach (Drosten et al., 2000) durchgeführt. Hierzu wurde eine LightCycler 480 Multiwell Plate 96, sowie folgender Reaktionsansatz (Primer und Probe Sequenzen siehe 2.5.2. Verwendete Primer und Sonden für Klonierungen, PCR und Northern Blot) verwendet.

Reagenz	Volumen
cdbs1 + cdbs2 + cdbs3 (Mischung) [10 µM]	1,2 µl
cdba [10 µM]	1,2 µl
cdq380 [10 µM]	0,8 µl
Takyon™ No ROX Probe MasterMix Blue dTTP (2x)	10 µl
HBV-DNA / virale Nukleinsäuren	2 µl (zuletzt hinzugefügt)
dH ₂ O	4,8 µl

Letztlich erfolgte die qPCR mittels LightCycler® 480 Instrument II, unter folgendem Temperatur- und Messungsprofil. Zur Quantifizierung diente hier ein ebenso aus rekombinant generierten HBV hergestellter bereits evaluierter DNA-Standard (HBV-Genotyp D3-3091 (Nassal et al., 1990)).

	Aktivierung	Amplifikation	Abkühlung
Temperatur	95 °C	95 °C	60 °C
Zeit	3 min	10 s	40 s
Quantifizierung	-	-	single
Zyklen	1x	45x	1x

Reverse Transkription und quantitative Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) zur Quantifizierung rekombinanter pseudotypisierter HDV

Um die generierten pseudotypisierten HDV (3.1.4. Generierung von pseudotypisierten HDV *in-vitro*) zu quantifizieren, wurden aus den die pseudotypisierten HDV enthaltenden Zellkulturüberständen oder -Konzentraten zunächst die viralen Nukleinsäuren isoliert (siehe 3.4.4. Isolierung viraler Nukleinsäuren aus Zellkulturüberständen und humanem Serum) und anschließend eine quantitative RT-PCR (*Real-Time quantitative Reverse Transcription PCR*) durchgeführt. Zunächst wurden die Zellkulturüberstände in einer LightCycler 480 Multiwell Plate 96 allerdings mit DNase I inkubiert, um mögliche verbliebene Plasmid-DNA zu entfernen. Hierzu diente folgender Reaktionsansatz und Temperaturprofil.

Reagenz	Volumen	Temperatur	Zeit
HDV-RNA / virale Nukleinsäuren	5 µl	37 °C	1 h
DNase I Reaktionspuffer mit MgCl ₂ (10x)	0,9 µl	95 °C	1 min
DNase I, RNase-frei	2 µl		
dH ₂ O	1,1 µl		

Zur Quantifizierung diente hier ein *in-vitro* transkribierter HDV-RNA-Standard. Schließlich wurde folgender Reaktionsansatz (Primer und Probe Sequenzen siehe 2.5.2. Verwendete Primer und Sonden für Klonierungen, PCR und Northern Blot) für die qRT-PCR verwendet, bzw. hinzugefügt.

Reagenz	Volumen	
Reaktionsansatz aus DNase I Verdau	9 µl	(bereits vorgelegt)
HDV-F / HDV-F1378-wobble [10 µM]	1 µl	
HDV-R [10 µM]	1 µl	
HDV-P [10 µM]	0,5 µl	
TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (4x)	5 µl	
dH ₂ O	3,5 µl	

Letztlich erfolgte die qRT-PCR mittels LightCycler® 480 Instrument II, unter folgendem Temperatur- und Messungsprofil.

	Reverse Transkription	RT- Inaktivierung	Amplifikation		
Temperatur	53 °C	95 °C	95 °C	64 - 60 °C	72 °C
Temperatursenkung				0,5 °C/Z	
Zeit	5 min	20 s	20 s	30 s	10 s
Temperturänderungsrate	4,4 °C/s	4,4 °C/s	4,4 °C/s	2,2 °C/s	4,4 °C/s
Quantifizierung	-	-	-	single	-
Zyklen	1x	1x	45x		

3.4.6. Vektor-Klonierungen (FastCloning nach Li et al., 2011)

Um Untersuchungen bezüglich der HBV cccDNA durchzuführen wurden die beiden Vektoren pcDNA3.1⁽⁺⁾_HBV_Gt.D3-3091_M125T_1.5mer und pMC_HBV_Gt.D3-3091_M125T_cccDNA (parental) kloniert. Hierbei wurde die FastCloning-Methode nach (C. Li et al., 2011) verwendet, jedoch etwas abgewandelt. Dennoch wurden so mittels PCR DNA-Fragmente generiert, welche an ihren 5'- und 3'-Enden jeweils komplementäre Überhänge als Überlapp zum anzugliedernden Fragment hatten. Diese Überhänge hatten eine Länge von 10-24 Nukleotiden und beinhalteten ggf. gewünschte Mutationen (M125T, Mutation für die Bindung des Antikörpers HB01). Die verwendeten Primerpaare (siehe auch 2.5.2. Verwendete Primer und Sonden für Klonierungen, PCR und Northern Blot, ‚Vektor-Klonierungen‘) zur Generierung der entsprechenden Fragmente, setzten sich wie der folgenden Abbildung zu entnehmen zusammen.

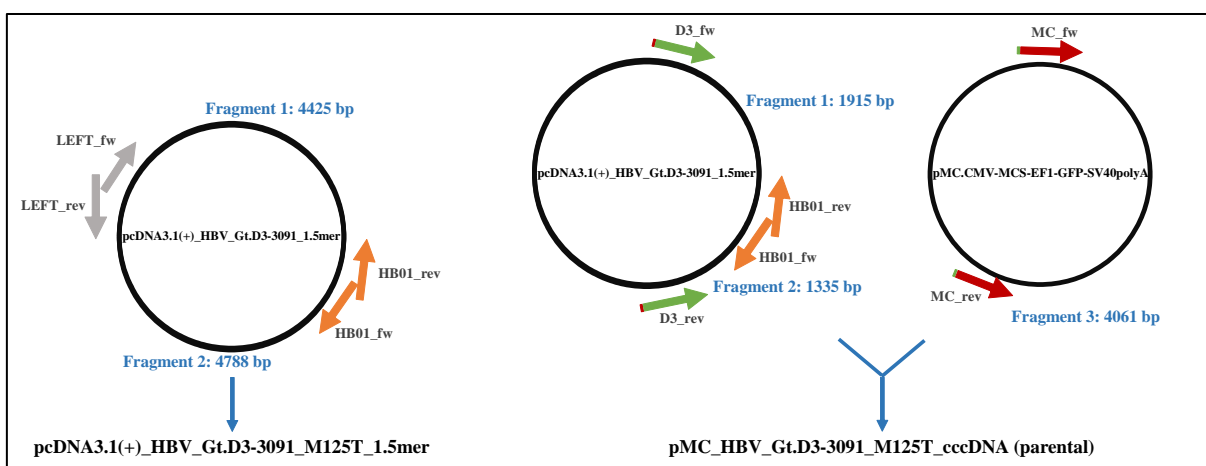


Abb. 7: Schemata zur Generierung der Fragmente für die Klonierung von pcDNA3.1⁽⁺⁾_HBV_Gt.D3-3091_M125T_1.5mer und pMC_HBV_Gt.D3-3091_M125T_cccDNA (parental) mittels PCR

Dargestellt sind die jeweils zwei (für pcDNA3.1⁽⁺⁾_HBV_Gt.D3-3091_M125T_1.5mer) oder drei (pMC_HBV_Gt.D3-3091_M125T_cccDNA (parental)) Fragmente (blau), welche hier mittels PCR, unter Verwendung der mittig beschriebenen ursprüngl. Donor-Vektoren und genannten Primer, generiert und zur Klonierung verwendet wurden.

Die in Abb. 7 dargestellten Fragmente wurden mittels PCR anhand des Folgenden Reaktionsansatzes, sowie dem gezeigten Temperaturprofil nach Herstellerangaben, generiert.

Reagenz	Menge	Temperatur	Zeit
Donor-Vektor	5 ng	98 °C	3 min
Phusion HF-Puffer (5x)	5 µl	98 °C	10 s
dNTPs [2,5 mM]	2,5 µl	66 °C	30 s
Primer fw / rev [10 µM]	je 0,5 µl	72 °C	20 s / kb
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	0,25 µl	72 °C	5 min
dH ₂ O	add 25 µl		

18
Zyklen

Nach Generierung der Fragmente wurden je zu klonierendem Konstrukt entsprechend aus jedem Ansatz der jeweiligen Fragment-Amplifikate 5 µl vereinigt, je Fragment 0,25 µl DpnI hinzugefügt

und der entstandene Reaktionsansatz für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden nun *E. coli* Stellar™ Competent Cells mittels Zugabe von je 5 µl des jeweiligen Reaktionsansatzes transformiert (siehe 3.3.1. Transformation von Bakterien (*E. coli* Stellar™ Competent Cells)), auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (pcDNA3.1⁽⁺⁾_HBV_Gt.D3-3091_M125T_1.5mer: Carbenicillin [100 µg/ml]; pMC_HBV_Gt.D3-3091_M125T_cccDNA (parental) mittels PCR: Kanamycin [50 µg/ml]) ausplattiert und das jeweilige klonierte Plasmid nun durch Kultivierung einzelner Bakterienkolonien, als entsprechende Kultur mit 40 ml LB-Medium (zzgl. Selektionsantibiotikum s.o.), amplifiziert (siehe 3.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakteriensuspensionen). Die Sanger-Sequenzierung der Plasmide erfolgte durch LGC Genomics GmbH (Berlin, DE).

3.4.7. Klonierung von Gen-spezifischen sgRNA-Sequenzen in lentiCRISPRv2

Um später durch Transduktion mit den für diese Arbeit generierten Lentiviren (siehe 3.2.2. Produktion von Lentiviren durch transiente Transfektion von HEK293T Zellen mittels Calciumphosphat-Methode und Transduktion von Huh7-NTCPMPL Zellen) das Genom der Huh7-NTCP^{MPL} Zellen stabil zu modifizieren, wurde das CRISPR/Cas9-System (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated protein 9*) angewendet, sprich zuvor entsprechende Gen-spezifische sgRNA-Sequenzen in den Expressionsvektor lentiCRISPRv2, dem hierzu publizierten Protokoll (Sanjana et al., 2014; Shalem et al., 2014) folgend, kloniert. Schließlich sollte so nach lentiviraler Transduktion der Huh7-NTCP Zellen hier durch gezieltes Schneiden der DNA durch Cas9 *Knock-Out*-Zellen generiert werden.

Hierzu wurden zunächst die entsprechenden Oligonukleotide phosphoryliert und zeitgleich ligiert. Verwendet wurden hier je Oligonukleotid-Paar (2.5.3. Verwendete sgRNAs (als Oligonukleotide) zur Klonierung in lentiCRISPRv2 zum induzierten gezielten Gen-*Knock-Out*) ein Reaktionsansatz, sowie das Temperaturprofil im MiniAmp™ Thermocycler, wie folgend dargestellt:

Reagenz	Volumen	Temperatur	Zeit
Oligonukleotide (ss, [100 µM])	je 1 µl	37 °C	30 min
T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10x)	1 µl	95 °C	5 min
T4-Polynukleotid-Kinase	0,5 µl	25 °C	∞
dH ₂ O	add 10 µl		

Das entsprechende Ligationsprodukt wurde anschließend nun 1:250 verdünnt. Es folgte der enzymatische Restriktionsverdau mittels BsmBI / Esp3I des nun phosphorylierten doppelsträngigen sgRNA-Oligonukleotids, sowie des Vektors lentiCRISPRv2, zeitgleich mit der Ligation beider Fragmente. Hierbei wurde der folgende Reaktionsansatz, sowie das entsprechende Temperaturprofil im MiniAmp™ Thermocycler, verwendet:

Reagenz	Menge	Temperatur	Zeit	
phosphoryliertes <i>ds</i> Oligonukleotid	2 μ l	37 °C	5 min	6 Zyklen
lentiCRISPRv2 Vektor	100 ng	23 °C	5 min	
Tango Buffer (10x)	2 μ l	4 °C	∞	
DTT [10 mM]	1 μ l			
ATP [10 mM]	1 μ l			
BsmBI / Esp3I	1 μ l			
T7 DNA Ligase	0,5 μ l			
dH ₂ O	add 20 μ l			

Anschließend wurden nun *E. coli* Stellar™ Competent Cells mittels Zugabe von 2 μ l des Ligationsansatzes transformiert (siehe 3.3.1. Transformation von Bakterien (*E. coli* Stellar™ Competent Cells)), auf LB-Agar-Platten mit dem Selektionsantibiotikum Carbenicillin [100 μ g/ml] ausplattiert und das jeweilige klonierte Plasmid nun durch Kultivierung einzelner Bakterienkolonien, als entsprechende Kultur mit 40 ml LB-Medium (zzgl. Carbenicillin [100 μ g/ml]), amplifiziert (siehe 3.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakteriensuspensionen). Die Sanger-Sequenzierung der Plasmide erfolgte durch Microsynth AG (Balgach, CH).

Letztlich wurden die klonierten und nun vervielfältigten Vektoren mittels OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit aufgereinigt und hierbei mit je 130 μ l DNase/RNase-freiem destilliertem Wasser eluiert, sowie anschließend die entsprechende DNA-Konzentration mittels Picodrop Spektralphotometer ermittelt und folgend Lentiviren produziert (siehe 3.2.2. Produktion von Lentiviren durch transiente Transfektion von HEK293T Zellen mittels Calciumphosphat-Methode und Transduktion von Huh7-NTCP^{MPL} Zellen).

3.4.8. Analyse rekombinanter HBV mittels linearer CsCl-Gradienten

Zur Analyse rekombinanter HBV wurden lineare CsCl-Gradienten angefertigt. Hierbei wurden 2,24 ml 24 % CsCl (1,21 g/ml in TNE) und 1,76 ml 42 % CsCl₂ (1,42 g/ml in TNE) mittels Gradientenmischer, sowie der Masterflex™ L/S Peristaltikpumpe mit Masterflex™ L/S Easy-Load II Pumpenkopf, in silikonisierten (Sigmacote®) OPEN-TOP POLYCLEAR™ TUBES linear geschichtet. Unmittelbar nach Anfertigung der Gradienten wurden je 400 μ l Viruskonzentrat mit zzgl. 100 μ l TNE aufgeschichtet. Vergleichsweise wurden hier auch zwei Gradienten mit humanem Serum eines HBV-positiven Patienten angefertigt. Hierfür wurde dieses (ebenfalls je 400 μ l) zunächst für eine Stunde mit 100 μ l TNE oder 5 % Nonidet P-40 mit 250 mM TCEP in TNE (f.c. 1 % Nonidet P-40 mit 50 mM TCEP) bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend für 15 min bei 10.000 xg zentrifugiert und der resultierende Überstand nun auf den entsprechenden Gradienten aufgeschichtet. Unter Verwendung des Rotors SW60TiD wurden die Gradienten nun mittels

Optima™ L-70K Ultrazentrifuge für 18 Stunden bei 10 °C und 37.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden Fraktionen von ca. 300 µl aliquotiert und hier für jede Fraktion sowohl mittels Refraktometer die jeweilige Dichte des CsCl bestimmt, als auch virale Nukleinsäuren isoliert und so mittels qPCR eine Quantifizierung der rekombinanten HBV durchgeführt (siehe 3.4.4. Isolierung viraler Nukleinsäuren aus Zellkulturüberständen und humanem Serum und 3.4.5. Quantifizierung rekombinanter HBV und pseudotypisierter HDV).

3.5. Proteinbiochemische Methoden

3.5.1. Lysieren von Zellen und Vorbereitung von Proben für Western Blot Analysen

Um Zellen für Western Blot Analysen zu lysieren, wurden die adhären wachsenden Zellen einmal mit PBS gewaschen, dieses komplett von den Zellen entfernt und infolgedessen dem bloßen Zellrasen (je Well einer 6-Well-Mikrotiterplatte) 140 µl OPT-Lysepuffer (siehe 2.9. Chemikalien, Lösungen und Puffer) zugegeben. Nach einer Inkubation von zwei Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen vom Boden der Mikrotiterplatte gelöst, resuspendiert, anschließend in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und über Nacht bei 50 °C schüttelnd (120 rpm) inkubiert. Die entsprechende Protein-Konzentration konnte ggf. mittels Picodrop Spektralphotometer ermittelt werden. Bis zur weiteren Analyse mittels Western Blot (siehe 3.5.2. Diskontinuierliche SDS-PAGE, Western Blot (*semi-dry*) und Immundetektion von Proteinen) wurden die Zellysate nun bei -20 °C gelagert.

3.5.2. Diskontinuierliche SDS-PAGE, Western Blot (*semi-dry*) und Immundetektion von Proteinen

Zur Auftrennung von aus Zellen isolierten Proteinen (siehe 3.4.2. Isolierung von RNA, genomischer DNA und Gesamtprotein aus Zellen oder 3.5.1. Lysieren von Zellen und Vorbereitung von Proben für Western Blot Analysen) in Abhängigkeit zu ihrer Molekülmasse wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) durchgeführt. Für die Anfertigung der Proben wurden 5 - 8 µl Zellysat oder Gesamtprotein mit Laemmli Sample Buffer (1x), DTT [50 mM] und UltraPure™ DNase/RNase-freien destillierten Wasser zu einem Probenvolumen von ca. 12 µl angesetzt und zur Denaturierung der Proteine bei 95°C für 5 Minuten erhitzt. Neben den nun generierten Proben wurde zudem ein Protein-Größenmarker (Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10-250 kDa) oder PageRuler™ Prestained Protein Ladder) aufgetragen. Das verwendete SDS-Polyacrylamidgel setzte sich wie folgend zusammen.

	Sammelgel (4 %)	Trenngel (14 %)
dH ₂ O	1,50 ml	1,50 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	1,45 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	625 µl	-
ROTIPHORESE®Gel 30 (37,5:1)	350 µl	2,70 ml
10 % (w/v) SDS	25 µl	57,15 µl
10 % APS	25 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Unter Verwendung des Mini-PROTEAN Tetra Cell Vertikal-Elektrophorese-Sets befüllt mit Laemmli-Laufpuffer (siehe 2.9. Chemikalien, Lösungen und Puffer), folgte nun die die Auftrennung der Proteine bei einer elektrischen Spannung von erst 100 V für 20 Minuten und anschließend für bei 170 V für weitere 80 Minuten. Zur späteren Abbildung der aufgetrennten Proteine mittels Immundetektion wurde das SDS-Polyacrylamidgel im Western Blot weiterverwendet.

Hierbei wurden die aufgetrennten Proteine so nun auf eine Immobilon®-P PVDF-Membran transferiert. Diese wurde zunächst für drei Minuten in Methanol inkubiert und schließlich in Transferpuffer (siehe 2.9. Chemikalien, Lösungen und Puffer) äquilibriert. Die Durchführung des Western Blots erfolgte mittels der Fastblot B33 Elektrophoresezelle bei einer konstanten Stromstärke von 2,5 mA / cm² Trägermembran für 30 - 45 Minuten, ebenfalls unter Verwendung des Transferpuffers, mit folgendem Aufbau (Anode → Kathode):

2 Whatman™-Papiere - Immobilon®-P PVDF-Membran - SDS-Polyacrylamidgel - 2 Whatman™-Papiere

Zur Blockierung möglicher unspezifischer Bindestellen des im folgenden verwendeten Primärantikörpers, folgte die Inkubation der Immobilon®-P PVDF-Membran für eine Stunde schwenkend in 5% (w/v) Magermilch in TBS-T, woran sich schließlich die Inkubation mit dem Protein-spezifischen primären Antikörper (siehe Primärantikörper) schüttelnd über Nacht bei 4°C oder für zwei Stunden bei Raumtemperatur anschloss. Folgend wurde die Immobilon®-P PVDF-Membran nun zweimal für fünf Minuten schwenkend mit TBS-T, sowie zweimal für fünf Minuten schwenkend mit TBS, gewaschen und anschließend für zwei Stunden mit dem entsprechenden HRP(Meerrettichperoxidase)-gekoppelten sekundären Antikörper (siehe Sekundärantikörper) schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen der Immobilon®-P PVDF-Membran folgte, unter Verwendung des Clarity Max Western ECL Substrate nach Herstellerangaben, die Detektion der jeweiligen Primärantikörper-spezifischen Proteine anhand des ChemoCam Imager. Hierbei wurde ggf. eine Quantifizierung der ermittelten densitometrischen Signalstärke mittels Image Studio Lite Software (Version 5.2) durchgeführt.

3.5.3. Diagnostische Nachweisverfahren: Bestimmung von HBsAg (quantitativ) und HBeAg (qualitativ)

Um sekretiertes HBsAg oder HBeAg in Zellkulturüberständen von mit rekombinanten HBV oder pseudotypisierten HDV infizierten Zellen, sowie von mit HBV-/HDV-Expressionskonstrukten transfizierten Zellen, zu bestimmen, wurden diagnostische Nachweisverfahren durchgeführt (Virusdiagnostik, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, DE; HBsAg (*quantitative Abbott Architect assay*) und HBeAg (*qualitative Abbott Architect assay*)).

3.5.4. Immunpräzipitation zum Nachweis von HBV in Zellkulturüberständen

HepG2 Tet-On® Advanced Zellen wurden transient mit den Expressionsplasmiden des HBV-Genotypen-Panels (siehe 2.5. Expressionsvektoren und weitere Oligonukleotide) transfiziert (siehe 3.1.2. Transiente Transfektion von Hepatomzelllinien) und anschließend für 5 Tage kultiviert. Um sekretierte rekombinante HBV und subvirale Partikel aus ebendiesen Zellkulturüberständen zu konzentrieren, wurde eine Immunpräzipitation unter Verwendung des murinen monoklonalen anti-präS1-Antikörpers MA18/7 (Sominskaya et al., 1992) durchgeführt. Zunächst wurden 1 mg Dynabeads™ M-280 Schaf Anti-Maus IgG nach Herstellerangaben mit 20 µg des anti-präS1-Antikörpers MA18/7 beschichtet. Folgend wurden diese zweimal mit 1 % BSA in PBS, anschließend zweimal mit 1 % BSA und 0,2 % Triton-X-100 in PBS, sowie letztlich einmal mit 1 % BSA in PBS, gewaschen. Zur Bindung der HBV und subviralen Partikel wurden nun je 0,3 mg Antikörper-beschichtete Dynabeads™ mit 200 µl Zellkulturüberstand rotierend bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Antikörper-beschichteten Dynabeads™, welche folglich nun die im Zellkulturüberstand befindlichen HBV und subviralen Partikel gebunden hatten, erneut gewaschen (wie s.o.) und anschließend in je 200 µl 1 % BSA in PBS resuspendiert. Es folgte nun die Isolierung der viralen Nukleinsäuren mittels innuPREP Virus DNA/RNA Kit nach Herstellerangaben, wobei diese schließlich mit 50 µl auf 70 °C erwärmtem DNase/RNase-freiem destilliertem Wasser eluiert wurden. Anschließend wurde die nach transients Transfektion der HepG2 Tet-On® Advanced Zellen möglicherweise im Zellkulturüberstand verbliebene Plasmid-DNA mittels DpnI-Restriktionsverdau entfernt und so schließlich eine Quantifizierung der rückschließend im Zellkulturüberstand befindlichen rekombinanten HBV mittels qPCR (siehe 3.4.5. Quantifizierung rekombinanter HBV und pseudotypisierter HDV) durchgeführt.

3.6. Bioinformatische Methoden

Die Berechnung der Signifikanz wurde mit Hilfe von GraphPad Prism (Version 7.03; GraphPad Software, Inc, Boston, US) unter Verwendung der in den Abbildungen angegebenen Tests durchgeführt.

Die densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen und Northern Blot Analysen erfolgte mittels Image Studio Lite Software (Version 5.2; Li-cor Biosciences GmbH, Bad Homburg vor der Höhe, DE).

Die Bildgebungsaufgaben wurden anhand der Mikroskop-Software-Plattform Leica Application Suite X (Version 3.7.3.23245; Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, DE) oder der BZ-X Analysesoftware (KEYENCE DEUTSCHLAND GmbH, Neu-Isenburg, DE) durchgeführt.

Die Auswahl diverser sgRNAs erfolgte unter Verwendung des CHOPCHOP*web tools* (Labun et al., 2016, 2019; Montague et al., 2014).

Vereinzelt wurden DeepL (DeepL SE, Köln, DE) und Scribbr (Scribbr, Amsterdam, NL) zur autographen Korrektur verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Analyse von molekularbiologischen und mikrobiologischen Methoden zur Generierung rekombinanter HBV *in-vitro*

Zentraler Punkt dieser Arbeit war zunächst die Evaluierung verschiedener Methoden, welche zur Untersuchung von HBV-Infektionen *in-vitro* dienen sollten. Hierbei wurde entsprechend nicht nur versucht eine reale Infektion bestmöglich nachzubilden, wobei die Infektion von NTCP-tragenden Hepatomazellen oder primären humanen Hepatozyten als ‚Goldstandard‘ anzusehen ist, sondern auch Wert darauf gelegt unterschiedliche Schritte im HBV-Infektionszyklus separat betrachten zu können. So sollten zuerst die transiente Transfektion diverser HBV-Expressionskonstrukte mit Genomüberlänge, sowie später rekombinante HBV cccDNA, untersucht werden, da hier das Vorhandensein des NTCP als HBV-Rezeptor, nicht notwendig ist und als Teil des HBV-Lebenszyklus so von Analysen exkludiert werden konnte.

Zunächst wurden demnach HepG2 Tet-On® Advanced Zellen mit 1.1mer- und 1.5mer-HBV-Expressionskonstrukten verschiedener HBV-Genotypen transfiziert (Abb. 8). Hierbei war es wichtig zu beachten, dass die Expression bei Verwendung von 1.5mer-Expressionskonstrukten mittels natürlicher Promotoren reguliert wird, jedoch bei Verwendung der 1.1mer-Expressionskonstrukte stattdessen ein vorgeschalteter, hier Doxycyclin-induzierbarer (TRE-tight), CMV-Promoter (*human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter*) regulierend wirkt.

Bei Transfektion der 1.5mer-Expressionskonstrukte wurde, im Vergleich zur Transfektion von 1.1mer-Expressionskonstrukten eine stärkere HBsAg- und HBeAg-Expression und entsprechend Sekretion beobachtet. Der HBV-Subgenotyp F2 wies zudem, im Vergleich zu den weiteren untersuchten HBV-Genotypen, bei Transfektion des 1.1mer-Expressionskonstrukts eine deutlich höhere HBsAg-Expression auf. Bei Transfektion des HBV-Subgenotyps F3 konnte hier weder eine Sekretion von HBeAg noch von HBsAg beobachtet werden (Abb. 8 A, B; F3-M), obwohl schließlich jedoch mittels Immunpräzipitation der sekretierten HBV und subviralen Partikel, sowie entsprechender Quantifizierung mittels qPCR, schließlich rekombinante HBV im Zellkulturüberstand detektiert werden konnten (Abb. 8 C). Bei diesem HBV-Isolat des Subgenotyp F3 handelt es sich um eine HBeAg-negative *Immune Escape* Variante (Mutationen im S-ORF: s120Q, s129P und s145R), die bei einem Patienten im Rahmen einer Reaktivierung nach Immunsuppression beobachtet wurde (Schlabe et al., 2018).

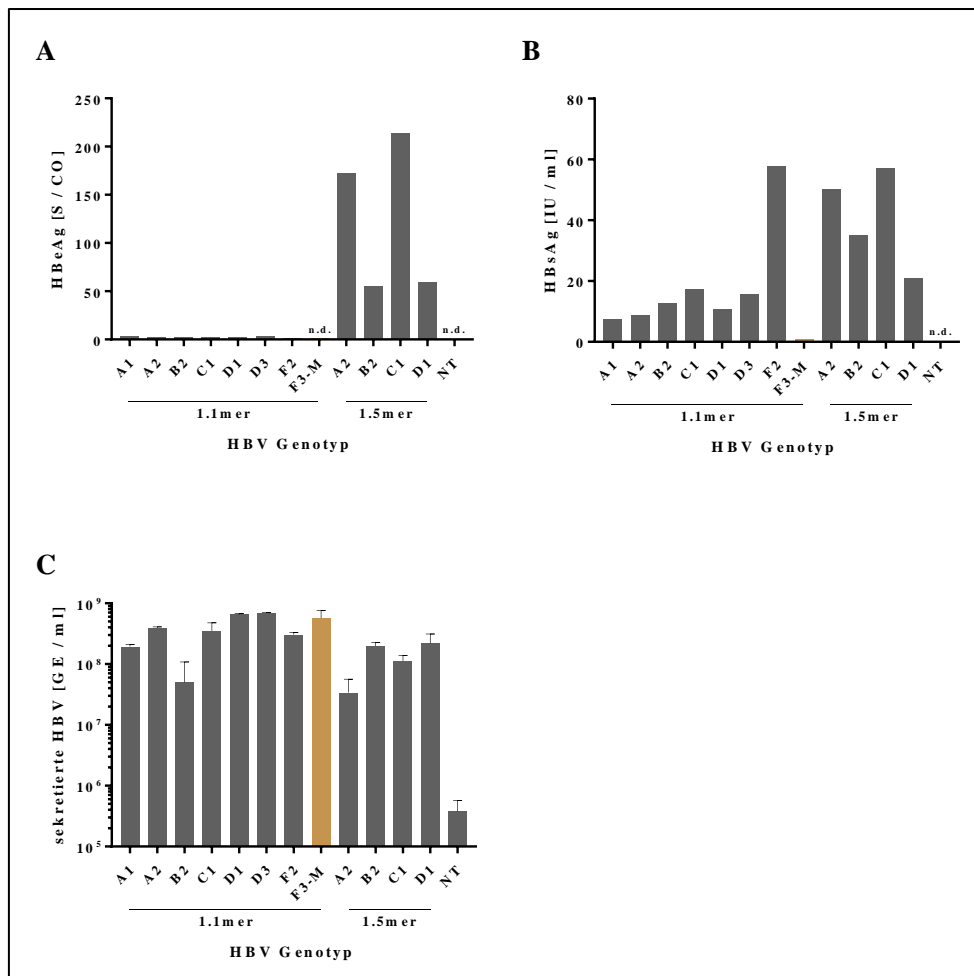


Abb. 8: Analyse der transienten Transfektion von HepG2 Tet-On® Advanced Zellen mit 1.1mer- und 1.5mer-Expressionsvektoren verschiedener HBV-Genotypen

HepG2 Tet-On® Advanced Zellen wurden mittels X-tremeGENE™ HP DNA-Transfektionsreagenz mit 1.1mer- und 1.5mer-Expressionsvektoren verschiedener HBV-Genotypen (1 µg / 24-Well) transfiziert. Entsprechend wurde die Expression bei Transfektion von 1.1mer-Expressionsvektoren mittels Zugabe von 3 µg/ml Doxycyclin zum Kulturmedium induziert. Die Bestimmung von sekretiertem HBeAg (A) und HBsAg (B), sowie die Immunpräzipitation der sekretierten HBV und subviralen Partikel des Zellkulturüberstands und die entsprechende Quantifizierung der rekombinanten HBV (C) erfolgte an Tag sechs nach Transfektion. Die HBV-(Sub)genotypen A1, A2, B2, C1, D1, D3 und F2 sind Wildtyp-Isolate. Bei dem HBV-Subgenotyp F3 handelt es sich um eine *Immune Escape* Variante (Mutationen im S-ORF: s120Q, s129P und s145R) (Schlabe et al., 2018). Dargestellt sind die Daten aus einem Experiment, mit technischen Duplikaten für C. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD). NT: nicht transfizierte Zellen. n.d.: nicht detektierbar.

Dem folgend sollte nun, neben diesen diversen HBV-Expressionskonstrukten mit Genomüberlänge, rekombinante HBV cccDNA generiert und entsprechend Heptomazelllinien mit diesen transfiziert werden. Hierzu wurde zunächst die ‚MiniCircle Technologie‘ (System Biosciences, LLC; Palo Alto, US) angewendet (siehe 3.3.3. Produktion (Transformation von *E. coli* ZYCY10P3S2T) und Aufreinigung von MiniCircle HBV cccDNA). Diese Methode bietet die Möglichkeit einer einfachen bakteriellen Produktion großer Mengen von rekombinanter HBV cccDNA. Zudem ist hier kein HBV-Rezeptor, sprich keine NTCP-Expression, für den Viruseintritt erforderlich, und auch die Quantität der verwendeten cccDNA kann anhand der Transfektionsdosis genau bestimmt werden (F. Li et al., 2016). Nach bakterieller Produktion der rekombinanten HBV cccDNA wurde diese zudem auch mittels Restriktionsenzym KpnI und Minicircle-safe DNase von DNA-Kontamination aufgrund

von verbliebener bakterieller genomischer DNA und verbliebenem parentalem Plasmid pMC_HBV_Gt.D3-3091(_M125T)_cccDNA gereinigt (Abb. 9).

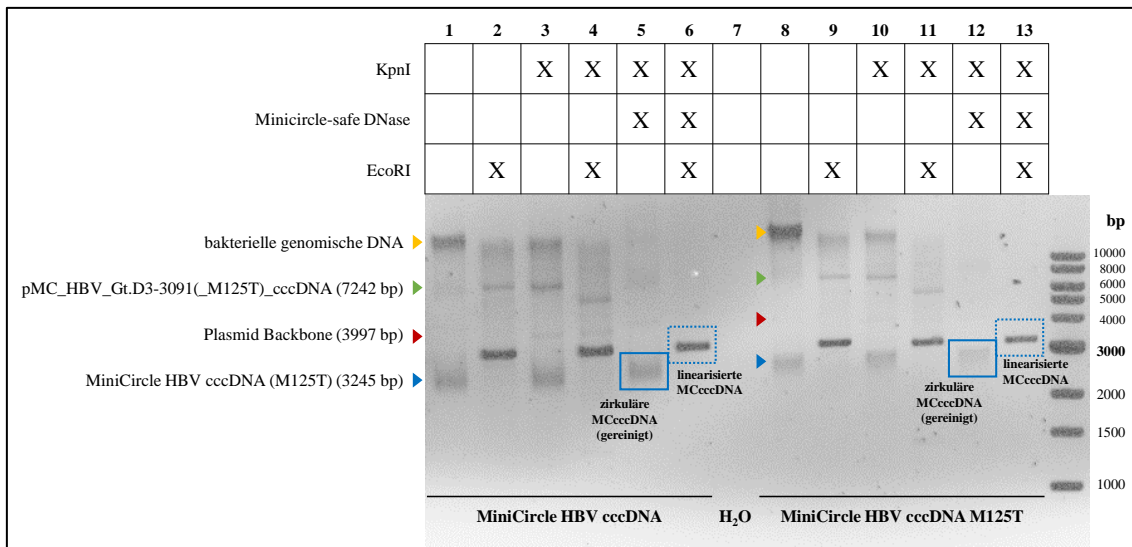


Abb. 9: Präparation von MiniCircle HBV cccDNA - Entfernung von bakterieller genomischer DNA und parentaler Plasmid-DNA-Kontamination

Die generierte MiniCircle HBV cccDNA (ggf. mit M125T-Austausch) wurde hier unbehandelt aufgetragen, sowie nach entsprechender Entfernung von genomischer und parentaler Plasmid-DNA-Kontamination (pMC_HBV_Gt.D3-3091(_M125T)_cccDNA (parental)) mittels Restriktionsenzym KpnI und Minicircle-safe DNase. Zuzüglich wurden entsprechende Ansätze mittels Restriktionsenzym EcoRI, welches einmal innerhalb des HBV-Genoms schneidet, linearisiert. Zur Visualisierung wurden hier die entsprechenden verbliebenen DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese (1 % Agarosegel) aufgetrennt.

Bei Rekombination von attB und attP erfolgte so anhand der Φ C31 Integrase der Spaltung des parentalen Plasmids in bakterielles Plasmid-Backbone und die einzelnen MiniCircle (siehe Abb. 6). Es wurde zunächst, das verbliebene parentale Plasmid pMC_HBV_Gt.D3-3091(_M125T)_cccDNA sowie das verbliebene bakterielle Plasmid-Backbone mittels Restriktionsenzym KpnI linearisiert (Abb. 9 Pfeile grün und rot). Durch anschließende Inkubation mit Minicircle-safe DNase, wurden diese nun linearen DNA-Fragmente degradiert, sodass schließlich nur die zirkuläre rekombinante HBV cccDNA im Reaktionsansatz vorhanden war (Abb. 9 Kästen blau, Proben 5 und 12). Zur genauen molekularen Größenbestimmung (3245 bp) und Identifikation wurde diese mittels Restriktionsenzym EcoRI (Schnittstelle siehe Abb. 32) anschließend linearisiert (Abb. 9 Kästen blau-gestrichelt, Proben 6 und 13).

Als weitere Methode zur Produktion von rekombinanter HBV cccDNA wurde zudem ein PCR-basierter Ansatz gewählt (siehe 3.4.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Generierung von rekombinanter HBV cccDNA (rcccDNA)). Hierbei wurden demnach exakte 1.0mere des HBV-Genoms amplifiziert (Primerposition siehe auch Abb. 32 A violett). Diese doppelsträngigen HBV-1.0mere bilden entsprechend ein Konstrukt mit der identischen Information zur HBV cccDNA, demnach ohne bakterielles Plasmid-Backbone, allerdings in linearer Form. Durch die angefügte Phosphorylierung am jeweiligen 5'-Ende dieses Doppelsstrangs wäre eine Zirkularisierung zur

cccDNA möglich. Im Anschluss wurden Huh7 Zellen vergleichsweise sowohl mit 1.1mer- und 1.5mer-Expressionsvektoren des HBV-Genotyps D3, als auch mit den verschiedenen generierten rekombinanten HBV cccDNAs transfiziert und letztlich analysiert (Abb. 10).

Hierbei war zu beobachten, dass kein deutlicher Unterschied zwischen Transfektion der gereinigten (siehe Abb. 9 Kasten blau) oder nicht-gereinigten MiniCircle HBV cccDNA, im Hinblick auf das exprimierte HBsAg und HBcAg (Abb. 10 A), sowie dem sekretierten HBeAg (Abb. 10 B), bestand. Bei Transfektion mit dem entsprechenden 1.1mer-Expressionsvektor (Nassal, 1992; Nassal et al., 1990), bei welchem die Expression durch einen vorgeschalteten konstitutiv aktiven CMV-Promoter reguliert wird, konnte eine leicht höhere HBcAg Expression, im Vergleich zur Transfektion mit MiniCircle HBV cccDNA oder HBV-1.0meren, zu beobachtet werden (Abb. 10 A, Abb. 12 A). Die Menge an sekretiertem HBeAg war jedoch, wie auch bei Transfektion mit den 1.1mer-Expressionsvektoren anderer HBV-Genotypen (Abb. 8), deutlich geringer (Abb. 10 B, Abb. 12 B). Auch hier konnte bei Transfektion mit einem 1.5mer-Expressionsvektor eine deutlich höhere Sekretion von HBeAg im Zellkulturüberstand beobachtet werden. Wurden Huh7 Zellen hingegen mit PCR-generierten HBV-1.0meren transfiziert, so konnte im Vergleich zu mit MiniCircle HBV cccDNA transfizierten Zellen eine deutlich höhere Zahl an HBsAg-exprimierenden Zellen und auch eine höhere Menge an sekretiertem HBeAg nachgewiesen werden (Abb. 10 A, B).

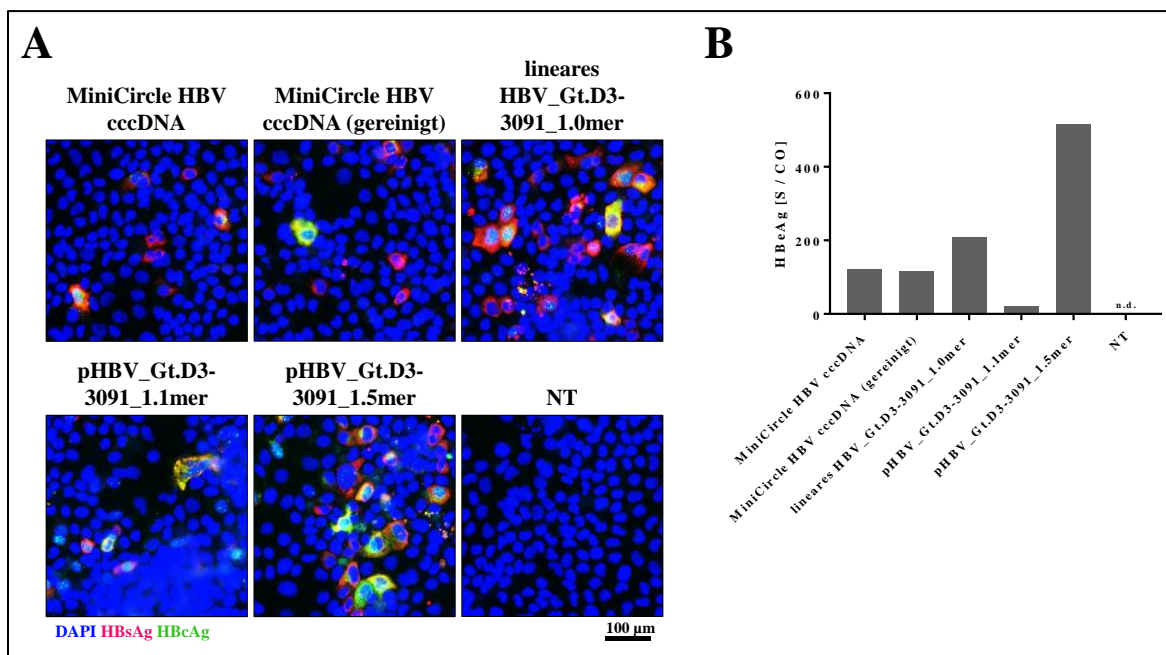


Abb. 10: Vergleich der transienten Transfektion von Huh7 Zellen mit verschiedenen HBV-Expressionsvektoren und rekombinanter cccDNA

Huh7 Zellen wurden mittels Lipofectamine™ 2000 mit MiniCircle HBV cccDNA (ggf. gereinigt, siehe Abb. 9), mit mittels PCR generierten linearen phosphorylierten HBV-1.0meren, sowie 1.1mer- und 1.5mer-Expressionsvektoren des HBV-Genotyps D3-3091 (150 fmol / 48-Well) transfiziert. Die Durchführung der Immunfluoreszenz-Färbung unter Verwendung der Antikörper anti-HBs (SA8045) mit anti-Kaninchen-IgG (A568, rot) und anti-HBc (SYC953) mit anti-Meerschweinchen-IgG (A488, grün) (A), sowie die Bestimmung von sekretiertem HBeAg (B) im Zellkulturüberstand, erfolgte an Tag fünf nach Transfektion. Dargestellt sind die Daten aus einem Experiment als technische Unikate. NT: nicht transfizierte Zellen. n.d.: nicht detektierbar.

Infolgedessen sollte der entsprechende Versuchsansatz nun wiederholt werden und hierbei die mittels PCR generierten noch linearen phosphorylierten HBV-1.0mere vor Transfektion der Huh7 Zellen mittels T4 DNA Ligase zur cccDNA zirkularisiert werden, um bestmöglich die entsprechende HBV cccDNA *in-vitro* zu rekonstruieren (Abb. 11). Als Referenz wurde hier nicht-gereinigte MiniCircle HBV cccDNA (Abb. 9 Probe 1 = Abb. 11 Probe 5) aufgetragen. Nach Ligation der linearen phosphorylierten HBV-1.0mere, konnte ein Produkt, mit vergleichbarer Größe zur MiniCircle HBV cccDNA beobachtet werden (Abb. 11 gelbe Pfeile), welches zudem durch Inkubation mit Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase nicht hydrolysiert wurde (Abb. 11 Probe 4, gelber Pfeil). Es war aber auch zu erkennen, dass sich in Folge der DNA-Ligation ein erheblicher Anteil an HBV-2.0meren, sprich Dimeren, gebildet hatte (Abb. 11 grüner Pfeil). Auch blieb die Menge an verbliebenen linearen HBV-1.0meren hier sichtbar hoch (Abb. 11 Probe 4, blauer Pfeil).

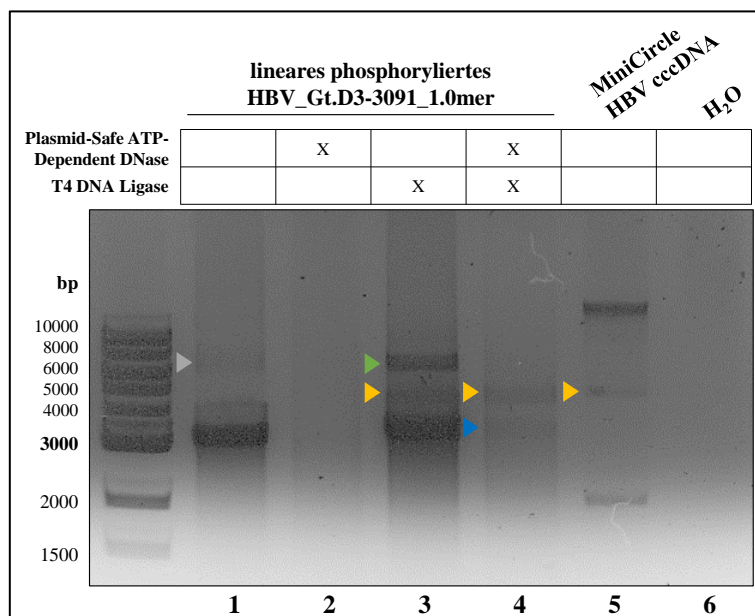


Abb. 11: Analyse der durch PCR generierten und zirkularisierten rekombinanten HBV cccDNA

Mittels PCR unter Verwendung eines Expressionsvektors, codierend für den HBV-Genotyp D3-3091, wurden lineare phosphorylierte HBV-1.0mere generiert. Diese wurden, ggf. mittels T4 DNA Ligase ligiert / zirkularisiert. Der jeweilige Reaktionsansatz wurde zudem mittels Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase behandelt, um schließlich verbliebene lineare DNA-Fragmente zu entfernen. Zur Visualisierung wurden hier die entsprechenden verbliebenen DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese (1 % Agarosegel) aufgetrennt. Zudem wurde hier MiniCircle HBV cccDNA des HBV-Genotyps D3-3091 als Referenz aufgetragen.

Schließlich wurden Huh7 Zellen mit den teils zirkularisierten HBV-1.0meren und HBV-Dimeren (Abb. 11 Probe 3) transfiziert. Hierbei konnte, im Vergleich zum unbehandelten Reaktionsansatz (Abb. 11 Probe 1), allerdings keine signifikant veränderte Menge an exprimiertem HBcAg oder sekretiertem HBeAg beobachtet werden (Abb. 12).

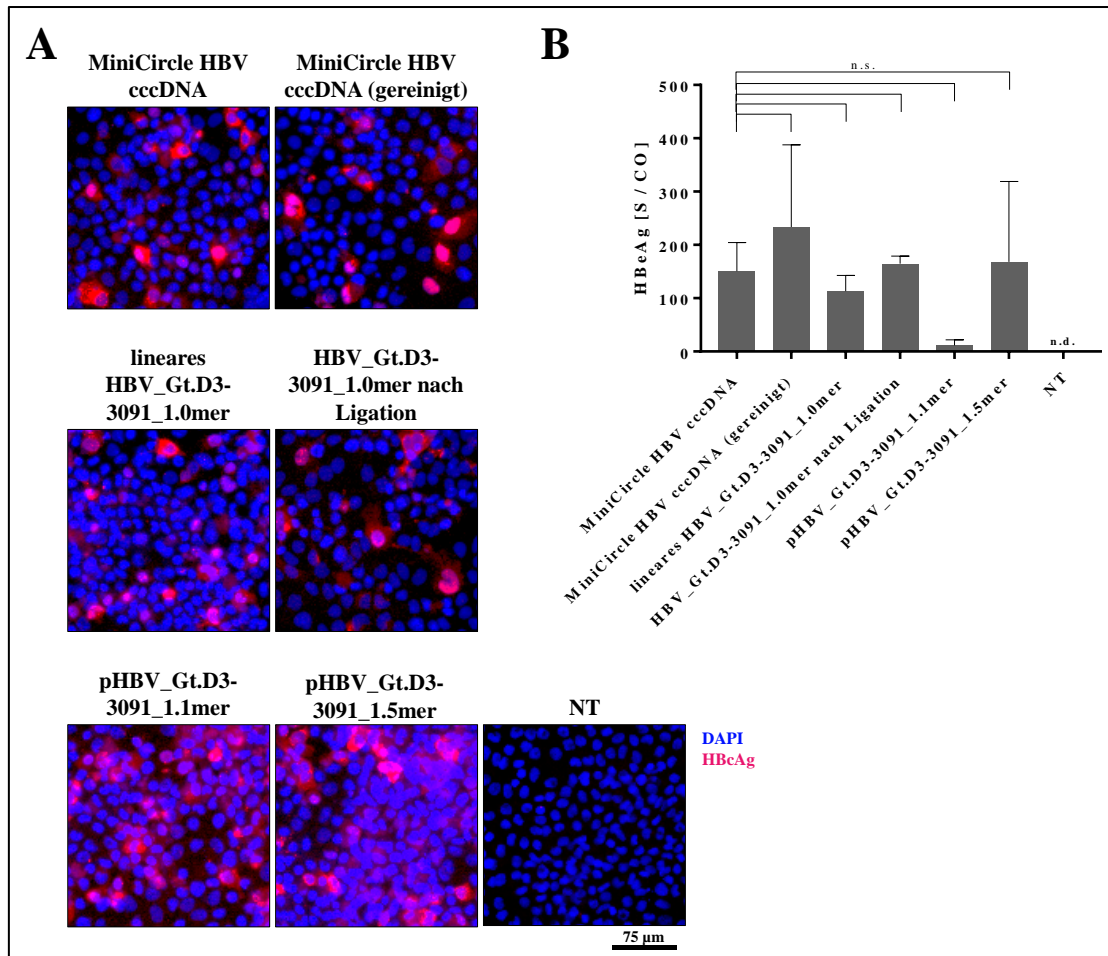


Abb. 12: Vergleich der transienten Transfektion von Huh7 Zellen mit verschiedenen HBV-Expressionsvektoren, sowie rekombinanter cccDNA auch nach Ligation / Zirkularisierung

Huh7 Zellen wurden mittels Lipofectamine™ 2000 mit MiniCircle HBV cccDNA (ggf. gereinigt, siehe Abb. 9), mit mittels PCR generierten linearen phosphorylierten HBV-1.0meren, welche ggf. mittels T4 DNA Ligase ligiert / zirkularisiert wurden, sowie 1.1mer- und 1.5mer-Expressionsvektoren des HBV-Genotyps D3-3091 (150 fmol / 48-Well) transfiziert. Die Durchführung der Immunfluoreszenz-Färbung unter Verwendung des Antikörpers anti-HBc (Dako) mit anti-Kaninchen-IgG (A568, rot) (A), sowie die Bestimmung von sekretiertem HBeAg (B) im Zellkulturüberstand, erfolgte an Tag fünf nach Transfektion. Dargestellt sind die kombinierten Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Unikaten. Signifikanz-Berechnung gemäß one-way ANOVA Varianzanalyse mit Tukey-Test (n.s. $p > 0,05$) durchgeführt mittels GraphPad Prism (Version 7.03). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD). NT: nicht transfizierte Zellen. n.d.: nicht detektierbar.

Um diese Methode der durchaus schnellen Generierung von linearen phosphorylierten HBV-1.0meren mittels PCR als Surrogat für echte HBV cccDNA diverser HBV-Genotypen experimentell auch auf klinische Untersuchungen anzuwenden, wurden zunächst die in Seren HBV-positiver PatientInnen enthaltenen viralen Nukleinsäuren gereinigt und ebenfalls mittels PCR HBV-1.0mere generiert (siehe 3.4.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Generierung von rekombinanter HBV cccDNA (rcccDNA)). Daraufhin wurden Huh7 Zellen mit diesen linearen phosphorylierten HBV-1.0meren diverser HBV-Genotypen transfiziert (Abb. 13). Zum Vergleich wurden die zuvor unter Verwendung des Expressionsvektors als PCR-Template generierten HBV-1.0mere herangezogen. Hierbei konnte bei Transfektion mit allen generierten HBV-1.0meren, unabhängig vom für die PCR verwendeten Template, eine vergleichbare HBeAg-Expression (Abb. 13 A) und auch HBeAg-Sekretion (Abb. 13 B) beobachtet werden.

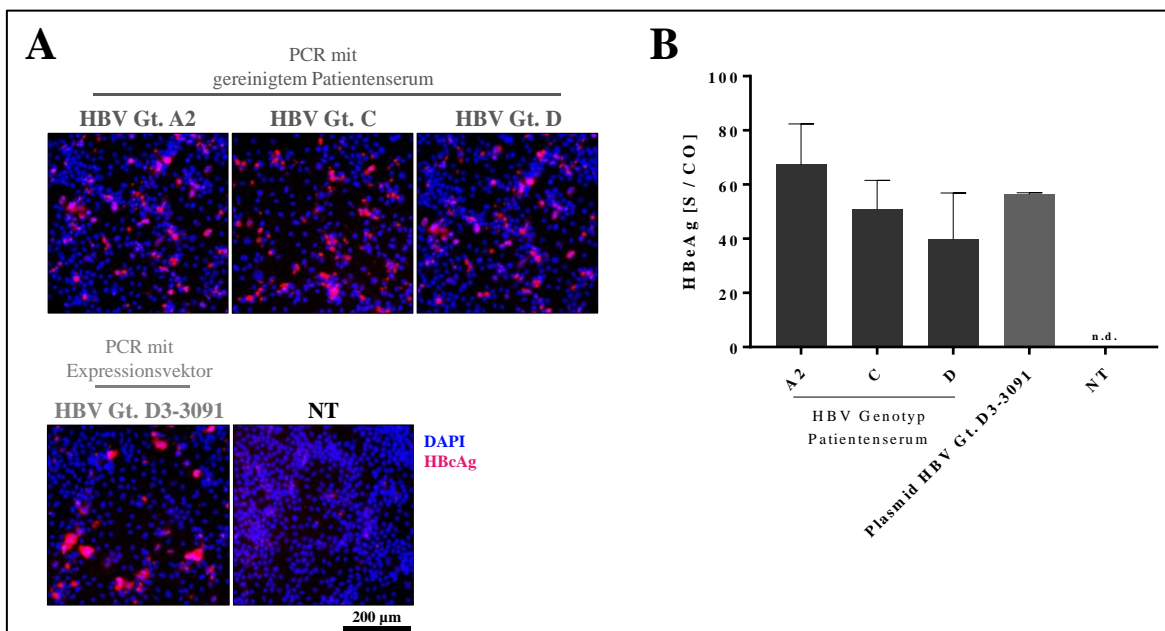


Abb. 13: Generierung von HBV-1.0meren aus Seren HBV-positiver PatientInnen mittels PCR

Huh7 Zellen wurden mittels Lipofectamine™ 2000 mit mittels PCR generierten linearen phosphorylierten HBV-1.0meren unter Verwendung von aufgereinigter viraler DNA aus Seren HBV-positiver PatientInnen oder einem Expressionsvektor des HBV-Genotyps D3-3091 als PCR-Template (siehe 3.4.1.; 150 fmol / 48-Well) transfiziert. Die Durchführung der Immunfluoreszenz-Färbung unter Verwendung des Antikörpers anti-HBc (Dako) mit anti-Kaninchen-IgG (A568, rot) (A), sowie die Bestimmung von sekretiertem HBeAg (B) im Zellkulturüberstand, erfolgte an Tag fünf nach Transfektion. Dargestellt sind die Daten aus einem Experiment mit technischen Duplikaten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD). NT: nicht transfizierte Zellen. n.d.: nicht detektierbar.

Für alle bisher durchgeführten Untersuchungen zur Generierung rekombinanter HBV cccDNA wurde das Isolat des HBV-Genotyps D3 aus Nassal et al. (1990) als Referenz verwendet. Zur Analyse der entsprechenden viralen Hüllproteine dieses Genoms kann jedoch einer der Referenz-Antikörper (monoklonaler anti-SHBs-Antikörper HB01) (Kucinskaite-Kodze et al., 2016) nicht eingesetzt werden. Dieser Antikörper erkennt ein lineares Epitop innerhalb der Aminosäuren 120 bis 125 in der S-Domäne der HBV-Hüllproteine, das bei fast allen HBV-Genotyp D3 Isolaten an einer Aminosäure-Position mutiert ist. Dementsprechend wurden in dieser Arbeit, neben den bereits vorhandenen Expressions-Konstrukten, nun ein entsprechender 1.5mer-Expressionsvektor dieses HBV-Genotyps D3-3091 mit M125T-Austausch (korrektes HB01-Bindemotiv), sowie ein entsprechendes Plasmid zur Generierung von MiniCircle HBV cccDNA ebenfalls dieses HBV-Genotyps mit M125T-Austausch kloniert (siehe 3.4.6. Vektor-Klonierungen (FastCloning nach Li et al., 2011)) und schließlich verwendet. Um mögliche Auswirkungen dieses Aminosäureaustauschs zu überprüfen, wurden Huh7 Zellen mit MiniCircle HBV cccDNA (ggf. gereinigt, siehe Abb. 9 Probe 5 und 12), mit PCR-generierten HBV-1.0meren, sowie 1.1mer- und 1.5mer-Expressionsvektoren, jeweils als Wildtyp-Sequenz nach Nassal et al. (1990) (Abb. 14 dunkelgrau) oder mit M125T-Austausch (Abb. 14 grün) transfiziert und analysiert. Hierbei konnte, bezüglich der HBcAg-Expression (Abb. 14 A), der HBeAg-Sekretion (Abb. 14 B) und der HBsAg-Sekretion (Abb. 14 C), kein signifikanter Unterschied zwischen der Transfektion von Huh7 Zellen mit Wildtyp-Expressionskonstrukten des

HBV-Genotyps D3-3091 und solchen mit M125T-Austausch beobachtet werden. Auch zeigte sich in diesem experimentellen Ansatz stets eine deutlich höhere HBsAg-Sekretion bei Transfektion von Huh7 Zellen mit linearen phosphorylierten HBV-1.0meren, im Vergleich zur Transfektion mit MiniCircle HBV cccDNAs, 1.1mer- oder 1.5mer-Expressionsvektoren (Abb. 14 C).

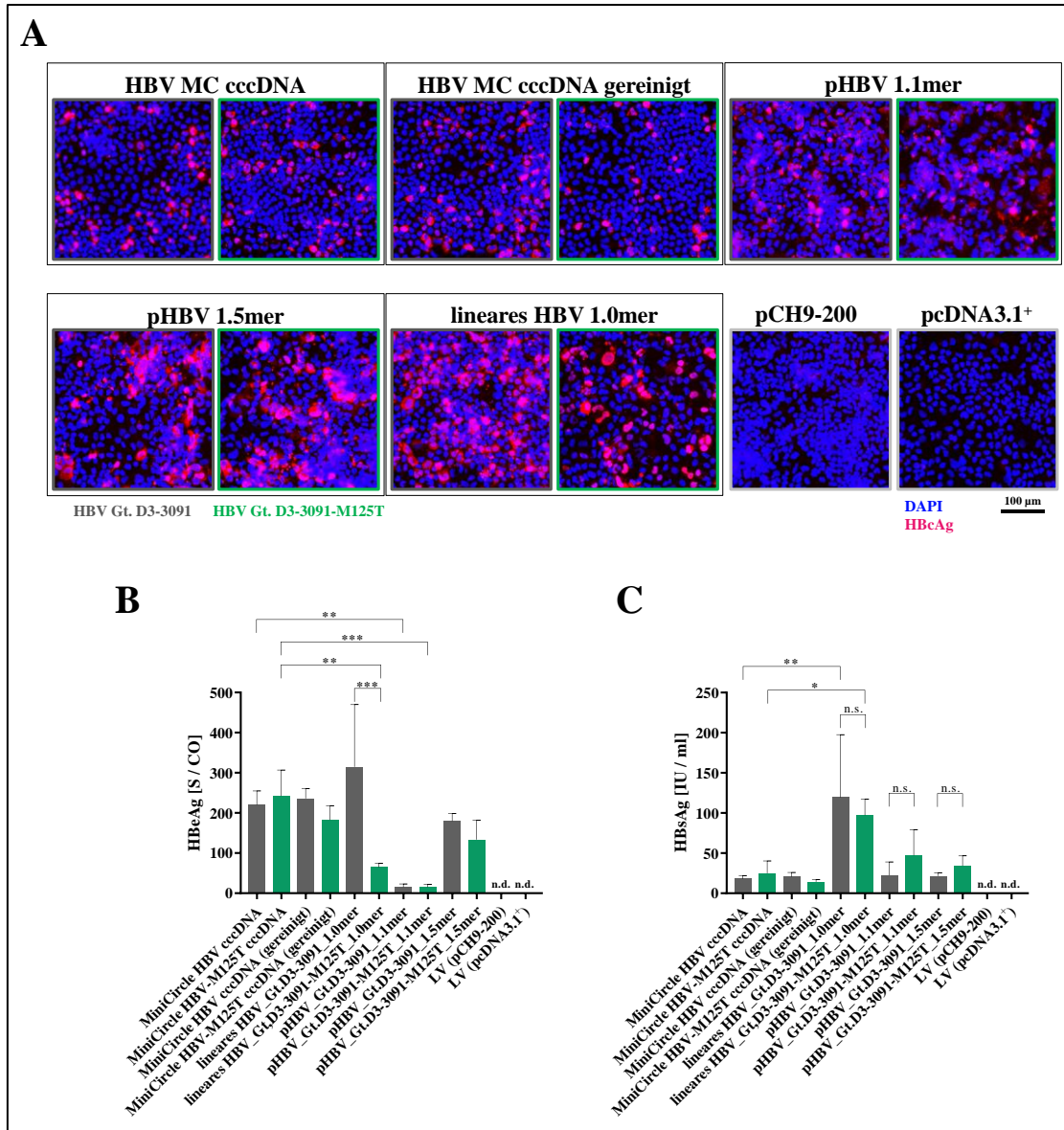


Abb. 14: Vergleich der transienten Transfektion von Huh7 Zellen mit verschiedenen HBV-Expressionsvektoren, sowie rekombinanter cccDNA, des HBV-Gt.D3-Wildtyps, sowie der M125T-Mutante

Huh7 Zellen wurden mittels FuGENE® HD Transfection Reagent mit MiniCircle HBV cccDNA (ggf. gereinigt, siehe Abb. 9), mit mittels PCR generierten linearen phosphorylierten HBV-1.0meren, sowie 1.1mer- und 1.5mer-Expressionsvektoren des HBV-Genotyps D3-3091 als Wildtyp (grau) und mit M125T-Austausch (grün) (600 fmol / 24-Well) transfiziert. Die Durchführung der Immunfluoreszenz-Färbung unter Verwendung des Antikörpers anti-HBc (Dako) mit anti-Kaninchen-IgG (A568, rot) (A), sowie die Bestimmung von sekretiertem HBsAg (C) im Zellkulturüberstand, erfolgte an Tag fünf nach Transfektion. Dargestellt sind die kombinierten Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit technischen Duplikaten. Signifikanz-Berechnung gemäß one-way ANOVA Varianzanalyse mit Tukey-Test (n.s. $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$) durchgeführt mittels GraphPad Prism (Version 7.03). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD). LV: Leervektor. n.d.: nicht detektierbar.

Als nächster Untersuchungsschritt sollte analysiert werden, welche der bisher verwendeten Expressionskonstrukte für die Produktion von HBV in der Zellkultur geeignet ist. Hierfür wurden

HepG2 Tet-On® Advanced Zellen transient transfiziert (siehe 3.1.5. Generierung von rekombinanten HBV *in-vitro*), und die sekretierten HBV und subviralen Partikel analysiert (Abb. 15, Abb. 16). Entsprechend wurden nun stets die Expressionskonstrukte des HBV-Genotyps D3-3091 mit M125T-Austausch in der S-Domäne zum besseren Nachweis der HBV-Hüllproteine verwendet. Zunächst wurde die direkt in den Zellkulturüberstand sekretierte Menge an HBeAg und HBsAg nach Transfektion der HepG2 Tet-On® Advanced Zellen betrachtet. Auch hier wurde erneut deutlich, dass nach Transfektion mit dem 1.5mer-Expressionsvektor eine vergleichsweise deutlich höhere Menge an HBeAg sekretiert wurde (Abb. 15 A). Nach Transfektion mit dem 1.1mer-Expressionsvektor war die Menge an sekretiertem HBeAg weiter stets gering, die Menge an sekretiertem HBsAg jedoch vergleichsweise hoch (Abb. 15 B). Nach Transfektion mit dem linearen phosphorylierten HBV-1.0mer war auch hier eine erhöhte Sekretion von HBsAg detektierbar (Abb. 15 B, vergleiche Abb. 14 C), die Sekretion von HBeAg war allerdings deutlich geringer (Abb. 15 A, vergleiche Abb. 14 B). Zudem wurde nach Transfektion mit der entsprechenden MiniCircle HBV cccDNA eine sehr geringe Menge an sekretiertem HBsAg beobachtet (Abb. 15 B).

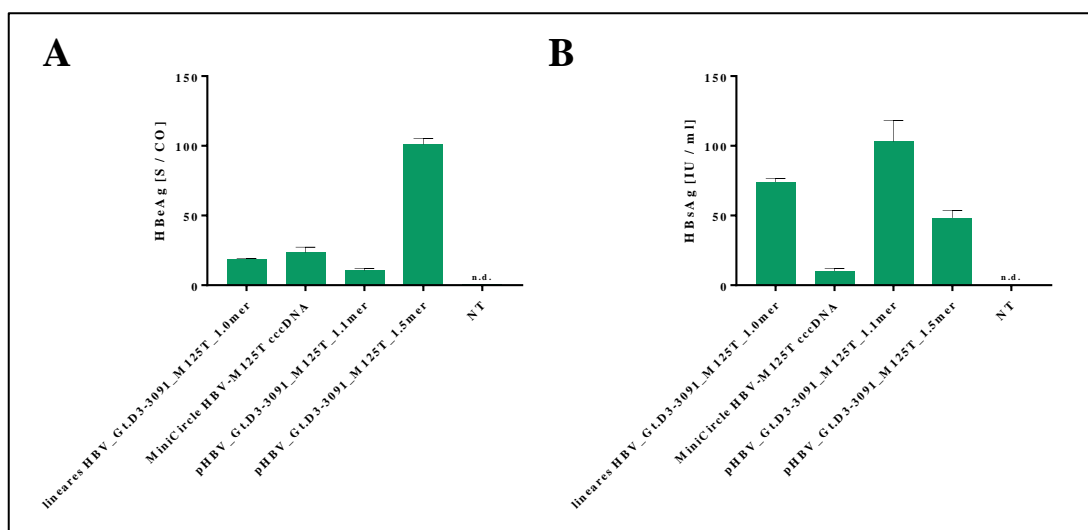


Abb. 15: Analyse von sekretiertem HBeAg und HBsAg bei der Produktion rekombinanter HBV mittels transients Transfektion von HepG2 Tet-On® Advanced Zellen mit verschiedenen HBV-Expressionsvektoren, sowie rekombinanter cccDNA, des HBV-Gt.D3 mit M125T-Austausch

HepG2 Tet-On® Advanced Zellen wurden mittels X-tremeGENE™ HP DNA-Transfektionsreagenz mit MiniCircle HBV cccDNA, mit mittels PCR generierten linearen phosphorylierten HBV-1.0meren, sowie 1.1mer- und 1.5mer-Expressionsvektoren des HBV-Genotyps D3-3091 mit M125T-Austausch (8 pmol / 15cm-Zellkulturschale, siehe 3.1.5.) transfiziert. Die Bestimmung von sekretiertem HBeAg (A) und HBsAg (B) im Zellkulturüberstand, erfolgte an Tag fünf nach Transfektion. Dargestellt sind die Daten aus einem Experiment mit technischen Quadruplikaten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD). NT: nicht transfizierte Zellen. n.d.: nicht detektierbar.

Schließlich wurde nun der die rekombinanten HBV enthaltende Zellkulturüberstand mittels Zentrifugalkonzentratoren einkonzentriert und entsprechend die HBV und nicht-umhüllten Core-Partikel mittels linearer Caesiumchlorid-Gradienten entsprechend ihrer Dichte nach separiert (siehe 3.4.8. Analyse rekombinanter HBV mittels linearer CsCl-Gradienten). Für jede entnommene Gradientenfraktion wurde die entsprechende Caesiumchloriddichte, sowie die Konzentration an HBV-Genomen, bestimmt (Abb. 16). Die generierten HBV sollten bei ca. 1,25 g/ml CsCl-Dichte

(Abb. 16, rote Balken) zu detektieren sein, während die nicht-umhüllten, HBV-DNA-haltigen Core-Partikel bei einer CsCl-Dichte von 1,30 bis 1,36 g/ml (Abb. 16, graue Balken) detektierbar wären (Sureau et al., 1986).

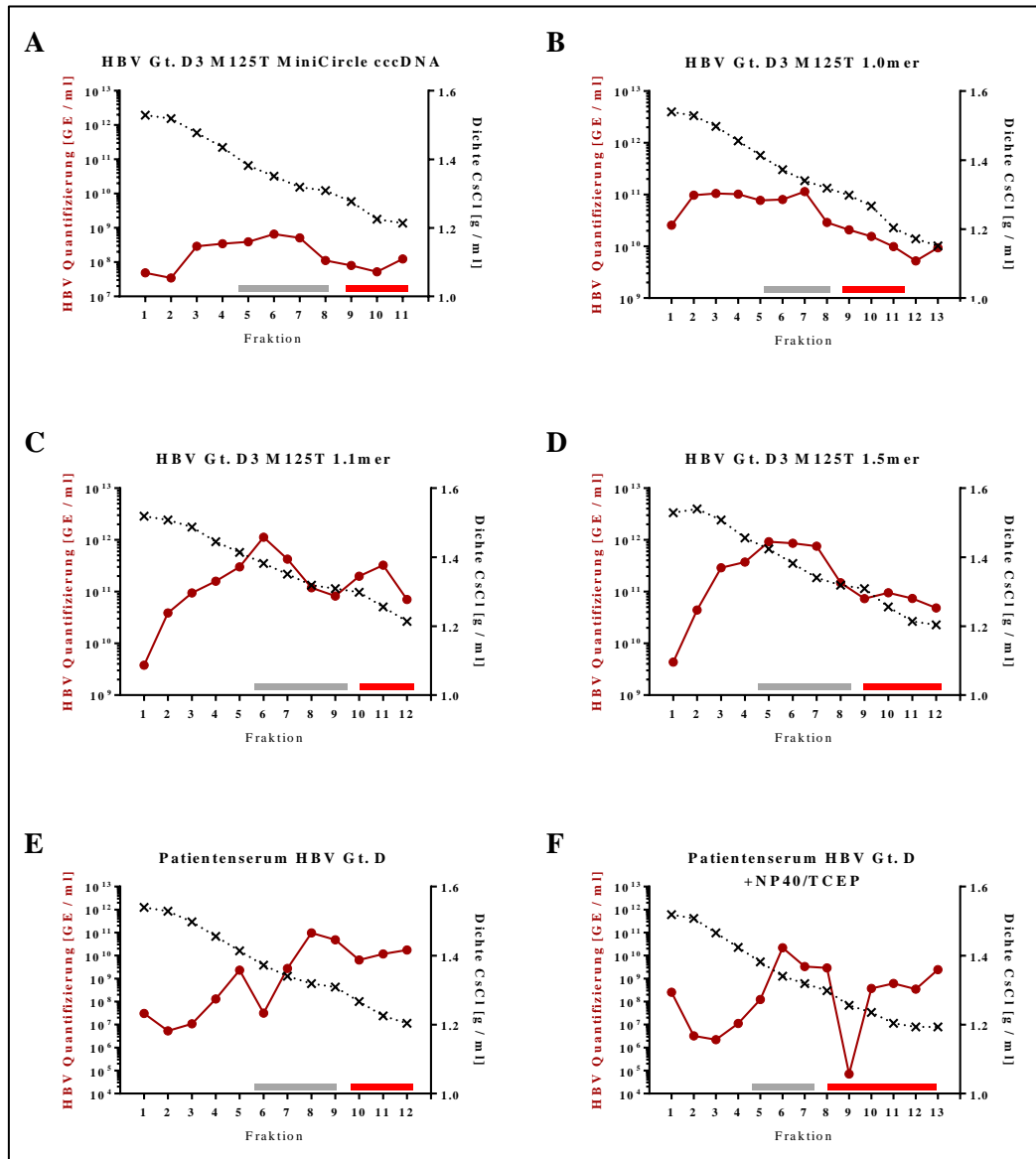


Abb. 16: CsCl-Gradienten zur Analyse generierter rekombinanter HBV des Genotyps D3-3091 mit M125T-Austausch

Die generierten rekombinanten HBV des Genotyps D3-3091 mit M125T-Austausch (siehe 3.1.5. Generierung von rekombinanten HBV *in-vitro*) wurden mittels linearer CsCl-Gradienten analysiert, um hier Virionen von nicht-umhüllten Core-Partikeln differenzieren zu können (siehe 3.4.8. Analyse rekombinanter HBV mittels linearer CsCl-Gradienten). Hierbei wurden die einzelnen Gradienten nun in 12-13 Fraktionen eingeteilt und für jede Fraktion schließlich die entsprechende Dichte mittels Refraktometer (schwarz) bestimmt, sowie nach Aufreinigung der viralen Nukleinsäuren eine Quantifizierung der viralen Genome (siehe 3.4.5. Quantifizierung rekombinanter HBV und pseudotypisierter HDV, dunkelrot) durchgeführt. Als Referenz wurde hier auf zwei separaten CsCl-Gradienten das Serum eines chronisch HBV-infizierten Patienten (ID1, (Glebe et al., 2003)) aufgetragen (E), welches ggf. zuvor mit 1 % Nonidet P-40 / 50 mM TCEP inkubiert wurde (F). Dargestellt sind die Daten aus einem Experiment mit technischen Unikaten.

Als Referenz wurde hier das Serum eines chronisch HBV-infizierten Patienten (ID1, (Glebe et al., 2003)) ebenfalls mittels CsCl-Gradienten analysiert (Abb. 16 E, F). Dieses wurde in einem zweiten Ansatz vor Aufschichtung auf den CsCl-Gradienten mit 1 % Nonidet P-40 / 50 mM TCEP inkubiert,

wodurch die Virushülle der Virionen zerstört und nachfolgend in diesem Ansatz hauptsächlich nur noch nicht-umhüllte Core-Partikel entsprechender Größe detektierbar waren (Abb. 16 F). Bei dem Versuch mittels Transfektion mit MiniCircle HBV cccDNA rekombinante HBV zu produzieren konnten nur vergleichsweise geringe Mengen HBV-Genome bei Quantifizierung detektiert werden. Eine erhöhte Menge an detektierbaren HBV-Genomen, konnte hier lediglich im Bereich der CsCl-Dichte entsprechend für nicht-umhüllte Core-Partikel beobachtet werden (Abb. 16 A, Tabelle 2). Auch bei Transfektion mit linearen phosphorylierten HBV-1.0meren konnte nur eine geringe Menge HBV-Genome in Fraktionen mit passender CsCl-Dichte entsprechend für Virionen nachgewiesen werden, die Menge an solchen in Fraktionen mit passender CsCl-Dichte entsprechend für nicht-umhüllte Core-Partikel war hier leicht höher (Abb. 16 B, Tabelle 2).

Tabelle 1: Gegenüberstellung der HBV-DNA-Quantifizierung der Fraktionen mit Core-Partikeln und HBV-Virionen

experimenteller Ansatz	HBV-DNA-Quantifizierung [Genome / ml]	
	Fraktion mit Core-Partikeln	Fraktion mit Virionen
MiniCircle HBV cccDNA	$6,5 \times 10^8$	$5,2 \times 10^7$
HBV-1.0mer	$1,1 \times 10^{11}$	$1,6 \times 10^{10}$
pHBV-1.1mer	$1,1 \times 10^{12}$	$3,3 \times 10^{11}$
pHBV-1.5mer	$8,6 \times 10^{11}$	$7,4 \times 10^{10}$
Patientenserum	$9,7 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^{10}$
Patientenserum + NP40/TCEP	$2,2 \times 10^{10}$	$6,1 \times 10^8$

Bei Transfektion der HepG2 Tet-On® Advanced Zellen mit 1.1mer- und 1.5mer-Expressionsvektoren, konnten jedoch vergleichsweise deutlich erhöhte Mengen an HBV-Genomen in Fraktionen mit passender CsCl-Dichte entsprechend für Virionen, sowie auch für solche mit entsprechender CsCl-Dichte für nicht-umhüllte Core-Partikel, gemessen werden (Abb. 16 C, D, Tabelle 2). Hierbei war zu beobachten, dass im Vergleich, nach Transfektion mit dem entsprechenden 1.1mer-Expressionsvektor, zu dieser mit dem 1.5mer-Expressionsvektor, zudem eine fast fünfmal höhere Menge an HBV-Genomen im CsCl-Dichte-Bereich passend für Virionen zu detektieren war (Tabelle 2), wobei jedoch die entsprechende Menge an detektierbaren HBV-Genomen, im CsCl-Dichte-Bereich passend für nicht-umhüllte Core-Partikel, in beiden Versuchsansätzen ähnlich hoch war. In beiden Fällen überschritt die Menge der detektierbaren HBV-Genome in Fraktionen mit passender CsCl-Dichte entsprechend für nicht-umhüllte Core-Partikel, deutlich die gemessene Menge an HBV-Genomen in Fraktionen mit passender CsCl-Dichte entsprechend für Virionen, welche hier schließlich primär generiert werden sollten. Grundsätzlich war in allen untersuchten experimentellen Ansätzen die gemessene Menge an HBV-Genomen im CsCl-Dichte-Bereich, passend für nicht-umhüllte Core-Partikel, etwa zehnmal höher als diese in Fraktionen mit passender CsCl-Dichte entsprechend für Virionen (Abb. 16 A - D, Tabelle 2).

4.2. Untersuchungen zur Spezies-übergreifenden Infektiosität von Hepatitis-B-Virus-Isolaten nicht-humaner Primaten

Da HDV nicht eigenständig replizieren kann (siehe auch 1.2.2. Replikationszyklus des HDV), sondern die Hüllproteine des HBV (HBsAg) nutzt um infektiöse Partikel zu bilden (Rizzetto, Hoyer, et al., 1980), sollten so auch rekombinante pseudotypisierte HDV mit den Hüllproteinen von HBV-Isolaten nicht-humaner Primaten generiert werden. Hierzu wurden Huh7 Zellen transient mit Expressionsvektoren codierend für HBsAg von humanem HBV oder der HBV-Isolate nicht-humaner Primaten (Schimpanse und Orang-Utan), sowie solchen codierend für alle acht HDV-Genotypen, co-transfiziert und die sekretierten pseudotypisierten HDV aus dem Zellkulturüberstand verwendet (siehe auch 3.1.4. Generierung von pseudotypisierten HDV *in-vitro*). Um eine mögliche Spezies-übergreifende Infektiosität der HBV-Isolate nicht-humaner Primaten zu untersuchen, sollte anschließend eine Infektion von NTCP/Ntcp-exprimierenden Huh7 Zellen mit den generierten rekombinanten pseudotypisierten HDV exemplarisch durchgeführt werden.

Zuvor wurden jedoch die Huh7 Zellen mit den Expressionsvektoren codierend für HBsAg von HBV oder von HBV-Isolaten nicht-humaner Primaten (Schimpanse, Gibbon, Gorilla und Orang-Utan) isoliert transfiziert werden. Dies diente zur Überprüfung, ob in diesen Zellen überhaupt eine HBsAg-Expression stattfindet. Hierbei wurde sowohl die Konzentration an sekretiertem HBsAg, als auch, anhand von einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung, die Menge an intrazellulärem LHBs und gesamt HBsAg bestimmt (Abb. 17). Diese Unterscheidung war von Bedeutung, da HDV, wie auch HBV, spezifisch mittels der präS1-Domäne des LHBs an den Rezeptor NTCP (Yan et al., 2012) bindet. LHBs ist bekanntlich für die NTCP-vermittelte Bindung und Endozytose des HDV-Virions, folglich für den Infektionsvorgang, essenziell (siehe auch 1.2. Virale Replikationsmechanismen).

Hierbei war deutlich erkennbar, dass HBsAg von ChHBV, GoHBV und OuHBV im Vergleich zu HBV signifikant erhöht sekretiert wurde, wobei die Sekretion des HBsAg von ChHBV und GoHBV deutlich hinausragte. Die Sekretion des HBsAg von GiHBV war allerdings deutlich geringer, auch signifikant geringer, als die des HBsAg von HBV (Abb. 17 A). Passend hierzu konnten innerhalb der transfizierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung im Vergleich zum LHBs von HBV signifikant geringere Mengen LHBs von ChHBV, GoHBV und OuHBV detektiert werden (Abb. 17 B, D). Auch die entsprechende Menge an detektiertem intrazellulärem HBsAg des OuHBV war hier signifikant geringer (Abb. 17 C, D). Die jeweilige Menge an detektiertem intrazellulärem präS1 / LHBs und auch HBsAg des GiHBV hingegen war deutlich erhöht (Abb. 17 B, C, D).

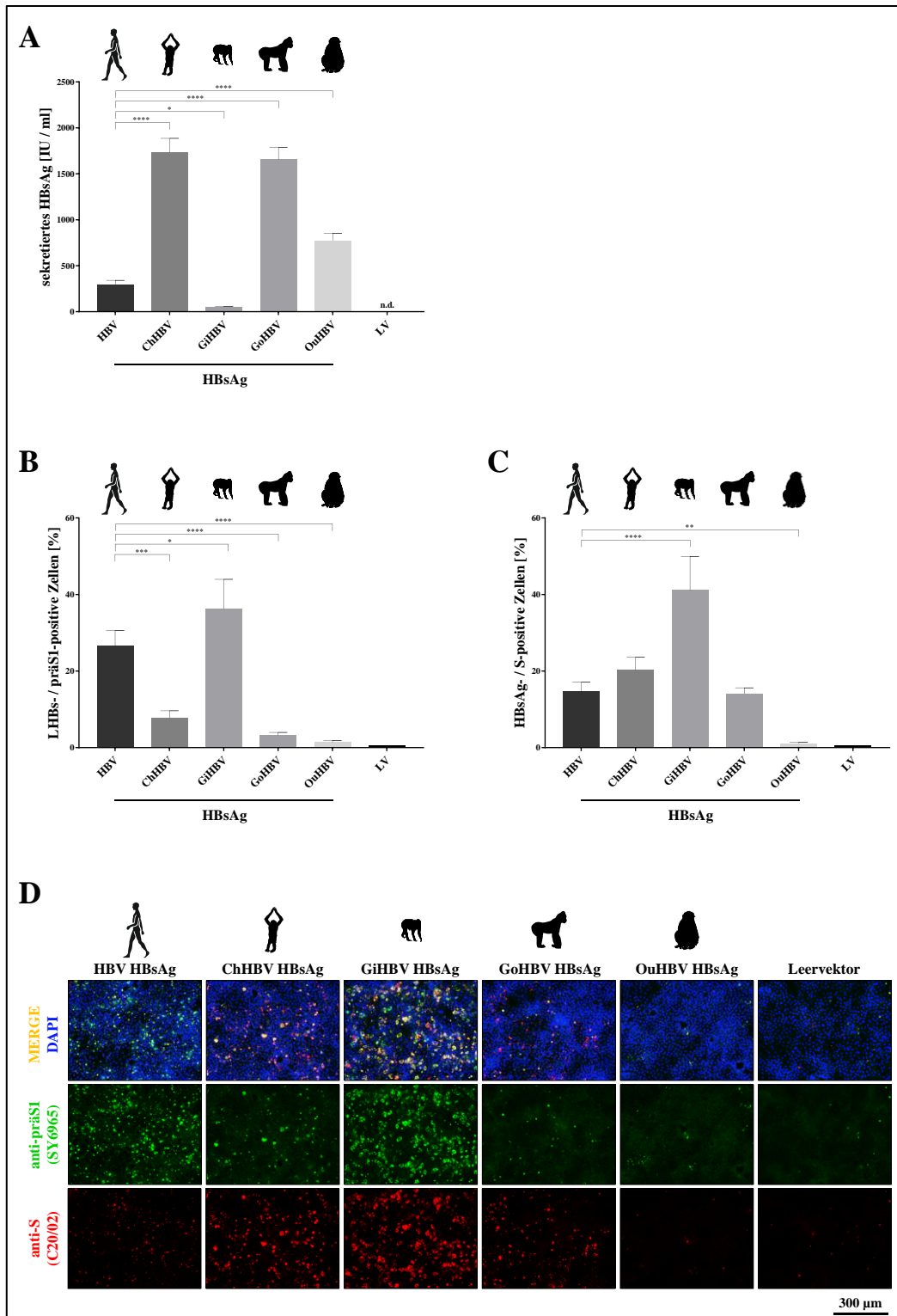


Abb. 17: Analyse der Expression und Sekretion des HBsAg von HBV oder HBV-Isolaten nicht-humaner Primaten nach transients Transfektion von Huh7 Zellen mit entsprechenden Expressionskonstrukten

Huh7 Zellen wurden mittels FuGENE® HD Transfection Reagent mit Expressionsvektoren codierend für das HBsAg von HBV oder HBV-Isolaten nicht-humaner Primaten (300 ng / 48-Well) transfiziert. Als Transfektionskontrolle wurde zusätzlich das Plasmid pSEAP (1:25) co-transfiziert. Die Bestimmung von sekretiertem HBsAg (A) im Zellkulturüberstand, sowie die Durchführung der Immunfluoreszenz-Färbung (B, C, D) unter Verwendung der Antikörper anti-präS1²⁰⁻⁴⁸ (SY6965) mit anti-Kaninchen-IgG (A488, grün) und anti-S (C20/02) mit anti-Maus-IgG (A568, rot) (D), erfolgte an Tag fünf nach Transfektion. Es erfolgte zudem eine Quantifizierung mittels ImageXpress® Pico Zell-Imaging-System (B, C). Dargestellt sind die kombinierten Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten. Die Werte wurden auf die SEAP-Sekretion normalisiert. Signifikanz-Berechnung gemäß one-way ANOVA Varianzanalyse mit Tukey-Test (n.s. $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$) durchgeführt mittels GraphPad Prism (Version 7.03). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD). LV: Leervektor. n.d.: nicht detektierbar.

Schließlich sollten nun durch transiente Transfektion von Huh7 Zellen, mit Expressionsvektoren codierend für HBsAg von HBV oder der HBV-Isolate nicht-humaner Primaten (Schimpanse und Orang-Utan), in Kombination mit solchen codierend für alle acht HDV-Genotypen, rekombinante pseudotypisierte HDV generiert werden (siehe auch 3.1.4. Generierung von pseudotypisierten HDV *in-vitro*). Zunächst wurde die Konzentration an sekretierem HBsAg im Zellkulturüberstand analysiert, sowie auch die dort befindliche Konzentration an HDV-Genomen quantifiziert (Abb. 18). Um für diese Quantifizierung einen entsprechend passenden cut-off zu setzen, wurden als Kontrolle so auch Huh7 Zellen ausschließlich mit dem entsprechenden Expressionsvektor codierend für HDV des Genotyp 1 (WHO-Isolat), nicht aber mit einem für HBV-Hüllproteine codierenden Expressionskonstrukt, transfiziert. Gegensätzlich hierzu dienten zudem Huh7 Zellen co-transfiziert mit dem entsprechenden Expressionskonstrukt codierend für HBsAg von HBV, sowie mit einem Expressionsvektor, welcher zwar für HDV des Genotyp 1 (WHO-Isolat) codiert, jedoch so modifiziert ist, dass keine HDAg-Expression stattfinden kann, als weiterer Kontrollansatz.

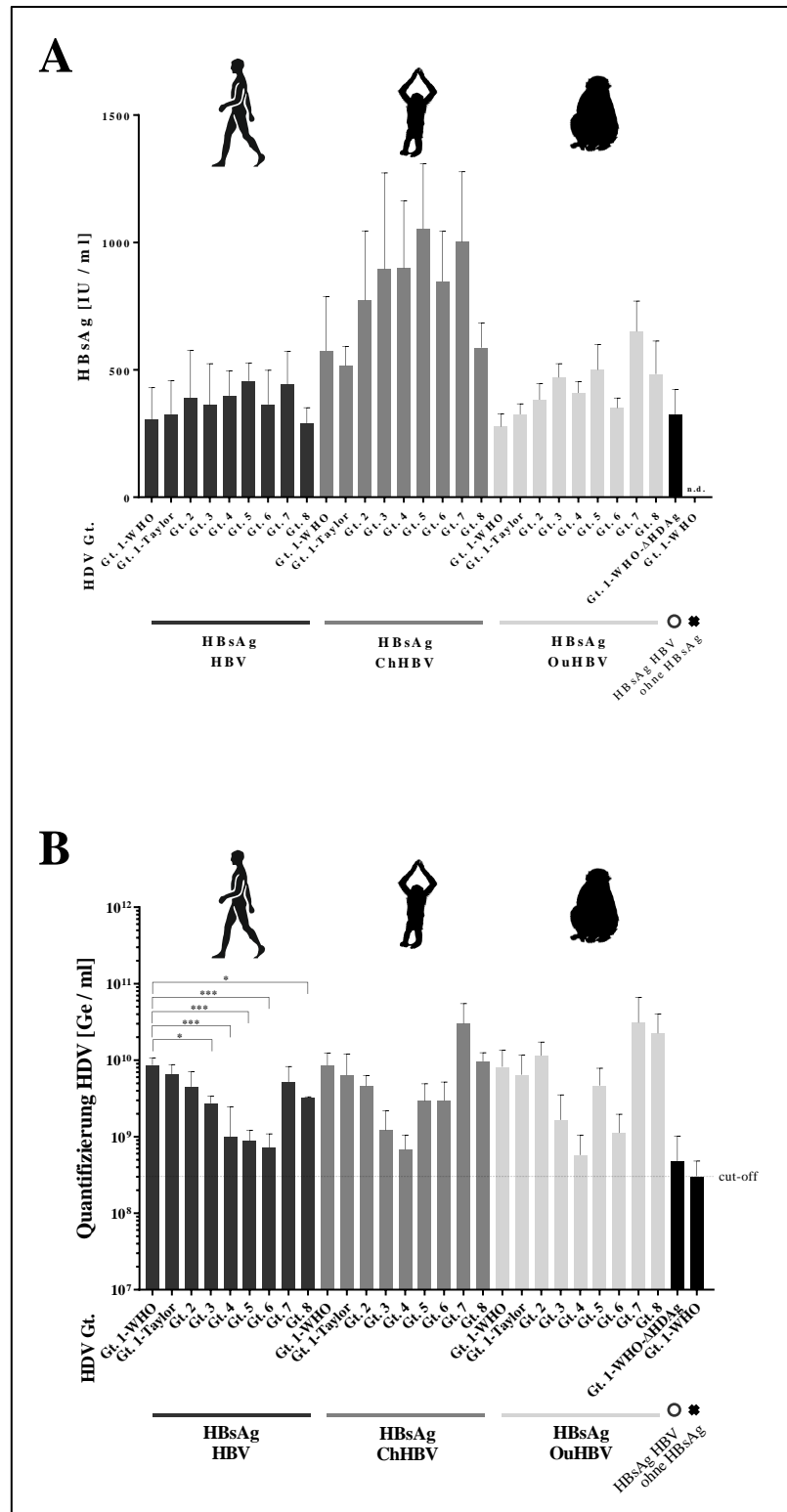


Abb. 18: Analyse der Sekretion des HBsAg von HBV oder HBV-Isolaten nicht-humaner Primaten und HDV-Quantifizierung in Folge der Produktion pseudotypisierter HDV verschiedener Genotypen

Huh7 Zellen wurden mittels FuGENE® HD Transfection Reagent mit Expressionsvektoren codierend für das HBsAg von HBV oder HBV-Isolaten nicht-humaner Primaten (360 ng / 12-Well), sowie entsprechend solchen codierend für alle HDV-Genotypen (730 ng / 12-Well) co-transfiziert. Als Transfektionskontrolle wurde zusätzlich das Plasmid pSEAP (1:25) co-transfiziert. Die Bestimmung von sekretiertem HBsAg (A), sowie die Isolation der viralen Nukleinsäuren im Zellkulturüberstand und entsprechende Quantifizierung der HDV-Genome (B), erfolgte an Tag 10 nach Transfektion. Dargestellt sind die kombinierten Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten. Die Werte wurden auf die SEAP-Sekretion normalisiert. Signifikanz-Berechnung gemäß one-way ANOVA Varianzanalyse mit Tukey-Test (n.s. $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$) durchgeführt mittels GraphPad Prism (Version 7.03). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD). n.d.: nicht detektierbar.

Auch bei Produktion von rekombinanten pseudotypisierten HDV war zu beobachten, dass, unabhängig vom kombinierend verwendeten HDV-Genotyp, eine deutlich höhere Sekretion des HBsAg von ChHBV stattfand (Abb. 18 A, vergleiche Abb. 17 A). Bei Quantifizierung der HDV-Genome im Zellkulturüberstand wurde deutlich, dass die HDV-Genotypen 3, 4, 5 und 6, im Vergleich zum HDV-Genotyp 1, weniger effizient produziert werden konnten. Diese Beobachtung war hier unabhängig von den jeweils verwendeten HBV-Hüllproteinen. Diese hatten hierzu auch keinen deutlich messbaren Einfluss auf die Gesamtmenge, der bei Quantifizierung gemessenen HDV-Genome, unabhängig vom entsprechenden HDV-Genotyp (Abb. 18 B).

Nach Generierung der unterschiedlichen rekombinanten pseudotypisierten HDV, sollte schließlich eine Infektion von transient NTCP/Ntcp-exprimierenden Huh7 Zellen exemplarisch durchgeführt werden (Abb. 19).

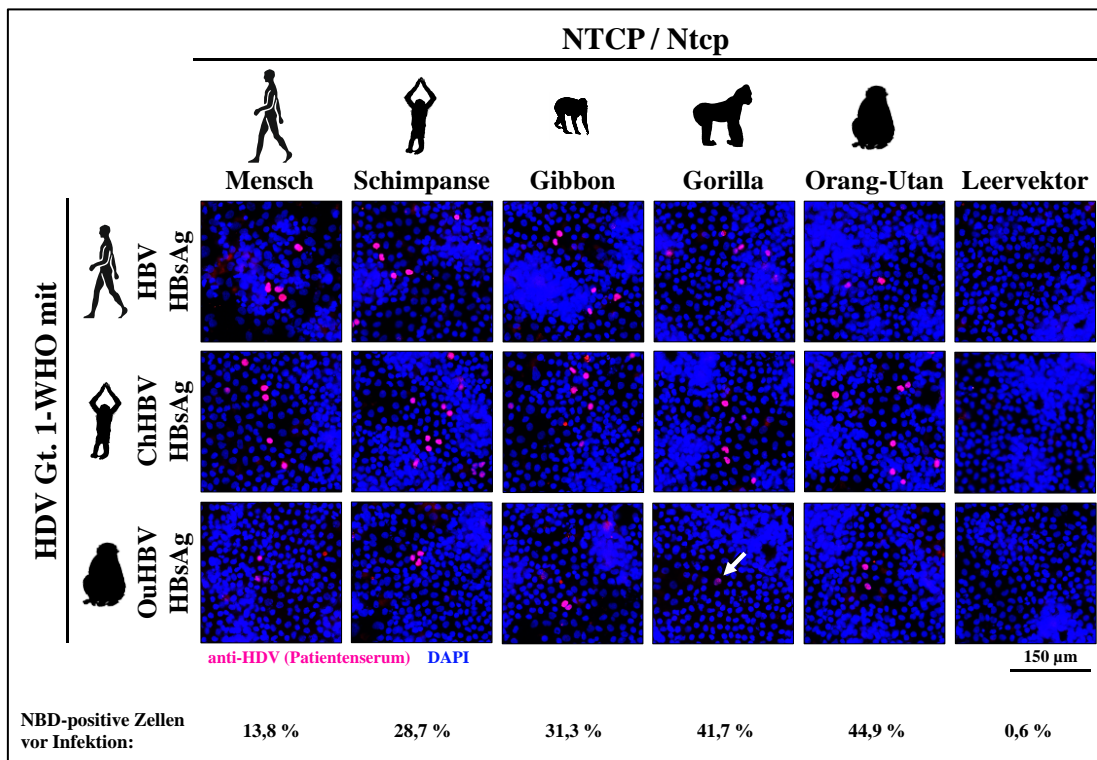


Abb. 19: Infektion von NTCP/Ntcp-exprimierenden Huh7 Zellen mit rekombinanten pseudotypisierten HDV
Huh7 Zellen wurden mittels Lipofectamine™ 3000 mit Expressionsvektoren codierend für den humanen NTCP oder den Ntcp nicht-humaner Primaten (300 ng / 48-Well) transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die nun NTCP/Ntcp-exprimierenden Huh7 Zellen mit verschiedenen rekombinanten pseudotypisierten HDV des Genotyps 1 (1×10^7 Genome / 48-Well) infiziert. Unmittelbar vor der Infektion wurde separat ein NBD-TC Transport-Assay durchgeführt, um die Funktionalität des jeweiligen NTCP/Ntcp zu überprüfen. Die Durchführung der Immunfluoreszenz-Färbung unter Verwendung des humanen HDV-Antiserums mit dem Sekundärantikörper anti-Human-IgG (A568, rot), erfolgte an Tag sechs nach Infektion. Dargestellt sind die repräsentativen Daten aus einem Experiment mit jeweils technischen Triplikaten.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass, unter Verwendung des HDV-Genotyp 1, bei Kombination mit allen verwendeten HBV-Hüllproteinen und allen verwendeten NTCP bzw. Ntcp, eine Infektion der Huh7 Zellen möglich war (Abb. 19). Dies konnte gezeigt werden, obwohl bei Durchführung eines NBD-TC Transport-Assays Unterschiede zwischen den transient NTCP/Ntcp exprimierenden Zellen

beobachtet wurden. So war der detektierte NBD-TC-Transport der transient den humanen NTCP exprimierenden Zellen mit 13 % vergleichsweise gering. Dennoch zeigte sich hier im Allgemeinen eine sehr geringe Infektionsrate, wobei scheinbar die Verwendung von HDV, pseudotypisiert mit ChHBV-Hüllproteinen, unabhängig von den hier verwendeten NTCP/Ntcp-exprimierenden Huh7 Zellen, die höchste Infektionsrate aufwies. Durch Verwendung von OuHBV-Hüllproteinen zur Generierung der rekombinanten pseudotypisierten HDV, resultierte hier ebenfalls eine vergleichsweise geringe Infektionsrate.

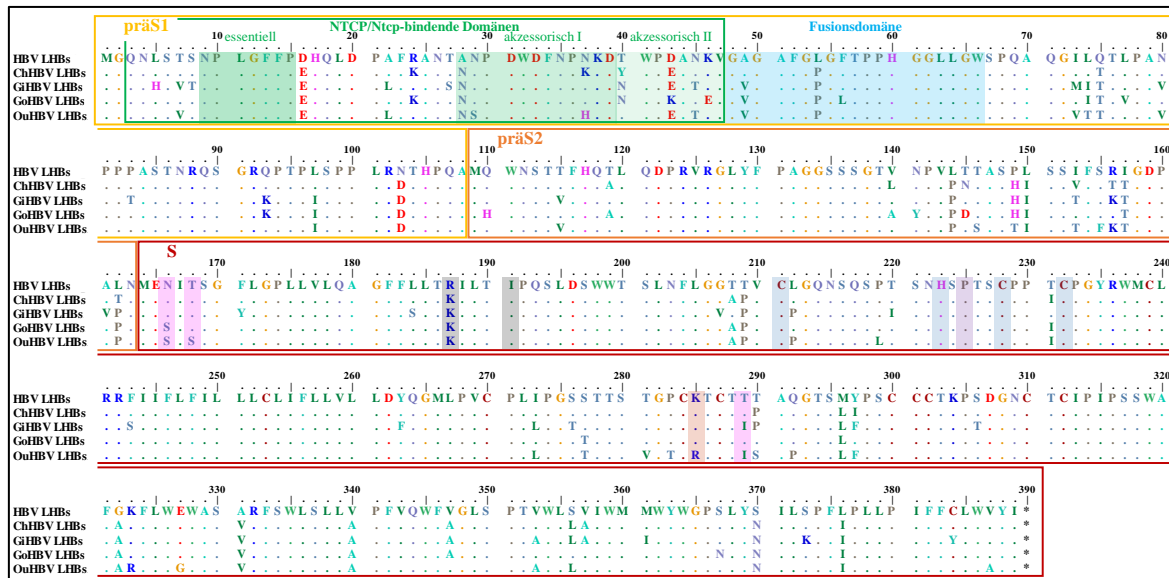


Abb. 20: Alignment des LHBs von HBV und HBV-Isolaten nicht-humaner Primaten

Das Alignment wurde mittels BioEdit Sequenzanalysetool generiert. Bezeichnung der NTCP-bindender Domänen nach (Glebe et al., 2005). Kennzeichnung der potenziellen Fusionsdomäne, wichtig für die Fusion zwischen der viralen und der Plasma- oder endosomalen Membran (Pérez-Vargas, Teppa, et al., 2021). Markierung der für die Interaktion mit L-HDAg wichtigen Aminosäure Prolin-62 (hier -125) im SHBs in Lila (Shih et al., 2010), der für die HDV-Assemblierung wichtigen Aminosäuren Arginin-24 (hier -187) und Isoleucin-28 (hier -191) im SHBs in Grau (Jenna & Sureau, 1998), sowie der für die Virionensekretion essenziellen Aminosäuren Cystein-48, -65, -69 (hier -211, -228, -232) und Histidin-60 (hier -223) in Dunkelblau (Mangold & Streeck, 1993) oder dafür wichtigen Aminosäuren Serin-3 (hier -166; sS3N), Threonin-5 (hier -168; sT5A) und Isoleucin-126 (hier -289; sI126T) in Pink (H. Liu, Chen, et al., 2024) und Lysin-122 (hier -285; sK122R) in Orange (Martin et al., 2012). HBV HBsAg-Sequenz aus (Nassal et al., 1990), GenBank accession number des jeweiligen HBV-Isolats nicht-humaner Primaten: ChHBV - AB032433, GiHBV - HQ603061, GoHBV - AJ131567, OuHBV - EU155824.

Beim Vergleich der entsprechenden Aminosäuresequenzen der verwendeten HBsAg von HBV und der HBV-Isolate nicht-humaner Primaten (Abb. 20), wurde deutlich, dass der essentielle NTCP/Ntcp-bindende Sequenzbereich (Abb. 20 dunkelgrün) hier identisch ist, die akzessorischen Domänen I und II aber schon deutliche Unterschiede aufweisen. Mit Vergleich zum HBsAg von HBV, zeigen diese der HBV-Isolate nicht-humaner Primaten Sequenzabweichungen von 8 - 15 % (ChHBV: 8,7 %, GiHBV: 14,6 %, GoHBV: 10,0 %, OuHBV: 13,8 %), wobei ChHBV HBsAg hier den geringsten Unterschied aufweist. Bezüglich der akzessorischen NTCP/Ntcp-bindenden Domänen (Abb. 20 hellgrün), zeigt OuHBV HBsAg die größten Abweichungen zu allen anderen HBsAg, sowohl ebendiesem von HBV, als auch derer der anderen untersuchten HBV-Isolate nicht-humaner Primaten. Beim Vergleich der Fusionsdomäne, welche wichtig für die Fusion zwischen der

viralen und der Plasma- oder endosomalen Membran ist (Pérez-Vargas, Teppa, et al., 2021), wird deutlich, dass alle untersuchten HBV-Isolate nicht-humaner Primaten, sich einheitlich in einer Aminosäure, zur Sequenz des betrachteten humanen HBsAg, unterscheiden (L54P). Bei dem Vergleich mit ChHBV HBsAg ist dies sogar der einzige Unterschied zum humanen HBsAg (Abb. 20 hellblau). Die Länge der HBsAg-Aminosäuresequenzen ist hier in allen untersuchten Isolaten identisch.

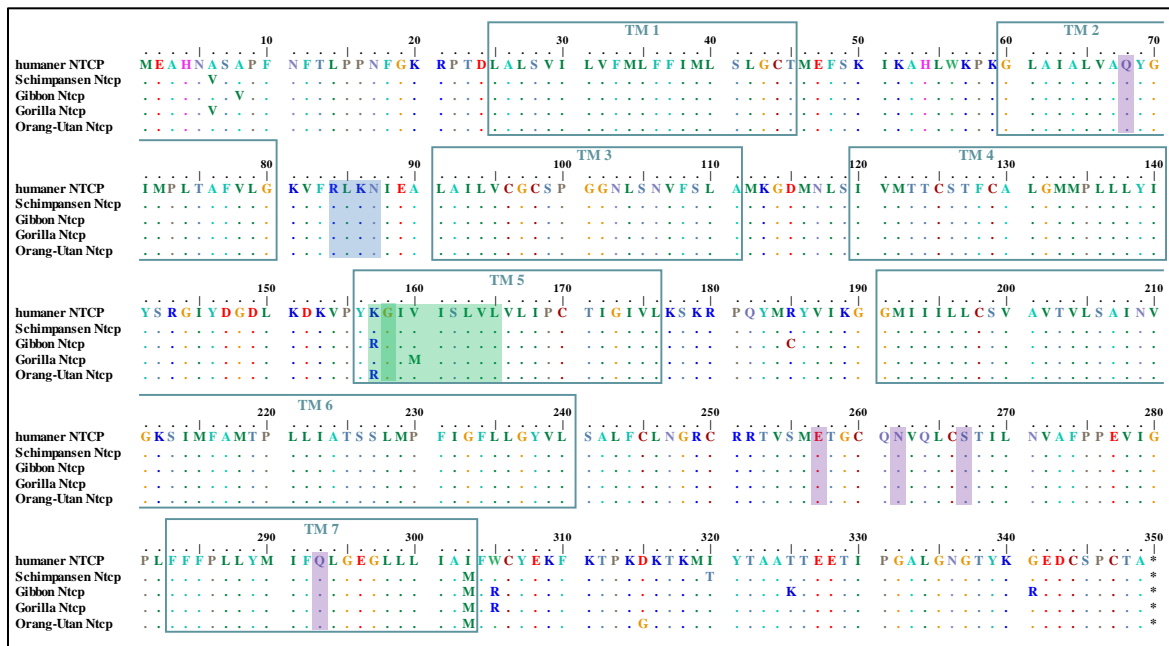


Abb. 21: Alignment des humanen NTCP und der Ntcp nicht-humaner Primaten

Das Alignment wurde mittels BioEdit Sequenzanalysetool generiert. Markierung der präS1-bindenden (grün) und für die HBV-Infektion wichtigen Domäne (blau) (Müller et al., 2018; Yan et al., 2012). Kennzeichnung weiterer für die Interaktion mit präS1 wichtiger Aminosäuren (lila) (Yan et al., 2014). Beschriftung der Transmembrandomänen (Zunaid et al., 2020). RefSeq.: humaner NTCP - NM_003049, Schimpansen NTCP - XM_510035, Gibbon Ntcp - XM_030812638, Gorilla Ntcp - XM_031002037, Orang-Utan Ntcp - XM_002824890. TM: Transmembrandomäne.

Beim Aminosäuresequenz-Vergleich des humanen NTCP, mit derer der Ntcp nicht-humaner Primaten, konnten hier deutlich weniger Unterschiede festgestellt werden (Abb. 21). Mit Vergleich zum humanen NTCP, zeigen die Ntcs der nicht-humanen Primaten lediglich Sequenzabweichungen von maximal 2 % (Schimpanse: 0,9 %, Gibbon: 2,0 %, Gorilla: 1,1 %, Orang-Utan: 0,9 %). Auch hier ist die Länge der NTCP/Ntcp-Aminosäuresequenzen der untersuchten Isolate identisch. Allerdings kann in der präS1-bindenden Domäne (Abb. 21 grün) des Gibbon Ntcp, Gorilla Ntcp und Orang-Utan Ntcp je eine, sich von der Sequenz des humanen NTCP abweichende, Aminosäure identifiziert werden. Die hier zur präS1-Bindung essenzielle Aminosäure Glycin an Position 158 (Müller et al., 2018), ist hier jedoch konserviert. Auch die Aminosäuresequenzbereiche der für die HBV-Infektion wichtigen Domäne (Abb. 21 blau), sowie diese weiterer für die Interaktion mit präS1 wichtiger Aminosäuren (Abb. 21 lila), weisen, für die hier analysierten Isolate, keine Unterschiede auf.

4.3. Detektion und Charakterisierung von Wirtsfaktoren, die mit Replikation und Persistenz von Hepatitis-B-Viren und Hepatitis-D-Viren interferieren

Da es auch bis heute keine spezifisch anti-virale Therapien gibt, um chronisch HBV- oder HBV/HDV-infizierte PatientInnen zu heilen, bleibt es ein wichtiges Forschungsthema, potenzielle Wirtsfaktoren, die mit Replikation und Persistenz von HBV und/oder HDV interferieren, zu identifizieren und zu charakterisieren. In dieser Arbeit wurden 64 verschiedene Wirtsfaktoren näher untersucht. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag hier auf der Infektion mit pseudotypisierten HDV des Genotyp 1, später auch des Genotyp 3, welche die Hüllproteine des HBV-Subgenotyp D3 (Nassal et al., 1990) trugen. Das HDV des Genotyp 1 tritt weltweit auf (siehe 1.3.1. Genetische Variabilität und Verbreitung von HDV und Abb. 5 A) und zeigen zudem die höchste Prävalenz (Le Gal et al., 2017). Gleichzeitig ist der HBV-Genotyp D ebenfalls der weltweit am weitesten verbreitete (1.3.2. Prävalenz und Variabilität von HBV und Abb. 5 B), sowie sogar im Mittelmeerraum, im Nahen Osten und in Südasien der dominierende Genotyp (Arauz-Ruiz et al., 1997; Norder et al., 1993). Daher stellten ebendiese sinnvolle Vertreter für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen dar.

Hierbei sollte zunächst der Fokus auf dem Wirtsfaktor IFITM3 (*interferon-induced transmembrane protein 3*) liegen. IFITM3 ist auch deshalb interessant, da bereits gezeigt wurde, dass sowohl die Replikation des Influenza-A-Virus, als auch die von SARS-CoV, durch IFITM3 beeinflusst werden (Brass et al., 2009; Diamond & Farzan, 2013; Huang et al., 2011). Diese Analysen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Geyer des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt und bereits in (Palatini et al., 2022) veröffentlicht. Dargestellt sind in der hier vorliegenden Arbeit ausschließlich die von mir durchgeführten Untersuchungen. Hierbei wurde die transiente Transfektion für den entsprechenden siRNA-vermittelten IFITM3-*Knock-Down* von Dr. Massimo Palatini durchgeführt und überprüft (siehe (Palatini et al., 2022)).

Zur Analyse der potenziell infolge des siRNA-vermittelten IFITM3-*Knock-Downs* veränderten HDV-Infektionsrate wurde schließlich eine Immunfluoreszenz-Färbung, unter Verwendung von humanem HDV-Antiserum, durchgeführt. Hierbei handelte es sich um das Serum eines HBV/HDV-positiven Patienten, welches demnach Antikörper gegen HDV enthält. Es erfolgte eine Quantifizierung der HDV/HDV-positiven Zellen mittels ImageXpress® Pico Zell-Imaging-System. So konnte gezeigt werden, dass in Huh7-NTCP Zellen, infolge eines siRNA-vermittelten IFITM3-*Knock-Downs*, eine verringerte HDV-Infektion hervorgerufen wurde, unabhängig vom verwendeten Isolat des HDV-Genotyp 1 (siehe Abb. 22 B). In HepG2-NTCP Zellen konnte dieser potenziell pro-virale Effekt von IFITM3 nur unter Verwendung von HDV Gt.1-WHO bestätigt werden. Bei Infektion mit HDV Gt.1-Taylor wurde hier kein signifikanter Unterschied durch den siRNA-

vermittelten IFITM3-*Knock-Down* beobachtet (Abb. 22 A). Um diese Beobachtung nun so nah wie möglich an der *in-vivo* Infektion zu untersuchen, wurden hier auch primäre humane Hepatozyten mit den verschiedenen Isolaten rekombinanter pseudotypisierter HDV des Genotyps 1 infiziert. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Infektionsrate, infolge des siRNA-vermittelten IFITM3-*Knock-Downs*, zeigte sich hier allerdings nicht. Dennoch konnte, durch Zugabe des synthetischen myristoylierten HBV-Gt.D3-präS1²⁻⁴⁸-Peptids, die Infektion mit HDV inhibiert werden, unabhängig vom für die Infektion verwendeten Isolat des HDV-Genotyp 1. (Abb. 17 C).

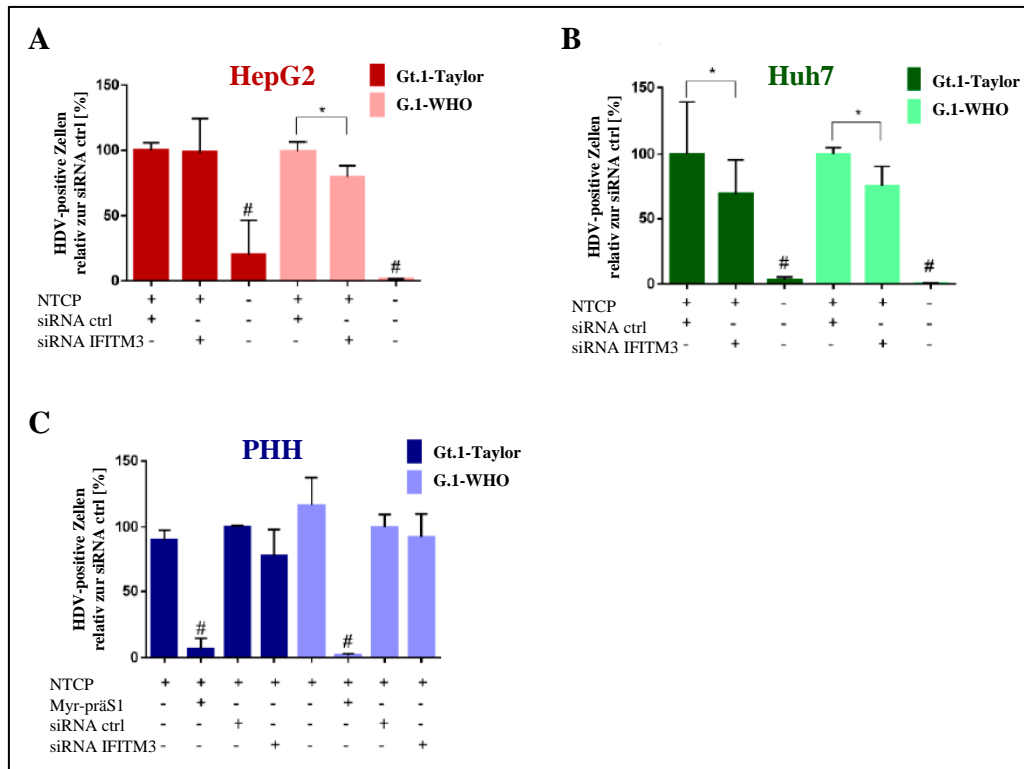


Abb. 22: Einfluss des IFITM3-*Knock-Downs* auf die HBV/HDV-Rezeptor-Funktion von NTCP

Die hier dargestellten Daten wurden bereits publiziert, die Abbildung wurde aus (Palatini et al., 2022) entnommen und übersetzt. HepG2-NTCP (A) und Huh7-NTCP Zellen (B), sowie primäre humane Hepatozyten (PHH, C) wurden auf 24-Well-Mikrotiterplatten ausgesät, entweder mit Silencer® Select IFITM3 siRNA oder Silencer™ Negative Control No. 1 (siRNA ctrl) transfiziert und 72 Stunden (HepG2-NTCP, Huh7-NTCP) bzw. 48 Stunden (PHH) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen über Nacht mit $2-4 \times 10^5$ IU / 24-Well verschiedenen Isolaten rekombinanter pseudotypisierter HDV des Genotyps 1 (HDV Gt.1-Taylor oder -WHO) infiziert. Die Durchführung der Immunfluoreszenz-Färbung unter Verwendung des humanen HDV-Antiserums mit dem Sekundärantikörper anti-Human-IgG (A568), erfolgte an Tag 8 nach Infektion. Es erfolgte eine Quantifizierung der HDV-positiven Zellen mittels ImageXpress® Pico Zell-Imaging-System. Dargestellt sind die kombinierten Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten (A, B) oder aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Duplikaten (C).

* Signifikant niedriger nach Transfektion mit Silencer® Select IFITM3 siRNA im Vergleich zur Transfektion mit siRNA ctrl mit $p < 0,05$ gemäß one-way ANOVA Varianzanalyse mit Šidák-Korrektur, durchgeführt mittels GraphPad Prism.

Signifikant niedriger nach Transfektion mit Silencer® Select IFITM3 siRNA im Vergleich zu allen anderen Versuchsbedingungen mit $p < 0,05$ gemäß one-way ANOVA Varianzanalyse mit Šidák-Korrektur, durchgeführt mittels GraphPad Prism.

Entsprechend eignete sich die Methode des siRNA-vermittelten *Knock-Downs* von Wirtsfaktoren auch, um in einem experimentellen Ansatz mehrere Wirtsfaktoren effizient auf pro- oder anti-virale Funktionen bei der HDV-Infektion und -Replikation zu untersuchen. Folgend wurde so eine Auswahl von 13 Wirtsfaktoren, sprich Kandidaten mit potenziell pro- oder anti-viralen Funktionen, analysiert.

Hierbei wurden erneut Huh7-NTCP Zellen mit entsprechenden siRNAs, jeweils komplementär zu einer Sequenz der mRNA für die Synthese des untersuchten Wirtsfaktors, transfiziert und folgend mit rekombinanten pseudotypisierten HDV des Genotyps 1 (Isolat: WHO) infiziert. Auch hier erfolgte eine Immunfluoreszenz-Färbung, unter Verwendung von humanem HDV-Antiserum, sowie daraufhin die Quantifizierung der HDV/HDAg-positiven Zellen (Abb. 23).

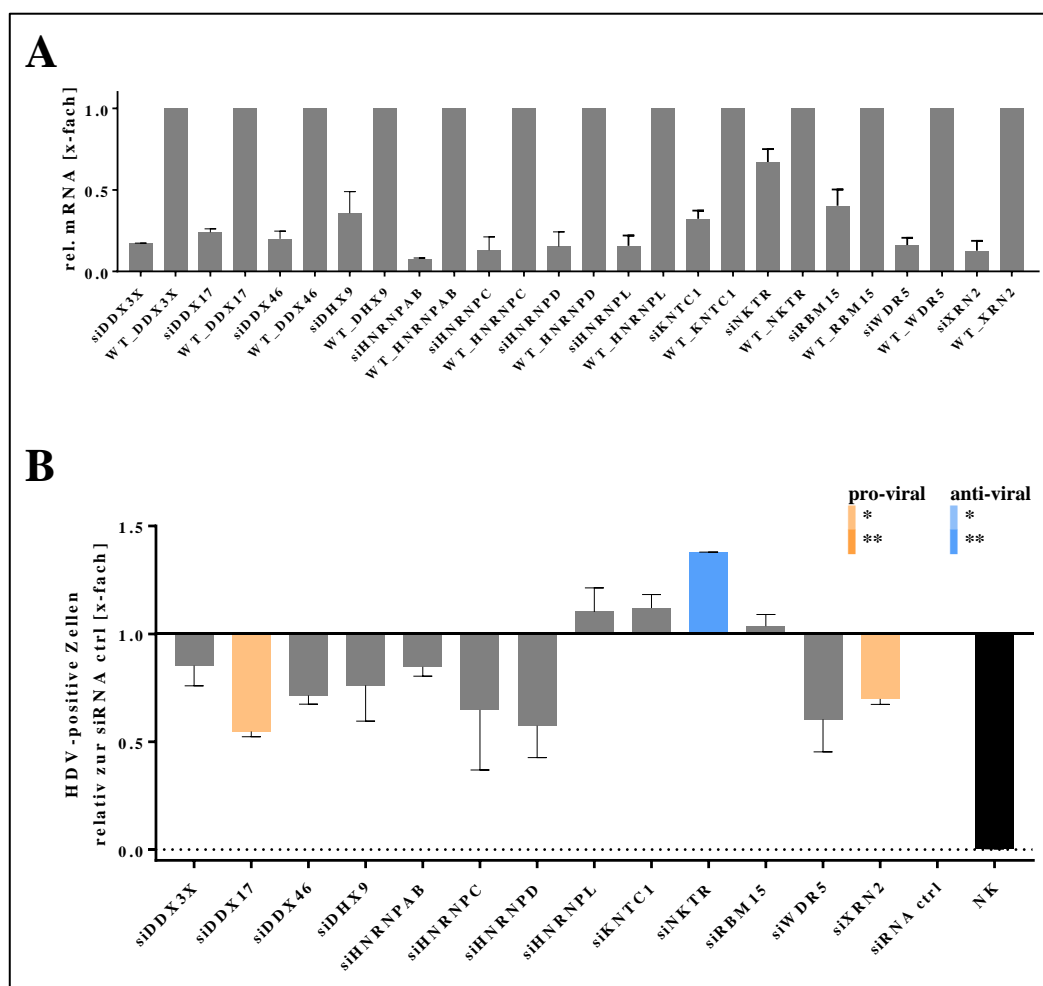


Abb. 23: Einfluss des siRNA-vermittelten *Knock-Downs* verschiedener Wirtsfaktoren auf die HDV-Infektion
Huh7-NTCP Zellen wurden auf 24-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und mit Dicer-Substrate Short Interfering RNAs (DsiRNAs) transfiziert (siehe 3.1.3. Transiente Transfektion von siRNAs zum gezielten *Knock-Down* von Wirtsfaktoren). Die relative Quantifizierung ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode) der Überprüfung des jeweiligen Gen-*Knock-Downs*, im Vergleich zu nicht-transfizierten Huh7-NTCP Zellen (WT), erfolgte 48 Stunden nach Transfektion (A). Anschließend wurden die Zellen über Nacht mit rekombinanten pseudotypisierten HDV Gt.1-WHO (4×10^8 Genome / 24-Well) infiziert. Die Durchführung der Immunfluoreszenz-Färbung, unter Verwendung des humanen HDV-Antiserums mit dem Sekundärantikörper anti-Human-IgG (A568), erfolgte an Tag 8 nach Infektion. Es erfolgte eine Quantifizierung der HDV-positiven Zellen mittels ImageXpress® Pico Zell-Imaging-System (B). Dargestellt sind die kombinierten Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit technischen Unikaten. Signifikanz-Berechnung für B: gepaarter t-Test (n.s. / grau $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$) durchgeführt mittels GraphPad Prism (Version 7.03). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD). NK: Negativ-Kontrolle, nicht-infizierte Zellen.

Zunächst konnte mittels RT-qPCR, unter Verwendung von spezifischen Hydrolysesonden, gezeigt werden, dass ein *Knock-Down* aller 13 Wirtsfaktoren mittels RNA-Interferenz möglich war. Hierbei wurde deutlich, dass für fast alle Wirtsfaktoren eine Reduktion der jeweiligen mRNA um mehr als 50 % erreicht werden konnte (Ausnahme: *NKTR*, 30 % Reduktion) (Abb. 23 A). Bei Infektion der

generierten *Knock-Down* Zellen mit rekombinanten pseudotypisierten HDV wurde dennoch deutlich, dass nach NKTR-*Knock-Down* eine, im Vergleich zur Kontroll-siRNA (siRNA ctrl), signifikant erhöhte HDV-Infektionsrate zu beobachten war (Abb. 23 B blau), was dementsprechend auf eine potenzielle anti-virale Funktion von NKTR hinweisen könnte. Im Gegensatz dazu, konnte nach *Knock-Down* von DDX17 und auch XRN2 eine signifikant verringerte Infektionsrate beobachtet werden (Abb. 23 B orange), was hier so für potenziell pro-virale Eigenschaften sprechen würde.

Ebendiese *Knock-Down*-Experimente, wie hier unter Verwendung von siRNAs, eigneten sich demnach, um zunächst eine erste Einschätzung von potenziellen pro- oder anti-viralen Eigenschaften von Wirtsfaktoren zu erlangen. Zur Validierung der Ergebnisse sollten so im nächsten Schritt stabile *Knock-Out*-Zellen generiert werden. Hierzu wurde das CRISPR/Cas9-System (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated protein 9*) angewendet, wonach, durch gezieltes Schneiden des Zielgens durch die Endonuklease Cas9, *Knock-Out*-Zellen generiert werden sollten. Außerdem wurden hier *in-vitro* Lentiviren generiert, um so das CRISPR/Cas9-System mittels lentiviraler Transduktion auch effizient in die Huh7-NTCP^{MPL} Zellen einzubringen (siehe auch 3.2.2. Produktion von Lentiviren durch transiente Transfektion von HEK293T Zellen mittels Calciumphosphat-Methode und Transduktion von Huh7-NTCP^{MPL} Zellen). Es wurden zunächst Gen-spezifische sgRNA-Sequenzen in den Expressionsvektor lentiCRISPRv2, anhand des hierzu publizierten Protokolls (Sanjana et al., 2014; Shalem et al., 2014), kloniert (Abb. 24, siehe auch 3.4.7. Klonierung von Gen-spezifischen sgRNA-Sequenzen in lentiCRISPRv2 und 2.5.3. Verwendete sgRNAs (als Oligonukleotide) zur Klonierung in lentiCRISPRv2 zum induzierten gezielten Gen-*Knock-Out*).

Die Auswahl der hier nun untersuchten Gene, erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Karim Majzoub vom Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM) in Montpellier. Diese hatten zuvor Untersuchungen mittels ChIRP-MS (*Comprehensive identification of RNA-binding proteins by mass spectrometry*) durchgeführt. Dies geschah unter Verwendung von drei Huh7.5.1 Zelllinien, welche persistent HDV replizieren, von welchen zwei Zelllinien darüber hinaus auch HBsAg exprimierten. Auch unter Berücksichtigung des RNAi-Screenings aus (Verrier et al., 2020) wurde eine Zusammenstellung von insgesamt 56 Genen erstellt, welche es zu untersuchen galt. Zunächst wurden für jedes zu untersuchende Gen je zwei Gen-spezifische sgRNA-Sequenzen ausgewählt und in das Plasmid lentiCRISPRv2 kloniert. Die hier verwendeten sgRNAs wurden der ‚Human KO Library‘ aus (Shalem et al., 2014) entnommen oder mittels des CHOPCHOP^{web tools} (Labun et al., 2016, 2019; Montague et al., 2014) generiert. In dieser Arbeit wurden so 36 Expressionskonstrukte, zur Untersuchung von entsprechend 18 Genen, kloniert (Abb. 24). Die in dieser Arbeit ebenfalls verwendeten Expressionskonstrukte, zur Untersuchung von weiteren 38 Genen, wurden durch Dr. Pierre Khalfi aus der Arbeitsgruppe von Dr. Karim Majzoub generiert (siehe Anhang ‚Von Dr. Pierre Khalfi verwendete sgRNAs zur Klonierung in lentiCRISPRv2 zum induzierten gezielten Gen-*Knock-Out*‘).

	190	200	210	sgRNA Zielsequenz (Insert)		240	250	260	270										
lentiCRISPRv2_sgACSL3_1	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgACSL3_2	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgCaectin_1	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgCaectin_2	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgCBX3_1	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgCBX3_2	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgC5orf34_1	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgC5orf34_2	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgDDX33_1	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgDDX33_2	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgDDX17_1	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgDDX17_2	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgEIF4H_1	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgEIF4H_2	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgELAVL1_1	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgELAVL1_2	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgF5TL1_1	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgF5TL1_2	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgHNRNPAB_1	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgHNRNPAB_2	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgIDE_1	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgIDE_2	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgKNTC1_1	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgKNTC1_2	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgNKR_1	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgNKR_2	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgNSUN2_1	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgNSUN2_2	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgPSMD5_1	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgPSMD5_2	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgRBM15_1	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgRBM15_2	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgTMPO_1	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgTMPO_2	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgWDR6_1	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G
lentiCRISPRv2_sgWDR6_2	C	T	T	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	A	C	A	C	C	G

Abb. 24: Sequenzvergleich der Sequenzierdaten zur Überprüfung der Klonierung von verschiedenen sgRNA-Sequenzen in das Plasmid lentiCRISPRv2

Das Alignment wurde mittels BioEdit Sequenzanalysetool generiert. Dargestellt sind die durch Sanger-Sequenzierung ermittelten Sequenzen der 36 in dieser Arbeit klonierten Plasmide (siehe 3.4.7. Klonierung von Gen-spezifischen sgRNA-Sequenzen in lentiCRISPRv2 und 2.5.3. Verwendete sgRNAs (als Oligonukleotide) zur Klonierung in lentiCRISPRv2 zum induzierten gezielten Gen-*Knock-Out*). Markierung der jeweiligen Gen-spezifischen sgRNA-Sequenz (Insert), sowie der ergänzenden Sequenz-Bereiche, der für die Klonierung verwendeten Oligonukleotide.

Nach Klonierung der entsprechenden Expressionskonstrukte, wurden schließlich, in Zusammenarbeit mit Dr. Pierre Khalfi und Dr. Karim Majzoub, am Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM) in Montpellier, Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zellen mittels lentiviraler Transduktion generiert (siehe 3.2.2. Produktion von Lentiviren durch transiente Transfektion von HEK293T Zellen mittels Calciumphosphat-Methode und Transduktion von Huh7-NTCP^{MPL} Zellen). Anschließend wurden zwei Screenings nach Wirtsfaktoren mit potenziell pro- oder anti-viralen Eigenschaften durchgeführt. Hierbei wurden die generierten 113 Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zellen mit rekombinanten pseudotypisierten HDV des Genotyps 1 (Gt.1-Taylor HDV und Gt.1-WHO) infiziert, sowie anschließend eine Quantifizierung der HDV-positiven Zellen vorgenommen (Abb. 25, Abb. 26). Als Referenz dienten hier für alle folgenden Untersuchungen Huh7-NTCP^{MPL} (Gen-*Knock-Out*-)Zellen mit Kontroll-sgRNA (sgRNA ctrl), wobei diese hier verwendete sgRNA gegen GFP (*green fluorescent protein*, (Shimomura et al., 1962)) gerichtet ist, sprich keinen Gen-*Knock-Out* in den verwendeten gängigen humanen Leberkarzinomzellen (Huh7 Zellen) hervorrufen sollte.

Da einige Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien bei Durchführung der beiden Screenings nicht erhalten werden konnten, sprich diese bei Zugabe des Selektionsantibiotikums (Puromycin Dihydrochlorid [3,5 µg/ml]) zur Realisierung des Gen-*Knock-Outs* starben, werden diese folgend nicht weiter aufgeführt. Die Zugabe von Puromycin zum Kulturmedium erfolgte kontinuierlich beim Passagieren oder Aussäen der Zellen bis zum Abschluss aller in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen. Aufgrund der großen Anzahl an untersuchten Wirtsgenen, bzw. generierten Huh7-

NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien, erfolgte zu diesem Zeitpunkt keine Überprüfung des jeweiligen Gen-*Knock-Outs*.

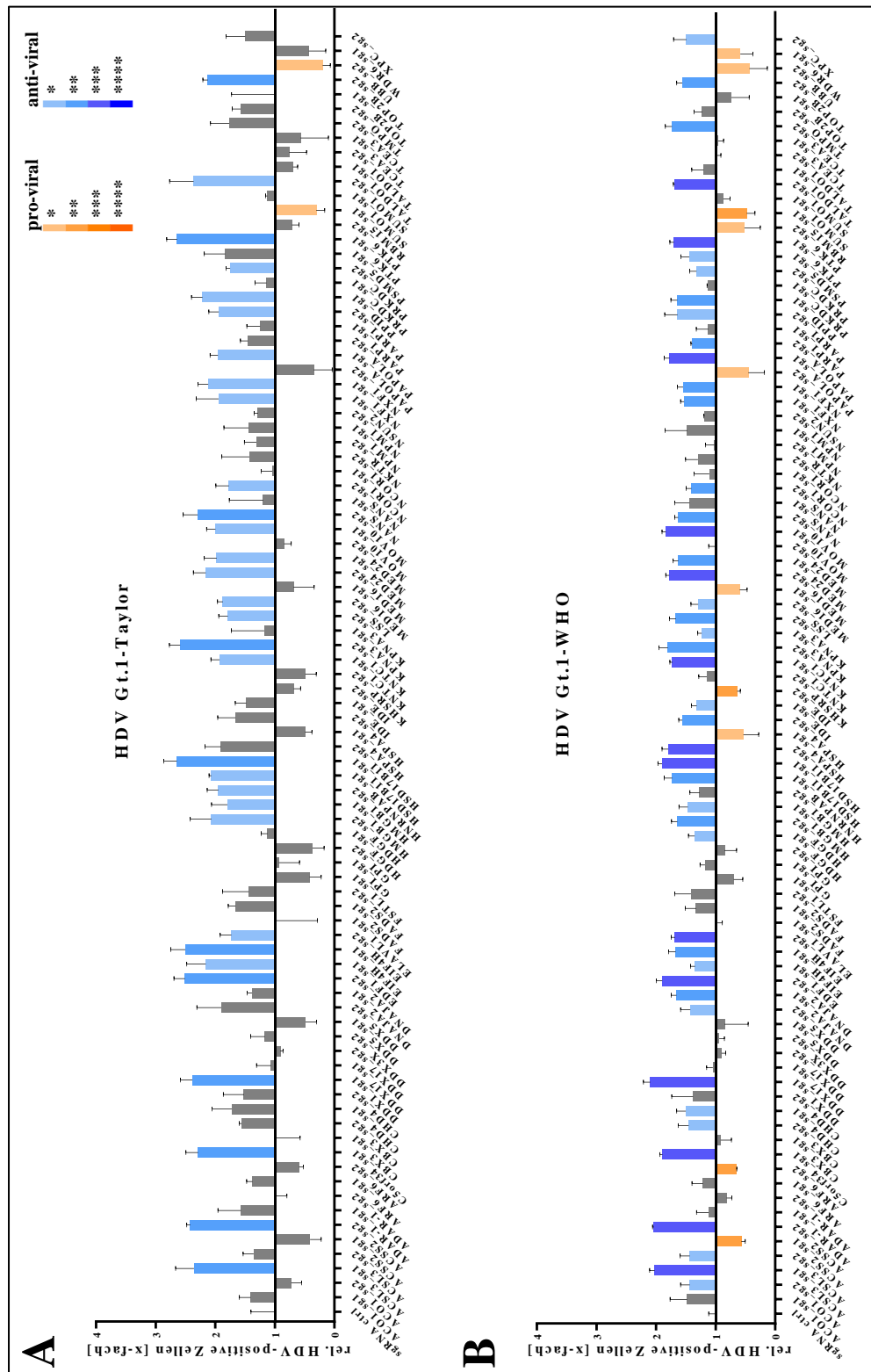


Abb. 25: Screening aller generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-Knock-Out-Zellen anhand der Infektion mit rekombinanten pseudotypisierten HDV

Die generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-Knock-Out-Zellen wurden mit 3×10^3 Zellen / Well in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und am Folgetag mit rekombinanten pseudotypisierten HDV Gt.1-Taylor ($1,7 \times 10^5$ Genome / 96-Well, A) oder HDV Gt.1-WHO ($1,3 \times 10^4$ Genome / 96-Well, B) infiziert. Die Durchführung der Immunfluoreszenz-Färbung, unter Verwendung des humanen HDV-IgBAB-Antiserums mit dem Sekundärantikörper anti-Human-IgG (A488), erfolgte an Tag 7 nach Infektion. Es erfolgte eine Quantifizierung der HDV-positiven Zellen mittels ImageXpress® Pico Zell-Imaging-System. Dargestellt sind die Daten aus einem Experiment mit technischen Triplikaten, jeweils relativiert auf die infizierten Huh7-NTCP^{MPL} (Gen-Knock-Out-)Zellen mit Kontroll-sgRNA (sgRNA ctrl). Signifikanz-Berechnung: nicht-gepaarter t-Test (n.s. / grau $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$) durchgeführt mittels GraphPad Prism (Version 7.03). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD).

Beim ersten Screening aller generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zellen anhand der Infektion mit rekombinanten pseudotypisierten HDV des Genotyp 1 (Gt.1-Taylor HDV und Gt.1-WHO) konnten zunächst zu einem größeren Anteil Wirtsfaktoren mit potenziell anti-viralen Eigenschaften beobachtet werden. Eine Ausnahme bildeten hier konstant nur RBM15 (sgRNA Nr. 1), sowie UBB (sgRNA Nr. 2), hier war infolge des Gen-*Knock-Outs* eine signifikant verringerte HDV-Infektionsrate zu beobachten (Abb. 25). Das Verhältnis der HDV-positiven Zellen nach Infektion der verschiedenen Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zellen blieb, beim Vergleich der beiden verwendeten Isolate des HDV-Genotyp 1, identisch.

Infolgedessen wurden die Wirtsfaktoren, für deren Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien im ersten Screening potenziell pro- oder anti-viralen Eigenschaften beobachtet wurden, in drei Kategorien eingeteilt. Hierfür wurden jeweils beide Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien (sgRNA Nr. 1/2) des jeweiligen Wirtsfaktors betrachtet:

- 1) Deutliche potenziell pro-/anti-virale Eigenschaften für eine der verwendeten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien (sgRNA), aber gegenteilige potenziell pro-/anti-virale Eigenschaften, oder kein signifikanter Unterschied (nur gleiche Tendenz) in der HDV-Infektionsrate im Vergleich zu Huh7-NTCP^{MPL} (Gen-*Knock-Out*-)Zellen mit Kontroll-sgRNA (sgRNA ctrl), bei Analyse der jeweils zweiten verwendeten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinie (sgRNA).
- 2) Deutliche potenziell pro-/anti-virale Eigenschaften für eine der verwendeten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien (sgRNA), aber keine Erhaltung der jeweils zweiten verwendeten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinie (sgRNA) möglich.
- 3) Deutliche potenziell pro-/anti-virale Eigenschaften für beide der verwendeten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien (sgRNAs).

Tabelle 2: Kategorisierung der im ersten Screening analysierten Wirtsfaktoren mit hier beobachteten potenziell pro- oder anti-viralen Eigenschaften

Farbliche Markierung der Wirtsfaktoren mit im zweiten Screening verifizierten pro- oder anti-viralen Eigenschaften, siehe Erläuterungen im Text.

Kategorie	Wirtsfaktor	Eigenschaft / Tendenz ^T	
		sgRNA Nr. 1	sgRNA Nr. 2
1	ACSL3	anti-viral	anti-viral ^T
1	ACSS2	pro-viral ^T	anti-viral
1	DNAJA	anti-viral ^T	anti-viral
1	HDGF	anti-viral ^T	anti-viral
1	HMGB1	anti-viral	anti-viral ^T
1	HSD17B11	anti-viral	anti-viral ^T
1	HSPA4	pro-viral ^T	anti-viral ^T
1	IDE	anti-viral ^T	pro-viral ^T

1	KPNA3	anti-viral ^T	anti-viral
1	MED16	pro-viral ^T	anti-viral
1	NANS	anti-viral ^T	anti-viral
1	PAPOLA	anti-viral	anti-viral ^T
1	PARP1	anti-viral ^T	anti-viral
1	PRKDC1	anti-viral ^T	anti-viral
1	PTK6	anti-viral	pro-viral ^T
1	SUMO1	-	anti-viral
1	TOP2B	pro-viral ^T	anti-viral
2	C5orf34	anti-viral	-
2	DDX1	anti-viral	-
2	EDF1	anti-viral	-
2	HNRNPAB	anti-viral	-
2	LSS	-	anti-viral
2	NSUN2	anti-viral	-
2	PPID	anti-viral	-
2	RBM15	pro-viral	-
2	UBB	-	pro-viral
3	EIF4H	anti-viral	anti-viral
3	KNTC1	anti-viral	anti-viral
3	MOV10	anti-viral	anti-viral
-	DDX17	pro-viral (siRNA-vermittelter <i>Knock-Down</i>)	

Beim zweiten Screening wurden nun nur solche der Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien erneut analysiert, welche beim ersten Screening entsprechend potenziell pro- oder anti-virale Eigenschaften zeigten. Hierbei wurde eine Auswahl von zunächst 20 zu untersuchenden Genen erstellt, sowie diese Auswahl mit *DDX17* und *NKTR* erweitert, da diese Wirtsfaktoren bereits bei Durchführung der siRNA-vermittelten *Knock-Down*-Experimente (Abb. 23) pro- (*DDX17*) bzw. anti-virale (*NKTR*) Eigenschaften aufwiesen. Wenn möglich, wurden im zweiten Screening ebenfalls beide Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien wie zuvor analysiert. Dies erfolgte erneut durch die Durchführung einer Infektion der Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien mit rekombinanten pseudotypisierten HDV des Genotyp 1 (Gt.1-Taylor HDV und Gt.1-WHO) (Abb. 26).

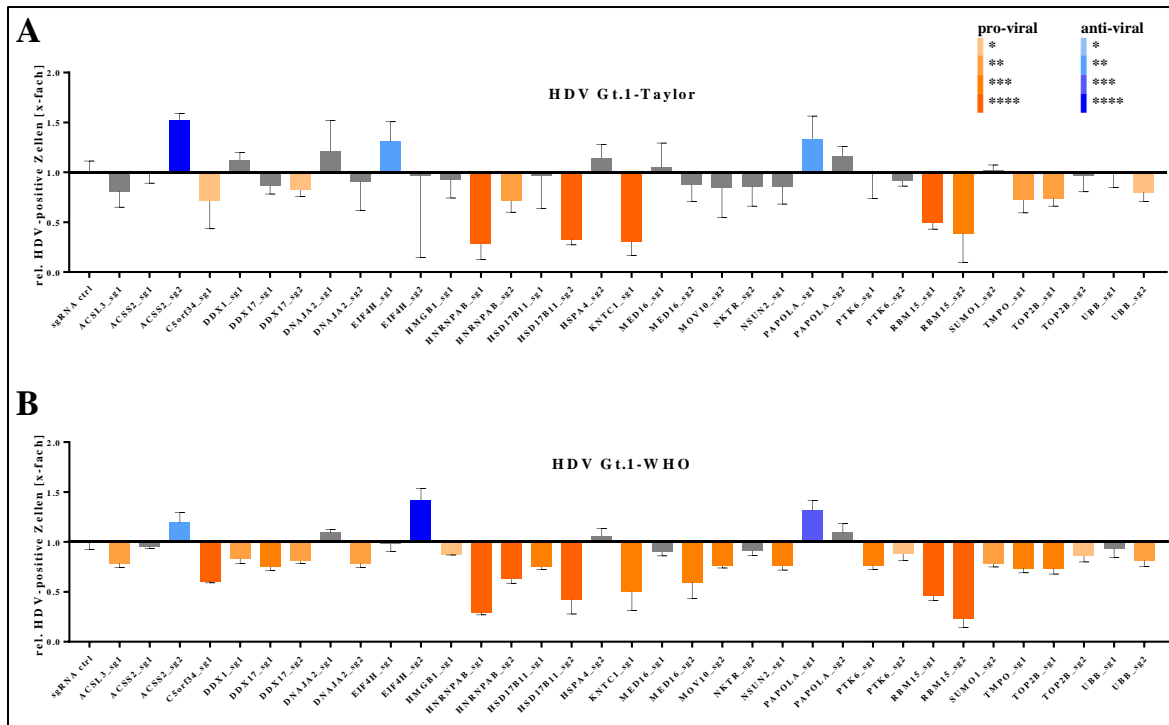


Abb. 26: Überprüfungsscreening der generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-Knock-Out-Zellen anhand der Infektion mit rekombinanten pseudotypisierten HDV

Die generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-Knock-Out-Zellen wurden mit 1×10^4 Zellen / Well in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und am Folgetag mit rekombinanten pseudotypisierten HDV Gt.1-Taylor ($4,1 \times 10^2$ Genome / 96-Well, A) oder HDV Gt.1-WHO ($1,1 \times 10^3$ Genome / 96-Well, B) infiziert. Die Durchführung der Immunfluoreszenz-Färbung, unter Verwendung des humanen HDV-IgBAB-Antiserums mit dem Sekundärantikörper anti-Human-IgG (A488), erfolgte an Tag 7 nach Infektion. Es erfolgte eine Quantifizierung der HDV-positiven Zellen mittels ImageXpress® Pico Zell-Imaging-System. Dargestellt sind die Daten aus einem Experiment mit technischen Triplikaten, jeweils relativiert auf die infizierten Huh7-NTCP^{MPL} (Gen-Knock-Out-)Zellen mit Kontroll-sgRNA (sgRNA ctrl). Signifikanz-Berechnung: nicht-gepaarter t-Test (n.s. / grau $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$) durchgeführt mittels GraphPad Prism (Version 7.03). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD).

Beim zweiten Screening der Huh7-NTCP^{MPL} Gen-Knock-Out-Zelllinien, das dazu dienen sollte die beim ersten Screening beobachteten potenziell pro- oder anti-viralen Eigenschaften der zu untersuchenden Gene zu verifizieren, konnten allerdings nun zu einem größeren Anteil Wirtsfaktoren mit potenziell pro-viralen Eigenschaften beobachtet werden. Sprich solche, bei welchen infolge des Gen-Knock-Outs eine signifikant verringerte HDV-Infektionsrate zu beobachten war. Nur wenige der im ersten Screening beobachteten potenziellen pro- oder anti-viralen Funktionen konnten im zweiten Screening bestätigt werden (Abb. 26). Bei Betrachtung der jeweils beiden verwendeten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-Knock-Out-Zelllinien (sgRNAs), konnten lediglich die zuvor beobachteten, in diesem Fall pro-viralen, Eigenschaften von RBM15 erneut signifikant bestätigt werden (Tabelle 2 orange). Einige der untersuchten Gene zeigten ebenfalls mit dem ersten Screening übereinstimmende deutliche potenziell pro- oder anti-virale Eigenschaften für je eine der verwendeten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-Knock-Out-Zelllinien (sgRNA), allerdings keinen signifikanten Unterschied, lediglich eine entsprechend gleiche Tendenz, in der HDV-Infektionsrate im Vergleich zu Huh7-NTCP^{MPL} (Gen-Knock-Out-)Zellen mit Kontroll-sgRNA (sgRNA ctrl), bei Analyse der jeweils zweiten verwendeten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-Knock-Out-Zelllinie (sgRNA) (Tabelle 2 pro-viral: gelb, anti-viral: grün). Demnach konnten hier die potenziell pro-viralen Eigenschaften von DDX17 und UBB, sowie die

potenziell anti-viralen Eigenschaften von PAPOLA, bestätigt werden. Sofern während der Durchführung der Untersuchungen keine Erhaltung beider der generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien (sgRNAs) möglich war, wurden zumindest die potenziell pro- / anti-viralen Eigenschaften der verbliebenen Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinie (sgRNA) analysiert. Hierbei konnten lediglich die potenziell anti-viralen Eigenschaften von HSPA4 (Tabelle 2 lila) verifiziert werden, allerdings wurde hier kein signifikanter Unterschied, lediglich eine entsprechend gleiche Tendenz, in der HDV-Infektionsrate im Vergleich zu Huh7-NTCP^{MPL} (Gen-*Knock-Out*-)Zellen mit Kontroll-sgRNA (sgRNA ctrl), beobachtet.

Die Berechnung signifikanter Unterschiede zwischen den Ergebnissen innerhalb der beiden durchgeführten Screenings erfolgte anhand eines nicht-gepaarten t-Tests. Eine Analyse mittels one-way ANOVA mit Dunnett-Test ergab hier keine identischen, aber vergleichbare Ergebnisse.

Folgend sollten so nun fünf der Wirtsfaktoren, die bisher als solche mit potenziell pro- oder anti-viralen Eigenschaften identifiziert wurden (siehe farbliche Markierung in Tabelle 2 und Abb. 23), weiter untersucht werden. Hierzu gehörten demnach, mit potenziell pro-viralen Eigenschaften, DDX17 und RBM15, sowie HSPA4 und PAPOLA, mit potenziell anti-viralen Eigenschaften. Auch NKTR wurde hier erneut in die zu untersuchende Auswahl an Wirtsfaktoren aufgenommen.

Da bisher keiner der angestrebten Gen-*Knock-Outs* tatsächlich auf Proteinebene bestätigt werden konnte, sollten zunächst für jeden zu untersuchenden Wirtsfaktor möglichst beide generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien mittels Western Blot Untersuchungen analysiert werden (Abb. 27).

Hierbei konnte sowohl für beide Huh7-NTCP^{MPL} *DDX17-Knock-Out*-Zelllinien (DDX17_sg1/2) der *DDX17-Knock-Out* auf Proteinebene bestätigt werden, als auch, mittels Transfektion mit entsprechendem Expressionsvektor, DDX17 in Huh7-NTCP^{MPL} Zellen (Wildtyp) überexprimiert werden (Abb. 27 A). Auch nach Durchführen von 35 Zellpassagen, konnte der *DDX17-Knock-Out* auf Proteinebene konstant bestätigt werden (Abb. 27 B). Eine entsprechende Überexpression von HSPA4 in Huh7-NTCP^{MPL} Zellen (Wildtyp) hingegen konnte hier nicht erreicht werden. Auch wurde der *HSPA4-Knock-Out* auf Proteinebene nur für eine der beiden Huh7-NTCP^{MPL} *HSPA4-Knock-Out*-Zelllinien (HSPA4_sg1) bestätigt. Hier wurde zudem deutlich, dass der *HSPA4-Knock-Out* erst nach einigen Zellpassagen, unter Zugabe des entsprechenden Selektionsantibiotikums ins Kulturmedium zur Realisierung des Gen-*Knock-Outs*, ausreichend selektiert wurde (Abb. 27 A, B). Desweiteren konnte zu keinem Zeitpunkt für eine der Huh7-NTCP^{MPL} *RBM15-Knock-Out*-Zelllinien ein kompletter *RBM15-Knock-Out* auf Proteinebene festgestellt werden. Dennoch war hier auch nach vielen Zellpassagen ein *RBM15-Knock-Down* für beide generierten Huh7-NTCP^{MPL} *RBM15-Knock-Out*-Zelllinien (RBM15_sg1/2) erkennbar (Abb. 27 A, B). Auch hier konnte vergleichend, ebenfalls mittels Transfektion mit entsprechendem Expressionsvektor, RBM15 in Huh7-NTCP^{MPL} Zellen (Wildtyp) überexprimiert werden (Abb. 27 A). Eine spezifische Detektion von NKTR oder

PAPOLA mittels Western Blot Analysen war aufgrund unspezifischer Antikörper zu keinem Zeitpunkt möglich (Abb. 27 C).

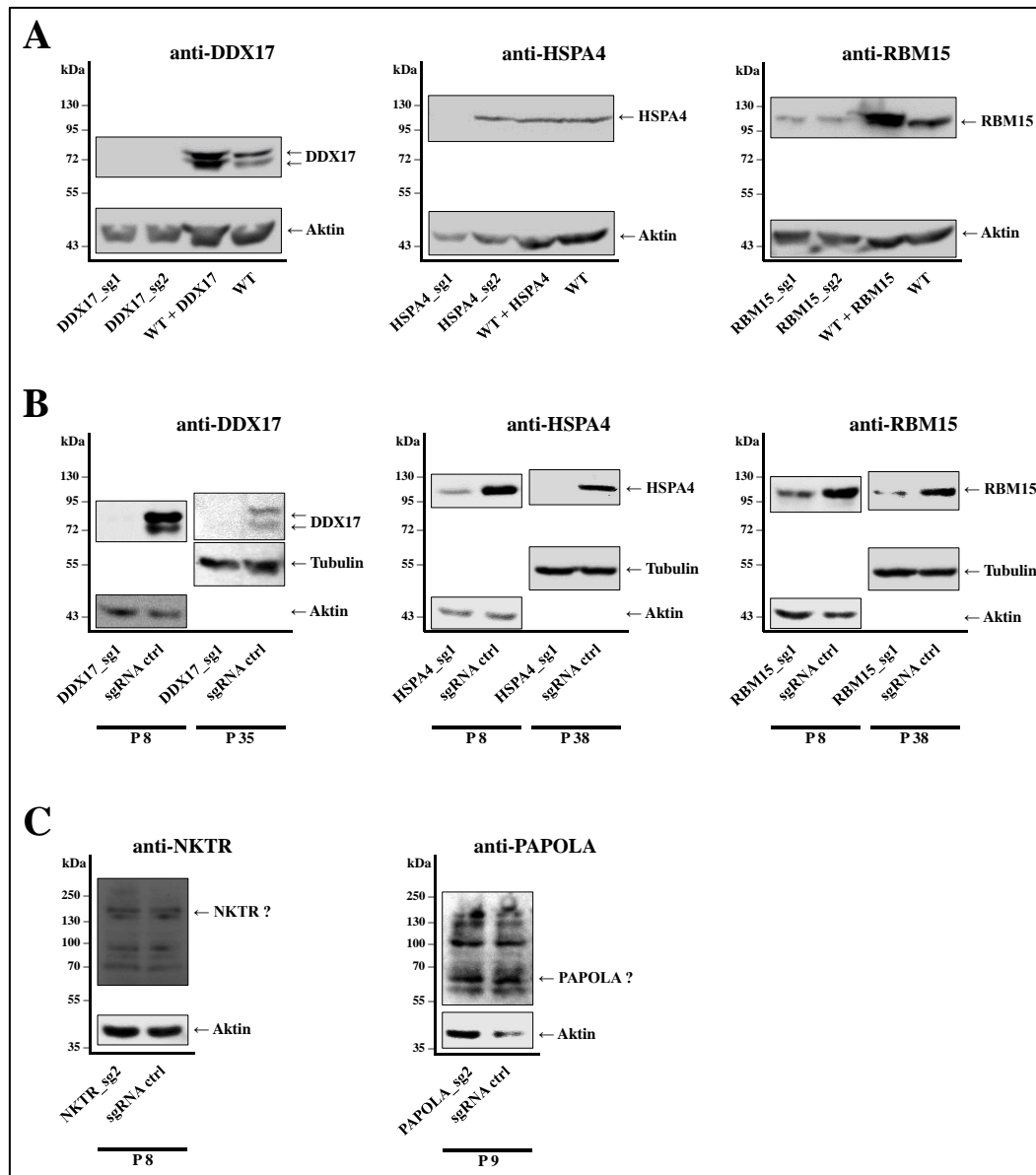


Abb. 27: Western Blot Analysen zur Überprüfung des Gen-Knock-Out der generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-Knock-Out-Zellen

Die Durchführung der Western Blot Analysen zur Überprüfung des Gen-Knock-Out der generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-Knock-Out-Zellen, unter Verwendung der jeweiligen Gen-spezifischen Antikörper, erfolgte nach Einfrieren und Überführung der Zelllinien. Dargestellt sind Daten ermittelt direkt nach Auftauen der Zelllinien, auch vergleichend mit Huh7-NTCP^{MPL}, welche mittels Lipofectamine™ 2000 mit Expressionsvektoren codierend für das entsprechend untersuchte Gen transfiziert (430 fmol / 6-Well, Lyse der Zellen 48 Stunden nach Transfektion) wurden (A), sowie nach verschiedenen Anzahlen an Zellpassagen (B, C), jeweils vergleichend mit Huh7-NTCP^{MPL} (Gen-Knock-Out-)Zellen mit Kontroll-sgRNA (sgRNA ctrl). P: Passage. WT: Wildtyp, Huh7-NTCP^{MPL}.

Nachfolgend wurde so für die fünf zu untersuchenden potenziell pro-/anti-viralen Wirtsfaktoren (DDX17, HSPA4, NKTR, PAOLA und RBM15) je eine Huh7-NTCP^{MPL} Knock-Out-Zelllinie ausgewählt und für weitere Analysen verwendet. Hierbei sollten nun einzelne Schritte des HDV-Replikationszyklus genauer betrachtet werden.

(Abb. 28 A). Zusammenfassend konnte bei Infektion von Huh7-NTCP^{MPL} *RBM15-Knock-Out*-Zellen mit HDV Gt.1-Taylor eine signifikant geringere Signalintensität für HDaG festgestellt werden, welche hier geringer war als bei der Kontrolle Huh7-NTCP^{MPL} (Gen-*Knock-Out*-)Zellen mit Kontroll-sgRNA (sgRNA ctrl) (Abb. 28 B). Auch nach einer Infektion mit HDV Gt.1-WHO oder HDV Gt.3 konnte eine erkennbare, wenn gleich nicht signifikante, Reduktion der Signalintensität für HDaG beobachtet werden. Dies könnte erneut auf potentiell pro-virale Eigenschaften von RBM15 hinweisen.

Im Rahmen weiterer Untersuchungen des HDV-Replikationszyklus wurden Northern Blot Analysen durchgeführt, um sowohl antigenomische, als auch genomische, HDV-RNA nach einer Infektion der generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien mit verschiedenen rekombinanten pseudotypisierten HDV des Genotyps 1 (HDV Gt.1-Taylor/-WHO) oder 3 nachzuweisen (Abb. 29, Abb. 30).

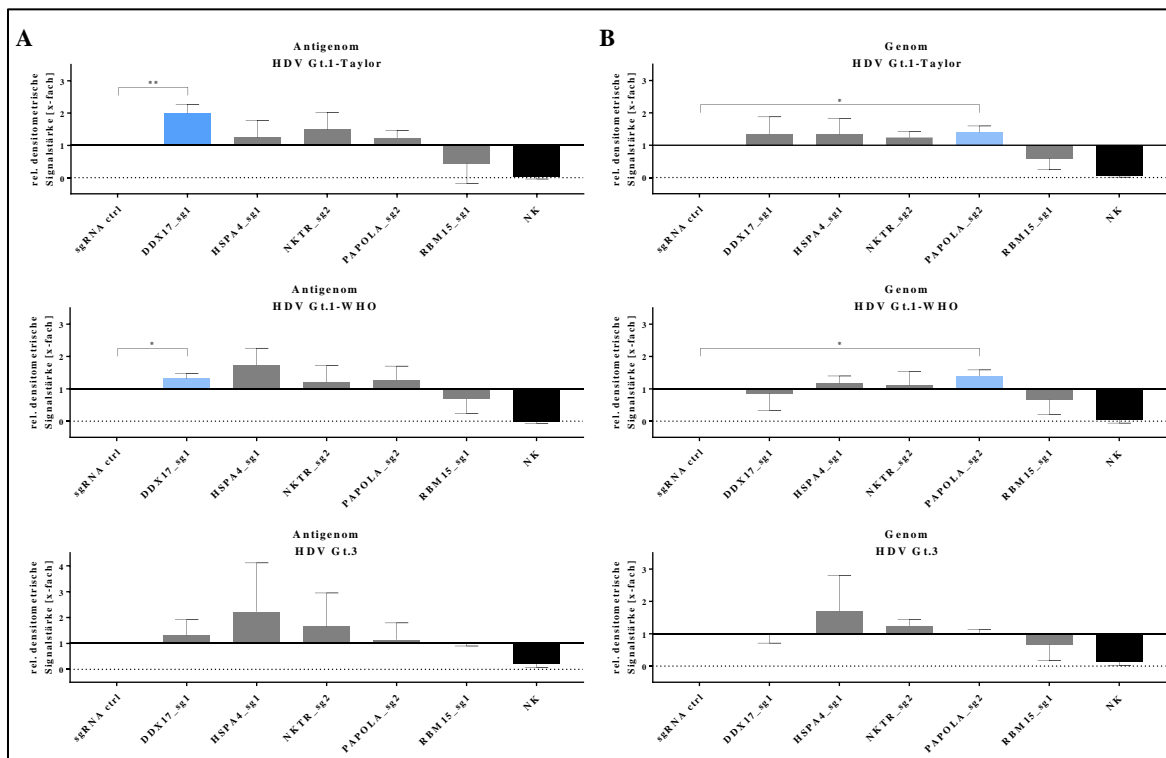


Abb. 29: Northern Blot Analysen zur Detektion der antigenomischen und genomischen HDV-RNA nach Infektion der generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zellen

Die generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zellen wurden mit verschiedenen rekombinanten pseudotypisierten HDV des Genotyps 1 (-Taylor, -WHO) oder 3 (2×10^9 Genome / 6-Well) infiziert. Die Durchführung der Northern Blot Analysen zur Detektion der jeweiligen antigenomischen (A) und genomischen (B) HDV-RNA, erfolgte an Tag sechs nach Infektion. Dargestellt ist eine Quantifizierung der ermittelten densitometrischen Signalstärke des im Northern Blot detektierten Signals für genomische oder antigenomische HDV-RNA, relativiert auf die Signalstärke der infizierten Huh7-NTCP^{MPL} (Gen-*Knock-Out*-)Zellen mit Kontroll-sgRNA (sgRNA ctrl), sowie die, für jede Probe im Agarosegel densitometrisch bestimmbare, Menge an ribosomaler 28S rRNA, jeweils ermittelt mittels Image Studio Lite Software (Version 5.2). Dargestellt sind die kombinierten Daten aus drei unabhängigen Experimenten jeweils relativiert auf die infizierten Huh7-NTCP^{MPL} (Gen-*Knock-Out*-)Zellen mit Kontroll-sgRNA (sgRNA ctrl). Die Einzelaufnahmen der drei unabhängigen Experimente sind in Abb. 30 dargestellt. Signifikanz-Berechnung: nicht-gepaarter t-Test (n.s. / grau $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$) durchgeführt mittels GraphPad Prism (Version 7.03). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD). Gt.: Genotyp. NK: Negativ-Kontrolle, nicht-infizierte Zellen. n = 3.

Auch bei den ebenfalls mehrfach durchgeführten Northern Blot Analysen wurden divergierende Ergebnisse erzielt (Abb. 30). Dennoch konnten, bei Infektion von Huh7-NTCP^{MPL} *DDX17-Knock-Out*-Zellen mit beiden Isolaten des HDV Gt.1, eine signifikant veränderte, hier jedoch erhöhte, Signalintensität für antigenomische HDV-RNA, im Vergleich zu Huh7-NTCP^{MPL} (Gen-*Knock-Out*-)Zellen mit Kontroll-sgRNA (sgRNA ctrl), detektiert werden (Abb. 29 A). Zudem war bei Infektion von Huh7-NTCP^{MPL} *PAPOLA-Knock-Out*-Zellen mit ebenfalls beiden Isolaten des HDV Gt.1, eine signifikant erhöhte Signalintensität für genomische HDV-RNA, im Vergleich zu Huh7-NTCP^{MPL} (Gen-*Knock-Out*-)Zellen mit Kontroll-sgRNA (sgRNA ctrl), zu beobachten (Abb. 29 B). Hingegen, bei Infektion mit rekombinanten pseudotypisiertern HDV des Genotyp 3 konnten für keine der untersuchten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien signifikante Unterschiede in der Signalintensität für antigenomische oder genomische HDV-RNA, im Vergleich zu Huh7-NTCP^{MPL} (Gen-*Knock-Out*-)Zellen mit Kontroll-sgRNA (sgRNA ctrl), gemessen werden (Abb. 29 A, B). Erwähnenswert bleibt, dass auch hier nach Infektion der Huh7-NTCP^{MPL} *RBM15-Knock-Out*-Zellen, unabhängig vom für die Infektion verwendeten HDV-Genotyp, konsequent eine erkennbare, aber nicht signifikante, Reduktion dieser Signalintensität, sowohl für antigenomische, als auch für genomische HDV-RNA, zu beobachten war (Abb. 29, Abb. 30).

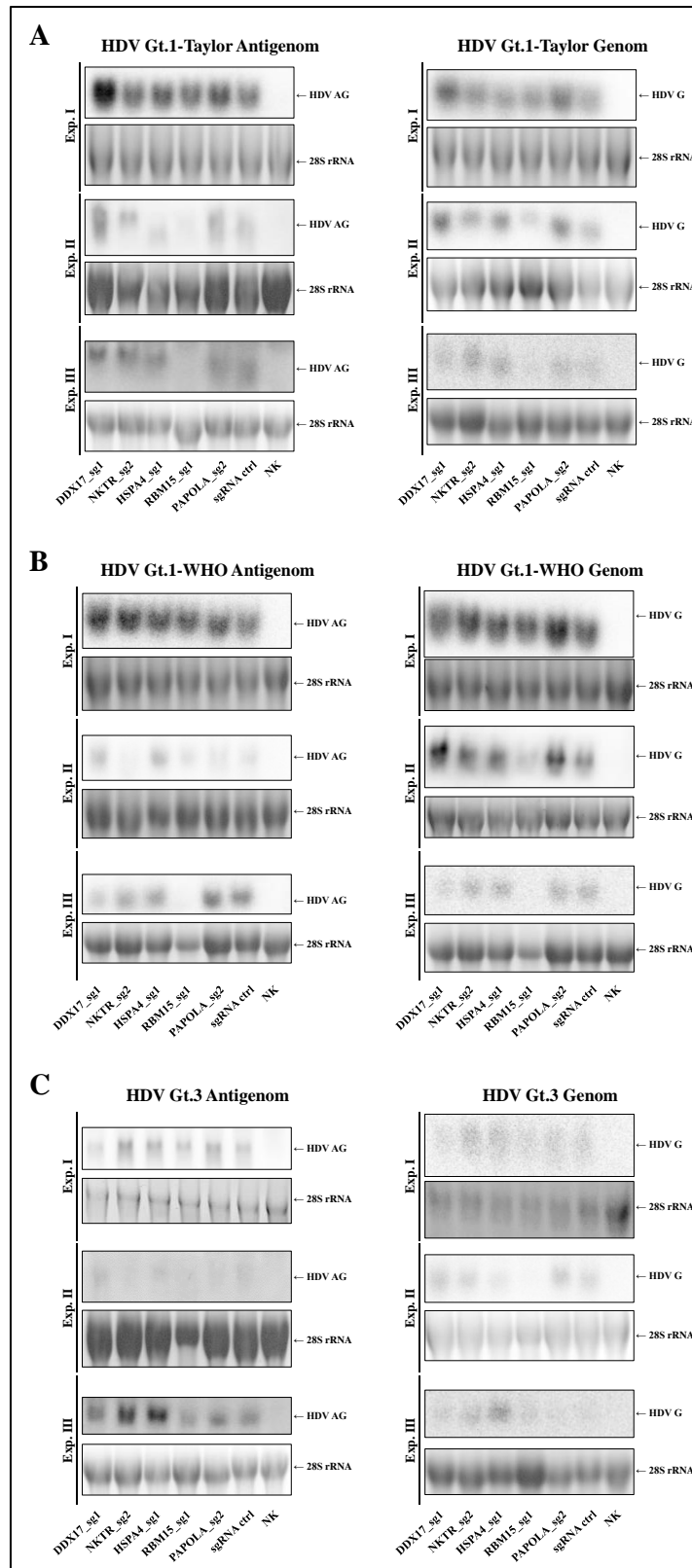


Abb. 30: Einzelaufnahmen der Northern Blot Analysen zur Detektion der antigenomischen und genomischen HDV-RNA nach Infektion der generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-Knock-Out-Zellen

Die generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-Knock-Out-Zellen wurden mit verschiedenen rekombinanten pseudotypisierten HDV des Genotyps 1 (-Taylor (A), -WHO (B)) oder des Genotyps 3 (C) infiziert (2×10^9 Genome / 6-Well). Die Durchführung der Northern Blot Analysen zur Detektion der jeweiligen antigenomischen und genomischen HDV-RNA, erfolgte an Tag sechs nach Infektion. Dargestellt sind die Einzelaufnahmen für die Northern Blot Analyse der genomischen oder antigenomischen HDV-RNA, sowie die im Agarosegel sichtbare ribosomale 28S rRNA, aus drei unabhängigen Experimenten (siehe hierzu auch zusammenfassend Abb. 29). Gt.: Genotyp. NK: Negativ-Kontrolle, nicht-infizierte Huh7-NTCP^{MPL} (Gen-Knock-Out)-Zellen mit Kontroll-sgRNA.

Nachdem nun auch einzelne Schritte des HDV-Replikationszyklus genauer betrachtet wurden, sollte abschließend die NTCP-Funktionalität der generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-Knock-Out-Zellen überprüft werden (Abb. 31). Grund hierfür waren auffällige HDV-Infektionen der Huh7-NTCP^{MPL} *RBM15-Knock-Out-Zellen*. Unabhängig vom für die Infektion verwendeten HDV-Genotyp, zeigten sich stets geringe Mengen an detektiertem HDAg in Western Blot Analysen (Abb. 28), sowie erkennbar niedrige Signalintensitäten für antigenomische und genomische HDV-RNA in Northern Blot Analysen (Abb. 29, Abb. 30). Weiterhin hatten die Huh7-NTCP^{MPL} Gen-Knock-Out-Zellen bis zum Abschluss der Untersuchungen bereits bis zu 40 Zellpassagierungen durchlaufen.

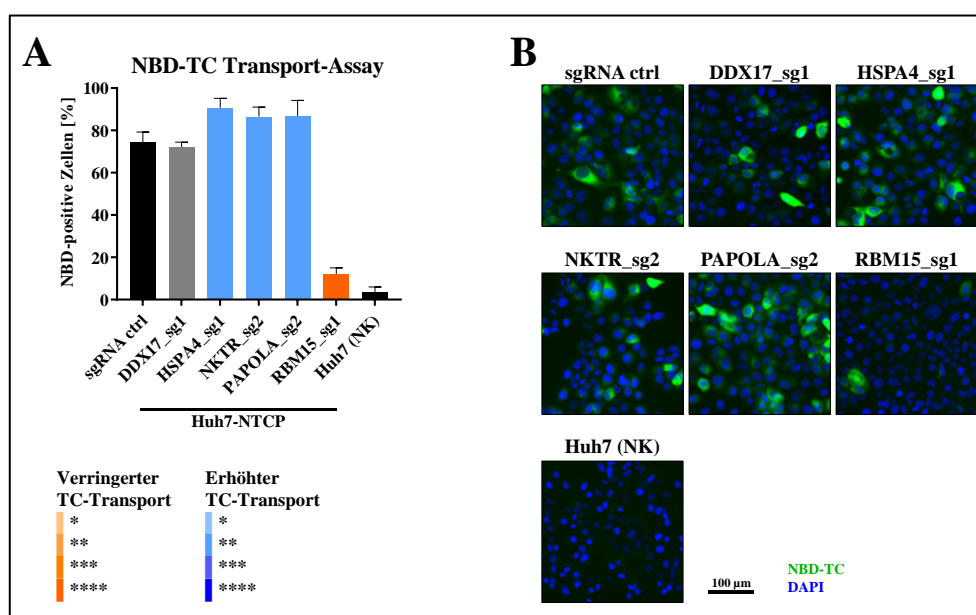


Abb. 31: Überprüfung der NTCP-Funktionalität der generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-Knock-Out-Zellen
Die generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-Knock-Out-Zellen wurden auf 48-Well-Mikrotiterplatten mit 30 % Konfluenz ausgesät und zwei Tage nach Aussaat entsprechend ein NBD-TC Transport-Assay durchgeführt. Dargestellt sind die kombinierten Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils technischen Triplikaten. Es erfolgte eine Quantifizierung mittels ImageXpress® Pico Zell-Imaging-System (A), sowie eine manuelle Analyse mittels Fluoreszenzmikroskop (B). Signifikanz-Berechnung gemäß one-way ANOVA Varianzanalyse mit Tukey-Test (n.s. $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$) durchgeführt mittels GraphPad Prism (Version 7.03). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD). NBD: Nitrobenzoxadiazol. TC: Taurocholat. NK: Negativ-Kontrolle.

Zur Überprüfung der NTCP-Funktionalität der generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-Knock-Out-Zellen, wurde ein NBD-TC Transport-Assay durchgeführt. Hierbei wurden diese Zellen mit Nitrobenzoxadiazol-Taurocholat (NBD-TC) inkubiert, wodurch, nach stattfindender Aufnahme via NTCP-vermitteltem Transport, entsprechend Fluorophor-markierte Zellen detektiert werden konnten (Abb. 31). Indes konnte bei Analyse, sowohl der Huh7-NTCP^{MPL} *HSPA4-Knock-Out-Zellen*, als auch der *NKTR-Knock-Out-Zellen* und der *PAPOLA-Knock-Out-Zellen*, ein erhöhter (ca. + 15 %) NBD-TC-Transport, im Vergleich zu Huh7-NTCP^{MPL} (Gen-Knock-Out-)Zellen mit Kontroll-sgRNA (sgRNA ctrl), welche eine Anzahl NBD-positiver Zellen von ca. 75 % aufwiesen, beobachtet werden. Bei Untersuchung der generierten Huh7-NTCP^{MPL} *RBM15-Knock-Out-Zellen* hingegen wurde eine deutlich geringere Anzahl (ca. 12 %) an NBD-positiven Zellen detektiert (Abb. 31 A, B). Eine

Evaluierung der generierten Huh7-NTCP^{MPL} *RBM15-Knock-Out*-Zellen hinsichtlich ihrer NTCP-Funktionalität zu Beginn sowie im Verlauf der durchgeführten Untersuchungen war nicht mehr möglich.

5. Diskussion

5.1. Die Generierung rekombinanter HBV und die Kontrolle der HBV cccDNA als Forschungsschwerpunkte zur Entwicklung neuer Therapien für die vollständige Heilung von chronischen HBV-Infektionen

Zwar ist es bereits möglich effizient und mit hoher Sensitivität erfolgreich HBV-Vollgenome mittels PCR zu amplifizieren, was grundlegend für die Funktionsanalyse von HBV und auch die Untersuchungen einzelner Virusisolate war (Günther et al., 1998). Dennoch bleibt die Generierung von rekombinanter HBV cccDNA, aufgrund der entscheidenden Rolle dieser im HBV-Replikationszyklus, und so die Forschung an möglichen Kontrollmechanismen der HBVcccDNA, ein zentraler Punkt für die Entwicklung neuer Therapien zur vollständigen Heilung von chronischen HBV-Infektionen. Denn obwohl die HBV cccDNA als Transkriptionsvorlage der viralen RNAs dient, wird sie mit keiner der derzeit zugelassenen Therapien gezielt behandelt (Martinez et al., 2021). Demnach wurden in dieser Arbeit die transiente Transfektion von HBV-Expressionskonstrukten mit Genomüberlänge und auch verschiedene Methoden zur Generierung von rekombinanter HBV cccDNA analysiert und verglichen.

Nach Transfektion von HepG2 Tet-On® Advanced Zellen mit HBV-1.1mer-Expressionskonstrukten verschiedener HBV-Genotypen konnten sowohl HBsAg als auch HBeAg im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (Ausnahme: HBV-Subgenotyp-Isolat F3, siehe unten). Die Konzentration an detektiertem HBeAg war jedoch, im Vergleich zur Transfektion mit HBV-1.5mer-Expressionskonstrukten, der gleichen HBV-Genotypen, deutlich geringer (Abb. 8 A, B). Bei Verwendung der HBV-1.1mer-Expressionskonstrukte erfolgte die Expressionsregulation durch einen vorgeschalteten Doxycyclin-induzierbaren CMV-Promotor (Abb. 32 A). Im Gegensatz dazu wird die Expression bei den jeweiligen HBV-1.5mer-Expressionskonstrukten durch den natürlichen Promotor, den BCP (*basal core promoter*), reguliert (Abb. 32 B, braun).

Das HBeAg ist ein lösliches Nichtstrukturprotein, das durch proteolytische Spaltung des Transkripts der präCore/Core-mRNA generiert wird. Hierbei ist der präCore-ORF für die HBeAg-Sekretion essenziell (Ou, 1997; Ou et al., 1986). Der regulatorische Bereich URR (*upstream regulatory region*) des BCP, steuert die Initiierung der Transkription von präCore/Core-mRNA und prägenomischer RNA, welche jeweils ca 3,5 kb umfassen. Dieser Bereich befindet sich im HBV-Genom direkt am 5'-Ende des präCore-ORFs und überlappt so auch mit dem 3'-Ende des X-ORFs (Abb. 32 B) (Quarleri, 2014; Yuh et al., 1992). Schon bei partieller Deletion des präCore-ORFs konnte bereits gezeigt werden, dass hier die HBeAg-Sekretion eingestellt wurde, jedoch eine erhöhte Core-Expression zu beobachten war (Roossinck et al., 1986). Bei den in dieser Arbeit verwendeten 1.5mer-Expressionskonstrukten ist die vollständige Sequenz des BCP dem präCore-ORF vorgelagert

positioniert (Abb. 32 B). Im Gegensatz dazu ist bei Verwendung der HBV-1.1mer-Expressionskonstrukte die Expression durch einen CMV-Promoter gesteuert (ggf. als verkürzter Doxycyclin-induzierbarer TRE-tight-Promoter). Es kann an dieser Stelle keine Expressionsregulation durch den BCP erfolgen (Abb. 32 A). Dies erklärt, dass, trotz vollständigem offenen Leserahmen für die Transkription von prä-Core/Core-mRNA, kaum, oder sogar keine, HBeAg-Sekretion zu detektieren war. (Abb. 8 A).

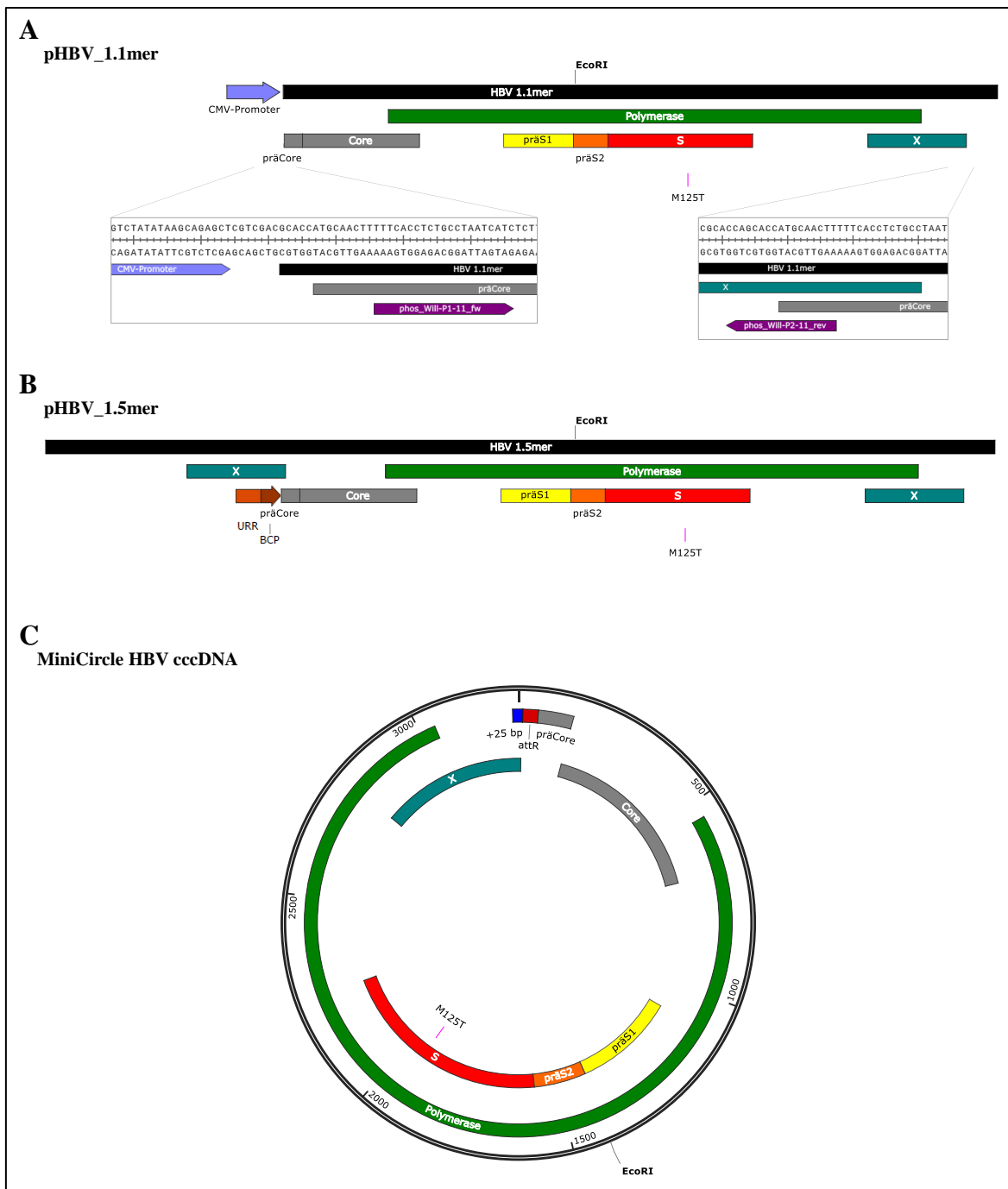


Abb. 32: Darstellung der offenen Leserahmen der verwendeten HBV-Expressionskonstrukte (HBV-1.1mer, HBV-1.5mer), sowie der generierten HBV cccDNA

Dargestellt sind die offenen Leserahmen der verwendeten 1.1mer- (A) und 1.5mer-Expressionsvektoren (B), sowie entsprechend generierte MiniCircle HBV cccDNA (C), des HBV-Genotyps D3-3091 mit M125T-Austausch (pink). Eintragung der zur Generierung von HBV-1.0meren mittels PCR verwendeten phosphorylierten Primer modifiziert nach (Günther et al., 1998) (A, violett). Die Abbildung wurde mittels SnapGene Software (GSL Biotech, LLC; San Diego, US) erstellt.

Schließlich werden leberspezifische Transkriptionsfaktoren zum BCP rekrutiert, welche so dort binden und die Transkription regulieren (Yu & Mertz, 1996). Untersuchungen zeigten bereits, dass bei Unterbindung dieser Rekrutierung, durch Mutation des BCP, eine verminderte Transkription der präCore/Core-mRNA, mit Folge einer reduzierten HBeAg-Expression, erfolgte. Zeitgleich konnte

demzufolge eine erhöhte Core-Expression und so Virionenproduktion beobachtet werden. Die HBV-Replikation wurde hierbei nicht beeinträchtigt (Buckwold et al., 1996). Dies erklärt auch, dass es unter Verwendung sowohl der HBV-1.5mer-Expressionskonstrukte, als auch der 1.1mer-Expressionskonstrukte, stets möglich war rekombinante HBV mit vergleichbarer Konzentration im Zellkulturüberstand zu quantifizieren (Abb. 8 C), sowie dass bei Transfektion mit 1.1mer-Expressionskonstrukten stets eine erhöhte HBcAg-Expression detektierbar war (Abb. 10 A, Abb. 12 A).

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Isolat des HBV-Subgenotyp F3 handelt es sich um eine *Immune Escape* Variante, welche die Mutationen s120Q, s129P und s145R im S-ORF trägt (Schlabe et al., 2018). Nach Transfektion mit dem 1.1mer-Expressionskonstrukt konnte weder HBsAg noch HBeAg im Zellkulturüberstand detektiert werden (Abb. 8 A, B). Viele *Immune Escape* Mutationen können gleichsam auch zum entsprechenden *Diagnostic Escape* führen. Auch da diagnostische Nachweissysteme zur Detektion von HBsAg auf der Verwendung von monoklonalen Antikörpern basieren (Lehmann et al., 2023; Raimondo et al., 2019). Demnach ist hier die Möglichkeit einer unzureichenden Detektion des sekretierten HBsAg mittels *quantitative Abbott Architect assay* von hoher Wahrscheinlichkeit. Da dieses Isolat des HBV-Subgenotyp F3 zudem eine Deletion im präCore-ORF (-1 nt) und eine zweite im X-ORF (-4 nt) aufweist, besteht die Möglichkeit, dass demzufolge keine Transkription der präCore/Core-mRNA stattfinden konnte, die zur Synthese des HBeAg führt. Es entfiel hier möglicherweise die entsprechende Transkriptionsregulation durch den BCP (Lucifora et al., 2011). Folgend konnte im Zellkulturüberstand kein HBeAg detektiert werden. Durch die Deletion im X-ORF war auch eine Expression von HBx hier nicht möglich. Da weder HBx noch HBeAg für die Assemblierung von HBV-Virionen notwendig sind (siehe 1.2.1. Replikationszyklus des HBV), war allerdings eine Quantifizierung von HBV-Genomen im Zellkulturüberstand möglich (Abb. 8 C). Auch dies spricht dafür, dass hier HBsAg exprimiert und sezerniert wurde, aber nicht mit dem diagnostischen Nachweissystem nachgewiesen werden konnte. Die Durchführung von Western Blot Analysen mit unterschiedlichen Antikörpern gegen das HBsAg könnte hier den nötigen Nachweis von HBsAg erbringen.

Bei Transfektion des 1.1mer-Expressionskonstrukts eines HBV-Isolats des Subgenotyp F2 resultierte im Vergleich zu allen anderen hier analysierten HBV-Genotypen eine hohe HBsAg-Sekretion (Abb. 8 B). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der HBV-Genotyp F generell der am stärksten von allen anderen HBV-Genotypen genetisch divergierende ist, gerade auch bei Betrachtung des S-ORFs (Kramvis et al., 2005; Norder et al., 1994). Ergänzend ist anzumerken, dass der zugelassene HBV-Impfstoff auf HBsAg des HBV-Subgenotyps A2 basiert, der sich genetisch stark von HBsAg des HBV-Genotyp F unterscheidet. Daher ist das Auftreten von *Vaccine Escape* Mutationen bei HBV-Isolaten des Genotyps F (wie in der untersuchten Mutante des HBV-Subgenotyp F3) mit hoher Wahrscheinlichkeit zu erwarten (Pezzano et al., 2011; Schlabe et al., 2018).

Zur Zeit- und Kosten-effizienten Generierung von rekombinanter HBV cccDNA zeichnete sich, in den hier durchgeführten Untersuchungen, die ‚MiniCircle Technologie‘ (System Biosciences, LLC; Palo Alto, US) aus (siehe 3.3.3. Produktion (Transformation von *E. coli* ZYCY10P3S2T) und Aufreinigung von MiniCircle HBV cccDNA). So wurden, angelehnt an (Guo et al., 2016), Konstrukte verwendet, welche die vielen überlappenden offenen Leserahmen, der HBV cccDNA nicht unterbrechen. Hierbei wurde die, infolge der Enzym-vermittelten Rekombination generierte, attR-Bindestelle (36 bp, *attachment site R*) so platziert, dass sie unmittelbar vor dem offenen Leserahmen des präCore/Core positioniert ist. Zudem wurden der Sequenz des HBV-Genoms nochmals 25 bp hinzugefügt, sodass auch der offene Leserahmen für HBx ebenfalls vollständig war. So bestand letztlich die später generierte ca. 3,2 kb umfassende rekombinante HBV cccDNA, im Folgenden als MiniCircle HBV cccDNA bezeichnet, aus einem monomeren HBV-Genom (1.0mer), der eingefügten redundanten Sequenz mit 25 bp und der entsprechend generierten attR-Bindestelle mit 36 bp ((Guo et al., 2016), Abb. 32 C).

In dieser Arbeit konnte, nach bakterieller Produktion der rekombinanten HBV cccDNA, diese erfolgreich mittels Restriktionsenzym KpnI und Minicircle-safe DNase von verbliebener DNA-Kontamination gereinigt werden (Abb. 9). Diese vor allem zeit- aber auch kostenintensive Aufreinigung, könnte so schließlich verfälschte Ergebnisse, aufgrund von verbliebenem parentalen Plasmid pMC_HBV_Gt.D3-3091(_M125T)_cccDNA, abwenden. So könnte dieses beispielsweise bei nachfolgenden quantitativen Bestimmungen der cccDNA mittels PCR störend interagieren. In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten jedoch kaum experimentell messbare Unterschiede zur nicht-aufgereinigten MiniCircle HBV cccDNA detektiert werden. So blieb eine beobachtete leicht höhere Effizienz der aufgereinigten MiniCircle HBV cccDNA hier deutlich vernachlässigbar. Generell konnten bei Transfektion mit MiniCircle HBV cccDNA leicht divergierende Ergebnisse erzielt werden, wobei die resultierende HBeAg-Sekretion stets vergleichbar stark, oder ggf. geringer, als diese resultierend aus der Transfektion mit dem verwendeten HBV-1.5mer-Expressionskonstrukt war (Abb. 10, Abb. 12, Abb. 14, Abb. 15). Analog hierzu wurde bei Transfektion mit MiniCircle HBV cccDNA ebenfalls eine vergleichbar starke, oder ggf. geringere, HBcAg-Expression beobachtet. Zumindest ersteres ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die vollständige Sequenz des BCP hier zwar auch nicht direkt dem präCore-ORF vorgelagert positioniert ist, jedoch lediglich eine Unterbrechung von 36 bp, in Form der attR-Bindestelle, zwischengelagert ist. Zudem wird hier ein Teil des BCP wiederholt als redundante Sequenz (25 bp) eingefügt. Die zuvor angesprochene Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren an den BCP, kann demnach fast genau an der richtigen Position stattfinden und so weiterhin *in-trans* die Transkription regulieren. (Guo et al., 2016) zeigten zudem, dass die generierte MiniCircle HBV cccDNA eine vergleichbare, aber nicht identische, Transkriptionsrate, wie die entsprechende Wildtyp HBV cccDNA, aufweist, sowie, dass eine durch die MiniCircle HBV cccDNA vermittelte HBV-Replikation, sowie Generierung von Virionen, stattfand.

Unter Verwendung des PCR-basierten Ansatzes, um HBV-1.0mere, ohne bakterielles Plasmid-Backbone, zu generieren, konnten schließlich ebenfalls hohe Mengen an sekretiertem HBeAg, so wie auch an detektiertem zellulärem HBcAg, beobachtet werden (Abb. 10, Abb. 12, Abb. 14, Abb. 15). Dies spricht dafür, dass auch ohne Verwendung der T4 DNA Ligase mindestens Dimere, oder sogar Multimere, vermutlich intrazellulär nach Transfektion, gebildet wurden. Dafür ist auch hier erneut anzuführen, dass ohne die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren an einen dem präCore/Core-ORF vorgelagerten BCP, keine HBeAg-Expression hätte stattfinden können. Die für die PCR verwendeten Primer nach (Günther et al., 1998) sind so positioniert, dass das PCR-Produkt, wie auch bei den HBV-1.1-mer-Expressionskonstrukten, erst kurz vor dem Startcodon des präCore-ORFs beginnt (Abb. 32 A violett). Eine Zirkularisierung fand hier ohne weiteres jedoch nicht statt (Abb. 11). Auch aus viraler DNA, die aus Seren HBV-positiver PatientInnen isoliert wurde, konnten mittels PCR erfolgreich HBV-1.0mere generiert werden. Nach Transfektion von Huh7 Zellen, resultierte zudem eine vergleichbare HBeAg-Sekretion sowie HBcAg-Detektion (Abb. 13). So stellt diese Methode zwar nicht unbedingt eine effiziente Methode zur Generierung von großen Mengen an rekombinanter HBV cccDNA *in-vitro* dar, zeigt jedoch, dass eine schnelle Analyse einzelner HBV-Isolate möglich ist.

Die beobachtete erhöhte Detektion von sowohl intrazellulärem, als auch sekretiertem, HBsAg (Abb. 10 A, Abb. 14 C, Abb. 15 B), nach Transfektion der HBV-1.0mere, könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich stets der gesamte S-ORF vollständig im PCR-amplifizierten HBV-1.0mer befindet (Abb. 32 A). So konnte hier für jedes generierte Amplifikat, ob HBV-Monomer oder -Dimer, eine ungehinderte Expression von HBsAg gewährleistet werden.

Letztlich konnte in dieser Arbeit jedoch nicht analysiert werden, ob möglicherweise, nach Transfektion der Zellen, sprich intrazellulär, noch weitere, wohlmöglich Enzym-vermittelte, Modifikationen oder strukturelle Veränderungen der HBV-1.0mere oder auch der MiniCircle HBV cccDNA stattfinden. So könnte bspw. bei Transfektion eine Zirkularisation der HBV-1.0mere oder, wie bereits erwähnt, eine Bildung von Di-/Multimeren durch zelleigene Ligasen stattfinden. Entsprechend könnte anhand von Southern Blot Analysen ein gezielter Nachweis von HBV cccDNA oder der erwähnten Di-/Multimere in Lysaten transfizierter Zellen durchgeführt werden. Die HBV cccDNA assembliert mit zellulären Histon-Proteinen und wird infolgedessen durch posttranslationale Histonmodifikationen reguliert (Tropberger et al., 2015). So könnten mögliche Interaktionen und Modifikationen der MiniCircle HBV cccDNA mittels ChIP-Seq (*chromatin immunoprecipitation* und *DNA-Sequencing*) transfizierter Zellen auch hier weitere Erkenntnisse bringen. Auch frühere Untersuchungen zeigten bereits, dass die MiniCircle HBV cccDNA epigenetisch als ‚Minichromosom‘ organisiert ist, ähnlich der Wildtyp HBV cccDNA (Guo et al., 2016).

Nicht nur aufgrund des hohen Zeit- und Kostenaufkommens, sondern zudem auch wegen des sehr geringen Ertrags, bei Aufreinigung von MiniCircle HBV cccDNA, oder auch der Zirkularisierung der mittels PCR generierten HBV-1.0mere, wurde hier die Analyse der Virionenproduktion, mittels Transfektion von HepG2 Zellen mit den in dieser Arbeit untersuchten Expressionskonstrukten, nur anhand der nicht-aufgereinigten MiniCircle HBV cccDNA, sowie entsprechend den nicht-zirkularisierten PCR-basiert generierten HBV-1.0meren, durchgeführt (Abb. 15, Abb. 16). Neben den durch Transfektion mit den 1.1mer- und 1.5mer-Expressionskonstrukten generierten rekombinanten HBV, wurde so als Referenz zudem das Serum eines HBV-positiven Patienten mittels linearem CsCl-Gradienten analysiert. Demnach konnte so zwischen Virionen und nicht-umhüllten Core-Partikeln unterschieden werden.

Auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte so gezeigt werden, dass ohne den dem präCore-ORF direkt vorgeschalteten BCP, und so auch ohne die Möglichkeit der Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren fördernd für die Transkription der präCore/Core-mRNA, eine erhöhte Transkription der prägenomischen mRNA und so folglich Core-Expression und Virionenproduktion (Buckwold et al., 1996) beobachtet werden konnte. Die Generierung von rekombinanten HBV mittels Transfektion mit 1.1mer-Expressionskonstrukten zeichnete sich so als die erfolgreichste Methode aus, wenn auch der Anteil an nicht-umhüllten Core-Partikeln dennoch recht hoch ausfiel (Abb. 16 C). Dies spricht erneut dafür, dass die HBeAg-Expression nicht essenziell für die HBV-Replikation ist. Als funktional erwies sich entsprechend auch die Generierung von rekombinanten HBV mittels Transfektion mit 1.5mer-Expressionskonstrukten, auch, wenn erwartungsgemäß so das Verhältnis zwischen Virionen und nicht-umhüllten Core-Partikeln entsprechend nachteilig ausfiel (Abb. 16 D).

Letztlich konnten anhand der Transfektion von MiniCircle HBV cccDNA oder auch derer mit mittels PCR generierten HBV-1.0meren vergleichsweise weniger nicht-umhüllte Core-Partikel oder gar Virionen generiert werden (Abb. 16 A, B). Da, wie bereits erwähnt, auch die MiniCircle HBV cccDNA epigenetisch als ‚Minichromosom‘ organisiert ist (Guo et al., 2016), könnten die regulierend wirkenden Histon-Proteine auch einen Einfluss auf die Virionenproduktion haben. Zudem könnten hier, wie auch bei Transfektion mit mittels PCR generierten HBV-1.0meren, konformationale oder sterische Hinderungen die Funktionalität der rekombinanten HBV cccDNA einschränken. Wie genau diese rekombinanten HBV cccDNAs nun nach Transfektion innerhalb der Zelle organisiert werden, müsste durch weitere Untersuchungen betrachtet werden.

Fazit und Ausblick: Grundsätzlich zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen, dass, je nach zu untersuchendem Sachverhalt, separat entschieden werden muss, welcher Versuchsansatz, bzw. welche Methode, hier am geeignetsten ist. Zusammengefasst, bedeutet dies, dass, sofern Infektionsversuche mit rekombinanten Viren nicht gewährleistet werden können, die Generierung von rekombinanter HBV cccDNA für Transfektionen sinnvoll ist. Hierfür stellt die ‚MiniCircle

Technologie‘ eine zeit- und kosteneffiziente Lösung dar. Die Generierung von HBV-1.0meren mittels PCR ist eine Methode, um spezielle Patientenisolate, ohne aufwändige Klonierungen oder Aufreinigungsschritte, prompt zu analysieren. Dennoch kann hier, zum direkten Vergleich unterschiedlicher HBV-Genotypen, oder einzelner -Isolate, auch die Klonierung von und spätere Transfektion mit HBV-Überlängenkonstrukten lohnend sein. Hierbei könnten so auch die Funktionen einzelner Aminosäuren oder Gen-Abschnitte, durch das technische Einfügen von Mutationen analysiert werden. Damit könnte man auch bereits evolutionär entstandene Mutationen, wie Insertionen und Deletionen, die in verschiedenen HBV-Genotypen konserviert sind, genauer untersuchen. Um schließlich infektiöse Virionen rekombinant zu generieren, bietet sich die Verwendung von HBV-1.1meren an, idealerweise als stabile Zelllinie, aber auch nach transients Transfektion. Dies ermöglicht die Untersuchungen des gesamten Infektionsprozesses des HBV *in vitro*, unabhängig von Virionen aus humanen Patientenseren. Diese Seren sind oft sehr limitiert und enthalten stets eine Mischung unterschiedlicher Virusvarianten, mit denen sich eventuelle Unterschiede in der Infektion nicht auf eine HBV-Genom-Variante zurückführen lassen.

5.2. Die Spezies-übergreifende Infektiosität von Hepatitis-B-Virus-Isolaten nicht-humaner Primaten und ihre Fähigkeit, das humane Hepatitis-D-Virus zu umhüllen und so zu dessen Infektiosität beizutragen

Da frühere Studien über HBV-Isolate nicht-humaner Primaten, die Existenz von HBV-Varianten mit relativ begrenzter Sequenzvielfalt aufzeigten und diese genetisch mit den menschlichen HBV-Genotypen gruppieren (Starkman et al., 2003), stellte sich schnell die Frage, ob hier eine speziesübergreifende Infektiosität innerhalb der Primaten (inklusive dem Menschen) möglich wäre. Zwar wurde bisher noch keine Übertragung von HBV nicht-humaner Primaten auf den Menschen beobachtet, allerdings gibt es bereits Berichte von Übertragungen menschlicher HBV auf nicht-humane Primaten, sowie auch über die Kreuzübertragung von HBV nicht-humaner Primaten zwischen verschiedenen Arten dieser Primatengruppe (Locarnini et al., 2013; Sa-Nguanmoo et al., 2009, 2011). Darüber hinaus ist derzeit kein Primaten-spezifisches HDV-Isolat oder eine Übertragung von menschlichem HDV auf nicht-humane Primaten in deren natürlichem Lebensraum bekannt. Da HDV die Hüllproteine von HBV (HBsAg) in HDV/HBV-koinfizierten Zellen zur Umhüllung, Sekretion und anschließenden Infektion nutzt (Sureau, 2006), wurde in dieser Arbeit untersucht, ob alle derzeit bekannten acht menschlichen HDV-Genotypen auch von den Hüllproteinen von HBV nicht-humaner Primaten der Überfamilie *Hominoidea* (Menschenartige) umhüllt werden können. Weiterhin sollte analysiert werden, ob die so generierten rekombinanten

pseudotypisierten HDV, humane Leberkarzinomzellen über den primären HBV-Rezeptor, den humanen NTCP oder den Ntcp verschiedener nicht-humaner Primaten, infizieren können.

Zunächst konnte allerdings in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nach Transfektion von Huh7 Zellen nur mit Expressionsvektoren codierend für HBsAg von HBV oder der HBV-Isolate nicht-humaner Primaten (Gibbon, Gorilla, Schimpanse und Orang-Utan), divergierende Mengen an sezernierten subviralen Partikeln, gemessen als HBsAg im Zellkulturüberstand, beobachtet wurden (Abb. 17 A). Dieselben Effekte konnten intrazellulär mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 17 B) bestätigt werden.

Beim Vergleich aller untersuchten HBsAg, konnte bei Transfektion mit dem Expressionskonstrukt codierend für OuHBV HBsAg eine signifikant geringere Menge an detektiertem intrazellulärem präS1/LHBs und auch SHBsAg beobachtet werden (Abb. 17 B, C, D), wohingegen die Menge an sekretiertem HBsAg hier leicht erhöht war (Abb. 17 A). Passend hierzu zeigten frühere Untersuchungen bereits, dass die Mutation sK122R, welche bei OuHBV HBsAg zu beobachten ist, eine Reduktion von HBsAg in Zelllysaten hervorruft, während die gemessene Menge an HBsAg im Zellkulturüberstand unverändert bleibt (Abb. 20 orange, (Martin et al., 2012)).

Zudem wurde bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen deutlich, dass auch HBsAg von ChHBV und GoHBV im Vergleich zu HBsAg von HBV signifikant erhöht, HBsAg von GiHBV hingegen signifikant verringert, sekretiert wurde (Abb. 17 A). Frühere Untersuchungen zeigten, dass spezifische Mutationen im SHBs Auswirkungen auf dessen Expression und auch Sekretion haben. So resultierte aus den Mutationen sT5A (in dieser Arbeit: nur HBsAg von OuHBV, jedoch als sT5S) oder sI126T (in dieser Arbeit: HBsAg von HBV, ChHBV und GoHBV) eine signifikante Reduktion der intra- und extrazellulären Menge an detektiertem HBsAg. Aus der Mutation sS3N (in dieser Arbeit: HBsAg von HBV, ChHBV und GiHBV) hingegen ging eine Verringerung der intrazellulär detektierten Menge an HBsAg, jedoch Anstieg der Menge an HBsAg im Zellüberstand, hervor (siehe Abb. 20 pink, (H. Liu, Chen, et al., 2024)). Diese gemachten Beobachtungen stimmen jedoch nicht mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen überein. Dies spricht dafür, dass neben den bereits bekannten, für die HBsAg-Expression, die Virionenassemblierung oder –Sekretion, wichtigen oder sogar essenziellen Aminosäuren (Abb. 20), noch weitere existierten, die jedoch noch nicht charakterisiert wurden.

Schließlich wurden in dieser Arbeit erfolgreich *in-vitro*, durch Kotransfektion von Huh7 Zellen, mit Expressionsvektoren codierend für das HBsAg von HBV oder zweier HBV-Isolate nicht-humaner Primaten (Schimpanse und Orang-Utan), sowie solcher codierend für alle acht HDV-Genotypen, rekombinante pseudotypisierte HDV generiert und mittels qRT-PCR quantifiziert werden (Abb. 18). So konnte an dieser Stelle erneut gezeigt werden, dass, hier, unabhängig vom kombinierend verwendeten HDV-Genotyp, eine deutlich höhere HBsAg-Sekretion resultierte, wenn eine Transfektion mit dem entsprechenden Expressionsvektor codierend für das HBsAg von ChHBV

stattfand (Abb. 18 A, vergleiche Abb. 17). Die Quantifizierung der im entsprechenden Zellkulturüberstand befindlichen HDV-Genome, d. h. der Virionen, ergab keine mit der HBsAg-Sekretion korrelierenden Unterschiede (Abb. 18 B). Dies lässt die Vermutung zu, dass eine erhöhte Menge an subviralen Partikeln generiert wurde.

Die Tatsache, dass die für die HDV-Assemblierung wichtige Aminosäure Arginin an Position 24 bei allen verwendeten HBsAg von HBV nicht-humaner Primaten durch Lysin ersetzt ist (siehe Abb. 20 grau, (Jenna & Sureau, 1998)), hatte bei den hier durchgeführten Arbeiten entsprechend keinen Einfluss auf die erfolgreiche Virionenassemblierung (Abb. 18 B). Hierfür spricht auch, dass die für die Virionensekretion essenziellen Aminosäuren Cystein-48, -65, -69 und Histidin-60 (Mangold & Streeck, 1993), sowie die zur HDV-Assemblierung für die Interaktion mit L-HDAg wichtige Aminosäure Prolin-62 im SHBs (Jenna & Sureau, 1998; Shih et al., 2010), in allen in dieser Arbeit verwendeten Isolaten für HBsAg von HBV oder HBV nicht-humaner Primaten, konserviert ist (Abb. 20).

Auch, dass die HDV-Genotypen 1, 7 und 8 am effizientesten, der HDV-Genotyp 4 hingegen am geringsten, generiert wurden (Abb. 18 B), könnte unterschiedliche Gründe haben. Es wurde bereits nachgewiesen, dass die Aminosäure an Position 205 des L-HDAg, so im Bereich des NES (*nuclear export signal*), eine große Bedeutung für die Virus-Assemblierung hat. So ist an dieser Position bei HDV des Genotyp 1 die Aminosäure Prolin zu finden, bei HDV des Genotyp 2 und 4 jedoch Arginin, was die Interaktion zwischen L-HDAg und HBsAg negativ beeinflusst (Shih et al., 2010) und so auch hier offenbar zu einer geringeren Effizienz bei der Virus-Assemblierung führte. Jedoch wurde später gezeigt, dass zwar HDV des Genotyp 3 die Aminosäure Glycin an Position 205 des L-HDAg tragen, aber zudem auch bei allen weiteren HDV-Genotypen, bis auf den bereits erwähnten HDV-Genotyp 1, ebenfalls die Aminosäure Arginin an ebendieser Position zu finden ist (Le Gal et al., 2017). So auch bei den in dieser Arbeit verwendeten Isolaten. Dennoch zeigten frühere Untersuchungen, unter Verwendung anderer Isolate, als die in dieser Arbeit verwendeten (GenBank accession numbers: Gt.4 - AB118847, Gt.8 - AM183327), ebenfalls, dass HDV des Genotyp 4, eine stark reduzierte Virionensekretion aufweisen, welche hier sogar erst mehr als 7 Tage nach Transfektion nachweisbar war, sowie auch, dass HDV des Genotyp 8 mit einer deutlich höheren Virionensekretion behaftet sind (W. Wang et al., 2021). Dies unterstützt die hier gemachten Beobachtungen.

Nach Generierung der unterschiedlichen rekombinanten pseudotypisierten HDV wurde eine Infektion von transient NTCP/Ntcp-exprimierenden Huh7 Zellen durchgeführt. Demnach konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die rekombinanten pseudotypisierten HDV des Genotyp 1 (Isolat WHO), mit HBsAg von HBV oder aller hier untersuchten HBV-Isolate nicht-humaner Primaten (Schimpanse und Orang-Utan), sowohl über den humanen NTCP, als auch über den Ntcp von Gibbon, Gorilla, Schimpanse und Orang-Utan, infizieren konnten (Abb. 19), wenn auch mit etwas geringer Infektionsrate.

Dies zeigte somit, dass, neben dem humanen NTCP, auch alle untersuchten Ntcp nicht-humaner Primaten in Huh7 Zellen funktionsfähig sind und eine wirtsunabhängige Infektion unterstützen. Die Aminosäureposition 158 des NTCP/Ntcp im Bereich der präS1-bindenden Domäne, welche bei allen hier verwendeten Isolaten Glycin darstellt (Abb. 21), ist hier von großer Bedeutung. Es wurde bereits gezeigt, dass diese Position allein für die Bindung von myristoyliertem HBV-präS1-Peptid, sowie die HBV/HDV-Infektion, essenziell ist. So findet sich bei Vertretern der Überfamilie *Cercopithecoidea* (Geschwänzte Altweltaffen), zu der beispielsweise Makaken und Paviane zählen, an der Aminosäureposition 158 des Ntcp nicht Glycin, sondern Arginin, was dazu führt, dass eine Infektion mit HBV nicht möglich ist (Müller et al., 2018). Diese Tatsache weist auf eine sehr genaue Anpassung von HBV auf dessen Wirt hin. Auch wurde bereits gezeigt, dass die ersten N-terminalen 75 Aminosäuren, im Gegensatz zu den Aminosäuren 76 bis 113, des HBV-präS1, notwendig für die Infektiosität sind (Blanchet & Sureau, 2007). Auch die N-terminale Modifikation mittels Myristoylierung trägt hier maßgeblich zur Infektiosität bei (Gripon et al., 2005). So zeigten sowohl HBsAg von ChHBV, als auch der Schimpansen Ntcp, die größten Sequenz-Übereinstimmungen zu den jeweiligen humanen Äquivalenten, dem HBsAg von HBV und dem humanen NTCP (Abb. 20, Abb. 21), was hier die vergleichsweise identische Infektionsrate der rekombinanten pseudotypisierten HDV mit dem jeweiligen NTCP/Ntcp erklären könnte (Abb. 19). Da die verwendeten HBsAg-Sequenzen (Abb. 21) hier stärker divergieren, als die entsprechenden NTCP/Ntcp-Sequenzen (Abb. 20), stellen erstere hier wohlmöglich den limitierenden Faktor dar. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass die Infektionsrate, unter Verwendung der rekombinanten pseudotypisierten HDV mit OuHBV HBsAg, unabhängig vom kombinierend verwendeten NTCP/Ntcp, deutlich am niedrigsten war (Abb. 19). Um hier noch genauere Aussagen treffen zu können, müssten jedoch noch rekombinante pseudotypisierte HDV mit HBsAg von GiHBV und GoHBV generiert werden. Weiterhin könnte die Expression des NTCP/Ntcp durch Etablierung von stabil exprimierenden NTCP/Ntcp-Zelllinien optimiert werden, um die Infektionsrate der Viren zu steigern. Darüberhinaus sollte die virale Bindung an den NTCP, anhand von synthetischen Peptiden, lediglich den ersten 48 N-terminalen Aminosäuren des HBV-präS1 entsprechend, analysiert und quantifiziert werden (Glebe et al., 2005).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen (Abb. 19), dass eine Übertragung von HBV nicht-humaner Primaten auf den Menschen theoretisch möglich ist. Dies müsste jedoch mit Hüllproteinen weiterer HBV nicht-humaner Primaten erweitert werden.

Phylogenetische Analysen ergaben bereits, dass in südlichen Gebieten Asiens gefundene Isolate von Orang-Utan-HBV (OuHBV) auch als Rekombinationen mit Gibbon-HBV (GibHBV) auftraten. Dort, wo sich die Verbreitungsgebiete von Orang-Utans und Gibbons überschneiden. Zudem gehören Gibbons, im Gegensatz zu Gorillas, Orang-Utans und Schimpansen (*Hominidae*, Große Menschenaffen), zur Familie der *Hylobatidae* (Kleine Menschenaffen) und sind in den tropischen und subtropischen Regenwäldern von Nordostindien bis Indonesien und Nord- bis Südchina sowie

auf den Inseln Sumatra, Borneo und Java verbreitet (Abb. 5 C). Auch, dass in Afrika spezifische Isolate von Schimpansen-HBV (ChHBV) gleichzeitig in verschiedenen Schimpansen-Unterarten beobachtet werden konnte, lässt hier wohl auf eine geografische, und keine artenspezifische, Verbindung dieser HBV schlussfolgern (Bonvicino, 2014; Starkman et al., 2003). So sind ChHBV und GiHBV zwar phylogenetisch verschieden, dennoch wurden in GiHBV-Isolaten bereits Hinweise auf eine mögliche Rekombination mit ChHBV beobachtet (Lyons et al., 2012).

Nicht zu vergessen bleibt in diesem Sinne auch die Analyse der Möglichkeit des Inter-Spezies-Kontakts, welcher entsprechend zur Übertragung von HBV oder HBV nicht-humaner Primaten führen könnte. So nutzte der Mensch vermutlich bereits vor über 35.000 Jahren Orang-Utans als Nahrungsquelle (Leiman & Ghaffar, 1996). Heutige Probleme stellen eher die private Haltung der Tiere in Gefangenschaft und hier auch deren Misshandlung dar, z.B. in Form von sexualisierter Gewalt. Häufig sind Orang-Utans auch Gegenstand von Filmen und Dokumentationen. Dies, vorallem aber der stetig steigende Tourismus, führen zu einer Zunahme von Kontakten zwischen Mensch und Tier (Leiman & Ghaffar, 1996; Wich et al., 2008). Zudem müssen diese, in freier Wildbahn eigentlich halbsolitär lebenden, Primaten, aufgrund der Abholzung der Wälder (z.B. infolge des Palmölanbaus), immer häufiger in Rehabilitationszentren untergebracht werden (Kopp & Liebal, 2018), was so auch intraspezifische und interspezifische Kontakte, wie den zum Menschen, fördert.

Fazit und Ausblick: Abschließend konnten die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass grundsätzlich eine Kreuzübertragung von pseudotypisierten HDV, mit Hüllproteinen von humanem HBV oder HBV nicht-humaner Primaten (Orang-Utan und Schimpanse), zwischen Menschen und verschiedenen nicht-humanen Primaten möglich ist. Ob die beobachtete geringe Infektiosität in der Zellkultur, hier ein ausschlaggebender Faktor für eine Übertragung ist, oder ob dem weitere Ursachen zugrunde liegen, muss in Zukunft dennoch weiter analysiert werden.

5.3. Wirtsfaktoren und deren potezieller Einfluss auf die Replikation und die Persistenz von Hepatitis-B-Viren und Hepatitis-D-Viren

Trotz der Verfügbarkeit eines Impfstoffs und antiviraler Behandlungsmöglichkeiten stellen die HBV-Infektion, und auch die Koinfektion mit HDV, nach wie vor ein erhebliches Risiko für die menschliche Gesundheit dar. Es bleibt von Bedeutung potenzielle Wirtsfaktoren zu erforschen, da bisher keine spezifischen, genau auf das Virus, bzw. dessen Replikationszyklus, abzielenden, Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung stehen. Das einzige, jedoch nur für die Behandlung von chronischen HDV-Infektionen zugelassene, Medikament Hepcludex® (Bulevirtid), ist hier vom

präS1-Peptid des HBV (Genotyp C) abgeleitet und blockiert entsprechend die Bindung des Virus an den NTCP (Cheng et al., 2021; Gripon et al., 2005; Kang & Syed, 2020; H. Liu, Zakrzewicz, et al., 2024).

Bisher ist nur eine geringe Anzahl an Wirtsfaktoren bekannt, welche einen Einfluss auf die Persistenz oder Replikation von HBV oder HDV haben. Beispielsweise konnte bereits gezeigt werden, dass der Mustererkennungsrezeptor (*pattern recognition receptor*, PRR) MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) als Bestandteil des angeborenen Immunsystems in der Lage ist HDV-RNA-Intermediate zu erkennen. Der *Knock-Down* von MDA5 hat jedoch nur eine geringe Auswirkung auf die HDV-Replikation (Zhang et al., 2018). Folglich wurden in dieser Arbeit 64 unterschiedliche Wirtsfaktoren eingehender analysiert.

Bei den zunächst in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Geyer durchgeführten Untersuchungen (siehe auch (Palatini et al., 2022)), konnte gezeigt werden, dass der siRNA-induzierte IFITM3-*Knock-Down* in Huh7-NTCP Zellen zu einer reduzierten HDV-Infektion führte, unabhängig vom zur Infektion verwendeten Isolat des HDV-Genotyp 1 (Abb. 22 B). Diese pro-virale Wirkung von IFITM3 konnte jedoch bei Untersuchungen unter Verwendung von HepG2-NTCP Zellen nur mit HDV Gt.1-WHO bestätigt werden (Abb. 22 A). Dennoch konnte die Zugabe des synthetischen myristoylierten HBV-Gt.D3-präS1²⁻⁴⁸-Peptids, zwar die Infektion mit HDV (Abb. 22 C), und auch HBV, inhibieren, die Bindung an den NTCP blieb allerdings auch nach IFITM3-*Knock-Down* beständig, was darauf hindeutete, dass IFITM3 erst nach Bindung des Virus an den NTCP die weiteren Infektionsschritte beeinflusst (Palatini et al., 2022). Die in dieser Arbeit aufgeführten Untersuchungen zeigen so, dass IFITM3 demnach einen pro-viralen Einfluss auf die HDV-Infektion hat.

Die effektive Methode des siRNA-vermittelten *Knock-Downs* diente dazu, weitere Wirtsfaktoren mit möglichen pro- oder anti-viralen Funktionen zu analysieren. Hierbei konnte anhand der Transfektion von Huh7-NTCP Zellen mit spezifischen siRNAs erfolgreich der entsprechende *Knock-Down* von 13 Wirtsfaktoren hervorgerufen werden (Abb. 23 A) und schließlich eine Infektion mit rekombinanten pseudotypisierten HDV durchgeführt werden. Der *Knock-Down* von NKTR führte hier zu einer erhöhten HDV-Infektionsrate (Abb. 23 B), was auf eine potenzielle anti-virale Funktion hinweisen könnte. Frühere Studien zeigten, dass NKTR in einem Xenotransplantat-Tumormodell, durch Hemmung der Phosphorylierung von Akt, die Tumorzellproliferation einschränkt und hierbei die Arretierung in der G1/S-Phase fördert (Zhao et al., 2022). Eine erhöhte Zellproliferation könnte, aufgrund von Zellteilung vermittelter HDV-RNA-Ausbreitung (Goldmann, 2021; Khalfi et al., 2024), auch hier eine erhöhte Anzahl an HDV-positiven Zellen hervorgerufen haben. Umgekehrt konnte beim *Knock-Down* von DDX17 und XRN2 eine signifikant verringerte HDV-Infektionsrate beobachtet werden (Abb. 23 B), was hier auch pro-virale Eigenschaften hinweisen könnte. Frühere Untersuchungen zeigten, dass XRN2 in die Terminierung der Transkription durch RNA-Polymerase

II involviert ist (Eaton & West, 2018). Passend hierzu ist, dass auch die Transkription der genomischen, sowie antigenomischen, HDV-RNA mithilfe der RNA-Polymerase II des eukaryotischen Wirts erfolgt (Abeywickrama-Samarakoon et al., 2020; J. Chang et al., 2008; Yamaguchi et al., 2001). Dies wäre zudem ein weiterer Hinweis auf eine stattgefundene starke spezifische Anpassung von HDV an seinen Wirt.

Dennoch blieb bei den hier durchgeführten Untersuchungen problematisch, dass die Infektionsrate nach Infektion mit rekombinanten pseudotypisierten HDV *in-vitro*, auch bei den hier stabil NTCP-exprimierenden Zellen, stets gering (maximal 30 %) war. Zudem kann bei Durchführung transienter Transfektionen, hier mit siRNAs zum gezielten *Knock-Down* des jeweiligen Wirtsfaktors, die Transfektionseffizienz divergierend sein. So sollte stets beachtet werden, dass die entsprechende Schnittmenge von erfolgreich mit siRNA transfizierten und zudem tatsächlich mit HDV infizierten Zellen oft gering sein könnte. Demnach sollten so nun stabile *Gen-Knock-Out-Zelllinien* generiert werden, sodass die Transfektionseffizienz als limitierender Faktor für Analysen umgangen werden konnte.

Folgend wurden, in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Dr. Karim Majzoub, eine erweiterte Auswahl von 56 Genen erstellt und basierend auf dem CRISPR/Cas9-System (Jinek et al., 2012; Shalem et al., 2014) so für jedes zu untersuchende Gen zwei Gen-spezifische sgRNA-Sequenzen jeweils in das Plasmid lentiCRISPRv2 kloniert (Abb. 24). Schließlich wurden mittels lentiviraler Transduktion stabile *Knock-Out-Zelllinien* (Huh7-NTCP^{MPL}) erzeugt und, mit dem Ziel der Identifikation von potenziell pro- oder anti-viralen Wirtsfaktoren, analysiert. So wurden mit den generierten 113 Huh7-NTCP^{MPL} *Gen-Knock-Out-Zellen* zunächst zwei Screenings, in Form der Infektion dieser mit rekombinanten pseudotypisierten HDV des Genotyp 1 (Gt.1-Taylor und Gt.1-WHO) und anschließender Quantifizierung der infizierten Zellen, vorgenommen.

Vorerst, beim ersten Screening der Huh7-NTCP^{MPL} *Gen-Knock-Out-Zellen*, wurde ein größerer Anteil von Wirtsfaktoren mit potenziell anti-viralen Eigenschaften beobachtet, mit Ausnahme von Huh7-NTCP^{MPL} mit *RBM15-* oder *UBB-Knock-Out*, welche eine signifikante Verringerung der HDV-Infektionsraten durch den jeweiligen *Gen-Knock-Out* aufwiesen (Abb. 25, Tabelle 2). Frühere Untersuchungen zeigten, dass intrazellulär-befindliche HDV-Genome und -Antigene, im Gegensatz zu extrazellulär-befindlichen HDV-Genomen, eine m6A-Methylierung (Methylierung des Adenosins zu N6-Methyladenosin) aufweisen. Die m6A-Methylierung des HDV-Genoms reguliert hier die Replikation und auch die Virus-Assemblierung, indem YTHDF1 rekrutiert wird (Kim et al., 2022). Zudem wurde bereits gezeigt, dass RBM15 an den m6A-Methylierungskomplex binden, sowie diesen lenken, kann, und hier so regulierend wirkt (Patil et al., 2016). So besteht hier die Möglichkeit, dass RBM15 demnach auch einen regulierenden Einfluss auf die HDV-Replikation und -Assemblierung hat.

Aus den, nach dem ersten Screening der Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zellen, nun kategorisierten Wirtsfaktoren, mit beobachteten potenziell pro- oder anti-viralen Eigenschaften (Tabelle 2), wurden schließlich 20 Gene ausgewählt und diese, sowie zusätzlich auch *DDX17* und *NKTR*, erneut mit einem zweiten Screening, unter Verwendung selbiger Methodik, analysiert. Hierbei konnten nur wenige der im ersten Screening beobachteten potenziellen pro- oder anti-viralen Funktionen bestätigt werden (Abb. 21). Die Verifizierung eines pro- bzw. anti-viralen Effekts, anhand beider der verwendeten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien (sgRNAs), war hier nur für den potenziell pro-viralen Effekt von *RBM15* möglich, was hier so erneut für einen regulierenden Einfluss auf die HDV-Replikation und -Assemblierung spricht.

Auch die potenziell pro-viralen Eigenschaften von *DDX17* und *UBB*, sowie die potenziell anti-viralen Eigenschaften von *PAPOLA*, konnten hier erneut verifiziert werden. Allerdings wurde dies hier nur von einer der jeweils verwendeten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien (sgRNAs) signifikant bestätigt, die jeweils zweite verwendete Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinie (sgRNA) deutete dennoch dieselbe Tendenz an. Dass *DDX17* (*DEAD-Box Helicase 17*) eine RNA-Helikase ist und so auch bei einigen Transkriptions-, miRNA- und Splicing-Prozessen regulierend wirkt (Dardenne et al., 2014; Hönig et al., 2002), spricht hier auch für eine potenzielle regulierende Wirkung von *DDX17* auf HDV mit charakteristischem ssRNA-Genom. Zudem wurde bereits kürzlich gezeigt, dass *DDX17*, aber auch *DDX5*, Restriktionsfaktoren für die HBV-Replikation sind, indem diese Helikasen Einfluss auf die effiziente Transkription der HBV cccDNA haben. Hierbei hemmen sie die Erkennung des Polyadenylierungssignals und somit die Terminierung der Transkription (Chapus et al., 2024). Auch ist schon länger bekannt, dass die enzymatisch aktive Helikase *DDX17* mit der HBV-Polymerase um die Bindung an das Epsilon-Motiv am 5'-Ende der prägenomischen HBV-RNA konkurriert und somit die Enkapsidierung blockiert (Mao et al., 2021). Im Gegensatz dazu zeigten jedoch weitere Untersuchungen bereits, dass die Expression von *DDX17* durch HBx verstärkt wird, was so die Metastasierung von HBV-assoziiertem HCC (hepatozelluläres Karzinom) untersützt (Dong et al., 2022). *PAPOLA* (*Poly(A) Polymerase Alpha*) hingegen, eine Polymerase, welche essenziell für die 3'-Polyadenylierung von mRNAs ist, ist entsprechend in Eukaryoten regulieren für die Translation (Komini et al., 2021). Demnach könnte diese hier auch einen Einfluss auf die intrazelluläre Immunregulation haben.

Zudem konnten erneut, jedoch nur mit Möglichkeit der Verwendung einer Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinie (sgRNA), die potenziell anti-viralen Eigenschaften von *HSPA4* verifiziert werden. Frühere Untersuchungen konnten bereits eine erhöhte Expression von *HSPA4* in PatientInnen mit aus einer HBV-Infektion hervorgehendem HCC beobachtet werden, sowie auch, dass hier eine positive Assoziation mit der Infiltration von Immunzellen besteht (Shang et al., 2021), was auf eine generelle anti-virale Wirkung von *HSPA4* hinweisen könnte. Schließlich wurden so die Wirtsfaktoren *DDX17*, *HSPA4*, *NKTR*, *PAPOLA* und *RBM15* ausgewählt um diese weiter zu analysieren.

Im Verlaufe diverser Zellpassagierungen wurde schließlich die nach potentiell Gen-*Knock-Out* resultierende Menge an jeweiligem exprimiertem Protein analysiert, demnach die tatsächliche Funktionalität der verwendeten sgRNA eingestuft. So konnte hier zu jedem Zeitpunkt der tatsächliche *DDX17-Knock-Out*, sowie zumindest einen *RBM15-Knock-Down*, von beiden generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien bestätigt werden (Abb. 27 A, B), was so erneut den beobachteten potenziellen pro-viralen Effekt von DDX17 und RBM15 bekräftigt. Eine Bestätigung des erfolgreichen *Knock-Outs* von NKTR oder PAPOLA in den entsprechenden Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien, konnte zu keinem Zeitpunkt der Untersuchungen erfolgen (Abb. 27 C), was die in dieser Arbeit beobachteten potenziellen anti-viralen Funktionen dieser Wirtsfaktoren in Frage stellt. So könnten die hier analysierten Beobachtungen rein auf das Durchlaufen vieler Zellpassagierungen und die hiermit verbundene Änderung der Mischkultur zurückzuführen sein. Auch auf diese Weise konnte der entsprechende *HSPA4-Knock-Out* durch Zugabe des entsprechenden Selektionsantibiotikums in der generierten Mischkultur von Huh7-NTCP^{MPL} *HSPA4-Knock-Out*-Zellen erst nach und nach immer dominanter hervorgerufen werden (Abb. 27 B). Allgemein könnte dies die hier beobachteten divergierenden Effekte bei Durchführung der Western Blot und Northern Blot Analysen (Abb. 28, Abb. 30) erklären.

Folgend wurden so, anhand je einer der jeweils zwei generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien zur Untersuchung des entsprechenden Wirtsfaktors, nun einzelne Schritte des HDV-Replikationszyklus genauer betrachtet werden. Hierbei diene zunächst der Nachweis von HDAg in Zelllysaten, nach Infektion der Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien mit verschiedenen Isolaten von rekombinanten pseudotypisierten HDV des Genotyp 1 und 3, als Surrogat-Nachweis für eine stattfindende HDV-Replikation. Der tatsächliche Beginn der HDV-Replikation wird hier so indirekt durch die anfängliche Translation von genomischer HDV-RNA und so nachfolgend generiertes HDAg (Kuo et al., 1989) nachgewiesen. Der direkte Einfluss, der potenziell pro- oder anti-viralen Eigenschaften der untersuchten Wirtsfaktoren, auf die HDV-Replikation wurde im nächsten Schritt zudem mittels Northern Blot Analysen analysiert.

Trotz Betrachtung stark divergierender Ergebnisse bei den durchgeführten Western Blot Analysen zum Nachweis von S/L-HDAg nach HDV-Infektion der Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out*-Zelllinien, wurde eine signifikant veränderte, hier geringere, Signalintensität für HDAg bei der Infektion der Huh7-NTCP^{MPL} *RBM15-Knock-Out*-Zellen mit HDV Gt.1-Taylor festgestellt (Abb. 28). Dies würde so erneut die Vermutung von pro-viralen Funktionen von RBM15 stützen. Auch die bei den durchgeführten Northern Blot Analysen, nach Infektion der Huh7-NTCP^{MPL} *RBM15-Knock-Out*-Zellen, beobachtete, tendenziell verringerte, Menge an detektierter antigenomischer und genomischer HDV-RNA (Abb. 29, Abb. 30), könnte so für einen pro-viralen Einfluss von RBM15 auf frühe Prozesse während der HDV-Replikation hinweisen

Zwar führten die in dieser Arbeit vollzogenen Northern Blot Analysen ebenfalls zu stark divergierenden Ergebnissen (Abb. 30), dennoch zeigten hier die generierten Huh7-NTCP^{MPL}

DDX17-Knock-Out-Zellen, entsprechend bei Infektion dieser mit rekombinanten pseudotypisierten HDV der beiden hier verwendeten HDV-Isolate des Genotyp 1, eine signifikant erhöhte Signalintensität für antigenomische, nicht jedoch genomische, HDV-RNA. Gegensätzlich hierzu zeigten die generierten Huh7-NTCP^{MPL} *PAPOLA-Knock-Out-Zellen*, ebenfalls bei Infektion dieser mit rekombinanten pseudotypisierten HDV der beiden hier verwendeten HDV-Isolate des Genotyp 1, eine signifikant erhöhte Signalintensität für genomische, nicht jedoch antigenomische, HDV-RNA (Abb. 29). Wie zuvor angedeutet, könnte *PAPOLA* hier einen Einfluss auf Prozesse bezüglich der Translation von HDAg haben, was bei *PAPOLA-Knock-Out* so dazu geführt haben könnte, dass hier eine erhöhte Menge an genomischer HDV-RNA zu beobachten war. So könnte sich, wie ebenfalls zuvor angedeutet, die RNA-Helikase *DDX17* hier schließlich regulierend auf die Transkription der antigenomischen HDV-RNA auswirken, wodurch so bei *DDX17-Knock-Out* eine ungewöhnlich erhöhte Menge an antigenomischer HDV-RNA detektiert wurde.

Bei Infektion der Huh7-NTCP^{MPL} *Gen-Knock-Out-Zelllinien* mit rekombinanten pseudotypisierten HDV des Genotyp 3, konnten, weder bei den in dieser Arbeit durchgeführten Western Blot Analysen (Abb. 28), noch bei ebendiesen Northern Blot Analysen (Abb. 29, Abb. 30 C), Hinweise auf signifikante pro- oder anti-virale Funktionen der untersuchten Wirtsfaktoren gefunden werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der wesentlich in Südamerika vorkommende HDV-Genotyp 3 (Casey et al., 1993), sich genetisch am meisten von allen anderen HDV-Genotypen unterscheidet (Alvarado-Mora et al., 2011; Le Gal et al., 2017).

Erst nach Abschluss, und demnach weder vor, noch während, der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, wurde schließlich die Funktionalität des stabil exprimierten NTCP der generierten Huh7-NTCP^{MPL} *Gen-Knock-Out-Zelllinien* überprüft. Die Beobachtung, dass die generierten Huh7-NTCP^{MPL} *HSPA4-Knock-Out-Zellen* (sgRNA Nr.1), sowie auch die Huh7-NTCP^{MPL} *NKTR-Knock-Out-Zellen* (sgRNA Nr.2) und die Huh7-NTCP^{MPL} *PAPOLA-Knock-Out-Zellen* (sgRNA Nr.2), einen vergleichsweise erhöhten NBD-TC-Transport zeigten, stellt hiermit die beobachteten potenziell anti-viralen Funktionen von *HSPA4*, *NKTR* und *PAPOLA* in Frage. Da diese Steigerung, im Vergleich zu Huh7-NTCP^{MPL} (*Gen-Knock-Out*-)Zellen mit Kontroll-sgRNA, so jedoch bei nur ca. 15 % lag, schließt dies die gezeigte potenziell anti-virale Funktion hier jedoch nicht aus. Die generierten Huh7-NTCP^{MPL} *RBM15-Knock-Out-Zellen* (sgRNA Nr.1) hingegen, zeigten, auch hier vergleichsweise, eine sehr deutliche Verringerung des NBD-TC-Transports, um ganze 60 %. Dies könnte so die in dieser Arbeit vorgenommene Auslegung einer potenziell pro-virale Funktion von *RBM15* entkräften.

Fazit und Ausblick: Zusammenfassend konnte, bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, klar gezeigt werden, dass *IFITM3* eine pro-virale Funktion bei der Infektion mit HDV einnimmt. Für die weiteren analysierten Wirtsfaktoren konnten jedoch keine konkreten Funktionen oder Wirkmechanismen für potenziell pro- oder anti-virale Eigenschaften identifiziert

werden. Klar bleibt auch, dass keiner der 64 untersuchten Wirtsfaktoren essenziell für die HDV-Infektion ist. Die zuvor erwähnte, mit den ausgeführten Zellpassagierungen verbundene, schrittweise Änderung der Mischkultur, kann hier zudem ein Grund für die, in den durchgeführten Western Blot und Northern Blot Analysen beobachteten, divergierenden Ergebnisse sein. Dennoch schließen diese Untersuchungen entsprechende pro- oder anti-virale Eigenschaften dieser Wirtsfaktoren nicht aus, sowie zeigen darüber hinaus dennoch mögliche Tendenzen auf. Die in dieser Arbeit unterbreiteten Vermutungen und Vergleiche könnten somit durch weitere Untersuchungen, idealerweise unabhängig von den in dieser Arbeit generierten Huh7-NTCP^{MPL} Gen-*Knock-Out/Down*-Zelllinien (sgRNAs), weiter analysiert und ggf. verifiziert oder widerlegt werden.

Literaturhinweise

- Abeywickrama-Samarakoon, N., Cortay, J.-C., Sureau, C., Müller, S., Alfaiate, D., Guerrieri, F., Chaikuad, A., Schröder, M., Merle, P., Levrero, M., & Dény, P. (2020). Hepatitis Delta Virus histone mimicry drives the recruitment of chromatin remodelers for viral RNA replication. *Nature Communications*, *11*(1), 419. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14299-9>
- Abou El Nasr, A. A. E. W. A. (2011, März 17). *Use of peptide microarrays for mapping viral b cell epitopes*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Use-of-peptide-microarrays-for-mapping-viral-b-cell-Nasr-Nasr/7eed2c65c4c0b6ed7fa717a4a52385ae7da08304>
- Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., & Knowles, B. B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, *282*(5739), 615–616. <https://doi.org/10.1038/282615a0>
- Alvarado-Mora, M. V., Romano, C. M., Gomes-Gouvêa, M. S., Gutierrez, M. F., Carrilho, F. J., & Pinho, J. R. R. (2011). Dynamics of Hepatitis D (delta) virus genotype 3 in the Amazon region of South America. *Infection, Genetics and Evolution*, *11*(6), 1462–1468. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.05.020>
- Araujo, N. M., & Osiowy, C. (2022). Hepatitis B Virus Genotype G: The Odd Cousin of the Family. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 872766. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.872766>
- Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Visoná, K. A., & Magnusius, L. O. (1997). Genotype F prevails in HBV infected patients of Hispanic origin in Central America and may carry the precore stop mutant. *Journal of Medical Virology*, *51*(4), 305–312. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199704\)51:4<305::AID-JMV8>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199704)51:4<305::AID-JMV8>3.0.CO;2-9)
- Bartenschlager, R., Junker-Niepmann, M., & Schaller, H. (1990). The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *Journal of Virology*, *64*(11), 5324–5332. <https://doi.org/10.1128/jvi.64.11.5324-5332.1990>
- Beck, J., & Nassal, M. (2007). Hepatitis B virus replication. *World Journal of Gastroenterology*, *13*(1), 48–64. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i1.48>
- Berger, J., Hauber, J., Hauber, R., Geiger, R., & Cullen, B. R. (1988). Secreted placental alkaline phosphatase: A powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene*, *66*(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90219-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90219-3)
- Bergner, L. M., Orton, R. J., Broos, A., Tello, C., Becker, D. J., Carrera, J. E., Patel, A. H., Biek, R., & Streicker, D. G. (2021). Diversification of mammalian deltaviruses by host shifting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(3), e2019907118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2019907118>
- Berting, A., Hahnen, J., Kröger, M., & Gerlich, W. H. (1995). Computer-Aided Studies on the Spatial Structure of the Small Hepatitis B Surface Protein. *Intervirology*, *38*(1–2), 8–15. <https://doi.org/10.1159/000150409>
- Bichko, V., Pushko, P., Dreilina, D., Pumpen, P., & Gren, E. (1985). Subtype ayw variant of hepatitis B virus: DNA primary structure analysis. *FEBS Letters*, *185*(1), 208–212. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80771-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80771-7)
- Birnbaum, F., & Nassal, M. (1990). Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: Primary structure requirements in the core protein. *Journal of Virology*, *64*(7), 3319–3330. <https://doi.org/10.1128/jvi.64.7.3319-3330.1990>
- Blanchet, M., & Sureau, C. (2007). Infectivity Determinants of the Hepatitis B Virus Pre-S Domain Are Confined to the N-Terminal 75 Amino Acid Residues. *Journal of Virology*, *81*(11), 5841–5849. <https://doi.org/10.1128/JVI.00096-07>
- Blank, A., Markert, C., Hohmann, N., Carls, A., Mikus, G., Lehr, T., Alexandrov, A., Haag, M., Schwab, M., Urban, S., & Haefeli, W. E. (2016). First-in-human application of the novel

- hepatitis B and hepatitis D virus entry inhibitor myrcludex B. *Journal of Hepatology*, 65(3), 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.04.013>
- Blumberg, B. S. (1964). POLYMORPHISMS OF THE SERUM PROTEINS AND THE DEVELOPMENT OF ISO-PRECIPTINS IN TRANSFUSED PATIENTS. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 40(5), 377–386.
- Bonino, F., Hoyer, B., Ford, E., Shih, W.-K. J., Purcell, R. H., & Gerin, J. L. (1981). The δ agent: HBsAg particles with δ antigen and RNA in the serum of an HBV carrier. *Hepatology*, 1(2), 127–131. <https://doi.org/10.1002/hep.1840010207>
- Bonvicino, C. R. (2014). Hepatitis B virus lineages in mammalian hosts: Potential for bidirectional cross-species transmission. *World Journal of Gastroenterology*, 20(24), 7665. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i24.7665>
- Brass, A. L., Huang, I.-C., Benita, Y., John, S. P., Krishnan, M. N., Feeley, E. M., Ryan, B. J., Weyer, J. L., van der Weyden, L., Fikrig, E., Adams, D. J., Xavier, R. J., Farzan, M., & Elledge, S. J. (2009). The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell*, 139(7), 1243–1254. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.017>
- Buckwold, V. E., Xu, Z., Chen, M., Yen, T. S., & Ou, J. H. (1996). Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *Journal of Virology*, 70(9), 5845–5851. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.9.5845-5851.1996>
- Canese, M. G., Rizzetto, M., Novara, R., London, W. T., & Purcell, R. H. (1984). Experimental infection of chimpanzees with the HBsAg-Associated delta (δ dL) agent: An ultrastructural study. *Journal of Medical Virology*, 13(1), 63–72. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890130108>
- Casey, J. L., Brown, T. L., Colan, E. J., Wignall, F. S., & Gerin, J. L. (1993). A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(19), 9016–9020. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.19.9016>
- Chang, F. L., Chen, P. J., Tu, S. J., Wang, C. J., & Chen, D. S. (1991). The large form of hepatitis delta antigen is crucial for assembly of hepatitis delta virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(19), 8490–8494. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.19.8490>
- Chang, J., Nie, X., Chang, H. E., Han, Z., & Taylor, J. (2008). Transcription of hepatitis delta virus RNA by RNA polymerase II. *Journal of Virology*, 82(3), 1118–1127. <https://doi.org/10.1128/JVI.01758-07>
- Chapus, F., Giraud, G., Huchon, P., Rodà, M., Grand, X., Charre, C., Goldsmith, C., Roca Suarez, A. A., Martinez, M.-G., Fresquet, J., Diederichs, A., Locatelli, M., Polvèche, H., Scholtès, C., Chemin, I., Hernandez Vargas, H., Rivoire, M., Bourgeois, C. F., Zoulim, F., & Testoni, B. (2024). Helicases DDX5 and DDX17 promote heterogeneity in HBV transcription termination in infected human hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 81(4), 609–620. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2024.05.016>
- Chen, P. J., Kalpana, G., Goldberg, J., Mason, W., Werner, B., Gerin, J., & Taylor, J. (1986). Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(22), 8774–8778. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.22.8774>
- Cheng, D., Han, B., Zhang, W., & Wu, W. (2021). Clinical effects of NTCP-inhibitor myrcludex B. *Journal of Viral Hepatitis*, 28(6), 852–858. <https://doi.org/10.1111/jvh.13490>
- Chou, H.-C., Hsieh, T.-Y., Sheu, G.-T., & Lai, M. M. C. (1998). Hepatitis Delta Antigen Mediates the Nuclear Import of Hepatitis Delta Virus RNA. *Journal of Virology*, 72(5), 3684–3690. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.5.3684-3690.1998>
- Chudy, M., Hanschmann, K.-M., Kress, J., Nick, S., Campos, R., Wend, U., Gerlich, W., & Nübling, C. M. (2012). First WHO International Reference Panel containing hepatitis B virus

- genotypes A-G for assays of the viral DNA. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 55(4), 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.08.013>
- Dane, D. S., Cameron, C. H., & Briggs, M. (1970). VIRUS-LIKE PARTICLES IN SERUM OF PATIENTS WITH AUSTRALIA-ANTIGEN-ASSOCIATED HEPATITIS. *The Lancet*, 295(7649), 695–698. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(70\)90926-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(70)90926-8)
- Dardenne, E., Polay Espinoza, M., Fattet, L., Germann, S., Lambert, M.-P., Neil, H., Zonta, E., Mortada, H., Gratadou, L., Deygas, M., Chakrama, F. Z., Samaan, S., Desmet, F.-O., Tranchevent, L.-C., Dutertre, M., Rimokh, R., Bourgeois, C. F., & Auboeuf, D. (2014). RNA helicases DDX5 and DDX17 dynamically orchestrate transcription, miRNA, and splicing programs in cell differentiation. *Cell Reports*, 7(6), 1900–1913. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.010>
- De Carvalho Dominguez Souza, B. F., König, A., Rasche, A., De Oliveira Carneiro, I., Stephan, N., Corman, V. M., Roppert, P. L., Goldmann, N., Kepper, R., Müller, S. F., Völker, C., De Souza, A. J. S., Gomes-Gouvêa, M. S., Moreira-Soto, A., Stöcker, A., Nassal, M., Franke, C. R., Rebello Pinho, J. R., Soares, M. D. C. P., ... Drexler, J. F. (2018). A novel hepatitis B virus species discovered in capuchin monkeys sheds new light on the evolution of primate hepadnaviruses. *Journal of Hepatology*, 68(6), 1114–1122. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.029>
- Diamond, M. S., & Farzan, M. (2013). The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nature Reviews. Immunology*, 13(1), 46–57. <https://doi.org/10.1038/nri3344>
- Dong, M.-L., Wen, X., He, X., Ren, J.-H., Yu, H.-B., Qin, Y.-P., Yang, Z., Yang, M.-L., Zhou, C.-Y., Zhang, H., Cheng, S.-T., & Chen, J. (2022). HBx Mediated Increase of DDX17 Contributes to HBV-Related Hepatocellular Carcinoma Tumorigenesis. *Frontiers in Immunology*, 13, 871558. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.871558>
- Drosten, C., Weber, M., Seifried, E., & Roth, W. K. (2000). Evaluation of a new PCR assay with competitive internal control sequence for blood donor screening. *Transfusion*, 40(6), 718–724. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2000.40060718.x>
- Eaton, J. D., & West, S. (2018). An end in sight? Xrn2 and transcriptional termination by RNA polymerase II. *Transcription*, 9(5), 321–326. <https://doi.org/10.1080/21541264.2018.1498708>
- Francis, D., Favero, M., & Maynard, J. (1981). Transmission of Hepatitis B Virus. *Seminars in Liver Disease*, 1(01), 27–32. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1063927>
- Ganem, D., & Varmus, H. E. (1987). THE MOLECULAR BIOLOGY OF THE HEPATITIS B VIRUSES. *Annual Review of Biochemistry*, 56(1), 651–693. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.003251>
- Glebe, D., Aliakbari, M., Krass, P., Knoop, E. V., Valerius, K. P., & Gerlich, W. H. (2003). Pre-S1 Antigen-Dependent Infection of *Tupaia* Hepatocyte Cultures with Human Hepatitis B Virus. *Journal of Virology*, 77(17), 9511–9521. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.17.9511-9521.2003>
- Glebe, D., & Bremer, C. (2013). The Molecular Virology of Hepatitis B Virus. *Seminars in Liver Disease*, 33(02), 103–112. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1345717>
- Glebe, D., Urban, S., Knoop, E. V., Çağ, N., Krass, P., Grün, S., Bulavaite, A., Sasnauskas, K., & Gerlich, W. H. (2005). Mapping of the Hepatitis B Virus Attachment Site by Use of Infection-Inhibiting preS1 Lipopeptides and *Tupaia* Hepatocytes. *Gastroenterology*, 129(1), 234–245. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.03.090>
- Goldmann, N. T. (2021). *Interaktion des Hepatitis-Delta-Virus (HDV) mit seinem Helfervirus (HBV) und seinem Rezeptor NTCP in einem in vitro Infektionsmodell*. Universitätsbibliothek Giessen.

- Grethe, S., Heckel, J.-O., Rietschel, W., & Hufert, F. T. (2000). Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus Variants in Nonhuman Primates. *Journal of Virology*, 74(11), 5377–5381. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.11.5377-5381.2000>
- Gripon, P., Canine, I., & Urban, S. (2005). Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *Journal of Virology*, 79(3), 1613–1622. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.3.1613-1622.2005>
- Gripon, P., Le Seyec, J., Rumin, S., & Guguen-Guillouzo, C. (1995). Myristylation of the Hepatitis B Virus Large Surface Protein Is Essential for Viral Infectivity. *Virology*, 213(2), 292–299. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.0002>
- Günther, S., Sommer, G., Von Breunig, F., Iwanska, A., Kalinina, T., Sterneck, M., & Will, H. (1998). Amplification of full-length hepatitis B virus genomes from samples from patients with low levels of viremia: Frequency and functional consequences of PCR-introduced mutations. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(2), 531–538. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.2.531-538.1998>
- Guo, X., Chen, P., Hou, X., Xu, W., Wang, D., Wang, T., Zhang, L., Zheng, G., Gao, Z., He, C.-Y., Zhou, B., & Chen, Z.-Y. (2016). The recombined cccDNA produced using minicircle technology mimicked HBV genome in structure and function closely. *Scientific Reports*, 6(1), 25552. <https://doi.org/10.1038/srep25552>
- Hartwig, D., Schütte, C., Warnecke, J., Dorn, I., Hennig, H., Kirchner, H., & Schlenke, P. (2006). The large form of ADAR 1 is responsible for enhanced hepatitis delta virus RNA editing in interferon- α -stimulated host cells. *Journal of Viral Hepatitis*, 13(3), 150–157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2005.00663.x>
- Heermann, K. H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H., & Gerlich, W. H. (1984). Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *Journal of Virology*, 52(2), 396–402. <https://doi.org/10.1128/jvi.52.2.396-402.1984>
- Heidrich, B., Manns, M. P., & Wedemeyer, H. (2013). Treatment Options for Hepatitis Delta Virus Infection. *Current Infectious Disease Reports*, 15(1), 31–38. <https://doi.org/10.1007/s11908-012-0307-z>
- Hönig, A., Auboeuf, D., Parker, M. M., O'Malley, B. W., & Berget, S. M. (2002). Regulation of alternative splicing by the ATP-dependent DEAD-box RNA helicase p72. *Molecular and Cellular Biology*, 22(16), 5698–5707. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.16.5698-5707.2002>
- Hu, J., & Seeger, C. (2015). Hepadnavirus Genome Replication and Persistence. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(7), a021386. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021386>
- Hu, K.-Q., & Siddiqui, A. (1991). Regulation of the hepatitis B virus gene expression by the enhancer element I. *Virology*, 181(2), 721–726. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90906-R](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90906-R)
- Huang, I.-C., Bailey, C. C., Weyer, J. L., Radoshitzky, S. R., Becker, M. M., Chiang, J. J., Brass, A. L., Ahmed, A. A., Chi, X., Dong, L., Longobardi, L. E., Boltz, D., Kuhn, J. H., Elledge, S. J., Bavari, S., Denison, M. R., Choe, H., & Farzan, M. (2011). Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLoS Pathogens*, 7(1), e1001258. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001258>
- Hudu, S. A. (2022). An Insight into the Epidemiology and Genetic Diversity of Hepatitis B Virus in Africa. *Journal of Molecular Virology and Immunology*, 1. <https://doi.org/10.46683/jmvi.2022.50>
- Hwang, S. B., & Lai, M. M. (1993). Isoprenylation mediates direct protein-protein interactions between hepatitis large delta antigen and hepatitis B virus surface antigen. *Journal of Virology*, 67(12), 7659–7662. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.12.7659-7662.1993>
- Iwamoto, M., Saso, W., Sugiyama, R., Ishii, K., Ohki, M., Nagamori, S., Suzuki, R., Aizaki, H., Ryo, A., Yun, J.-H., Park, S.-Y., Ohtani, N., Muramatsu, M., Iwami, S., Tanaka, Y., Sureau, C.,

- Wakita, T., & Watashi, K. (2019). Epidermal growth factor receptor is a host-entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(17), 8487–8492. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811064116>
- Iwamoto, M., Shibata, Y., Kawasaki, J., Kojima, S., Li, Y.-T., Iwami, S., Muramatsu, M., Wu, H.-L., Wada, K., Tomonaga, K., Watashi, K., & Horie, M. (2021). Identification of novel avian and mammalian deltaviruses provides new insights into deltavirus evolution. *Virus Evolution*, *7*(1), veab003. <https://doi.org/10.1093/ve/veab003>
- Jenna, S., & Sureau, C. (1998). Effect of Mutations in the Small Envelope Protein of Hepatitis B Virus on Assembly and Secretion of Hepatitis Delta Virus. *Virology*, *251*(1), 176–186. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9391>
- Jenna, S., & Sureau, C. (1999). Mutations in the Carboxyl-Terminal Domain of the Small Hepatitis B Virus Envelope Protein Impair the Assembly of Hepatitis Delta Virus Particles. *Journal of Virology*, *73*(4), 3351–3358. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.4.3351-3358.1999>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, *337*(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kang, C., & Syed, Y. Y. (2020). Bulevirtide: First Approval. *Drugs*, *80*(15), 1601–1605. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01400-1>
- Kaplan, P. M., Greenman, R. L., Gerin, J. L., Purcell, R. H., & Robinson, W. S. (1973). DNA Polymerase Associated with Human Hepatitis B Antigen. *Journal of Virology*, *12*(5), 995–1005. <https://doi.org/10.1128/jvi.12.5.995-1005.1973>
- Kay, M. A., He, C.-Y., & Chen, Z.-Y. (2010). A Simple And Rapid Minicircle DNA Vector Manufacturing System. *Nature biotechnology*, *28*(12), 1287–1289. <https://doi.org/10.1038/nbt.1708>
- Kew, M. C. (2011). Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *26*(s1), 144–152. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06546.x>
- Khalifi, P., Denis, Z., McKellar, J., Merolla, G., Chavey, C., Ursic-Bedoya, J., Soppa, L., Szivovicza, L., Hetzel, U., Dufourt, J., Leyrat, C., Goldmann, N., Goto, K., Verrier, E., Baumert, T. F., Glebe, D., Courgnaud, V., Gregoire, D., Hepojoki, J., & Majzoub, K. (2024). Comparative analysis of human, rodent and snake deltavirus replication. *PLOS Pathogens*, *20*(3), e1012060. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012060>
- Kim, G.-W., Moon, J.-S., Gudima, S. O., & Siddiqui, A. (2022). N⁶-Methyladenine Modification of Hepatitis Delta Virus Regulates Its Virion Assembly by Recruiting YTHDF1. *Journal of Virology*, *96*(19), e01124-22. <https://doi.org/10.1128/jvi.01124-22>
- Komini, C., Theohari, I., Lambrianidou, A., Nakopoulou, L., & Trangas, T. (2021). PAPOLA contributes to cyclin D1 mRNA alternative polyadenylation and promotes breast cancer cell proliferation. *Journal of Cell Science*, *134*(7), jcs252304. <https://doi.org/10.1242/jcs.252304>
- Komla-Soukha, I., & Sureau, C. (2006). A tryptophan-rich motif in the carboxyl terminus of the small envelope protein of hepatitis B virus is central to the assembly of hepatitis delta virus particles. *Journal of Virology*, *80*(10), 4648–4655. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.4648-4655.2006>
- Kopec, A. M., Rivera, P. D., Lacagnina, M. J., Hanamsagar, R., & Bilbo, S. D. (2017). Optimized solubilization of TRIzol-precipitated protein permits Western blotting analysis to maximize data available from brain tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, *280*, 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.02.002>
- Kopp, K. S., & Liebal, K. (2018). Conflict resolution in socially housed Sumatran orangutans (*Pongo abelii*). *PeerJ*, *6*, e5303. <https://doi.org/10.7717/peerj.5303>

- Kostyushev, D., Kostyusheva, A., Brezgin, S., Ponomareva, N., Zakirova, N. F., Egorshina, A., Yanvarev, D. V., Bayurova, E., Sudina, A., Goptar, I., Nikiforova, A., Dunaeva, E., Lisitsa, T., Abramov, I., Frolova, A., Lukashev, A., Gordeychuk, I., Zamyatnin, A. A., Ivanov, A., & Chulanov, V. (2023). Depleting hepatitis B virus relaxed circular DNA is necessary for resolution of infection by CRISPR-Cas9. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *31*, 482–493. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.02.001>
- Kramvis, A. (2014). Genotypes and Genetic Variability of Hepatitis B Virus. *Intervirology*, *57*(3–4), 141–150. <https://doi.org/10.1159/000360947>
- Kramvis, A., Kew, M., & François, G. (2005). Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*, *23*(19), 2409–2423. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.10.045>
- Krause, A., Haberkorn, U., & Mier, W. (2018). Strategies for the treatment of HBV/HDV. *European Journal of Pharmacology*, *833*, 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.06.030>
- Kucinskaite-Kodze, I., Pleckaityte, M., Bremer, C. M., Seiz, P. L., Zilnyte, M., Bulavaite, A., Mickiene, G., Zvirblis, G., Sasnauskas, K., Glebe, D., & Zvirbliene, A. (2016). New broadly reactive neutralizing antibodies against hepatitis B virus surface antigen. *Virus Research*, *211*, 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.10.024>
- Kuhn, J. H., Babaian, A., Bergner, L. M., Dény, P., Glebe, D., Horie, M., Koonin, E. V., Krupovic, M., Paraskevopoulou, S., De La Peña, M., Smura, T., & Hepojoki, J. (2024). ICTV Virus Taxonomy Profile: Kolmioviridae 2024. *Journal of General Virology*, *105*(2). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001963>
- Kuo, M. Y., Chao, M., & Taylor, J. (1989). Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: Role of delta antigen. *Journal of Virology*, *63*(5), 1945. <https://doi.org/10.1128/jvi.63.5.1945-1950.1989>
- Labun, K., Montague, T. G., Gagnon, J. A., Thyme, S. B., & Valen, E. (2016). CHOPCHOP v2: A web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Research*, *44*(W1), W272–W276. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw398>
- Labun, K., Montague, T. G., Krause, M., Torres Cleuren, Y. N., Tjeldnes, H., & Valen, E. (2019). CHOPCHOP v3: Expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W171–W174. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz365>
- Landers, T. A., Greenberg, H. B., & Robinson, W. S. (1977). Structure of Hepatitis B Dane Particle DNA and Nature of the Endogenous DNA Polymerase Reaction. *Journal of Virology*, *23*(2), 368–376. <https://doi.org/10.1128/jvi.23.2.368-376.1977>
- Lanford, R. E., Chavez, D., Brasky, K. M., Burns, R. B., & Rico-Hesse, R. (1998). Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(10), 5757–5761. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5757>
- Le Gal, F., Brichtler, S., Drugan, T., Alloui, C., Roulot, D., Pawlotsky, J., Dény, P., & Gordien, E. (2017). Genetic diversity and worldwide distribution of the deltavirus genus: A study of 2,152 clinical strains. *Hepatology*, *66*(6), 1826–1841. <https://doi.org/10.1002/hep.29574>
- Le Gal, F., Gault, E., Ripault, M.-P., Serpaggi, J., Trinchet, J.-C., Gordien, E., & Dény, P. (2006). Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerging Infectious Diseases*, *12*(9), 1447–1450. <https://doi.org/10.3201/eid1209.060112>
- Lehmann, F., Slanina, H., Roderfeld, M., Roeb, E., Trebicka, J., Ziebuhr, J., Gerlich, W. H., Schüttler, C. G., Schlevogt, B., & Glebe, D. (2023). A Novel Insertion in the Hepatitis B Virus Surface Protein Leading to Hyperglycosylation Causes Diagnostic and Immune Escape. *Viruses*, *15*(4), 838. <https://doi.org/10.3390/v15040838>
- Leiman, A., & Ghaffar, N. (1996). Use, misuse and abuse of the orang utan—Exploitation as a threat or the only real salvation? In V. J. Taylor & N. Dunstone (Hrsg.), *The Exploitation of*

- Mammal Populations* (S. 345–357). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1525-1_20
- Li, C., Wen, A., Shen, B., Lu, J., Huang, Y., & Chang, Y. (2011). FastCloning: A highly simplified, purification-free, sequence- and ligation-independent PCR cloning method. *BMC Biotechnology*, *11*, 92. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-92>
- Li, F., Cheng, L., Murphy, C. M., Reszka-Blanco, N. J., Wu, Y., Chi, L., Hu, J., & Su, L. (2016). Minicircle HBV cccDNA with a Gaussia luciferase reporter for investigating HBV cccDNA biology and developing cccDNA-targeting drugs. *Scientific Reports*, *6*(1), 36483. <https://doi.org/10.1038/srep36483>
- Liu, H., Chen, S., Liu, X., & Lou, J. (2024). Effect of S-region mutations on HBsAg in HBsAg-negative HBV-infected patients. *Virology Journal*, *21*(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s12985-024-02366-2>
- Liu, H., Zakrzewicz, D., Nosol, K., Irobalieva, R. N., Mukherjee, S., Bang-Sørensen, R., Goldmann, N., Kunz, S., Rossi, L., Kossiakoff, A. A., Urban, S., Glebe, D., Geyer, J., & Locher, K. P. (2024). Structure of antiviral drug bulevirtide bound to hepatitis B and D virus receptor protein NTCP. *Nature Communications*, *15*(1), 2476. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46706-w>
- Liu, Z., Zhang, Y., Xu, M., Li, X., & Zhang, Z. (2021). Distribution of hepatitis B virus genotypes and subgenotypes: A meta-analysis. *Medicine*, *100*(50), e27941. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000027941>
- Locarnini, S., Littlejohn, M., Aziz, M. N., & Yuen, L. (2013). Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). *Seminars in Cancer Biology*, *23*(6), 561–575. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.08.006>
- Locarnini, S., Shaw, T., Dean, J., Colledge, D., Thompson, A., Li, K., Lemon, S. M., Lau, G. G. K., & Beard, M. R. (2005). Cellular response to conditional expression of the hepatitis B virus precore and core proteins in cultured hepatoma (Huh-7) cells. *Journal of Clinical Virology*, *32*(2), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.002>
- Lucifora, J., Arzberger, S., Durantel, D., Belloni, L., Strubin, M., Levrero, M., Zoulim, F., Hantz, O., & Protzer, U. (2011). Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *Journal of Hepatology*, *55*(5), 996–1003. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.015>
- Lucifora, J., & Delphin, M. (2020). Current knowledge on Hepatitis Delta Virus replication. *Antiviral Research*, *179*, 104812. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104812>
- Lyons, S., Sharp, C., LeBreton, M., Djoko, C. F., Kiyang, J. A., Lankester, F., Bibila, T. G., Tamoufé, U., Fair, J., Wolfe, N. D., & Simmonds, P. (2012). Species Association of Hepatitis B Virus (HBV) in Non-Human Apes; Evidence for Recombination between Gorilla and Chimpanzee Variants. *PLoS ONE*, *7*(3), e33430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033430>
- MacDonald, D. M., Holmes, E. C., Lewis, J. C. M., & Simmonds, P. (2000). Detection of Hepatitis B Virus Infection in Wild-Born Chimpanzees (*Pan troglodytes verus*): Phylogenetic Relationships with Human and Other Primate Genotypes. *Journal of Virology*, *74*(9), 4253–4257. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.9.4253-4257.2000>
- Magnius, L. O., Mason, W. S., Taylor, J., Kann, M., Glebe, D., Dény, P., Sureau, C., Norder, H., & Ictv Report Consortium, null. (2020). ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepadnaviridae. *The Journal of General Virology*, *101*(6), 571–572. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001415>
- Magnius, L. O., & Norder, H. (1995). Subtypes, Genotypes and Molecular Epidemiology of the Hepatitis B Virus as Reflected by Sequence Variability of the S-Gene. *Intervirology*, *38*(1–2), 24–34. <https://doi.org/10.1159/000150411>

- Mangold, C. M., & Streeck, R. E. (1993). Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein. *Journal of Virology*, *67*(8), 4588–4597. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.8.4588-4597.1993>
- Mao, R., Dong, M., Shen, Z., Zhang, H., Liu, Y., Cai, D., Mitra, B., Zhang, J., & Guo, H. (2021). RNA Helicase DDX17 Inhibits Hepatitis B Virus Replication by Blocking Viral Pregenomic RNA Encapsidation. *Journal of Virology*, *95*(19), e00444-21. <https://doi.org/10.1128/JVI.00444-21>
- Marciano, S., Galdame, O. A., & Gadano, A. C. (2013). HBV Genotype F: Natural History and Treatment. *Antiviral Therapy*, *18*(3_part_2), 485–488. <https://doi.org/10.3851/IMP2604>
- Martin, C. M., Welge, J. A., Rouster, S. D., Shata, M. T., Sherman, K. E., & Blackard, J. T. (2012). Mutations associated with occult hepatitis B virus infection result in decreased surface antigen expression *in vitro*. *Journal of Viral Hepatitis*, *19*(10), 716–723. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2012.01595.x>
- Martinez, M. G., Boyd, A., Combe, E., Testoni, B., & Zoulim, F. (2021). Covalently closed circular DNA: The ultimate therapeutic target for curing HBV infections. *Journal of Hepatology*, *75*(3), 706–717. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.05.013>
- McLachlan, A. (2018). *Molecular Biology of the Hepatitis B Virus* (A. McLachlan, Hrsg.; 1. Aufl.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351074759>
- Millman, I., Loeb, L. A., Bayer, M. E., & Blumberg, B. S. (1970). AUSTRALIA ANTIGEN (A HEPATITIS-ASSOCIATED ANTIGEN). *The Journal of Experimental Medicine*, *131*(6), 1190–1199. <https://doi.org/10.1084/jem.131.6.1190>
- Montague, T. G., Cruz, J. M., Gagnon, J. A., Church, G. M., & Valen, E. (2014). CHOPCHOP: A CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Research*, *42*(Web Server issue), W401–W407. <https://doi.org/10.1093/nar/gku410>
- Moolla, N., Kew, M., & Arbuthnot, P. (2002). Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. *Journal of Viral Hepatitis*, *9*(5), 323–331. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.2002.00381.x>
- Müller, S. F., König, A., Döring, B., Glebe, D., & Geyer, J. (2018). Characterisation of the hepatitis B virus cross-species transmission pattern via Na⁺/taurocholate co-transporting polypeptides from 11 New World and Old World primate species. *PLOS ONE*, *13*(6), e0199200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199200>
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., & Sato, J. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Research*, *42*(9), 3858–3863.
- Nassal, M. (1992). The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *Journal of Virology*, *66*(7), 4107–4116. <https://doi.org/10.1128/JVI.66.7.4107-4116.1992>
- Nassal, M. (2015). HBV cccDNA: Viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut*, *64*(12), 1972–1984. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309809>
- Nassal, M., Junker-Niepmann, M., & Schaller, H. (1990). Translational inactivation of RNA function: Discrimination against a subset of genomic transcripts during HBV nucleocapsid assembly. *Cell*, *63*(6), 1357–1363. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90431-d](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90431-d)
- Norder, H., Couroucé, A.-M., Coursaget, P., Echevarria, J. M., Lee, S.-D., Mushahwar, I. K., Robertson, B. H., Locarnini, S., & Magnius, L. O. (2004). Genetic Diversity of Hepatitis B Virus Strains Derived Worldwide: Genotypes, Subgenotypes, and HB_sAg Subtypes. *Intervirology*, *47*(6), 289–309. <https://doi.org/10.1159/000080872>

- Norder, H., Couroucé, A.-M., & Magnius, L. O. (1994). Complete Genomes, Phylogenetic Relatedness, and Structural Proteins of Six Strains of the Hepatitis B Virus, Four of Which Represent Two New Genotypes. *Virology*, *198*(2), 489–503. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1060>
- Norder, H., Hammas, B., Lee, S.-D., Bile, K., Couroucé, A.-M., Mushahwar, I. K., & Magnius, L. O. (1993). Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *Journal of General Virology*, *74*(7), 1341–1348. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-7-1341>
- Okamoto, H., Imai, M., Tsuda, F., Tanaka, T., Miyakawa, Y., & Mayumi, M. (1987). Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *Journal of Virology*, *61*(10), 3030–3034. <https://doi.org/10.1128/jvi.61.10.3030-3034.1987>
- Otto, J. C., & Casey, P. J. (1996). The hepatitis delta virus large antigen is farnesylated both in vitro and in animal cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(9), 4569–4572. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.9.4569>
- Ou, J. H. (1997). Molecular biology of hepatitis B virus e antigen. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *12*(9–10), S178–187. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.1997.tb00499.x>
- Ou, J. H., Laub, O., & Rutter, W. J. (1986). Hepatitis B virus gene function: The precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(6), 1578–1582. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.6.1578>
- Palatini, M., Müller, S. F., Kirstgen, M., Leiting, S., Lehmann, F., Soppa, L., Goldmann, N., Müller, C., Lowjaga, K. A. A. T., Alber, J., Ciarimboli, G., Ziebuhr, J., Glebe, D., & Geyer, J. (2022). IFITM3 Interacts with the HBV/HDV Receptor NTCP and Modulates Virus Entry and Infection. *Viruses*, *14*(4), 727. <https://doi.org/10.3390/v14040727>
- Paraskevopoulou, S., Pirzer, F., Goldmann, N., Schmid, J., Corman, V. M., Gottula, L. T., Schroeder, S., Rasche, A., Muth, D., Drexler, J. F., Heni, A. C., Eibner, G. J., Page, R. A., Jones, T. C., Müller, M. A., Sommer, S., Glebe, D., & Drosten, C. (2020). Mammalian deltavirus without hepadnavirus coinfection in the neotropical rodent *Proechimys semispinosus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(30), 17977–17983. <https://doi.org/10.1073/pnas.2006750117>
- Patil, D. P., Chen, C.-K., Pickering, B. F., Chow, A., Jackson, C., Guttman, M., & Jaffrey, S. R. (2016). m6A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, *537*(7620), 369–373. <https://doi.org/10.1038/nature19342>
- Perez-Vargas, J., Amirache, F., Boson, B., Mialon, C., Freitas, N., Sureau, C., Fusil, F., & Cosset, F.-L. (2019). Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo. *Nature Communications*, *10*(1), 2098. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10117-z>
- Pérez-Vargas, J., Pereira de Oliveira, R., Jacquet, S., Pontier, D., Cosset, F.-L., & Freitas, N. (2021). HDV-Like Viruses. *Viruses*, *13*(7), 1207. <https://doi.org/10.3390/v13071207>
- Pérez-Vargas, J., Teppa, E., Amirache, F., Boson, B., Pereira De Oliveira, R., Combet, C., Böckmann, A., Fusil, F., Freitas, N., Carbone, A., & Cosset, F.-L. (2021). A fusion peptide in preS1 and the human protein disulfide isomerase ERp57 are involved in hepatitis B virus membrane fusion process. *eLife*, *10*, e64507. <https://doi.org/10.7554/eLife.64507>
- Pezzano, S. C., Torres, C., Fainboim, H. A., Bouzas, M. B., Schroder, T., Giuliano, S. F., Paz, S., Alvarez, E., Campos, R. H., & Mbayed, V. A. (2011). Hepatitis B virus in Buenos Aires, Argentina: Genotypes, virological characteristics and clinical outcomes. *Clinical Microbiology and Infection*, *17*(2), 223–231. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03283.x>

- Pyne, M. T., Mallory, M. A., Xie, H. B., Mei, Y., Schlaberg, R., & Hillyard, D. R. (2017). Sequencing of the Hepatitis D Virus RNA WHO International Standard. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, *90*, 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.03.009>
- Quarleri, J. (2014). Core promoter: A critical region where the hepatitis B virus makes decisions. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(2), 425. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i2.425>
- Raimondo, G., Locarnini, S., Pollicino, T., Levrero, M., Zoulim, F., Lok, A. S., Allain, J.-P., Berg, T., Bertoletti, A., Brunetto, M. R., Bruno, R., Chen, D.-S., Coppola, N., Cornberg, M., Craxì, A., Dandri, M., Di Marco, V., Ferrari, C., Gaeta, G. B., ... Yuen, M.-F. (2019). Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*, *71*(2), 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.03.034>
- Rizzetto, M., Canese, M. G., Aricò, S., Crivelli, O., Trepo, C., Bonino, F., & Verme, G. (1977). Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut*, *18*(12), 997–1003. <https://doi.org/10.1136/gut.18.12.997>
- Rizzetto, M., Canese, M. G., Gerin, J. L., London, W. T., Sly, D. L., & Purcell, R. H. (1980). Transmission of the Hepatitis B Virus-Associated Delta Antigen to Chimpanzees. *Journal of Infectious Diseases*, *141*(5), 590–602. <https://doi.org/10.1093/infdis/141.5.590>
- Rizzetto, M., & Ciancio, A. (2012). Epidemiology of Hepatitis D. *Seminars in Liver Disease*, *32*(03), 211–219. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1323626>
- Rizzetto, M., Hoyer, B., Canese, M. G., Shih, J. W., Purcell, R. H., & Gerin, J. L. (1980). delta Agent: Association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *77*(10), 6124–6128. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.10.6124>
- Robinson, W. S., & Greenman, R. L. (1974). DNA Polymerase in the Core of the Human Hepatitis B Virus Candidate. *Journal of Virology*, *13*(6), 1231–1236. <https://doi.org/10.1128/jvi.13.6.1231-1236.1974>
- Roggendorf, H., Shouval, D., Roggendorf, M., & Gerken, G. (2024). Longterm Outcome of Therapeutic Vaccination with a Third Generation Pre-S/S HBV Vaccine (PreHevbrioR) of Chronically HBV Infected Patients. *Journal of Personalized Medicine*, *14*(4), 364. <https://doi.org/10.3390/jpm14040364>
- Roossinck, M. J., Jameel, S., Loukin, S. H., & Siddiqui, A. (1986). Expression of hepatitis B viral core region in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, *6*(5), 1393–1400. <https://doi.org/10.1128/mcb.6.5.1393-1400.1986>
- Ryu, W. S., Netter, H. J., Bayer, M., & Taylor, J. (1993). Ribonucleoprotein complexes of hepatitis delta virus. *Journal of Virology*, *67*(6), 3281–3287. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.6.3281-3287.1993>
- Sandmann, L., & Wedemeyer, H. (2023). Interferon-based treatment of chronic hepatitis D. *Liver International*, *43*(S1), 69–79. <https://doi.org/10.1111/liv.15410>
- Sa-Nguanmoo, P., Rianthavorn, P., Amornsawadwattana, S., & Poovorawan, Y. (2009). Hepatitis B virus infection in non-human primates. *Acta Virologica*, *53*(2), 73–82. https://doi.org/10.4149/av_2009_02_73
- Sa-Nguanmoo, P., Tanaka, Y., Ratanakorn, P., Sugiyama, M., Murakami, S., Payungporn, S., Sommanustweechai, A., Mizokami, M., & Poovorawan, Y. (2011). Cross-species transmission of gibbon and orangutan hepatitis B virus to uPA/SCID mice with human hepatocytes. *Virus Research*, *158*(1–2), 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.002>

- Sanjana, N. E., Shalem, O., & Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature Methods*, *11*(8), 783–784. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3047>
- Schlabe, S., van Bremen, K., Aldabbagh, S., Glebe, D., Bremer, C. M., Marsen, T., Mellin, W., Cristanziano, V. D., Eis-Hübinger, A. M., & Spengler, U. (2018). Hepatitis B virus subgenotype F3 reactivation with vaccine escape mutations: A case report and review of the literature. *World Journal of Hepatology*, *10*(7), 509–516. <https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i7.509>
- Schulze, A., Gripon, P., & Urban, S. (2007). Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein–dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology*, *46*(6), 1759–1768. <https://doi.org/10.1002/hep.21896>
- Seeger, C., & Mason, W. S. (2015). Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*, *479–480*, 672–686. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.031>
- Seiz, P. L., Mohr, C., Wilkinson, D. E., Ziebuhr, J., Schüttler, C. G., Gerlich, W. H., & Glebe, D. (2016). Characterization of the 3rd International Standard for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). *Journal of Clinical Virology*, *82*, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.05.009>
- Shakil, A. O., Hadziyannis, S., Hoofnagle, J. H., Di Bisceglie, A. M., Gerin, J. L., & Casey, J. L. (1997). Geographic Distribution and Genetic Variability of Hepatitis Delta Virus Genotype I. *Virology*, *234*(1), 160–167. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8644>
- Shalem, O., Sanjana, N. E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D. A., Mikkelsen, T. S., Heckl, D., Ebert, B. L., Root, D. E., Doench, J. G., & Zhang, F. (2014). Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. *Science*, *343*(6166), 84–87. <https://doi.org/10.1126/science.1247005>
- Shang, B.-B., Chen, J., Wang, Z.-G., & Liu, H. (2021). Significant correlation between HSPA4 and prognosis and immune regulation in hepatocellular carcinoma. *PeerJ*, *9*, e12315. <https://doi.org/10.7717/peerj.12315>
- Shih, H. H., Shih, C., Wang, H.-W., Su, C.-W., Sheen, I.-J., & Wu, J.-C. (2010). Pro-205 of large hepatitis delta antigen and Pro-62 of major hepatitis B surface antigen influence the assembly of different genotypes of hepatitis D virus. *Journal of General Virology*, *91*(4), 1004–1012. <https://doi.org/10.1099/vir.0.017541-0>
- Shimomura, O., Johnson, F. H., & Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, *59*, 223–239. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030590302>
- Sominskaya, I., Pushko, P., Dreilina, D., Kozlovskaya, T., & Pumpen, P. (1992). Determination of the minimal length of preS1 epitope recognized by a monoclonal antibody which inhibits attachment of Hepatitis B virus to hepatocytes. *Medical Microbiology and Immunology*, *181*(4), 215–226. <https://doi.org/10.1007/BF00215767>
- Starkman, S. E., MacDonald, D. M., Lewis, J. C. M., Holmes, E. C., & Simmonds, P. (2003). Geographic and species association of hepatitis B virus genotypes in non-human primates. *Virology*, *314*(1), 381–393. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00430-6](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00430-6)
- Sureau, C. (2006). The Role of the HBV Envelope Proteins in the HDV Replication Cycle. In J. L. Casey (Hrsg.), *Hepatitis Delta Virus* (Bd. 307, S. 113–131). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-29802-9_6
- Sureau, C., Romet-Lemonne, J.-L., Mullins, J. I., & Essex, M. (1986). Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell*, *47*(1), 37–47. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90364-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90364-8)

- Szirovicza, L., Hetzel, U., Kipar, A., Martinez-Sobrido, L., Vapalahti, O., & Hepojoki, J. (2020). Snake Deltavirus Utilizes Envelope Proteins of Different Viruses To Generate Infectious Particles. *mBio*, *11*(2), e03250-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.03250-19>
- Tatematsu, K., Tanaka, Y., Kurbanov, F., Sugauchi, F., Mano, S., Maeshiro, T., Nakayoshi, T., Wakuta, M., Miyakawa, Y., & Mizokami, M. (2009). A Genetic Variant of Hepatitis B Virus Divergent from Known Human and Ape Genotypes Isolated from a Japanese Patient and Provisionally Assigned to New Genotype J. *Journal of Virology*, *83*(20), 10538–10547. <https://doi.org/10.1128/JVI.00462-09>
- Taylor, J. M. (2015). Hepatitis D Virus Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *5*(11), a021568. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021568>
- Tropberger, P., Mercier, A., Robinson, M., Zhong, W., Ganem, D. E., & Holdorf, M. (2015). Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(42). <https://doi.org/10.1073/pnas.1518090112>
- Tu, T., Zehnder, B., Qu, B., Ni, Y., Main, N., Allweiss, L., Dandri, M., Shackel, N., George, J., & Urban, S. (2020). A novel method to precisely quantify hepatitis B virus covalently closed circular (ccc)DNA formation and maintenance. *Antiviral Research*, *181*, 104865. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104865>
- Vaudin, M., Wolstenholme, A. J., Tsiquaye, K. N., Zuckerman, A. J., & Harrison, T. J. (1988). The Complete Nucleotide Sequence of the Genome of a Hepatitis B Virus Isolated from a Naturally Infected Chimpanzee. *Journal of General Virology*, *69*(6), 1383–1389. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-6-1383>
- Verrier, E. R., Weiss, A., Bach, C., Heydmann, L., Turon-Lagot, V., Kopp, A., El Saghire, H., Crouchet, E., Pessaux, P., Garcia, T., Pale, P., Zeisel, M. B., Sureau, C., Schuster, C., Brino, L., & Baumert, T. F. (2020). Combined small molecule and loss-of-function screen uncovers estrogen receptor alpha and CAD as host factors for HDV infection and antiviral targets. *Gut*, *69*(1), 158–167. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317065>
- Wang, K.-S., Choo, Q.-L., Weiner, A. J., Ou, J.-H., Najarian, R. C., Thayer, R. M., Mullenbach, G. T., Denniston, K. J., Gerin, J. L., & Houghton, M. (1986). Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (δ) viral genome. *Nature*, *323*(6088), 508–514. <https://doi.org/10.1038/323508a0>
- Wang, W., Lempp, F. A., Schlund, F., Walter, L., Decker, C. C., Zhang, Z., Ni, Y., & Urban, S. (2021). Assembly and infection efficacy of hepatitis B virus surface protein exchanges in 8 hepatitis D virus genotype isolates. *Journal of Hepatology*, *75*(2), 311–323. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.03.025>
- Warren, K. S., Heeney, J. L., Swan, R. A., Heriyanto, & Verschoor, E. J. (1999). A New Group of Hepadnaviruses Naturally Infecting Orangutans (*Pongo pygmaeus*). *Journal of Virology*, *73*(9), 7860–7865. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.9.7860-7865.1999>
- Weiner, A. J., Choo, Q. L., Wang, K. S., Govindarajan, S., Redeker, A. G., Gerin, J. L., & Houghton, M. (1988). A single antigenomic open reading frame of the hepatitis delta virus encodes the epitope(s) of both hepatitis delta antigen polypeptides p24 delta and p27 delta. *Journal of Virology*, *62*(2), 594–599. <https://doi.org/10.1128/jvi.62.2.594-599.1988>
- WHO Global Hepatitis Report. (2024). *Global Hepatitis Report 2024: Action for Access in Low- and Middle-Income Countries* (1st ed). World Health Organization.
- Wich, S. A., Utami Atmoko, S. S., Setia, T. M., & Van Schaik, C. P. (2008). *Orangutans*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199213276.001.0001>
- Yamaguchi, Y., Filipovska, J., Yano, K., Furuya, A., Inukai, N., Narita, T., Wada, T., Sugimoto, S., Konarska, M. M., & Handa, H. (2001). Stimulation of RNA Polymerase II Elongation by

- Hepatitis Delta Antigen. *Science*, 293(5527), 124–127.
<https://doi.org/10.1126/science.1057925>
- Yan, H., Peng, B., Liu, Y., Xu, G., He, W., Ren, B., Jing, Z., Sui, J., & Li, W. (2014). Viral Entry of Hepatitis B and D Viruses and Bile Salts Transportation Share Common Molecular Determinants on Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide. *Journal of Virology*, 88(6), 3273–3284. <https://doi.org/10.1128/JVI.03478-13>
- Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B., Wang, H., Fu, L., Song, M., Chen, P., Gao, W., Ren, B., Sun, Y., Cai, T., Feng, X., Sui, J., & Li, W. (2012). Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*, 1, e00049. <https://doi.org/10.7554/eLife.00049>
- Yang, T. T., Sinai, P., Kitts, P. A., & Kain, S. R. (1997). Quantification of gene expression with a secreted alkaline phosphatase reporter system. *BioTechniques*, 23(6), 1110–1114. <https://doi.org/10.2144/97236pf01>
- Yu, X., & Mertz, J. E. (1996). Promoters for synthesis of the pre-C and pregenomic mRNAs of human hepatitis B virus are genetically distinct and differentially regulated. *Journal of Virology*, 70(12), 8719–8726. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.12.8719-8726.1996>
- Yuh, C. H., Chang, Y. L., & Ting, L. P. (1992). Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus. *Journal of Virology*, 66(7), 4073–4084. <https://doi.org/10.1128/JVI.66.7.4073-4084.1992>
- Zhang, Z., Filzmayer, C., Ni, Y., Sülmann, H., Mutz, P., Hiet, M.-S., Vondran, F. W. R., Bartenschlager, R., & Urban, S. (2018). Hepatitis D virus replication is sensed by MDA5 and induces IFN- β / λ responses in hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 69(1), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.02.021>
- Zhao, M., Qin, T., & Huang, D. (2022). ACT001 inhibits the proliferation of non-small cell lung cancer cells by upregulating NKTR expression. *Thoracic Cancer*, 13(12), 1772–1782. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.14453>
- Zuckerman, A. J., Thornton, A., Howard, C. R., Tsiquaye, K. N., Jones, D. M., & Brambell, M. R. (1978). HEPATITIS B OUTBREAK AMONG CHIMPANZEES AT THE LONDON ZOO. *The Lancet*, 312(8091), 652–654. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(78\)92761-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(78)92761-7)
- Zunaid, I. R., Pacini, S., & Ruggiero, M. (2020). Significance of hydrophobic and charged sequence similarities in sodium-bile acid cotransporter and vitamin D-binding protein macrophage activating factor. <https://doi.org/10.1101/2020.03.03.975524>

Anhang

Von Dr. Pierre Khalfi verwendete sgRNAs zur Klonierung in lentiCRISPRv2 zum induzierten gezielten Gen-Knock-Out

Die hier untersuchten Gene wurden nach drei Kriterien ausgewählt: (1) Sie sind bei zuvor durchgeführten ChIRP-MS (*Comprehensive identification of RNA-binding proteins by mass spectrometry*) Untersuchungen detektiert worden. (2) Sie zeigten einen Phänotyp (Up- oder Down-Regulierung) in einem publizierten RNAi-Screening (Verrier et al., 2020). (3) Sie sind nicht essentiell für die Zellviabilität. Die hier verwendeten sgRNAs wurden der ‚Human KO Library‘ aus (Shalem et al., 2014) entnommen.

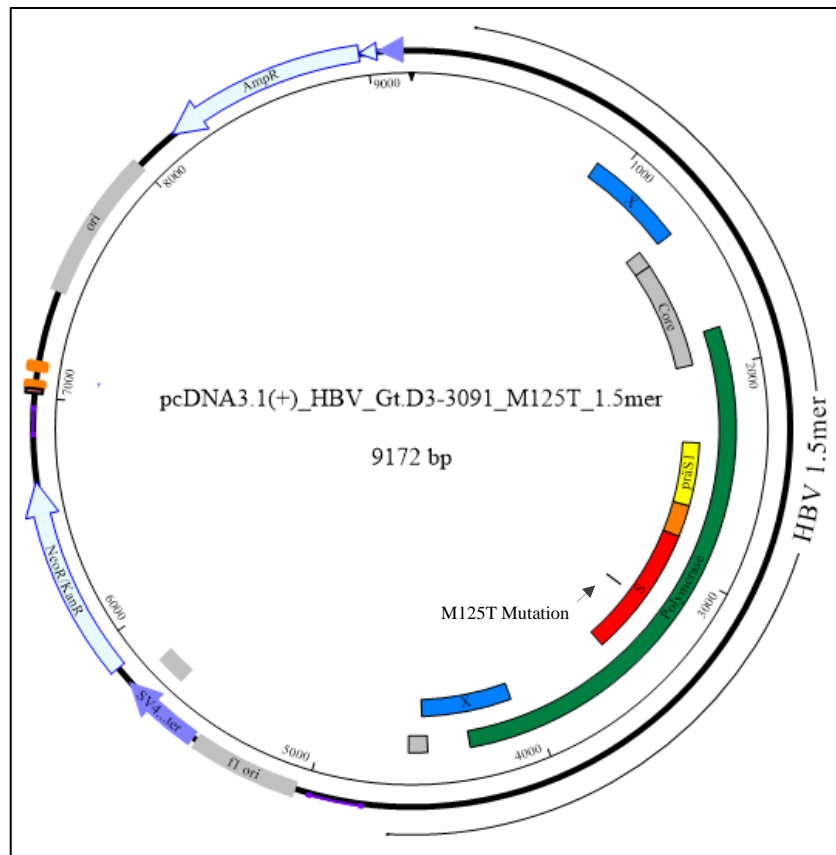
Zielgen	Sequenz Oligonukleotide 5' → 3'	
ACO1	CACCGCGCACACCTTGCTGAGCCAT CACCGATTTTCGATCAGAGTTCTTC	AAACATGGCTCAGCAAGGTGTGCGC AAACGAAGAACTCTGATCGAAAATC
ACSS2	CACCGCACATGTTGACTCCCCTTCC CACCGTCATGGGTGTGGCACCAGGA	AAACGGAAGGGGAGTCAACATGTGC AAACTCCTGGTGCCACACCCATGAC
ADAR-1 (Khalfi et al., 2024)	CACCGGACCGCGATTTTCCACAAA CACCGAATTGACATGGAAAGGCAGG	AAACCTTTGTGGAAAATCGCGGTCC AAACCTGCCTTTCCATGTCAATTC
AFF3	CACCGAACCAGATAGAAATGCATTA CACCGCTCCGTAATGCATTTCTATC	AAACTAATGCATTTCTATCTGGTTC AAACGATAGAAATGCATTACGGAGC
ARF5	CACCGCCGTGTCCGCGCTCTTTTCG CACCGAACACTCCACCTGAGTGTTT	AAACCGAAAAGAGCGCGGACACGGC AAACGAACACTCAGGTGGAGTGTTT
CHD4	CACCGGAGCGGAAGGGGATGGCGTC CACCGCATTGACCACGTGTTCTCAG	AAACGACGCCATCCCCTTCCGCTCC AAACCTGAGAACACGTGGTCAATGC
DDX1	CACCGTCACCTCCTCCTAAGATCAA CACCGGATTCAGCCTGGATATCAGT	AAACTTGATCTTAGGAGGAGGTGAC AAACACTGATATCCAGGCTGAATCC
DDX5	CACCGAGGTTTGGTGCACCTCGATT CACCGGCCCTACTTCCCTCAAATCG	AAACAATCGAGGTGCACCAAACCTC AAACCGATTTGGAGGAAGTAGGGCC
DNAJA2	CACCGGACCGCTGTAAAAAATGTGA CACCGCTTGAAGTCCACGTAGACAA	AAACTCACATTTTTTACAGCGGTCC AAACTTGTCTACGTGGACTTCAAGC
EDF1	CACCGAATTTTCTAGGCTATCTTAG CACCGCTAAGATAGCCTAGAAAATT	AAACACAGAGACGAGGAGAAGATGC AAACCATCTTCTCCTCGTCTCTGTC
FADS2	CACCGCCAGACTTACGTTCTTGCCG CACCGCCGCGCCTTCCACCTTGACC	AAACCGGCAAGGATCGTAAGTCTGGC AAACGGTCAGGAGTGGAAAGGCGCGGC
GPI	CACCGCTCTTGCGCCCGCTTTGC CACCGGGCAGAGCCCGGGATCAC	AAACGCAAAGCGGCGGCGCAAGAGC AAACGTGATCCCCGGGCTCTGCCCC
HDGF	CACCGGGGTCCCGAAAAAAGACT CACCGTAGCCGGAAGCCTTGACAGT	AAACAGTCTTTTTTTTCGGGACCCC AAACACTGTCAAGGCTTCCGGCTAC
HMGB1	CACCGAGATACTCACGGAGGCCTCT CACCGGAGATCCTAAGAAGCCGAG	AAACAGAGGCCTCCGTGAGTATCTC AAACCTCGGCTTCTTAGGATCTCCC
HSD17B11	CACCGTACCACAAAGGTATGAACCT CACCGTGCCAAGGTTACATACCTTTG	AAACAGGTTCATACTTTGTGGTAC AAACCAAAGGTATGAACCTTGGCAC
HSPA4	CACCGGCTCCAATTGAACGATTCTT CACCGTTTATACCTGTTAATCCTGT	AAACAAGAATCGTTCAATTGGAGCC AAACACAGGATTAACAGGTATAAAC
KHSRP	CACCGAGTGCTGTTATTCACTGTCTG CACCGCCTGGACTTACAGTCTCCCT	AAACCGACAGTGAATAACAGCACTC AAACAGGGAGACTGTAAGTCCAGGC
KPNA3	CACCGACATAGAAATGAAGTGACAG CACCGAACCTAGAAAGCTATATTGC	AAACCTGTCACTTCATTTCTATGTC AAACGCAATATAGCTTCTAGGGTTC
LSS	CACCGTGCAGGCTGAGGATGGGCAC CACCGGCTGTGGCCATCCCCTCCTG	AAACGTGCCCATCCTCAGCCTGCAC AAACCAGGAGGGGATGGCCACAGCC
MED16	CACCGGGCCGTACGGACGGTCCTC CACCGTCACGCAGGCGTCCGGCCCA	AAACGAGGACCGTCCGTGACGGCCC AAACTGGGCGGACGCCTGCGTGAC

MED24	CACCGTGCAGATGCGTTACTAGAGC	AAACGCTCTAGTAACGCATCTGCAC
	CACCGGAAGTATGCCATTAGTTCCC	AAACGGGAACTAATGGCATACTTCC
MOV10	CACCGGTCCGCTTGAAGGGAGTCAT	AAACATGACTCCCTTCAAGCGGACC
	CACCGCCTTCTGAACCCGACTCCCC	AAACGGGGAGTCGGGTTTCAAGAGGC
NANS	CACCGCGGGGAGCACAAACGACATC	AAACGATGTCGTTTGTGCTCCCCGC
	CACCGCGAGGTGTATGGCCTCTCCA	AAACTGGAGAGGCCATACACCTCGC
NCOR1	CACCGTCCCAACACCCGCCACCAGC	AAACGCTGGTGGCGGGTGTGGGAC
	CACCGAATGTATACTGGACAGAGTG	AAACCACTCTGTCCAGTATACATTC
NPM1	CACCGATGTCCATCGAATCTTCCAT	AAACATGGAAGATTTCGATGGACATC
	CACCGGCACCAGTTATCTTTAAGAA	AAACTTCTTAAAGATAACTGGTGCC
NXF1	CACCGTGGTCACTCACTATCGTACT	AAACAGTACGATAGTGAGTGACCAC
	CACCGTATTTCGGTCTTCCCGCCTTG	AAACCAAGGCGGGAAGACCGAATAC
PAK2	CACCGATGGTGTGCTCAAAATCAGA	AAACTCTGATTTTGAGCACACCATC
	CACCGTTTGAGCACACCATCCATGT	AAACACATGGATGGTGTGCTCAAAC
PAPOLA	CACCGAAGTACGCAGTCAGTCTCCT	AAACAGGAGACTGACTGCGTACTTC
	CACCGTGTGATCCCTGTGTTGTAAC	AAACGTTACAACACAGGGATCACAC
PARP1	CACCGTTCTAGTCGCCCATGTTTGA	AAACTCAAACATGGGCGACTAGAAC
	CACCGCCCCTTGCACGTACTTCTGT	AAACACAGAAGTACGTGCAAGGGGC
PPID	CACCGACGAAAATTTTCCGCAGTTT	AAACAAACTGCGGAAAATTTTCGTC
	CACCGAAAGGCATTGGACACACGAC	AAACGTCGTGTGTCCAATGCCTTTC
PRKDC	CACCGGGTTCAGGAGAAGACTCACA	AAACTGTGAGTCTTCTCCTGAACCC
	CACCGGTATGGCCCTGACGCGCAAG	AAACCTTGCGCGTCAGGGCCATACC
PTK6	CACCGACCCGCCTCGTCCAGCAGCG	AAACCGCTGCTGGACGAGGCGGGTC
	CACCGCGTGAAGACGTCCCCCGCG	AAACCGCGGGGGACGTCTTCCACGC
SUMO1	CACCGGTGTTCCAATGAATTCACTC	AAACGAGTGAATTCATTGGAACACC
	CACCGAGAAACCTGAGTGAATTCAT	AAACATGAATTCACTCAGGTTTCTC
TALDO1	CACCGCATCGACGAGTACAAGCCCC	AAACGGGGCTTGTACTCGTCGATGC
	CACCGACGGGTTGGTGGTAGCATCC	AAACGGATGCTACCACCAACCCGTC
TCEA3	CACCGAAGGGCTTGAGTGTTCAGAC	AAACGTCTGAACACTCAAGCCCTTC
	CACCGAACGAGAAGACCCAAAACC	AAACGGTTTTGGGGTCTTCTCGTTC
TOP2B	CACCGTGGGTGTATGATGAAGATGT	AAACACATCTTCATCATAACCCAC
	CACCGAGGGAGGTTACCTTTGTGCC	AAACGGCACAAAGGTAACCTCCCTC
UBB	CACCGGAGGGATGCCTTCTTTATCC	AAACGGATAAAGAAGGCATCCCTCC
	CACCGCGGCAAGACCATCACCCCTG	AAACCAAGGGTGATGGTCTTGCCGC
XPC	CACCGTGAGGTCATCCCCATCGCTG	AAACAGCGATGGGGATGACCTCAC
	CACCGGGACCATCTGCTGAACCCCC	AAACGGGGGTTTCAGCAGATGGTCCC
GFP	CACCGCTCGTGACCACCCTGACCTA	AAACTAGGTCAGGGTGGTTCAGGAGC
(sgRNA ctrl)		

N = ergänzte Nukleotide für die Restriktion mittels BsmBI

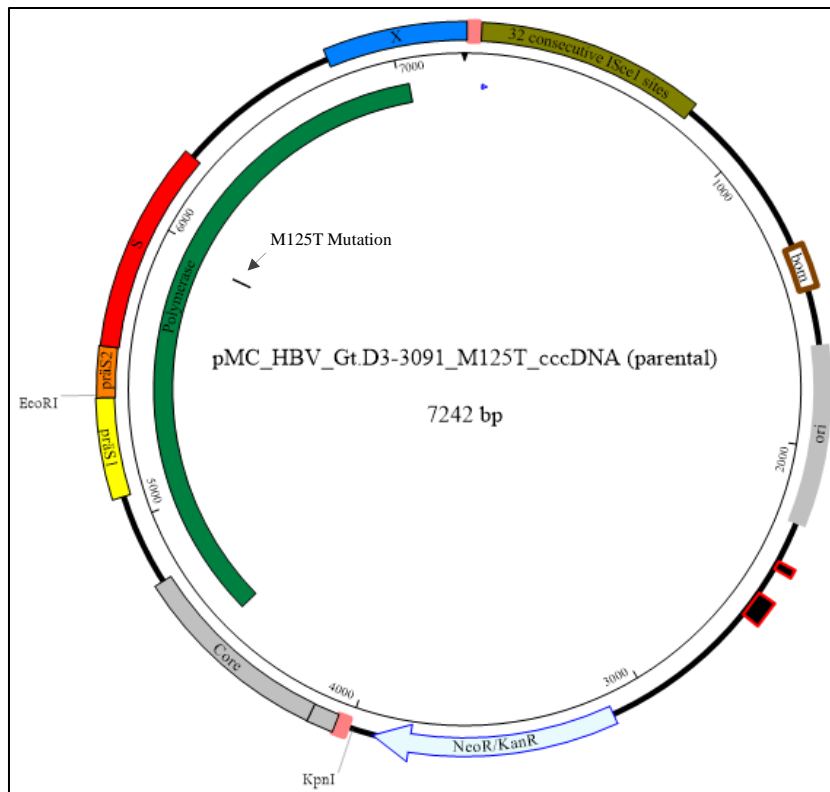
Schematische Plasmidkarte von pcDNA3.1(+)_HBV_Gt.D3-3091_M125T_1.5mer

Das Plasmid pcDNA3.1(+)_HBV_Gt.D3-3091_M125T_1.5mer wurde für diese Arbeit kloniert (siehe hierzu 3.4.6. Vektor-Klonierungen (FastCloning nach Li et al., 2011)).



Schematische Plasmidkarte von pMC_HBV_Gt.D3-3091_M125T_cccDNA (parental)

Das Plasmid pMC_HBV_Gt.D3-3091_M125T_cccDNA (parental) wurde für diese Arbeit kloniert (siehe hierzu 3.4.6. Vektor-Klonierungen (FastCloning nach Li et al., 2011)).



Eidesstattliche Selbstständigkeitserklärung

Die vorgelegte Dissertation habe ich selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Lena Soppa

Danksagung
