

Infektiosität von Hepatitis-B-Virus Genotyp F- und H-pseudotypisierten
Hepatitis-Delta-Viren und deren
Neutralisierbarkeit durch humane und tierische Impfsereen nach Hepatitis-B-Impfung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Lopez Pautz, Nadia Katharina
aus Kempen

Gießen 2026

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für medizinische Virologie

1. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Glebe
2. Gutachterin: Prof. Dr. Elke Roeb

Tag der Disputation: 30.04.2026

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Die Hepatitis als akute und chronische Erkrankung der Leber	1
1.2.	Das Hepatitis-B-Virus (HBV)	2
1.2.1.	Hintergrund und aktuelle Einordnung	2
1.2.2.	Taxonomie	2
1.2.3.	(Sub)-Genotypen und Serotypen des Hepatitis-B-Virus und deren Epidemiologie	3
1.2.4.	Die Genotypen F und H des Hepatitis-B-Virus	4
1.2.5.	Das Hepatitis-B-Virus-Genom	5
1.2.6.	Die Hepatitis-B-Virus Oberflächenproteine	7
1.2.7.	Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus	8
1.2.8.	Klinik	10
1.2.9.	Diagnostik	12
1.2.10.	Therapie und Prävention	15
1.2.11.	Präventive Immunisierung	15
1.3.	Das Hepatitis-Delta-Virus (HDV)	19
1.3.1.	Hintergrund des Hepatitis-Delta-Virus	19
1.3.2.	Morphologie des Hepatitis-Delta-Virus und Deltaantigen	20
1.3.3.	Replikation des Hepatitis-Delta-Virus	21
1.4.	Zielsetzung der Arbeit	25
2.	Material und Methoden	27
2.1.	Material	27
2.1.1.	Chemikalien, Puffer und kommerzielle Medien	27
2.1.2.	Antikörper	33
2.1.3.	Primer und Probe	35
2.1.4.	Marker	36
2.1.5.	Antibiotika	36
2.1.6.	Enzyme	36
2.1.7.	Kommerzielle Kits	37
2.1.8.	Plasmide	37
2.1.9.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	39
2.1.10.	Verwendete Zellen	41
2.2.	Methoden	43
2.2.1.	Produktion subviraler Partikel	43
2.2.2.	Transfektion zur Herstellung subviraler Partikel	46
2.2.3.	ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent-assay)	47
2.2.4.	Indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von intrazellulärem HBsAg	49
2.2.5.	Bestimmung des quantitativen HBsAg (qHBsAg)	50
2.2.6.	SEAP-Test	50
2.2.7.	Produktion von pseudotypisierten Hepatitis-Delta-Viren (psHDV)	50
2.2.8.	Infektion von HepG2-NTCP Zellen mit Hepatitis-Delta-Virus - Konzentraten	54
2.2.9.	Neutralisation der Hepatitis-Delta-Viren in HepG2-NTCP	55

3.	Ergebnisse	57
3.1.	Nachweis der amplifzierten Plasmid-DNA.....	57
3.2.	Produktion subviraler Partikel (SVP) in HepG2-Zellen und Nachweis von HBsAg.....	59
3.2.1.	Nachweis von HBsAg mittels diagnostisch zugelassenem ELISA.....	59
3.2.2.	Quantitativer Nachweis von HBsAg (qHBsAg) mittels Abbott-Architect	61
3.2.3.	Nachweis der drei Oberflächenproteine LHBs, MHBs und SHBs mittels in-house-Sandwich-ELISA.....	62
3.3.	Nachweis von intrazellulärem LHBs, MHBs und SHBs mittels indirekter Immunfluoreszenz in HepG2-Zellen.....	70
3.3.1.	Testung polyklonaler Antikörper (pAk).....	70
3.3.2.	Indirekte Immunfluoreszenz von HepG2-Zellen zum Nachweis von LHBs, MHBs und SHBs.....	72
3.4.	Produktion von Hepatitis-Delta-Viren mit definierten Hepatitis-B-Viren-Oberflächenproteinen	75
3.5.	Fluoreszenzmikroskopie der Infektion und Neutralisation von HepG2-NTCP-Zellen mit psHDV	77
4.	Diskussion	81
4.1.	Produktion subviraler Partikel und Nachweis von HBsAg mittels Enzygnost HBsAg 6.0 und qHBsAg	82
4.2.	Qualitativer Nachweis der Oberflächenproteine via In-house-Sandwich-ELISA.....	85
4.3.	Nachweis von intrazellulärem LHBs, MHBs und totalem HBsAg mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	91
4.3.1.	Bindungsfähigkeit der polyklonalen Antikörper im Sandwich-ELISA	91
4.3.2.	Indirekte Immunfluoreszenz von HepG2-Zellen zum Nachweis von intrazellulärem LHBs, MHBs und totalem HBsAg.....	92
4.4.	Erzeugung und Quantifizierung der psHDV	95
4.5.	Infektion und Neutralisation von HepG2-NTCP-Zellen mit pseudotypisierten Hepatitis-Delta-Viren	95
5.	Ausblick	103
6.	Zusammenfassung.....	105
7.	Abstract	106
8.	Abkürzungsverzeichnis	107
9.	Abbildungsverzeichnis	113
10.	Tabellenverzeichnis.....	114
11.	Literaturverzeichnis.....	115
12.	Anhang	127
13.	Ehrenwörtliche Erklärung	129
14.	Danksagung	130

1. Einleitung

1.1. Die Hepatitis als akute und chronische Erkrankung der Leber

Die Hepatitis beschreibt ein Symptom einer entzündlichen Lebererkrankung, welche mit mehreren phänotypischen Folgen assoziiert ist. Dazu zählt unter anderem eine Gelbfärbung (lat. Ikterus) der Skleren und der Haut, welche durch die Anhäufung der Abfallprodukte Bilirubin und Biliverdin im Blut des Patienten infolge einer Leberschädigung entsteht. Anamnestisch berichten betroffene Patienten von Übelkeit, Gewichts- und Appetitverlust, Fieber und Farbverlust des Stuhls (Herold, 2020).

Nicht selten gipfelt die Hepatitis über eine Leberzirrhose, einer Vernarbung und Fibrosierung des Leberparenchyms, in ein tumorös verändertes Parenchym, dem hepatozellulären Karzinom (HCC) (Aitiok et al., 2018).

Ein häufiger Auslöser einer Hepatitis sind Viren. Hierzu gehören auch die weltweit fünf bekanntesten Hepatitis-Viren (Hepatitis A-E) (Robert Koch-Institut, 2024a).

Man unterscheidet fäkal-oral übertragbare Viren, zu denen das Hepatitis-A-Virus (HAV) und das Hepatitis-E-Virus (HEV) gehören und deren Krankheitsverlauf zumeist selbstlimitierend ist, von denen, welche sexuell und über Blutkontakt übertragen werden. Hierzu zählen das Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV) und das Hepatitis-D-Virus (HDV). HDV stellt zudem als Satellitenvirus eine weitere Besonderheit dar. Dieses benötigt eine vorangegangene oder zeitgleiche Infektion mit HBV, damit es sich zusammen mit den Oberflächenproteinen des HBV vermehren kann. Für die akute HBV- bzw. HDV-Infektion existiert bisher keine medikamentös-kurative Therapie. Aufgrund mangelnder Immunkompetenz ist eine vollständige Viruselimination zudem oftmals nicht möglich, was nicht selten zu einer Chronifizierung der Infektion führt (Bartenschlager et al., 2019).

Während für HCV derzeit keine präventive, jedoch aber innerhalb der letzten Jahre eine vollständig heilende Therapie etabliert werden konnte, existiert seit 1971 eine schützende Impfung zur Prävention einer HBV-Infektion. Diese wird seit 1992 von der ständigen Impfkommission und der WHO als Standardimpfung der Bevölkerung empfohlen. (Robert Koch-Institut, 2024b).

1.2. Das Hepatitis-B-Virus (HBV)

1.2.1. Hintergrund und aktuelle Einordnung

Die HBV-Infektion stellt noch immer eine der größten globalen Gesundheitsprobleme dar. Weltweit sind mehr als 254 Millionen Menschen an chronischer Hepatitis B erkrankt (World Health Organization, 2024). Im Jahr 2022 sind schätzungsweise 1,1 Millionen Menschen an den Folgen einer HBV-Infektion verstorben (World Health Organization, 2024). In Deutschland stieg die Fallzahl an gemeldeten HBV-Infektionen im Jahr 2023 im Vergleich zum Vorjahr (2022) um 36% an (Robert Koch-Institut, 2024a). Dieser Anstieg betraf sowohl die Anzahl der akuten Infektionen als auch der chronischen und die der unbekanntenen Infektionsstadien.

2020 wurde die weltweite Impfquote der Neugeborenen mit drei empfohlenen Dosen auf 90 % geschätzt (World Health Organization, 2024).

Trotz der hohen Impfquote, wird jedoch bei einzelnen Personen auch ein ausbleibender Impferfolg beschrieben, welcher von verschiedenen Faktoren, wie dem Alter oder der individuellen Beschaffenheit des Immunsystems der Patienten abhängig zu sein scheint. Nicht selten werden empfohlene Impftiter nicht erreicht. Man spricht hier von sogenannten Non-Respondern, welche trotz vorhandenem Impfstatus oftmals durch impfstofffremde HBV-Genotypen infiziert werden können (Kato et al., 2017).

1.2.2. Taxonomie

Das HBV, welches die Hepatitis B Erkrankung auslöst, ist ein umhülltes DNA-Virus und gehört zu der Familie der *Hepadnaviridae*. Die Hepadnaviren können in die zwei Gattungen der *Avihepadnaviren* bei Vögeln und der *Orthohepadnaviren* bei Säugetieren, wozu auch das humane HBV zählt, unterteilt werden (Littlejohn et al., 2016). Ferner bestehen noch drei weitere Gattungen bei Amphibien (*Herpetohepadnaviridae*) und Fischen (*Metahepadnaviridae*, *Parahepadnaviridae*) (Suh et al., 2014).

1.2.3. (Sub)-Genotypen und Serotypen des Hepatitis-B-Virus und deren Epidemiologie

Zurzeit sind zehn Genotypen (A-J) des HBV bekannt (Lin & Kao, 2017). Diese unterscheiden sich im gesamten Genom um mehr als 8% in ihrer Nukleotidsequenz (Sozzi et al., 2018). Dies ist auf das Fehlen von Korrekturmaßnahmen für spontane Fehler der reversen Transkriptase und somit der langfristigen Entwicklung der unterschiedlichen Genotypen und Subgenotypen zurückzuführen. Die unterschiedlichen Genotypen (Gt) besitzen klinische und epidemiologische Relevanz (Lin & Kao, 2017). Vor der Einteilung in unterschiedliche Genotypen erfolgte die Klassifizierung des humanen HBV anhand der sogenannten *a*-Determinante (antigen-Determinante). Diese Determinante stellt einen Sequenzbereich der HBV-Oberflächenproteine dar, gegen den ein Großteil der anti-HBs-Antikörper gerichtet ist. Es werden vier Hauptserotypen beschrieben: *adw*, *adr*, *ayr* und *ayw*, welche zusätzlich in Subserotypen unterteilt werden können. Die erste Position beschreibt die *a*-Determinante. Die letzten beiden Positionen beziehen sich auf bestimmte Aminosäurevariationen im Antigenloop (Cooreman et al., 2001).

In Europa und Afrika sind die Genotypen A und D stark verbreitet. Subgenotyp A1 kommt sowohl in Afrika als auch in Indien vor. Die Genotypen C und B kommen gehäuft in asiatischen und südpazifischen Gebieten vor. Der Genotyp E beschränkt sich auf Zentral- und Westafrika. Der Subgenotyp I1 ist in Laos, Vietnam und China vorherrschend, wobei Subgenotyp I2 auch in Indien vorkommt (Kramvis, 2014). Der Genotyp J ist bisher lediglich als ein Isolat aufzufinden und wurde als Rekombinante bei einem achtundachtzig jährigen Japaner entdeckt (Tatematsu et al., 2009). Genotyp H und F kommen vor allem in Südamerika vor, wobei Genotyp G auch in Deutschland, Italien, Frankreich und Großbritannien verbreitet ist (Kramvis, 2014).

Die Genotypen C, D und F werden als Genotypen mit besonders hoher Pathogenität beschrieben (S. Li et al., 2017). Auch in der Art der Übertragung unterscheiden sich die Genotypen untereinander. Während die Genotypen A, B, D und F vermutlich maßgeblich horizontal übertragen werden, wird für den Genotypen C eine gehäuft vertikale Übertragung vermutet (S. Li et al., 2017; Livingston et al., 2007).

Von den unterschiedlichen Genotypen A-D, F und I sind zudem noch unterschiedliche Subgenotypen bekannt, die sich in ihrer Nukleotidsequenz innerhalb der Genotypen zwischen 4% und 7,8% unterscheiden. Auch hier liegt aller Vermutung nach eine ortsspezifische-Verteilung vor (Lin & Kao, 2017). So findet man im mittleren Osten und

in Zentralasien vorwiegend den Subgenotypen D1. Der Subgenotyp D2 ist vor allem in Europa, Japan und im Libanon verbreitet. Der Subgenotyp D3 ist weltweit vorherrschend (Kramvis, 2014). In Afrika findet sich der Subgenotyp A1 wieder, wohingegen in den USA und Europa A2 vorherrscht.

Die unterschiedlichen Subgenotypen, wie auch die Genotypen, zeigen diverse Unterschiede in Pathogenität, Übertragungsweg, HCC-Inzidenz und in der Ansprache auf die antivirale Therapie. Neben dem horizontalen Übertragungsweg, welcher die direkte oder indirekte Übertragung über Blut oder sexuellen Kontakt beschreibt, wird auch die vertikale Übertragung beschrieben. Welcher Infektionsweg häufiger oder wahrscheinlicher vorkommt, korreliert einerseits mit der Art der Genotypen und andererseits mit der HBV-Inzidenz in den einzelnen Gebieten (Li et al., 2017).

Ferner ist die vertikale Übertragung auch abhängig von der Viruslast der Mutter und der Art der Übertragung (Glebe & Bremer, 2013). Das Phänomen des vertikalen Weges wird eher in Hoch-Endemie-Gebieten beschrieben, wobei niedrig endemische Gebiete eher eine horizontale Übertragung des HBV aufweisen (Li et al., 2017).

1.2.4. Die Genotypen F und H des Hepatitis-B-Virus

Die Genotypen F und H sind in Süd- und Zentralamerika vorherrschend, wobei Genotyp H besonders in Mexiko präsent ist (Arauz-Ruiz et al., 2002). Phylogenetisch betrachtet, haben sich Genotyp F und H sehr früh von den anderen Genotypen abgetrennt. Sie sind phylogenetisch am weitesten vom Subgenotyp A2, welcher als Grundlage des weltweiten Impfstoffs dient, entfernt (Arauz-Ruiz et al., 2002).

Zusätzlich unterscheiden sich die beiden Genotypen F und H hinsichtlich ihrer antigenen Determinanten mit dem Serotyp *adw4* zum Genotyp A2 mit Serotyp *adw2*. Eine mögliche Infektionsgefahr mit dem Genotyp H und F trotz bestehendem Impfschutz, scheint nicht ausgeschlossen (Schlabe et al., 2018). Der Genotyp F wird derzeit in vier unterschiedliche Subgenotypen unterteilt. Ein fünfter Subgenotyp ist noch nicht anerkannt (Martínez et al., 2014).

Der Verlauf einer HBV-Infektion des Genotyps F wird als besonders kritisch beschrieben, da eine Infektion zumeist mit einem fulminanten Leberschaden einhergeht und mit einer etwa achtfach höheren Progression zum HCC vergesellschaftet ist. Außerdem ist die HBV-Infektion des Genotyps F mit HBeAg-Positivität assoziiert,

welche mit einer erhöhten Sterblichkeit aufgrund von Leberversagen einhergeht (Marciano et al., 2013).

Der Genotyp H wiederum ist mit einer geringen Inzidenz von HCC assoziiert (Roman et al., 2010). Die Patienten mit einer akuten als auch chronischen Genotyp-H-Infektion zeigen typischerweise einen asymptomatischen Verlauf, ohne eine klinisch oder laborspezifische Leberschädigung (Ruiz-Tachiquín et al., 2007). Bis heute zeigt sich eine niedrige Prävalenz für die Entstehung des HCC in Mexiko (Vivas-Arceo, 1999). Eine Infektion mit HBV-Genotyp H wird vor allem im Erwachsenenalter durchlaufen und horizontal durch sexuellen Kontakt oder Bluttransfusionen übertragen, weshalb eine Chronifizierung seltener auftritt (1.2.8.2) (Panduro et al., 2011).

1.2.5. Das Hepatitis-B-Virus-Genom

Das HBV besitzt eine partiell doppelsträngige DNA mit einem unvollständigen, komplementären Positivstrang und einem durchgängigen Negativstrang. Der Negativstrang entspricht dem codogenen Strang und besitzt am 5'-Ende eine viruseigene Polymerase. Die Länge des Negativstrangs variiert je nach Genotyp zwischen 3,0 und 3,4 kb (Glebe & Bremer, 2013). Der Positivstrang ist nur partiell vorhanden und deckt circa 50-70% der Länge des Negativstrangs ab (Lazarevic, 2014).

Da die zirkuläre DNA an ihren Enden nicht kovalent geschlossen ist, sondern eine kohäsive Überlappung von 240 Basen am 5'-Ende der Stränge enthält, wird von der relaxed circular DNA (rcDNA) gesprochen. In dieser Form liegt die DNA im Virus vor, bis sie den Zellkern einer Leberzelle erreicht und dort als cccDNA (kovalent geschlossene, zirkuläre HBV-DNA) verbleibt. Eine schematische Darstellung der HBV-cccDNA, sowie der codierenden und regulatorischen Bereiche ist in Abbildung 1 dargestellt.

Das Genom des HBV besitzt vier offene Leserahmen („Open Reading Frames“; ORF). Es werden fünf mRNAs für sieben Proteine durch die ORF codiert. Jede dieser mRNAs verfügt über ein 5'-Cap und einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende. Neben dem ORF der Oberflächenproteine (Surface; S-ORF), gibt es den ORF des Protein P (P-ORF). Dieser codiert für die viruseigene Polymerase P, welche drei funktionelle Einheiten besitzt. Dazu gehört die Funktion der RNase H, einer reversen Transkriptase mit RNA/DNA-

abhängiger DNA-Polymeraseaktivität und einer terminalen Protein-Priming-Domäne. Durch das Fehlen einer „proofreading“- Domäne ist die HBV-Mutationsrate, im Gegensatz zu anderen DNA-Viren, um das Zehnfache erhöht (Pollicino et al., 2014). Der ORF des Protein X (X-ORF) exprimiert als Endprodukt das HBx, dessen Funktion zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt ist (Glebe & Bremer, 2013). Es wird angenommen, dass es als multifunktionaler Regulator der Transkription einen Einfluss auf die HCC-Entstehung und den Zelluntergang nimmt (W. Li, 2015; Seeger & Mason, 2015). Das HBcAg und HBeAg wird von dem PräC/C-ORF codiert. Das HBcAg ist strukturbildend für das Kapsid und wird vom Core-Abschnitt des ORF exprimiert. Es ist für die Replikation unabdingbar, indem es Protein P und die prägenomische RNA (pgRNA) über ein Verpackungssignal der pgRNA umhüllt. Außerdem wird die mRNA des HBcAg als Matrize für die reverse Transkriptase verwendet. Das nicht essenzielle HBeAg wird bei vollständiger Expression des ORF synthetisiert und anders als das HBcAg, ins Blut sekretiert. HBcAg ist daher in den Leberzellen und bei Leberzellzerfall im Blut nachweisbar. Jeder ORF wird zu Beginn von einem Promotor markiert. Der S-ORF der Oberflächenproteine besitzt zwei getrennte Promotoren. Der PräC/C-ORF besitzt als gemeinsamen Promotor den basalen Core-Promotor (Glebe & Bremer, 2013; Kramvis & Kew, 2005).

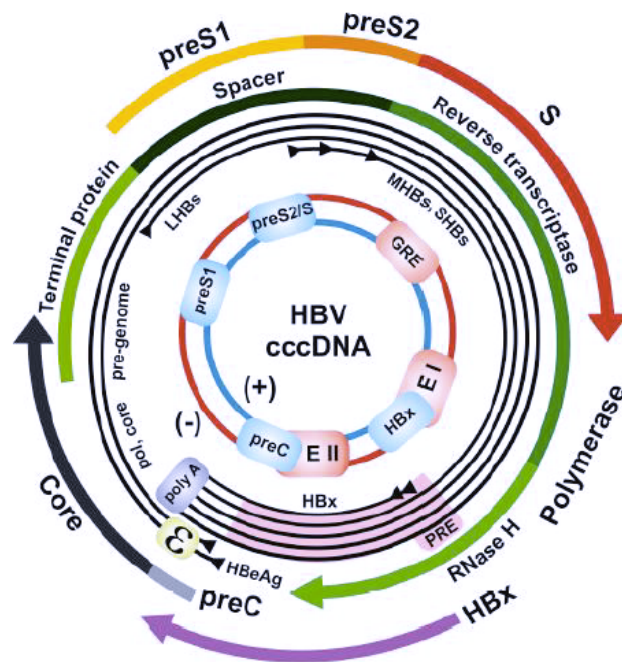


Abbildung 1 : Schematische Darstellung der HBV cccDNA mit codierenden und regulatorischen Bereichen. Darstellung des HBV-Genoms als cccDNA mit vier ORF und den entsprechenden mRNAs. Die Kennzeichnung der jeweiligen Startcodons der unterschiedlichen ORFs, des glucocorticoid response

elements (GRE), als auch der beiden Enhancer EI und EII sind als blaue bzw. rosafarbene Boxen in der zentral liegenden, doppelsträngigen cccDNA gekennzeichnet. Als darum liegende, schwarze Kreise sind die daraus resultierenden Transkripte gezeigt. Diese haben ein gemeinsames Polyadenylierungssignal (graue Box), sowie ein mit rosa hinterlegtes, posttranskriptionelles, regulatorisches Element (PRE). Die von der prägenomischen mRNA codierte virale Polymerase ist in grün-schwarz und das Core-Protein in schwarz dargestellt. Die längste mRNA codiert für das HBeAg und ist in grauschwarz gezeigt. Außen sind die drei unterschiedlichen, subgenomischen mRNAs gezeigt, welche für die Oberflächenproteine LHBs, MHBs und SHBs (gelb, orange, rot) codieren. Das X-Protein ist in violett dargestellt. (aus Glebe, D und Bremer, C.M; 2013)

1.2.6. Die Hepatitis-B-Virus Oberflächenproteine

Das Virion des HBV besitzt einen Durchmesser von 52 nm und ein ikosaedrisches Kapsid, welches von den drei HBV Hüllproteinen und Lipiden umgeben ist (Glebe & Bremer, 2013; Venkatakrishnan & Zlotnick, 2016). Ein schematischer Aufbau der HBV-Oberflächenproteine ist in Abbildung 2 gezeigt.

Die HBV-Hüllproteine sind als Transmembranproteine in die Lipidmembran des Virus integriert. Diese werden aus nur einem einzigen ORF kodiert, jedoch von zwei unterschiedlich langen mRNAs translatiert. Aus der längeren, etwa 2,4 kb großen mRNA wird das große Oberflächenprotein (eng. Large HBs; LHBs) übersetzt. Die 2,1 kb mRNA übersetzt das MHBs und das SHBs (engl.: middle- bzw. small HBs).

Alle Oberflächenproteine besitzen C-terminal die gleichen 226 Aminosäuren (AS). Diese bilden die S-Domäne bzw. das SHBs. Das SHBs besitzt vier Transmembrandomänen (TMD 1-4), welche sich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) assemblieren. Zwischen der TMD 2 und dem hydrophoben C-Terminus von AS 101-171 befindet sich der Antigenloop (AGL), welcher das Hauptziel neutralisierender Antikörper darstellt (Salisse & Sureau, 2009). Der AGL erlangt seine Stabilität über intramolekulare Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten des AGL und ist neben der PräS1-Domäne wichtig für den Eintritt des Virus in die Leberzelle (Salisse & Sureau, 2009).

Das MHBs enthält N-terminal des SHBs 55 AS, welche die PräS2-Domäne bilden. Die Funktion dieser ist noch nicht vollends geklärt (Glebe & Bremer, 2013).

Das große Oberflächenprotein LHBs besitzt N-terminal neben der PräS2-Domäne noch die PräS1-Domäne. Diese ist, zusammen mit den ersten fünf AS der PräS2-Domäne, wichtig für die Kapsidbindung und Reifung des HBV. Außerdem ist die PräS1-Domäne durch Interaktion mit dem Gallensäuretransporter NTCP (Na⁺/taurocholotransporting-polypeptide) entscheidend für die Interaktion und den Eintritt des Virus in die Zelle (Glebe & Bremer, 2013).

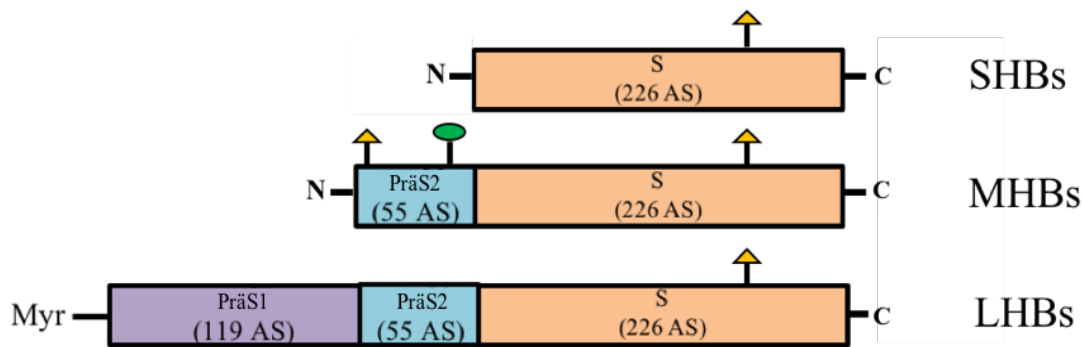


Abbildung 2 : Schematische Darstellung des Aufbaus der HBV- Oberflächenproteine. Gezeigt sind die drei Oberflächenproteine des HBV, LHBs, MHBs und SHBs mit den wichtigsten Modifikationen. Alle HBsAg weisen den gleichen C-terminalen Bereich von 226 AS (orange) mit einer N-glykosidischen Modifikation (gelbes Dreieck) an Stelle 146 auf. Das MHBs besitzt zusätzlich eine 55 AS N-terminal befindliche PräS2-Domäne (blau), welche ebenfalls an Stelle 4 des präS2-Domäne N-glykosyliert ist. Zusätzlich besitzt die präS2 Domäne eine o-glykosidische Modifikation (grüner Kreis) an Stelle 37. LHBs besitzt zudem noch die präS1-Domäne (violett). In der Abbildung 2 ist beispielhaft die präS1-Domäne des HBV-Subgenotypen A2 gezeigt. Das LHBs ist N-terminal myristoyliert (Myr).

1.2.7. Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus

In Abbildung 3 ist der schematische Ablauf der Replikation des HBV zu sehen. Für den Eintritt des HBV bindet das Virus zunächst unspezifisch über eine positive Ladung im AGL an den negativ geladenen Glykosaminoglykanen (GAGs) bzw. Heparansulfaten der Hepatozytenoberfläche (Saliße & Sureau, 2009). Die dadurch entstandene Annäherung des Virus ermöglicht nun der PräS1-Domäne und deren Myristoylierung spezifisch an einen Rezeptor, den NTCP, zu binden und gelangt vermutlich via Endozytose in das Zellinnere (Glebe & Bremer, 2013). Der NTCP ist ein natriumabhängiger Gallensäuretransporter und befindet sich auf der basolateralen Seite der Hepatozyten im Disséraum der Leber. Nach Eintritt in die Zelle streift das Virus seine Oberflächenproteine ab und das Kapsid gelangt anschließend an den Nukleus. Über ein Kernporenprotein gelangt die relaxed circular DNA (rcDNA) des viralen Genoms in den Zellkern. Im Zellkern wird dann rcDNA in covalently-closed-circular DNA (cccDNA) umgewandelt und wirkt als episomales Minichromosom (Glebe & Bremer, 2013). Die cccDNA wird anschließend als Matrize von der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II der Wirtszelle genutzt, um virale mRNA zu synthetisieren. Die so entstandene mRNA wird für die Translation der Oberflächenproteine aus dem Kern zum ER transportiert.

Außerdem dient die prägenomische RNA (pgRNA) als Matrize für die virale Polymerase und Core-Proteine, welche gemeinsam mit der pgRNA unreife Core-Partikel bilden. Die virale Polymerase bindet hierfür an eine RNA-Sekundärstruktur der pgRNA, genannt Epsilon (ϵ), wodurch die Replikation startet. Die pgRNA wird umhüllt, über reverse Transkription in rcDNA umgeschrieben und anschließend als „reifes“ Core Partikel bezeichnet. Die Partikel können anschließend mit Oberflächenproteinen ummantelt werden und aus der Zelle austreten.

Neben den so entstandenen Virionen werden auch circa 20 nm große sphärische und filamentöse Strukturen gebildet, welche als subvirale Partikel bezeichnet werden. Diese bestehen ausschließlich aus HBsAg und benötigen zur Assemblierung lediglich die S-Domäne. Die subviralen Partikel werden als nichtinfektiöse Produkte aus der Zelle ausgeschleust.

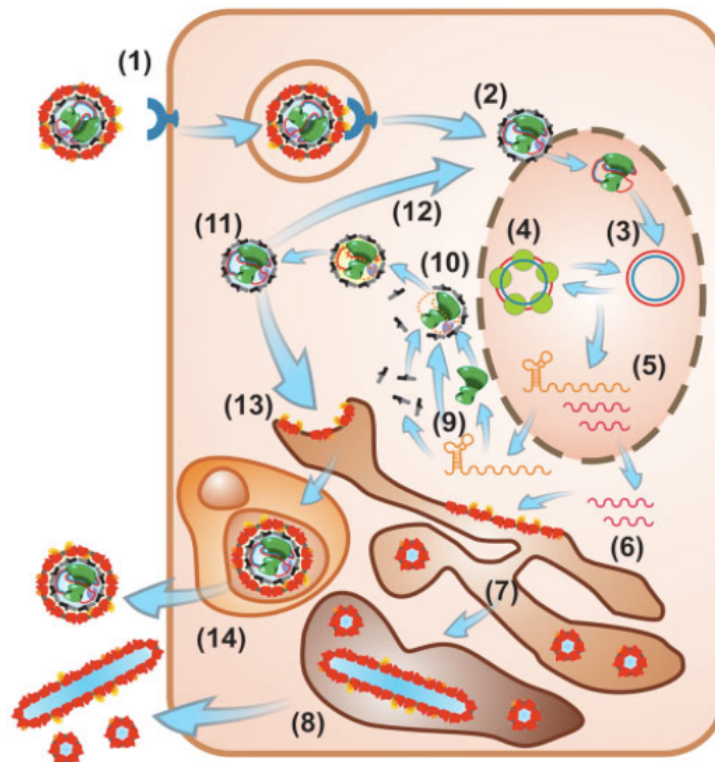


Abbildung 3: Replikationszyklus HBV (1) Als negativ geladene Annäherungsstelle dienen die Heparansulfatproteoglykane (HSPG), welche den eigentlichen Eintritt des Virus über den NTCP (blau dargestellt) erleichtern. (2) Via Endozytose wird das Virus nach dem Abstreifen der Oberflächenproteine über Mikrotubuli-Filamente zum Nukleus transportiert. (3) Die rcDNA wird in cccDNA umgewandelt und (4) durch Bindung von Histonen und Nicht-Histonproteinen zu einem episomalen Komplex ergänzt. (5) Es folgt die Transkription der cccDNA und die Synthese der pgRNA (prägenomische RNA) und sgRNA (subgenomische RNA). (6) Zwei sgRNAs werden als Matrize für die Oberflächenproteine verwendet. Eine weitere dient als Matrize für das HBx (nicht dargestellt). Die Oberflächenproteine werden aufgrund von Überproduktion zu subviralen Partikeln über das Trans-Golgi-System (7,8) in das Blut sezerniert. (9) Aus der pgRNA werden die Polymerase und die Core-Proteine translatiert. (10) Es folgt die Assemblierung der Polymerase und der Core-Proteine zu unreifen Core-Partikeln, welche durch die Aktivität der reversen Transkriptase (11) zu Core-Partikeln reifen. (12) Die reifen Core-Partikel werden entweder zurück zum

Kern befördert, wodurch es zu einer Anreicherung der cccDNA innerhalb der Zelle kommt, oder (13) am ER mit Oberflächenproteinen umhüllt und (14) als Virion in die Lebersinusoiden sekretiert. (aus Glebe & Bremer, 2013)

1.2.8. Klinik

Das HBV besitzt eine Inkubationszeit von ein bis sechs Monaten. Der klinische Verlauf der Krankheit ist je nach Alter und Gesundheitszustand des Patienten unterschiedlich ausgeprägt. Im Allgemeinen wird der Krankheitsverlauf der HBV-Infektion in einen akuten und einen chronischen Verlauf unterteilt.

1.2.8.1. Akute Hepatitis-B-Virus-Infektion

Circa zwei Drittel der akuten HBV-Infektionen verlaufen asymptomatisch. In einem Drittel der Fälle kommt es zur akuten Hepatitis mit einem meist ikterischen Hautkolorit. Die akute HBV-Infektion äußert sich mit grippaler Symptomatik, Oberbauchschmerzen, Appetitlosigkeit, sowie Druckgefühl unter dem rechten Rippenbogen. Histologisch zeigen sich bei der akuten HBV-Infektion Brückennekrosen und eosinophile Einzelzellnekrosen, welche auch Councilman-Nekrosen genannt werden (Ahtiok et al., 2018). Nach circa drei bis sechs Wochen sind die Symptome rückläufig. Insgesamt kommt es bei über 90% der immungesunden Erwachsenen zu einer vollständigen Ausheilung der akuten HBV-Infektion. Bei Kindern besteht eine Altersabhängigkeit der Chronifizierungsrate zum Infektionszeitpunkt. Im 1. Lebensjahr beträgt diese nahezu 90%. Die Chronifizierungsrate reduziert sich im Kleinkindalter auf 40-60% und im Vorschulalter auf 20-30% (Wirth, 2019). Im Schulkindalter ist die Chronifizierungsrate annähernd jener der Erwachsenen (Wirth, 2019). Die Ausheilung ist darüber definiert, dass mittels gängiger Methoden keine Virusbestandteile mehr im Blut nachweisbar sind (Ahtiok et al., 2018).

1.2.8.2. Chronische Hepatitis-B-Virus-Infektion

Besteht die HBV-Infektion mit positivem Serum-HBsAg länger als sechs Monate, so wird diese als chronische HBV-Infektion bezeichnet.

Zu den oben genannten, akuten Symptomen zeigen sich hier bei 10-20% der Patienten zusätzlich extrahepatische Symptome. Dazu zählen neben vaskulären Veränderungen wie

Panarteriitis nodosa und dem Raynaud-Syndrom, auch die membranöse Glomerulonephritis, Neuritiden und Hautveränderungen (Ahtiok et al., 2018).

Die entzündlichen Prozesse, welche vor allem im Leberparenchym fortschreiten, führen nicht selten zu einer Leberzirrhose. Für das HCC ist in Europa in 50% der Fälle die chronische Virushepatitis ursächlich (Ahtiok et al., 2018).

Histologisch zeigen sich lymphohistiozytäre, periportale Infiltrate, Mottenfraßnekrosen und insbesondere bei der HBV-Infektion, Milchglashepatozyten, welche sich durch ein aufgetriebenes, transparentes Zytoplasma von gesunden Hepatozyten unterscheiden. Milchglashepatozyten entstehen durch eine Hyperplasie des endoplasmatischen Retikulums (ER), welche durch die Produktion von HBsAg bedingt ist (Ahtiok et al., 2018).

Sind histologisch keine entzündlichen Prozesse an der Leber nachweisbar, so spricht man von einem „gesunden HBV-Träger“. Bei perinataler (vertikaler) Übertragung des HBV besteht im Vergleich zum horizontalem Übertragungsweg im späten Jugend- bzw. Erwachsenenalter, ein vielfach erhöhtes Risiko einen chronischen Verlauf der HBV-Infektion zu entwickeln. Bei perinataler Infektion im Säuglingsalter zeigt sich in circa 90% der Fälle ein chronischer Verlauf (Marciano et al., 2013). Es wird vermutet, dass dies auf der fehlenden Effektivität des angeborenen Immunsystems zur Elimination des Virus beruht. Zusätzlich erhöht eine Serumpositivität des HBeAg der Mutter, aufgrund seiner Plazentagängigkeit, die Wahrscheinlichkeit einer vertikalen Übertragung (Borgia, 2012; Milich, 2019).

Des Weiteren besteht eine 30-90% höhere Chronifizierungsrate bei infizierten, immunsupprimierten Erwachsenen (Milich, 2019).

Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung der messbaren HBV-Marker im Serum.

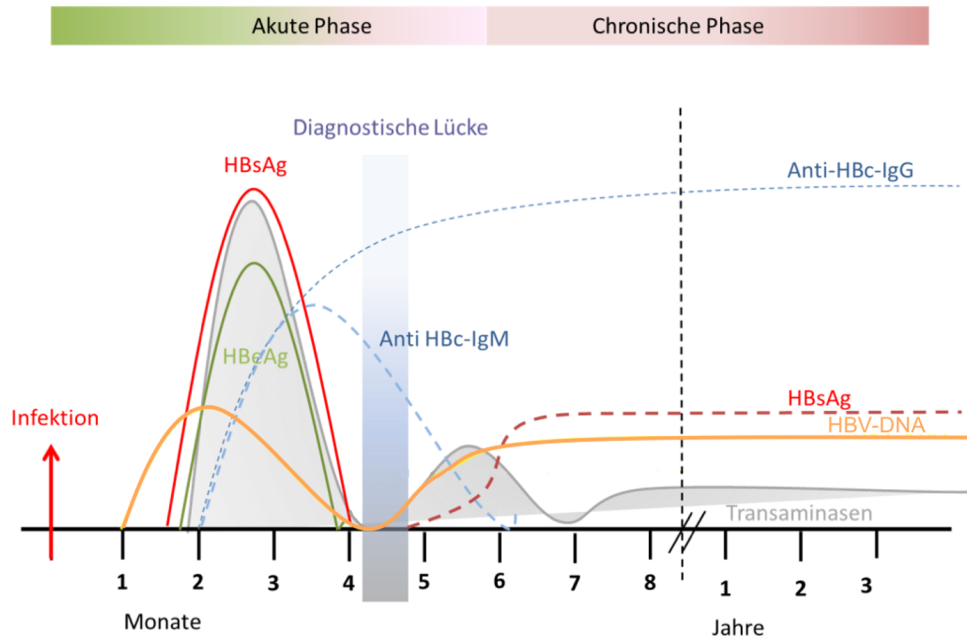


Abbildung 4: Serumverlauf der akuten und chronischen HBV-Infektion. Gezeigt ist ein Verlauf der serologischen HBV-Marker, auf der X-Achse die Zeit in Monaten bzw. Jahren. Das HBV-Screening beinhaltet, als Suchtest in erster Linie das HBsAg (rote Linie), welches etwas versetzt zur HBV-DNA (orange Linie) als erster Parameter ansteigt und einen Nachweis der produzierten und ins Blut abgegebenen Virionen darstellt. Kommt es zu Leberschädigungen, steigen die Transaminasen an (grau hinterlegt). Ihr Peak tritt vermehrt in der akuten Phase (grün/roter Verlauf) auf. Die Menge an HBeAg (grüne Linie) korreliert mit der Replikationsrate des HBV und gilt als Maß für die Infektiosität. Einen weiteren Nachweis der akuten HBV-Infektion stellt das Anti-HBc-IgM dar, welches auch mehrere Monate positiv erscheinen kann und auch im Rahmen der diagnostischen Lücke zur Detektion einer Infektion hilfreich sein kann. Die diagnostische Lücke (blau hinterlegt) von circa einem Monat, kann durch einen Abfall des HBsAg im Serum entstehen. Dies kann für die Ausheilung einer akuten HBV-Infektion sprechen. Nach 6 Monaten und weiterhin positiven Seromarkern, wie anhaltende Nachweisbarkeit von HBsAg (rot-gestrichelt) und weiterhin positiver HBV-DNA (orange), sowie positiven Anti-HBc-IgG (blau-gestrichelt), wird von der chronischen Phase gesprochen (rot hinterlegt).

1.2.9. Diagnostik

Neben den laborchemisch messbaren Parametern, wie Transaminasenaktivität und Gerinnungsmarkern, werden für den Nachweis einer HBV- Infektion virusserologische (quantitatives HBsAg, Anti-HBs, HBeAg und Anti-HBe) und molekularvirologische (HBV-DNA) Tests durchgeführt. Anhand der Marker-Konstellation im Serum, kann zwischen Impfstatus, einer vorangegangenen, ausgeheilten Infektion oder einer noch bestehenden Infektion unterschieden werden.

Die Indikation zum Screening von spezifischen HBV-Parametern sollten bei dem Verdacht auf Zeichen einer Hepatitis, bei Risikofaktoren für einen schweren Verlauf oder auch bei hohem Expositionsrisiko erfolgen (Cornberg et al., 2021).

Das Screening basiert auf der Bestimmung des HBsAg und des Anti-HBc. Sind beide Werte positiv, so kann von einer Infektion ausgegangen werden. Die Einordnung in die Verlaufsformen der HBV-Infektion erfolgt anhand der Bestimmung der Virusantigene, der Antikörper und dem Nachweis der Virus-DNA. Für den Suchtest einer aktiven HBV-Infektion dient das HBsAg. Dieses ist in der Regel nach zwei bis fünf Monaten im Serum nachweisbar. Anti-HBc-IgM ist ein Marker für die akute Infektion, der allerdings auch längere Zeit positiv bleiben kann, wobei HBsAg und Anti-HBs im Verlauf der Ausheilung auch zeitgleich negativ vorgefunden werden können. In dem Fall, dass HBsAg fehlt, obwohl HBV-DNA nachzuweisen ist, spricht man von einer okkulten HBV-Infektion. Der Nachweis des HBsAg fehlt zumeist, weil es in nicht ausreichender Menge gebildet wird, oder in Phasen der diagnostischen Lücke getestet wurde (Robert Koch-Institut, 2024b).

Die akute HBV-Infektion ist wie zuvor bereits beschrieben, durch einen zeitlich definierten Verlauf von maximal sechs Monaten bis zur vollständigen Ausheilung gekennzeichnet. Laborchemisch zeigt sich hier, neben einer Transaminasenerhöhung in 90% der Fälle, zusätzlich ein positives HBsAg und in der Regel ein positives Anti-HBc-IgM.

Die Ausheilung ist über den Nachweis von Anti-HBc und Anti-HBs mit Titern von >10 mIU/ml definiert (Cornberg et al., 2021). Im Unterschied zur Impfung, ist bei der Ausheilung Anti-HBc immer positiv. Serologisch sind HBsAg und HBV-DNA nicht mehr nachweisbar.

Die chronische HBV-Infektion zeigt sich laborchemisch durch einen anhaltenden Nachweis des HBs-Antigens für mindestens sechs Monate. Eine Serokonversion durch Anstieg des Anti-HBe und Anti-HBs kann nicht nachgewiesen werden. HBeAg kann sowohl positiv als auch negativ sein und gilt als prognostisch wichtiger Marker. Die Höhe des HBeAg korreliert positiv mit der Replikationsrate des Virus und stellt somit ein Maß für die Infektiosität dar. Anti-HBe wiederum wird mit einer geringen Viruslast assoziiert und geht mit einer besseren Prognose einher. Es zeigt gewissermaßen einen Übergang des Erkrankungsverlaufes in eine nicht-replikative Phase an (Cornberg et al., 2021).

Aktuell lässt sich die chronische HBV-Infektion in fünf klinische bzw. virologische Phasen einteilen (Pollicino & Caminiti, 2021).

Die HBV-DNA stellt den Marker der Virämie dar und ist ein bedeutsamer, prognostischer Marker der chronischen HBV-Infektion. Bei dieser zeigen sich initial oftmals Werte von >2000 IU HBV-DNA pro ml Serum (Cornberg et al., 2021).

Der Spezialfall, dass sowohl HBsAg als auch Anti-HBs positiv im Serum nachweisbar sind, stellt eine Ausnahme dar, welche als Immunevasion (Immunescape) bezeichnet wird. Bei der Immunevasion wird die Immunabwehr des Wirts samt Antikörper durch Mutationen in der *a*-Determinante des HBV unterlaufen (Gerlich, et al., 2010). Durch die Strukturänderung des mutierten HBsAg sind erneut freie Antikörper nachweisbar, welche den Immunescape diagnostizierbar machen. Anhand der Serologie kann ebenfalls der Impfschutz überprüft werden. Hierfür wird Anti-HBs im Serum nachgewiesen.

Neben den für die Hepatitis B spezifischen Markern werden die Transaminasen GPT (bzw. ALT) und GOT (bzw. AST), sowie der Fib4-Score berücksichtigt, welche neben der Leberbiopsie zum Nachweis und zur Abschätzung der Progression des Leberzellschadens und der Leberfibrosierung dienen (Bonino et al., 2010). Tabelle 1 zeigt die unterschiedlichen Konstellationen der HBV-Serologie.

		Serologische Parameter						
		HBsAg	Anti-HBsAg	Anti-HBc-IgM	Anti-HBc-IgG	HBeAg	HBV-DNA	Transaminasen
Akute Hepatitis B		↑	–	↑	–	↑	– / ↑	↑↑
Ausgeheilte Hepatitis B		–	↑	–	↑	–	–	<i>i.R.</i>
Zustand nach HBV-Impfung		–	↑	–	–	–	–	<i>i.R.</i>
Chronische Hepatitis B	HBeAg pos.	↑	–	–	↑	↑	↑/↑↑	↑/↑↑
	HBeAg neg.	↑	–	–	↑	–	↑/↑↑	↑/↑↑

Tabelle 1: Diagnostik bei unterschiedlicher HBV-Serologie. Mögliche Laborkonstellationen eines HBV infizierten Patienten. *i.R.* = Innerhalb der Referenzwerte, ↑ = Erhöhung oberhalb der Referenzwerte. – = keine Nachweisbarkeit. Die Diagnose der akuten HBV-Infektion erfolgt bei serologischem Nachweis von HBsAg, Anti-HBs-IgM und HBeAg. Die Transaminasen sind bei Leberschädigung massiv erhöht. Die HBV-DNA kann je nach Abnahme-Zeitpunkt normal bis erhöht erscheinen. Eine ausgeheilte HBV-Infektion stellt sich mit einer Seronarbe in Bezug auf Anti-HBs, Anti-HBc-IgG, sowie Anti-HBe dar. Der Zustand nach Impfung zeigt serologisch nur einen Nachweis von Anti-HBsAg. Die chronische HBV-Infektion zeigt sich mit der Kombination von erhöhten messbaren Werten für HBsAg, Anti-HBc-IgG, HBV-DNA und ggf. Transaminasenerhöhung.

1.2.10. Therapie und Prävention

Die akute HBV-Infektion ist durch eine hohe Spontanremissionsrate eher selten therapiebedürftig. Eine Therapie ist nur bei fulminantem Verlauf angebracht. Es werden regelmäßige Verlaufskontrollen des HBsAg und des Anti-HBs alle drei bis zwölf Monate bis zur vollständigen Serokonversion empfohlen (Herold, 2020).

Die sterilisierende Heilung einer chronischen HBV-Infektion, also eine vollständige Beseitigung aller Virusbestandteile im Körper, ist zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich. Dadurch wird die Erkrankung als unbedingt therapiebedürftig angesehen. Die aktuelle Leitlinie nennt als Therapieziel im ersten Schritt die Viruslast, im Sinne der dauerhaften Unterdrückung der HBV-DNA, zu verringern. Als zweites Ziel wird der Verlust des HBsAg genannt. Das dritte und am schwierigsten zu erreichende Therapieziel stellt die Serokonversion zu Anti-HBs dar (Cornberg et al., 2021). Durch diese Therapieziele soll sowohl die Mortalität als auch die Morbidität weltweit gesenkt werden (Cornberg et al., 2021). Die Indikation zur Therapie ist abhängig von der Entzündungsaktivität (Transaminasen, Histologie), der Virusaktivität (HBV-DNA) und dem Fibrosestatus der Leber. Für die medikamentöse Behandlung sind pegyliertes Interferon-alpha sowie Nukleosid- und Nukleotid-Analoga freigegeben. Letztere hemmen die Replikation des Virus, während Interferon das Immunsystem des Wirts als körpereigenes Gewebshormon stärkt (Ghany & Doo, 2009; Seeger & Mason, 2015). Welche Medikamente verwendet werden, ist vom Stadium der Lebererkrankung und der Viruslast abhängig (Cornberg et al., 2021). Nukleos(t)id-Analoga zeichnen sich durch eine nebenwirkungsarme Therapievariante aus. Da die cccDNA in den Hepatozyten durch die medikamentöse Therapie nicht eliminiert werden kann und lediglich die Replikation gehemmt wird, ist es vonnöten die Therapie langfristig fortzusetzen.

1.2.11. Präventive Immunisierung

Als präventive Maßnahme sieht die ständige Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut eine Durchimpfung der gesamten Bevölkerung vor (Robert Koch-Institut, 2024b). Erstmals wurde 1971 ein aktiver Impfstoff in Form von HBsAg aus humanem Plasma eines infizierten Patienten gewonnen. Man spricht hier von einem Erstgenerationsvakzin. Im Jahr 1986 wurde ein Zweit-Generations-Vakzin in rekombinanten Hefezellen

hergestellt, welches die genetische Information des SHBs des Subgenotyps A2 (Serotyp: *adw2*) trug (Gerlich, 2022).

Seit 1992 empfiehlt die WHO eine Durchimpfung mit einem 2-Generations-Vakzin für Säuglinge ab dem zweiten Lebensmonat, sowie allen Risikogruppen, welche Personal im Gesundheitswesen, dauerhaft (durch bspw. Transplantation) immunsupprimierte Patienten und Neonaten von HBsAg-positiven Müttern darstellen (Cornberg et al., 2021, Gerlich, 2013). Es ist des Weiteren bekannt, dass eine Impfung im frühen Säuglingsalter die perinatale Übertragung stark reduziert. Laut WHO gilt ein Titer >10 mIU/ml als protektiv (Cornberg et al., 2021). Die ständige Impfkommision schlägt als ausreichenden Schutz einen Titer von >100 mIU/ml innerhalb der ersten drei Monate nach Impfung vor (Robert Koch-Institut, 2024b). Der höhere Titer soll über einen längeren Zeitraum Schutz bieten. Eine erfolgreiche Impfung bietet einen Schutz von über 10 Jahren. Personen, die nach vier bis acht Wochen eine Grundimmunisierung mit 10-99 mIU/ml entwickelt haben, werden Low-Responder bezeichnet. Low-Respondern wird von der STIKO eine weitere Impfdosis empfohlen, sodass der Titer nach weiteren vier bis acht Wochen einen Wert von >100 mIU/ml erreicht (Robert Koch-Institut, 2024b). Titer von >10 mIU/ml bei Low-Respondern gelten als protektiv, wohingegen so genannte Non-Responder mit einem Titer von <10 mIU/ml als nicht ausreichend geschützt gelten (Cornberg et al., 2011; Krawczyk et al., 2014).

1.2.11.1. Grenzen des Zweit-Generations-Vakzins

Rund 10% der Impfungen mit einem Zweit-Generations-Vakzin versagen (Krawczyk, et al 2014). Ursächlich hierfür sind multiple Einflussgrößen. Damit eine Grundimmunisierung aufgebaut werden kann, sind drei Impfdosen notwendig. Neben der Compliance des Patienten, spielt auch das Alter bei Erhalt der Erstdosis eine entscheidende Rolle (Gerlich, 2013).

Ein weiterer Faktor für das Versagen der Immunisierung wird in der Varianz des impfinduzierten zum virusinduzierten Antikörper vermutet. Das HBsAg, welches von rekombinanten Hefezellen produziert wird, besitzt ein anderes Glykosylierungsmuster im Vergleich zu jenem, welches von Säugern produziert wird (Gerlich, 2013). Das Produkt, das in rekombinanten Hefezellen hergestellt wird, unterscheidet sich dadurch, dass es sich nicht spontan zu 20 nm großen Partikeln zusammenfügt und auch nicht sezerniert oder glykosyliert wird (Gerlich, 2013). Der Impfstoff aus rekombinanten Hefezellen zeigte

sich jedoch als kostengünstiges und durchaus effektiv schützendes Vakzin, sodass dieser seit 1992 von der WHO empfohlen wird (Gerlich, 2013).

1.2.11.2. Vakzin- und Immunescape

Für die Durchimpfung der Bevölkerung wird derzeit das SHBs des Impfgentyps A2 (Serotyp *adw2*) verwendet. Gegen die Determinanten *a*, *d* und *w* ist die Bildung von Antikörpern möglich. Der Kontakt mit HBV-Serotypen, welche nicht dem Impfserotyp *adw2* entsprechen, können dazu führen, dass nicht alle impfinduzierten Antikörper protektiv wirken (Heijntink et al., 2002; Tacke et al., 2007). Der AGL, welcher die *a*-Determinante beinhaltet, kann neben Mutationen auch wildtypspezifische bzw. genotypspezifische Unterschiede aufweisen.

Dies kann dazu führen, dass die neutralisierenden Antikörper nicht mehr an das HBsAg des impfstoffernen HBV-Genotyps binden können (Kato et al., 2017; Lazarevic, 2014). Vor allem Low- und Non-Responder zeigen eine erhöhte Rate an Mutationen in der *a*-Determinante (Vakzinescapemutationen), welche die Antigenität beeinflussen können (Gerlich, 2013; Lazarevic, 2014). Mutationen werden unter anderem durch die schnelle Virusproduktion von 10^{12} Viren pro Tag und dem Fehlen einer Korrekturfunktion der reversen Transkriptase begünstigt (Lazarevic, 2014). Durch die Mutation besitzen die Escapemutanten einen Überlebensvorteil unter dem Selektionsdruck des Immunsystems, da sie durch zuvor produzierte Antikörper vorerst nicht erkannt werden können. Neben dem Vakzinescape besteht auch die Möglichkeit des Immunescapes, worunter man die Reaktivierung eines bereits chronisch HBV-infizierten Patienten versteht (Tacke et al., 2007).

Da die *a*-Determinante auch über ihren Ladungsunterschied eine entscheidende Rolle für den Virus-Zell-Kontakt spielt, können Mutationen sich nachteilig oder vorteilhaft für die Escapemutanten darstellen. Eine Überlappung der ORF codierend für die Polymerase und das HBsAg könnte sich als positiv für den Zell-Virus-Kontakt erweisen. Eine einzelne Mutation im ORF der Polymerase könnte eine Verminderung der Replikation zur Folge haben und sich somit negativ auf die Viruslast auswirken. Die genaue Auswirkung auf Fitness und Adhäsionsfähigkeit ist dennoch vermutlich von den Genotypen selbst abhängig (S. Li et al., 2017).

Seit Impfeinführung stieg die Anzahl der neu aufgetretenen Mutationen laut einer Studie aus Taiwan, einem hochendemischen Gebiet, von 8% auf bis zu 28% an (Gerlich, 2013). Als Erstes wurde die am häufigsten auftretende Mutation G145R im HBsAg dokumentiert (aa-Position in der S-Domäne). Sie gehört zu den Mutationen, die mit einem Vakzinescape assoziiert werden und gilt als zeitlich stabilste, horizontal übertragbare Mutation (Coppola et al., 2015). Durch den Austausch des ungeladenen Glycins mit der positiv geladenen Aminosäure Arginin, kann das Virus besser an den negativ geladenen Heparansulfaten der Zelloberfläche binden. Neben dieser Steigerung der Infektiosität wird gleichzeitig weniger HBsAg sekretiert, wodurch ein Immunescape erleichtert wird (Salisse & Sureau, 2009).

Weitere Substitutionen, die zum Immunescape führen, sind P120Q und die horizontal übertragbare Mutation an Position Q129P (Gerlich, et al., 2010; Coppola, et al., 2015). Durch den Austausch von zwei unpolaren Aminosäuren wird lediglich die Sekretion des HBsAg verringert, was den Escape erleichtert (Cooreman et al., 2001; Lazarevic, 2014).

1.2.11.3. Dritt-Generations-Vakzin

In den 90er Jahren wurde in Israel ein weiterer Impfstoff gegen HBV entwickelt, welcher alle drei Bestandteile des HBsAg, also LHBs, MHBs und SHBs beinhaltet. Über Dritt-Generations-Vakzine wie Sci-B-VacTM oder auch PreHevbrio ist es möglich auch impfinduzierte Antikörper gegen alle Bestandteile des HBsAg, insbesondere der PräS1-Domäne zu bilden. Essenzielle Teile der PräS1-Dominante gelten als hoch konserviert und zeigen nur geringe Unterschiede innerhalb der HBV-Genotypen. Die neu entwickelten Impfstoffe werden, anders als die in Hefezellen produzierten Zweit-Generations-Vakzine, in Hamsteroovazellen hergestellt und ähneln daher den humanen Oberflächenproteinen in ihrer Glykosylierung und Faltung (Glebe et al., 2003). Zu den Vorteilen der Impfstoffe der dritten Generation zählt zudem, dass diese im Vergleich zur Vorgängergeneration bei nur zwei Impfdosen zu einem früheren Zeitpunkt höhere Antikörpertiter induzieren und somit auch für Bevölkerungsgruppen mit bisher schlechterem Ansprechen Erfolg versprechen (Krawczyk et al., 2014, Vesikari et al., 2023).

Untersuchungen zeigten außerdem, dass HBsAg Oberflächenproteine, die S, PräS1 und PräS2 beinhalten, eine breitere und robustere Immunreaktion auslösen. Aktuelle Studien zeigen, dass bereits nach sechs Monaten ein Anti-HBs-Titer von >100 mIU/ml erreicht

werden kann, wodurch besonders gefährdete Menschen frühzeitig vor einer Infektion geschützt werden könnten (Vesikari et al., 2023). Trotz der erfolgsversprechenden aktuellen Studienlage ist Sci-B-VacTM zum heutigen Zeitpunkt nur in Ostasien, Afrika und Israel zugelassen und daher nur selten verwendet. Ein weiterer 3A-HBV-Impfstoff stellt PreHevbrio dar, welcher seit 2021 in den USA und seit 2022 in Europa und Kanada zugelassen ist (Vesikari et al., 2023). Auch in Deutschland wurde der Impfstoff PreHevbrio zugelassen (Paul-Ehrlich-Institut, 2024). Die Firma VBI, die den Impfstoff PreHevbrio international vertrieben hat, musste jedoch im Jahr 2024 Konkurs anmelden, woraufhin die Auslieferungen des Impfstoffs gestoppt und alle noch verfügbaren Impfdosen vernichtet wurden. Es ist momentan unklar, ob und wann dieser Impfstoff in der Zukunft vertrieben wird (Zoey Becker, 2024).

1.3. Das Hepatitis-Delta-Virus (HDV)

1.3.1. Hintergrund des Hepatitis-Delta-Virus

Im Jahre 1977 wurde das HDV erstmalig in Leberbiopsien chronisch HBV infizierter Patienten von Rizotto et al. mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen (Botelho-Souza et al., 2017). Das HDV ist ein Satellitenvirus, welches nur in Gegenwart von HBV zu einer Infektion führen kann. Aktuell sind acht Genotypen bekannt (HDV1-8). Diese sind epidemiologisch weltweit verteilt. Genotyp HDV1 ist allgegenwärtig vertreten und gehört mit HDV3 zu den Virusvariationen, die als besonders gefährlich gelten (Botelho-Souza et al., 2017). Sie sind mit einem besonders aggressiven Krankheitsverlauf assoziiert. Aufgrund der Assoziation mit HBV, ist eine Infektion mit HDV nur in Gegenwart von HBV über eine Co- oder Superinfektion möglich. Eine Co-Infektion beschreibt die zeitgleiche akute Infektion mit HBV und HDV, welche durch ein besseres Outcome charakterisiert ist und eine Spontanheilungsrate von 95% aufweist. Bei der Superinfektion handelt es sich um einen chronisch HBV- infizierten Patienten, welcher zusätzlich durch HDV infiziert wird. Die Transmission des HDV findet meist über Blut- oder Sexualkontakte statt, seltener perinatal. In 2% der Fälle kommt es zu einem akut fulminanten Verlauf der Hepatitis (Altiok et al., 2018). Eine akute HDV Infektion führt zu einer Suppression der HBV-Marker in den Hepatozyten und im Serum (Sureau & Negro, 2016). Die Inkubationszeit der akuten HDV-Infektion beläuft sich auf circa sechs Wochen und geht mit unspezifischen Symptomen wie Lethargie einher. Der fulminante

Verlauf einer Hepatitis tritt bei einer Infektion mit HDV im Vergleich zu anderen viral assoziierten Hepatitiden circa zehnmals häufiger auf (Farci & Niro, 2012). Die chronische HDV-Infektion führt im Verlauf bei rund 60% der Patienten nach fünf bis zehn Jahren zu einer Leberzirrhose und einem dadurch bedingten Leberversagen. Auch die Chronifizierungsrate liegt bei 80% und das Risiko für eine frühe Entwicklung des HCC steigt bei einer Superinfektion drastisch an (Abeywickrama-Samarakoon et al., 2016; Botelho-Souza et al., 2017). Dank der flächenweise eingeführten Impfprävention der HBV-Infektion ist die Inzidenz der HDV-Infektionen deutlich zurückgegangen (Tseng & Lai, 2009).

1.3.2. Morphologie des Hepatitis-Delta-Virus und Deltaantigen

Das virale Genom von HDV ist ca. 1,7 kb groß und besteht aus einer einzelsträngigen, kreisförmigen RNA (ssRNA) mit negativer Polarität. Die Hülle des Virus wird aus zellulären Lipiden und HBsAg gebildet. Im Inneren befindet sich ein Ribonukleoprotein-Komplex (RNP).

Das Deltaantigen ist das einzige Protein, welches von HDV kodiert wird. Man unterscheidet eine große (L-HDAg) Proteinform von 214 AS- und eine kleine (S-HDAg) Form von 195 AS- Länge. S-HDAg fördert die Replikation während L-HDAg die Umhüllung der HDV-RNA unterstützt. Während des Replikationszyklus entsteht L-HDAg durch eine Basenmodifikation im RNA-Antigenom des HDV, bei dem letztlich ein Stoppcodon (UAG) in der entsprechenden HDV mRNA zu einem Tryptophan-Codon (UGG) mutiert und somit zu einer C-terminalen Verlängerung um 19 AS führt. Diese Verlängerung am C-Terminus stellt ein Virus Assembly Signal (VAS) dar (Botelho-Souza et al., 2017). Das L-HDAg besitzt C-terminal ein Farnesylierungsmotiv, welches wichtig für die Virusassemblierung ist (Sureau & Negro, 2016). Der schematische Aufbau des HDV ist in Abbildung 5 gezeigt.

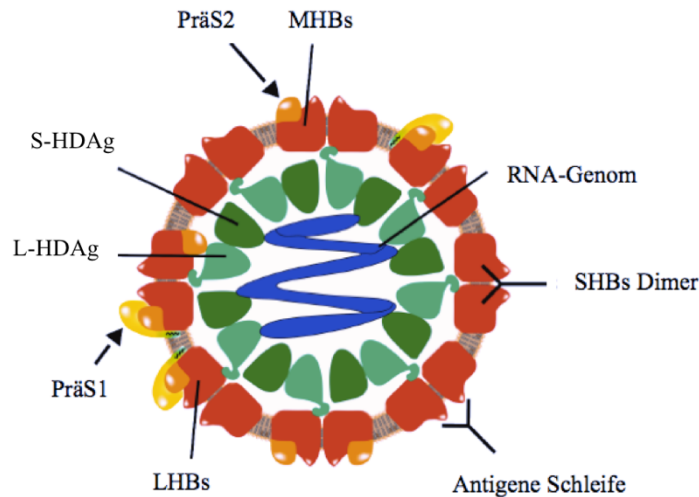


Abbildung 5: Schematische Darstellung des HBV. Das in hellgrün gezeigte, große Hepatitis Delta Protein (L-HDAg) interagiert mit den Oberflächenproteinen des HBV (rot) und vermittelt somit die Behüllung des Virus. Das kleine HD-Virusprotein (S-HDAg), (dunkelgrün) bildet gemeinsam mit dem L-HDAg und dem RNA-Genom einen Ribonukleoproteinkomplex (RNP). MHBs und LHBs sind mit ihrer jeweiligen PräS2-Domäne (orange) bzw. PräS1-Domäne (gelb) dargestellt. (aus Dissertation A. König, 2014, Beschriftungen geändert)

1.3.3. Replikation des Hepatitis-Delta-Virus

Der Eintritt des HDV wird, wie auch bei HBV, über die Bindung der HBV-Oberflächenproteine an HSPG des Wirtshepatozyten erleichtert. Diese Bindung hat lediglich eine geringe Affinität, ist aber für den Kontakt der PräS1-Domäne des LHBs mit dem NTCP zwingend nötig. Nach endozytärer Aufnahme wird der HDV-RNP in das Zytoplasma freigegeben und über ein nukleares Lokalisationssignal (NLS) des HDAg in den Kern transloziert, wo die genomische RNA (g-RNA) über die wirtseigene DNA-abhängige RNA-Polymerase II (POL II) in die antigenomische RNA (ag-RNA) transkribiert wird. Die Replikation der g-RNA und auch der ag-RNA geschieht über einen doppelten Rollkreismechanismus, bei dem zuerst repetitive, lineare RNA-Moleküle synthetisiert werden. Diese werden folglich von einem HDV-eigenen, selbstspaltendem Ribozym zerteilt. Die linearen Monomere bilden anschließend, über einen noch unbekanntem Mechanismus, zirkuläre RNAs (Abeywickrama-Samarakoon et al., 2016). Die ag-RNA dient als komplementäre Matrize für neue g-RNA, welche wiederum von der POL II transkribiert wird. Die HDV-RNA bildet zusammen mit den L-HDAg und S-HDAg einen RNP-Komplex. Anschließend interagiert dieser über das C-terminale Ende

des L-HDAg intrazellulär mit dem HBsAg und es erfolgt die Ausschleusung des HDV über intrazelluläre Vesikel (Abeywickrama-Samarakoon et al., 2016).

Zur Minimierung eines möglichen Infektionsrisikos mit HBV-Wildtypen oder mutiertem HBV, kann für in vitro und in vivo Infektionsexperimente auf das HDV-Surrogat-System zurückgegriffen werden. Hierbei wird das HDV-Genom in Form von RNA von dem HDV-Genom codierendem Plasmid gebildet und innerhalb des Hepatozyten repliziert. Durch die Kotransfektion mit einem HBV-Plasmid, welches für die jeweiligen Oberflächenproteine codiert, kann das Virus, nach Ummantelung aus der Zelle ausgeschleust werden und stellt somit ein infektiöses Virus dar (Freitas et al., 2014; Salisse & Sureau, 2009). Der gemeinsame Replikationszyklus von HBV und HDV ist in Abbildung 6 gezeigt.

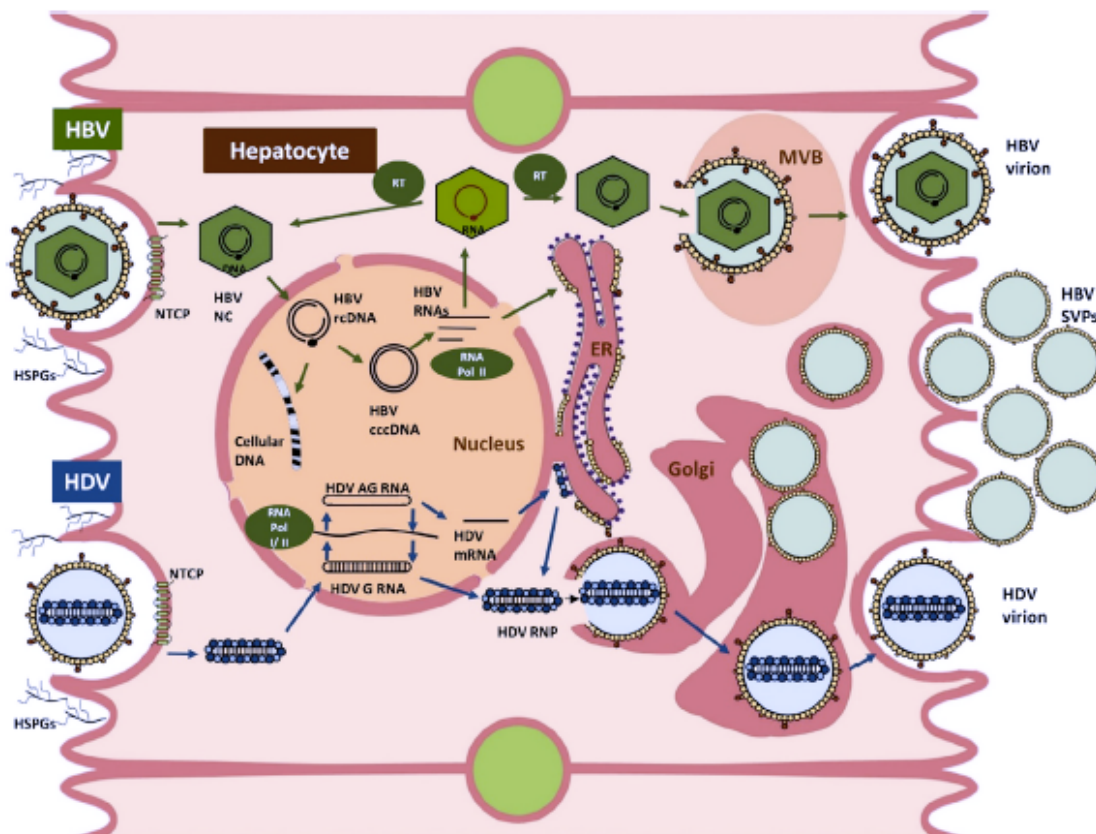


Abbildung 6: Gemeinsamer Replikationszyklus von HBV und HDV. In grün ist der bereits in Abbildung 3 im Detail beschriebene Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus gezeigt. Die erste Kontaktaufnahme des Virus mit der Leberzelle erfolgt über HSPG. Die Aufnahme des Virus erfolgt via Endozytose über die Bindung der PräS1-Domäne mit dem NCTP. Im Zytoplasma als Nucleokapsid transportiert, wird die rcDNA im Zellkern in cccDNA umgeschrieben. Die cccDNA dient der viralen RNA-Synthese. Die mRNA wird zu den HBsAg und der pgRNA translatiert. Aus der pgRNA werden die

Einleitung

Polymerase und die Core-Proteine produziert und zu Core-Partikeln zusammengesetzt. Die reifen Core-Partikel werden anschließend von den Oberflächenproteinen umhüllt und über multivesikuläre Körper (MVC; engl. multivesicular bodies (MVB)) in das Blut sekretiert. Subvirale Partikel (SVP) werden über den Golgi-Apparat ausgeschleust. In blau ist der Replikationszyklus des HDV dargestellt. Die Aufnahme des Virus erfolgt auch hier über HSPG und den NTCP. Im Zytoplasma wird der RNP-Komplex frei, welcher zum Zellkern transportiert wird und dort die g-RNA über einen double-rolling-circle Mechanismus zur ag-RNA und mRNA synthetisiert. Es folgt die Translation der HDV mRNA zu L-HDAg und S-HDAg. Diese bilden gemeinsam mit der g-RNA das HDV-RNP und werden über den Golgi-Apparat mit den HBV-Oberflächenproteinen umhüllt. Anschließend werden diese als HDV-Virionen ins Blut sekretiert. (Alfaiate et al., 2015)

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Zum Schutz vor einer HBV-Infektion wird zur Immunisierung ein Impfstoff empfohlen, welcher auf HBsAg des Subgenotyps A2 mit dem Serotyp *adw2* basiert. Ein im Jahr 2018 veröffentlichter Fall berichtet über einen 74-jährigen Patienten, welcher trotz erfolgter Immunisierung, eine fulminante Reaktivierung einer HBV-Infektion mit dem Nachweis des HBV-Genotyps F mit HBsAg-Variante G145R erlitt, ohne zuvor in ein für diese Genotypen endemisches Gebiet gereist zu sein (Schlabe et al., 2018). Aufgrund der zunehmenden Globalisierung und Migration von unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen, kommt es immer häufiger zum Austausch und zur Mischung der sonst endemisch stabil vorkommenden Genotypen (Schlabe et al., 2018).

Der vorliegende Fallbericht macht deutlich, dass ein Kontakt zu einem vakzinfremden (Sub)-Genotypen zu einer Infektion mit Chronifizierung trotz erfolgter Impfung und vermeintlich protektivem Titer führen kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Neutralisierbarkeit von HDV durch spezifische Anti-HBV-Antikörper zu untersuchen. Die Pseudotypisierung soll insbesondere mit den HBV-Oberflächenproteinen der Genotypen F (Serotyp *adw4*) und H (Serotyp *adw4*), sowie den Escapemutationen G145R, P120Q und Q129P erfolgen. Als Vergleich werden die in Europa verbreiteten Subgenotypen A2 und D3 ebenfalls auf ihre Neutralisierbarkeit untersucht.

Zusammenfassend werden folgende Fragen untersucht:

1. Ist es möglich subvirale Partikel, mit den oben genannten Genotypen und Escapemutationen durch Transfektion von HepG2 zu produzieren?
2. Wird sekretiertes HBsAg der untersuchten Virusisolate durch impfinduzierte Antikörper erkannt?
3. Wird sekretiertes HBsAg durch die kommerziellen, diagnostischen Assays detektiert?
4. Sind HDV, die mit den beschriebenen HBsAg-Varianten pseudotypisiert wurden, infektiös?

5. Können die pseudotypisierten HDV durch Anti-HBs-Antikörper, die auf verschiedene Weise induziert wurden, neutralisiert werden? Unterscheidet sich die Effizienz der Antikörper in Bezug auf die (Sub)-Genotypen und Escape-Mutanten?
6. Gibt es Unterschiede zwischen impfinduzierten Antikörpern, welche die PräS1-Domäne binden, zu denen, welche nur die S-Domäne binden?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien, Puffer und kommerzielle Medien

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Puffer und kommerziellen Medien

Name	Nutzung	Hersteller
Agarose	Agarosegelelektrophorese	Biozym Scientific, Oldendorf, D
Albumin Fraktion V, very low endotoxin (BSA)	HGM	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, D
Bacto-Agar	LB-Agar	BD Biosciences, Heidelberg, D
Bacto-Hefe-Extract	LB-Medium	BD Biosciences, Heidelberg, D
Bacto-Trypton	LB-Medium	BD Biosciences, Heidelberg, D
Casein	ELISA	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham USA
Casposfungin	Antimykotikum	MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar, D
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Zellkernfarbstoff in IF	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham USA
Dexamethason	HGM	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Zellkultur	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, D
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	PBS	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D

Material

Dublecco's Modified Eagle's Medium mit Phenolrot (DMEM)	Zellkultur	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham USA
Epidermal growth factor (EGF)	Zellkultur	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D
Essigsäure (CH ₃ COOH)	TAE-Lösung	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol (>99,8%)	Lösungsmittel	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Chelator	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D
Fast Digest Green Puffer	Gelelektrophorese	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham USA
Fötale Kälberserum (FKS)	Zellkultur	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham USA
FuGENE HD	Transfektion	Promega GmbH, Mannheim, D
Gel loading Dye Purple 6x	Gelelektrophorese	New England BioLabs Ipswich, MA, USA
HEPES(N-2-Hydroxyethyl) piperazin -N'-2-ethansulfonsäure)	Zellkultur	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham USA
Insulin-Transferrin-Selenium (ITS)	HGM	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham USA
Kaliumchlorid (KCL)	Puffer	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Puffer	Merck KGaA (Sigma-Aldrich) Darmstadt, D

Material

Kollagen Typ I	Zellkultur	BD Bioscience, Heidelberg, D
L-Glutamin	Zellkultur	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham USA
L-Homoarginin	Puffer	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Magnesiumchlorid (MgCl)	Puffer	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Natriumchlorid (NaCl)	Puffer	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumpyruvat (100mM)	Zellkultur	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham USA
Opti-MEM (Reduced Serum Media)	Transfektion	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham USA
Paraformaldehyd (PFA)	Zellfixierung	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D
p-Nitrophenolphosphat	Puffer	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D
Polyethylenglykol (PEG) (40%)	Zellkultur	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, D
RNase freies Wasser	PCR	Analytik Jena, Jena D
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	ELISA	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D
SOC-Medium	Transformation	Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, F
Streptavidin POD	ELISA	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Ely, UK
Tris	Puffer	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D

Triton-X-100	Detergenz	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, D
Trypsin-EDTA	Zellkultur	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham USA
Tween-20	Detergenz	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, D
Williams‘ E ohne Phenolrot	Zellkultur	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham USA
XtremeGene HP DNA	Transfektion	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, D

2.1.1.1. Selbst angesetzte Puffer, Lösungen, Medien

Tabelle 3: Auflistung der eigenständig zusammengemischten Puffer, Lösungen und Medien

Name	Zusammensetzung	Mengen/Konzentration
ELISA		
ELISA Coating Puffer	NaCl Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O KH ₂ PO ₄ Auf pH7,4 einstellen	83 mM 8,6 mM 2,2 mM
ELISA Blocker Lösung	FKS 10% In TNE (pH7,4)	
ELISA Waschpuffer	PBS Tween-20	1 L 0,1 %
SEAP-Substrat	p- Nitrophenolphosphat	50mM in ddH ₂ O
SEAP-Puffer (2x)	Dieethanolamin (100%) MgCl x 6H ₂ O L-Homoarginin <hr/> H ₂ O	2 M 1 mM 20 mM <hr/> Ad 50ml
Zellkultur		

Material

DMEM complete	DMEM Fötales Kälberserum Penicillin Streptomycin	500 ml 10 % 100 U/ml 100 µg/ml
William's E complete	Williams' E FKS Penicillin Streptomycin L-Glutamin HEPES	500 ml 2 % 100 U/ml 100 µg/ml 2 mM 10 mM
Hepatocyte Growth Medium (HGM)	Williams' E Albumin Fraction V, very low endotoxin Insulin-Transferrin-Selenium L-Glutamine Gentamycin Natriumpyruvat Dexamethason HEPES Caspofungin	500 ml 0,2 % 1x 2 mM 0,1 mg/ml 1 mM 10 nM 10 mM 50 µg/ml
Infektionsmedium	HGM Dimethylsulfoxid Polyethylenglykol (40 %) Doxycyclin EGF	Nach Gebrauch 2 % 4 % 6 µg/ml 100 ng/ml
PBS (50x)	NaCl, pH7,4 KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ _____ dH ₂ O	1,37 M 27 mM 80 mM 18 mM _____ 1 l

Material

PBS ++	PBS MgCl ₂ u. CaCl ₂ 100x Stammlösung	396 ml 4 ml
qPCR		
HDV-PCR-Mastermix (Pro Well)	HDV-R HDV-F HDV-P 4xFast-Virus- Mastermix RNase-freies Wasser	1 µl (500 nm f.c.) 1 µl (500 nm f.c.) 0,5µl (250 nm f.c.) 5 µl 3,5µl
Immunfluoreszenz		
Fixierungs- und Permeabilisierungslösung	Paraformaldehyd Triton-X-100	4 % 0,2 %
Blockierungslösung- IF	TBS FKS	1x 10 %
Sonstige Ansätze		
TAE (50x)	TRIS Essigsäure EDTA (pH 8,0)	2 M 1 M 50 mM
TNE pH 7,4	Tris- HCL NaCl EDTA	20 nM 140 nM 1 mM
TBS (10x) pH 7,6	Tris NaCl	200 mM 1,5 M
LB-Medium (Lysogen Broth- Medium)	dH ₂ O Bacto-Hefe-Extrakt Bacto-Trypton NaCl	1 l 10 g 5 g 10 g
LB-Agar	LB-Medium Bacto-Agar	1,5 %

2.1.2. Antikörper

2.1.2.1. Monoklonale Antikörper (mAk)

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten monoklonalen Antikörper (mAk)

Antikörper Bezeichnung	Spezies, Epitop, AS-Abfolge	Konzentration Stocklösung	Verdünnung ELISA	Quelle
MA18/7	Maus, DPXF der PräS1-Domäne; AS20-23	1 mg/ml	1:500	(Sominskaya et al., 1992)
C20/02	Maus, a- Determinante, S- Domäne; AS 120- 161	1 mg/ml	1:1000	(Abou El Nasr, 2011)
HB01	Maus, GPCR(K)TCT, S- Domäne, AS 119- 125	1 mg/ml	1:500	(Kucinskaite- Kodze et al., 2016)
Q19/10	Maus, N- Glykosylierungs- motiv in PräS2 (des MHBs)	1 mg/ml	1:500	(Meisel et al., 1994)

2.1.2.2. Polyklonale Primärantikörper (pAk)

Tabelle 5: Auflistung polyklonaler Primärantikörper

AK- Bezeichnung	Spezies, Detektion, Immunsierung	Verdünnung IF	Verdünnung Neutralisa- tion	Stock- konzentra- tion	Quelle
Anti- L	Kaninchen, Anti-PräS1, AS 20-48 <i>(Immunsierung)</i>	1:200	1:10 1:100 1:500	-	AG Glebe

Material

	<i>mittels PräSI, Kaninchen)</i>				
Anti-S	Kaninchen, S- Domäne <i>(Immunisierung mittels Zweit- Generations- Vakzin, SHBs Hefe)</i>	1:50	1:10 1:100 1:500	517,26 IU/ml Anti-HBs	AG Glebe
Human boost Anti-S	Mensch, S-Domäne <i>(Mehrfache Immunisierung mittels Zweit- Generations- Vakzin, SHBs Hefe)</i>	-	1:10 1:100	134,62 IU/ml Anti-HBs	AG Glebe
Anti-LMS	Schaf, gesamtes HBsAg <i>(Immunisierung mittels humanen SVP von Gt A, B, D)</i>	-	1:10 1:100 1:500	27,40 IU/ml Anti-HBs	AG Glebe
Anti-HDV	Mensch, HDAg <i>(natürliche Infektion)</i>	1:200	-	-	AG Glebe

2.1.2.3. Kommerzielle Sekundärantikörper

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten, kommerziellen Sekundärantikörper

AK- Bezeichnung	Spezies Detektion	Verdünnung IF	Verdünnung ELISA	Hersteller
Alexa Fluor 594 goat anti- mouse IgG	Ziege, Maus-IgG	1:400 einer 1mg/ml Stocklösung	-	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham USA
AlexaFluor 488 goat anti- rabbit	Ziege, Kaninchen- IgG	1:400 einer 1 mg/ml Stocklösung	-	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham USA

2.1.3. Primer und Probe

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Primer und Probe

Name	Sequenz (5' zu 3')	Funktion	Hersteller
D3_G145R_mut_rev	GCAATTTCTCCGAAGGTTTG GTAC	SDM-PCR	IDT, Leuven, BEL
D3_G145R_mut_fwd	CGGACAGAAATTGCACCTGT ATTCCC	SDM-PCR	IDT, Leuven, BEL
HDV-F	TGGCTCTCCCTTAGCCATCC G	HDV- qRT-PCR- sense- primer	IDT, Leuven, BEL
HDV-R	TTCCTCTTCGGGTCGGCATG	HDV- qRT-PCR- antisense primer	IDT, Leuven, BEL
HDV-P	FAM- CTCCTWCGGATGCCCAGGTC GGAC-BHQ1	HDV- qRT-PCR- Sonde	IDT; Leuven, BEL

2.1.4. Marker

Tabelle 8: Verwendete Marker

Name	Funktion	Hersteller
NEB Quick load purple 1 kb	DNA-Größenmarker in Gelelektrophorese	New England BioLabs GmbH; Frankfurt/Main, D

2.1.5. Antibiotika

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Antibiotika

Name	Funktion/Konzentration	Hersteller
Carbenecillin-Dinatriumsalz	Selektion transformierter E. coli /f.c. 100 µg/ml	Carl ROTH GmbH Co.KG, Karlsruhe, D
Doxycyclin	Induktion des humanen NTCP in Zellkultur /f.c. 6 µg/ml	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, D
Gentamycin	Zusatz in Zellkulturmedium HGM /f.c. 50 µg/ml	Thermo Fisher Scientific (Life technologies), Waltham, MA, USA
Geneticin (G418)	Selektion des Tet-on-Systems /f.c. 0,2 mg/ml	InvivoGen, San Diego, USA
Penicillin/Streptomycin	Zusatz in Zellkulturmedium f.c. 100 U/ml Penicillin; f.c. 100 µg/ml Streptomycin	Thermo Fisher Scientific (Life technologies), Waltham, MA, USA
Puromycin Dihydrochlorid >98%	Selektion des humanen NTCP in Zellkultur / f.c. 1µg/ml	Carl ROTH GmbH Co.KG, Karlsruhe, D

2.1.6. Enzyme

Tabelle 10: Auflistung verwendeter Enzyme

Name	Nutzung	Hersteller
Fast Digest DpnI	Plasmidverdau	New England BioLabs GmbH; Frankfurt/Main, D

Fast Digest MluI	Plasmidverdau	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham USA
Fast Digest XhoI	Plasmidverdau	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham USA
DNase I	HDV-qRT-PCR	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham USA
TaqMan Fast Virus 1 Step Master Mix	HDV-qRT-PCR	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham USA
Q5 Hot Start High-Fidelity 2 X Master Mix	HDV-qRT-PCR	NEB New England BioLabs, UK

2.1.7. Kommerzielle Kits

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten, kommerziellen Kits

Name	Hersteller
Enzygnost HBsAg 6.0	SIEMENS Healthcare Diagnostics Products GmbH, Duisburg, D
InnuPREP Plasmid Mini Kit 2.0	Analytik Jena, Jena, D
InnuPREP Virus DNA/RNA Kit	Analytik Jena, Jena, D
Monarch DNA Gel Extraction Kit	New England BioLabs GmbH, Frankfurt/Main, D
Qiagen Plasmid plus Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D

2.1.8. Plasmide

Tabelle 12: Auflistung der untersuchten Plasmide; Plasmidkarte im Abbildung 28: **P120Q** = Mutation von Prolin zu Glutamin an AS-Stelle 120 des SHBs; **Q129P** = Mutation von Glutamin zu Prolin an AS-Stelle 129 des SHBs; **G145R** = Mutation von Glycin zu Arginin an AS Stelle 145 des SHBs.

Bezeichnung	Plasmidname	Backbone	Expression
Gt A2	Genotyp A2 - N4879 - natProm_LHBs_PolyA	pcDNA3.1 +	Expressionsplasmid von HBsAg des HBV Gt A2

Material

Gt D3	Genotyp D3_3091_LHBs_3091EnhPREPoly A	pcDNA3.1 +	Expressionsplasmid von HBsAg des HBV Gt D3
Gt D3 G145R	Gt D3 LHBs mit G145R	pcDNA3.1	Expressionsplasmid von HBsAg des HBV Gt D3 mit SHBs Mutationen G145R
Gt F1	GtF1_AY090461_LHBs_2290_0_19 77	pcDNA3.1 +	Expressionsplasmid von HBsAg des HBV Gt F1
Gt F2	GtF2_X69798_LHBs_2290_0_1977	pcDNA3.1 +	Expressionsplasmid von HBsAg des HBV Gt F2
Gt F3 P120Q	Genotyp F-15- 6834_2290_0_1977_Escape120	pcDNA3.1 +	Expressionsplasmid von HBsAg mit SHBs Mutation P120Q des HBV Gt F3
Gt F3 P120Q_Q129P	Genotyp F-15- 6834_2290_0_1977_Escape120_129	pcDNA3.1 +	Expressionsplasmid von HBsAg mit SHBs Mutationen P120Q_Q129P des HBV Gt F3
Gt F3 P120Q_Q129P_G145R	GenotypF-15- 6834_2290_0_1977_Escape120_129_ 145	pcDNA3.1 +	Expressionsplasmid von HBsAg mit SHBs Mutationen P120Q_Q129P_G145 R des HBV Gt F3
Gt F3 P120Q_G145R	Genotyp F-15- 6834_2290_0_1977_Escape120_145	pcDNA3.1 +	Expressionsplasmid von HBsAg mit SHBs Mutationen P120Q _G145R des HBV Gt F3
Gt F3 Q129P	Genotyp F-15- 6834_2290_0_1977_Escape129	pcDNA3.1 +	Expressionsplasmid von HBsAg mit SHBs Mutation Q129P des HBV Gt F3
Gt F3 Q129P_G145R	Genotyp F-15- 6834_2290_0_1977_Escape129_145	pcDNA3.1 +	Expressionsplasmid von HBsAg mit SHBs Mutationen

Material

			Q129P_G145R des HBV Gt F3
Gt F3 G145R	Genotyp F-15-6834_2290_0_1977_Escape145	pcDNA3.1 +	Expressionsplasmid von HBsAg mit SHBs Mutation G145R des HBV Gt F3
Gt F3	GenotypF-15-6834_2290_0_1977_WTohneEscape	pcDNA3.1 +	Expressionsplasmid von HBsAg des HBV Gt F3
Gt F4	GtF4_KY382411_LHBs_2290_0_1977	pcDNA3.1 +	Expressionsplasmid von HBsAg des HBV Gt F4
Gt H	Genotyp H - V1688 - natProm_LHBs_PolyA	pcDNA3.1 +	Expressionsplasmid von HBsAg des HBV Gt H
pcDNA3.1+	pcDNA3.1+	-	Plasmid ohne Insert
pSEAP	pSEAP	-	Expressionsplasmid für sekretierte alkalische Phosphatase
pSVL(D3)	pSVL(D3)	-	Expressionsplasmid mit Trimer des Genoms von HDV-Genotyp 1

2.1.9. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Firma
Zellkultur (Prokaryot/Eukaryot)	
G24-Inkubator-Shaker	New Brunswick Scientific, Edison New Jersey, USA
Vortemp 56	Labnet International Edison, USA
Inkubator Modell 100-800	Memmert, Schwabach, D
CO2 Inkubator MCO-19AIC	Panasonic Healthcare/ pHcbi/ PHC Europe B.V. Etten-Leur, HOL
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, D
Centrifuge 5417C;5430	Eppendorf, Hamburg, D

Material

Herasafe KS	Fisher Scientific GmbH Schwerte, D
Sterilbank Typ KS12	ThermoSCIENTIFIC, Schwerte, D
ELISA	
ELISA-Reader EL 808	BioTek, Winooski Vermont, USA
Immunfluoreszenz	
DMI6000 B (Inverses Fluoreszenzmikroskop)	Leica Wetzlar, D
Polymerasekettenreaktion	
MiniAmp Thermal Cycler	ThermoFisher Scientific (Applied Biosystems) Waltham, USA
LightCycler 480 II	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D
Sonstiges	
Reagiergefäß-Heizblock	JLU-Werkstatt-Eigenbau
METTLER PM 4600	Mettler Toledo, Columbus Ohio, USA
Integra Pipet Boy	INTEGRA Biosciences Corp., Hudson New Hampshire, USA
PicoDrop	Biozym Scientific, Edison, USA
Vortexer VF2	Janke & Kunkel, Staufen, D
Mikrowelle R939	Sharp, Köln, D
NanoDrop ND-1000	ThermoSCIENTIFIC, Schwerte, D
Elektrophorese-Kammer	Carl Roth GmbH Co.KG Karlsruhe, D
Wasserbad	Memmert, Schwabach, D
Abbott Architect	Abbott, Lake Forest, Illinois, USA

Tabelle 14: Auflistung der Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Bakterienschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Cellstar-Zellkulturplatten 10 cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

Material

FALCON Gefäße, 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Glasgefäße	Schott AG Mainz, D
MaxiSorp-Platten	Nunc A/S, DEN
Pipettenspitzen; nicht gestopft	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen gestopft	Nerbe plus GmbH & Co. KG Winsen/Luhe, D
Reagiergefäße (1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, D
Multiwellplatten (6-, 48-, 96-well)	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, D
Zellkulturschalen 96-, 48-, 24-Well, 15 cm Platten	BD Biosciences, Heidelberg, D
VIVASPIN 20	Sartorius AG, Göttingen, D
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
MicroAmp Optical Adhesive Film (qPCR-Folie)	ThermoFisher Scientific (Applied Biosystems) Waltham, USA
PCR- Tubes 0,2 ml	Biozym Scientific Oldendorf, D
LightCycler 480 Multiwell Plate 96, white	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D

2.1.10. Verwendete Zellen

2.1.10.1. Eukaryotisch

2.1.10.1.1. HepG2 und HepG2 tet-on-advanced-NTCP (HepG2-NTCP)

Bei den HepG2 Zellen handelt es sich um eine nicht ausdifferenzierte Ableitung einer humanen Leberblastomzelle, welche aus einem Hepatoblastom eines 15-jährigen Jungen isoliert wurde (Aden et al., 1979). Clontech Laboratories entwickelte die HepG2 tet-on-advanced (HepG2-NTCP) Zelllinie, welche es ermöglicht, über einen Tetracyclin Transaktivatorsystem die gezielte Expression eines zuvor transfizierten Zielgens zu

steuern. Zur Inhibition der Expression bindet der Tetracyclinrepressor in Abwesenheit von Tetracyclin am Tetracyclin-Operator. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Tetracyclin-Derivat Doxycyclin, bindet an das Tetracyclin-Repressor-Protein, wodurch es vom Tetracyclin-Operator dissoziiert und somit das Ablesen und die Expression des Zielgens ermöglicht wird.

Für die Infektionsversuche mit pseudotypisierten HDV wurde die Expression eines Gallensäuretransporters benötigt, welcher als NTCP bezeichnet wird.

Dafür wurden HepG2 Zellen verwendet, welche zuvor stabil mit humanem NTCP transfiziert wurden. Die Expression des NTCP wird durch die Zugabe von Doxycyclin aktiviert. Zur Kultivierung der HepG2 als auch der HepG2-NTCP Zellen wurden die Zellkulturplatten vor dem Aussäen mit Kollagen beschichtet.

2.1.10.1.2. HuH7

HuH7 ist eine ausdifferenzierte, von einem Leberzellkarzinom abgeleitete Zelllinie, welche erstmalig 1982 aus einem Lebertumor eines 57-jährigen, japanischen Mannes entnommen wurde.

Charakteristisch für diese Zelllinie ist, dass sie epithelisierend und tumorerzeugend ist. Sie weist eine Punktmutation im P53-Gen auf. Etabliert wurde die Zelllinie von Nakabayashi und Sato (Nakabayashi et al., 1982).

2.1.10.2. Prokaryotisch

2.1.10.2.1. Kompetente E. coli Stellar Bakterien

Für die Transformation und Vermehrung der Plasmide wurden die kommerziell erhältlichen, chemisch kompetenten E. coli Stellar von Takara/Clontech verwendet. Die chemisch kompetenten E. coli Bakterien besitzen die Fähigkeit Plasmide über einen Hitzeschock aufzunehmen.

2.2. Methoden

2.2.1. Produktion subviraler Partikel

2.2.1.1. Zellkulturarbeit

Alle verwendeten Zelllinien wurden auf 10 cm Zellkulturschalen in DMEM complete kultiviert. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 96% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. Für die Kultivierung der HepG2-/HepG2-NTCP-Zellen wurde die 10 cm Kulturplatte zuvor kollagenisiert und das Kulturmedium zusätzlich mit 10 µl (100 µg/ml) Geneticin (G418) versetzt. Die HepG2-NTCP-Zellen erhielten zudem Puromycin (1 µg/ml) und Doxycyclin (6 µg/ml) zum Plasmidhalt und der Expression des NTCP. Die Kultivierung der Huh7-Zellen bedurfte keiner Kollagenisierung der Platten oder weiterer Ergänzungen des DMEM complete Medium. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Zum Passagieren der Zellen wurde zunächst das alte Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mittels 0,5% Trypsin/PBS abgelöst. Nach 5-minütiger Inkubationszeit bei 37°C wurde dann nach Bedarf in unterschiedlichen Mengen DMEM complete resuspendiert und auf die zuvor vorbereiteten Zellkulturplatten ausgesät. Ein Medienwechsel erfolgte bei Bedarf. Für die unterschiedlichen Versuche wurden die Zellen auf 6-Well, 48-Well oder 96-Well Platten ausgesät, sodass sie zum Tag der Versuche 70-80% Konfluenz aufwiesen.

2.2.1.2. Transformation chemisch-kompetenter Bakterien

Um das zu transformierende Plasmid für die Vervielfältigung in E. coli Stellar zu überführen, wurde 1 µl Plasmidlösung auf Eis zu 45µl kompetenten Bakterien pipettiert. Es folgte eine Inkubationszeit von 20 Minuten (Min.) auf Eis. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 45 Sek. bei 42°C durchgeführt. Nach weiteren 2 Min. Inkubationszeit auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium hinzugegeben. Das Gemisch wurde 1 Stunde (h) bei 37°C und 220 rounds per minute (rpm) geschüttelt. Danach wurde der Transformationsansatz bei 5.000 rpm für 5 Min. zentrifugiert, dekantiert und im Restvolumen resuspendiert. Anschließend wurden 20 µl des Ansatzes auf LB-Agar mit

Carbenicillin (50 µg/ml) ausgestrichen. Die Bakterienchale wurde bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Platten bei 4°C gelagert.

2.2.1.3. DNA-Isolation

Zur Isolation der DNA wurde nach der Transformation eine einzelne Bakterienkolonie in 40 ml LB-Medium mit 40 µl Carbenicillin (50µg/ml) angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Isolation der DNA mittels Plasmid Plus Midi-Kit nach Herstellerangaben durchgeführt und in 200µl RNase-/DNase-freiem H₂O eluiert. Die DNA-Konzentration wurde mittels Nanodrop photospektrometrisch bestimmt. Verunreinigungen durch Protein bzw. RNA wurden ebenfalls photometrisch bestimmt. Die Plasmid DNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.1.3.1. Agarosegelelektrophorese

Um nachzuweisen, dass es sich bei der isolierten DNA um die gewünschte Plasmid-DNA handelt, wurde ein Restriktionsverdau mit zwei Restriktionsenzymen durchgeführt, welche jeweils einmal innerhalb des Plasmids schneiden und somit zwei DNA-Fragmente mit bekannter Länge auf dem Agarosegel zeigen.

2.2.1.3.2. Restriktionsenzymverdau

Für das Schneiden der DNA wurden MluI und XhoI als Restriktionsenzyme verwendet.

Fast Digest Green Puffer	1 µl
XhoI	0,5 µl
MluI	0,5 µl
DNA	2 µg
<hr/>	
H ₂ O	ad 10 µl

Der Restriktionsansatz wurde für 10 Min. bei 37°C im Heizblock inkubiert.

2.2.1.3.3. Agarosegel

Es wurde ein 2% Agarose/TAE-Gel gegossen. Als Marker wurde der NEB Quick load Purple 1 kb verwendet. Eine Spannung von 70 V wurde angelegt.

2.2.1.3.4. Sequenzierung der DNA

Die Authentifizierung der DNA-Sequenz wurde mittels Sanger Sequenzierung bestimmt. Die Sequenzierung erfolgte durch LGC.

2.2.1.4. Site Directed Mutagenesis PCR (SDM-PCR)

Für die beschriebenen Versuche wurde ein weiteres Plasmid benötigt, welches mittels einer SDM-PCR aus dem Subgenotyp D3 hergestellt und anschließend über Transformation, wie in 2.2.1.2 beschrieben, vervielfältigt wurde.

Bei dem Plasmid handelt es sich um eine häufig vorkommende Mutation, welche als Problem für die öffentliche Gesundheit in Ländern beschrieben wird, in denen Impfprogramme durchgeführt wurden bzw. werden. Die Substitution in der S-Domäne an Stelle 145 von einem Glycin zu einem Arginin wird als besonders stabil beschrieben und kann horizontal weitergegeben werden (Salisse & Sureau, 2009).

Die PCR wurde mit Hilfe des Protokolls für die Q5 Hot Start Highfidelity Polymerase durchgeführt.

Q5 High-Fidelity 2X Master Mix	12,5 µl
10 µM D3_G145R_mut_rev	1,25 µl
10 µM D3_G145R_mut_fwd	1,25 µl
Plasmid	50 ng

H ₂ O	ad 25µl
------------------	---------

Initiale Denaturierung für 30 Sek. bei 98°C

Zyklus:	Denaturierung bei 98°C für 10 Sek. Annealing bei 71°C für 20 Sek. Elongation bei 72°C für 30 Sek.	35 Zyklen
---------	---	-----------

Final Extension bei 72°C für 2 Min.

2.2.1.4.1. Agarosegelelektrophorese und Restriktionsenzymverdau des SDM-Produkts

Nach der PCR wurde ein Agarosegel (siehe 2.2.1.3.1) durchgeführt und die DNA-Bande mit erwarteter Größe ausgeschnitten. Anschließend wurde der Agaroseausschnitt mittels Monarch DNA Gel Extraction Kit (#T1020G) nach Herstellerangaben gereinigt und in 10 µl RNase-/DNase-freiem H₂O eluiert. Daraufhin wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym DpnI geschnitten, um Template-DNA abzubauen.

Fast Digest Puffer	2 µl
Fast Digest Enzym DpnI	1 µl
DNA (PCR-Produkt)	9 µl (0,2 µg)
<hr/>	
H ₂ O	ad 30 µl

Das Gemisch wurde für 5 Min. bei 37°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde für weitere 5 Min. eine Hitzeinaktivierung bei 80°C durchgeführt.

2.2.1.4.1.1. Mini-Präp

Nach Transformation (siehe 2.2.1.2) wurde eine Mini-Präp nach Standardprotokoll mit dem InnuPREP Plasmid Mini Kit 2.0 durchgeführt. Die DNA wurde anschließend in 50 µl RNase-/DNase-freiem H₂O eluiert. Die DNA-Konzentration wurde photospektrometrisch bestimmt. Die Authentifizierung der Sequenz und das Vorhandensein der gewünschten Mutation an Stelle G145R in der S-Domäne des Subgenotyps D3 erfolgte durch Sequenzierung.

2.2.2. Transfektion zur Herstellung subviraler Partikel (SVP)

Um eine möglichst hohe Transfektionseffizienz zu erreichen, wurde eine Lipofektion durchgeführt. Dafür wurden die verwendeten 6-Well Platten am Vortag so ausgesät, dass sie am Transfektionstag zu 80% konfluent waren.

Das Transfektionsgemisch bestand aus 2 µg HBsAg-codierender Plasmid-DNA, 200 ng pSEAP und 6,6 µl XtremeGeneHP (3:1 Verhältnis von Reagenz:DNA) in einem Gesamtvolumen von 200 µl Optimem. Der Transfektionsmix wurde mittels Vortex durchmischt und mittels Zentrifuge abzentrifugiert. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch für 15 Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Derweil wurden

die Platten für die Transfektion vorbereitet. Die Wells wurden mit PBS gewaschen und mit 2 ml DMEM complete bedeckt. Das Transfektionsgemisch wurde tropfenweise auf die Zellkulturschale gegeben, die Schale leicht geschwenkt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Tag nach der Transfektion wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Die Wells wurden mit PBS++ gewaschen und mit 2 ml Medium (Williams' Medium E + 2% FKS + 1% P/S + 1% Glutamin) aufgefüllt und weiter kultiviert. Vier Tage nach Transfektion wurde der Überstand der transfizierten Zellen abgenommen und für 5 Min. bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden verworfen. Die Überstände wurden in neue Reagiergefäße überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.2.1. Transfektion zum Nachweis intrazellulärer HBsAg mittels Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden die HepG2-Zellen auf einer 96-Well Platte so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion zu 80 % konfluent waren.

Das Transfektionsgemisch bestand aus 0,1 µg Plasmid-DNA und 0,3 µl XtremeGeneHP (3:1 Verhältnis von Reagenz:DNA) ad 25 µl Optimem pro Well und wurde in einem Mastermix für die Anzahl der zu transfizierenden Wells zusammen gemischt, gevortext, kurz zentrifugiert und für 15 Min. bei RT inkubiert. Derweil wurden die Wells mit PBS++ gewaschen. Anschließend wurde 225 µl DMEM complete vorgelegt und danach die Transfektionsansätze hinzugegeben. Einen Tag nach Transfektion wurde das Medium nach einem Waschgang mit PBS++ auf Williams' E complete gewechselt. Am vierten Tag nach Transfektion erfolgte die in 2.2.4 beschriebene Fixierung und Färbung der Zellen.

2.2.3. ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent-assay)

Abbildung 7 zeigt eine Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA.

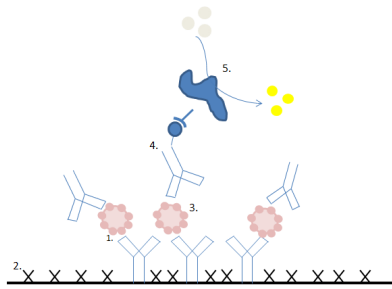


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA. Nach Zugabe eines zu detektierenden Antigens bindet dieses an den zuvor auf der Platte beschichteten Antikörper (1). Der Rest der Platte wird gesättigt, damit eine unspezifische Bindung des Antigens an die Platte verhindert wird (2). Anschließend werden die zu untersuchenden Proben hinzugegeben, welche von den Beschichtungsantikörpern gebunden werden (3). Ein zweiter z.B. Biotin-gekoppelter, antigenspezifischer Antikörper wird hinzugegeben. Danach erfolgt die Zugabe eines Peroxidase-gekoppelten Streptavidins (4). Durch Zugabe eines bestimmten Peroxids startet eine farchemische Reaktion, welche durch Schwefelsäure gestoppt wird. Durch den niedrigen pH-Wert kommt es zu einem Farbumschlag (5). Via photospektrometrischer Messung kann die optische Dichte bestimmt werden. Diese ist proportional zur Menge der gebundenen Antigene.

2.2.3.1. Qualitativer Nachweis von HBsAg in den Zellkulturüberständen

2.2.3.1.1. Monoklonaler ELISA

Die aus der Transfektion gewonnenen Zellkulturüberstände wurden via Sandwich-ELISA auf HBsAg hin untersucht. Dafür wurden die ELISA Platten mit 100 µl der im Coating Puffer verdünnten Antikörpern MA18/7 zur Detektion von LHBs, Q19/10 zur Detektion von MHBs, C20/02 und HB01 zur Detektion der S-Domäne versetzt und über Nacht bei 4 °C geschüttelt.

Am nächsten Tag wurde zweimal mit jeweils 300 µl PBS/0,1%-Tween bzw. PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl ELISA Blocker Lösung geblockt. Anschließend wurde die ELISA Platte 2 h lang bei RT geschüttelt. Danach wurden 100 µl der zum Teil verdünnten Zellkulturüberstände auf die Platte pipettiert und 2 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurden 100 µl Konjugat 1 (Anti-HBs-Biotin Enzygnost-HBsAg 6.0 (1:40 in 0,1% Casein/PBS verdünnt) hinzugegeben und für 1 h geschüttelt. 100 µl Konjugat 2 (Streptavidin in POD 1:500 in 0,1% Casein/PBS verdünnt) wurden auf die ELISA Platte gegeben und für 30 Min. bei RT geschüttelt. Zuletzt wurden 100 µl TMB X-tra pipettiert und dunkel bei RT inkubiert. Nach angegebener Zeit wurde mittels 0,5 M Schwefelsäure

gestoppt und im ELISA Reader bei 450 nm und 630 nm gemessen. Zwischen jedem der oben genannten Schritte wurde, wie oben beschrieben, gewaschen.

2.2.3.1.2. Enzygnost HBsAg 6.0. ELISA

Das Testverfahren dient dem qualitativen Nachweis von HBsAg in Blutseren und entspricht den von der WHO geforderten Anforderungen im Prequalification-of-in-vitro-Diagnostics-Programm. Der Test wurde durchgeführt um nachzuweisen, ob der Primärantikörper des Kits in Konjugat I, welcher auch in den oben beschriebenen ELISA verwendet wurde, das in dieser Arbeit untersuchte HBsAg bindet. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob der in der Klinik gängige Test für den HBsAg-Nachweis auch für die Escapemutationen und die anderen (Sub)-Genotypen reaktiv ist. Für den qualitativen Nachweis von HBsAg wurde das Enzygnost HBsAg 6.0 Kit von Siemens genutzt. Der diagnostische Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und validiert. Die gesammelten Zellkulturüberstände (siehe Kapitel 2.2.2) wurden 1:10 in PBS verdünnt.

2.2.4. Indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von intrazellulärem HBsAg

Die indirekte Immunfluoreszenz wurde für den Nachweis von intrazellulärem HBsAg genutzt. Bei der Methode wird ein Primärantikörper auf zuvor fixierte Zellen gegeben, welcher das zu detektierende Protein bindet. Anschließend wird ein mit Fluorophor gekoppelter Sekundärantikörper hinzugegeben. Dieser bindet die gebundenen Primärantikörper. Durch die indirekte Bindung des Sekundärantikörpers an den zuvor gebundenen Primärantikörper ist es möglich, spezifische Antigene mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen in unterschiedlichen Farben dazustellen. Im Fluoreszenzmikroskop werden dann bei spezifischen Wellenlängen die Bindungen der Sekundärantikörper sichtbar. Am vierten Tag nach Transfektion wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd/0,2% TritonX-100/PBS für 30 Min. bei RT fixiert und permeabilisiert. Für 30 Min. wurde dann mit 10% FKS/PBS bei 4°C geblockt.

Danach wurde für eine Stunde mit einem Primärantikörper 37°C inkubiert. Anschließend wurde 30 Min. mit den Sekundärantikörpern inkubiert. Zwischen jedem Schritt wurde dreimal mit PBS gewaschen. Die Platte wurde dunkel bei 4°C mit PBS bedeckt und bis zur Analyse gelagert.

2.2.5. Bestimmung des quantitativen HBsAg (qHBsAg)

Der quantitative Nachweis des HBsAg wurde mittels des Architects von Abbott durchgeführt. Dafür wurden die Zellkulturüberstände 1:100 ad 150 μ l in PBS verdünnt und in Messröhrchen überführt. Die Messung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Damit die Werte anschließend in ihrer Transfektionseffizienz vergleichbar sind, wurden diese anschließend mittels SEAP-Test (2.2.6) normalisiert.

2.2.6. SEAP-Test

Als Marker für die Transfektionseffizienz wurde der SEAP-Test verwendet. Dieser Test weist die alkalische Phosphatase in den Zellkulturüberständen nach. Für die Expression wurde zuvor mit dem pSEAP kotransfiziert (2.2.2). 60 μ l der gewonnenen Transfektionsüberstände wurden für die Messung 30 Min. bei 65°C inkubiert, um endogene Phosphatasen zu inaktivieren.

50 μ l der Proben wurden daraufhin in eine 96-Well-ELISA-Platte pipettiert. Anschließend wurden 100 μ l 2x SEAP Puffer hinzugegeben. 50 mM SEAP-Substratlösung wurden frisch angesetzt. Es wurden jeweils 50 μ l Substrat auf die 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden die Werte zu unterschiedlichen Zeitabständen bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA Reader gemessen und gegen einen sequenziell verdünnten SEAP-Standard aufgetragen.

2.2.7. Produktion von pseudotypisierten Hepatitis-Delta-Viren (psHDV)

Die Produktion von pseudotypisierten HDV (psHDV) wurde in Huh7 Zellen durchgeführt, welche mit pSVL(D3) und dem für HBsAg-codierenden Plasmid kotransfiziert wurden. Die daraufhin sekretierten, pseudotypisierten Viren wurden für das Infektions- und Neutralisationsexperiment verwendet.

2.2.7.1. Transfektion

Pro 10 cm Platte wurden 5 μ g der HBsAg-codierenden Plasmide und 10 μ g pHDV1 ad 1050 μ l Optimem pipettiert. Das Gemisch wurde gevortext und zentrifugiert. Nach 5 Min. Inkubation bei RT wurde FugeneHD im Verhältnis 3:1 zur DNA hinzugegeben. Erneut

wurde gevortext und zentrifugiert. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch bei RT für 5-10 Min. inkubiert.

Derweil wurden die HuH7 Zellen bei einer Konfluenz von circa 80% auf den Zellkulturplatten mit PBS++ gewaschen und mit 10 ml DMEM complete bedeckt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf den Zellen verteilt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am ersten Tag nach der Transfektion wurden die Huh7 Zellen auf 15 cm Zellkulturplatten umgesetzt. Dafür wurden die 10 cm Zellkulturplatten mit PBS++ gewaschen und anschließend zum Ablösen der Zellen für 5 Min. mit 0,5% Trypsin/PBS bei 37°C trypsinisiert. Auf die zuvor mit Kollagen beschichteten Schalen wurden 15 ml Williams E complete vorgelegt. Die Zellen wurden in 5 ml Williams E complete resuspendiert und anschließend gleichmäßig auf den Platten verteilt. Drei Tage nach der Transfektion wurde erstmalig das Medium gewechselt. Der Zellkulturüberstand wurde verworfen, die Zellen wurden mit PBS++ gewaschen und die Platten wurden mit Williams E complete bedeckt. Am Tag sieben nach Transfektion wurden die Überstände gesammelt und erneut wurden die Platten mit Williams E complete aufgefüllt. Das Sammeln der Überstände wurde alle drei bis vier Tage fortgeführt. 15 Tage nach Transfektion (days post transfectionem, dpt) wurde das Medium ein letztes Mal gesammelt. Die Zellen wurden verworfen.

2.2.7.2. Sterilfiltration und Ultrafiltration psHDV

Im Anschluss an das Sammeln der Überstände wurden diese in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 15 Min. bei 4°C und 3000 x g zentrifugiert. Der zentrifugierte Virusüberstand wurde dann mittels Ultrafiltration über Vivaspin 20-Röhrchen circa 100-fach konzentriert. Die Überstände wurden bis zur Fertigstellung der Konzentrierung bei 4 °C gelagert.

2.2.7.3. RNA-Reinigung und Quantifizierung psHDV

Für die quantitative Bestimmung der in den Überständen enthaltenen Virusgenome wurde eine RT-qPCR durchgeführt. Die Signalentstehung der RT-qPCR ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Bei der RT-qPCR wird einer quantitativen (früher Real-Time) PCR eine reverse Transkription vorangestellt. Durch die Zugabe der reversen

Transkriptase wird die aus dem Probenmaterial isolierte RNA in DNA umgeschrieben. In der PCR erfolgt dann der direkte Nachweis der quantitativen DNA, indem neben den Forward- und Reverse-Primern, eine Sonde hinzugegeben wird, welche zwischen den zu amplifizierenden Sequenzen bindet. Die Sonde verfügt an ihrem 5'-Ende über einen sogenannten Reporter (Fluorophor-Rest). Am 3'-Ende der Sonde befindet sich ein Quencher, ein Molekül, welches ein bestimmtes Lichtspektrum absorbieren kann, ohne dabei Licht zu emittieren. Wird der Reporter durch eine externe Lichtquelle angeregt, so emittiert er Licht des Wellenlängenmaximums von 520 nm. Befindet sich der Quencher in unmittelbarer räumlicher Nähe des Reporters, so kann dieser die Emissionswellenlänge des Reporters absorbieren. Die räumliche Nähe wird im Falle der RT-qPCR durch die Nukleotidsequenz des Primers gewährleistet. Während der Amplifikation bindet die Sonde innerhalb der zu amplifizierenden Sequenz. Anschließend wird der Reporter durch die Endonukleaseaktivität der verwendeten Polymerase abgebaut und somit vom Quencher räumlich getrennt. Die Lichtabsorption des Quenchers wird dadurch unterbrochen und die Emission des Reporters wird durch den Detektor des LightCyclers messbar.

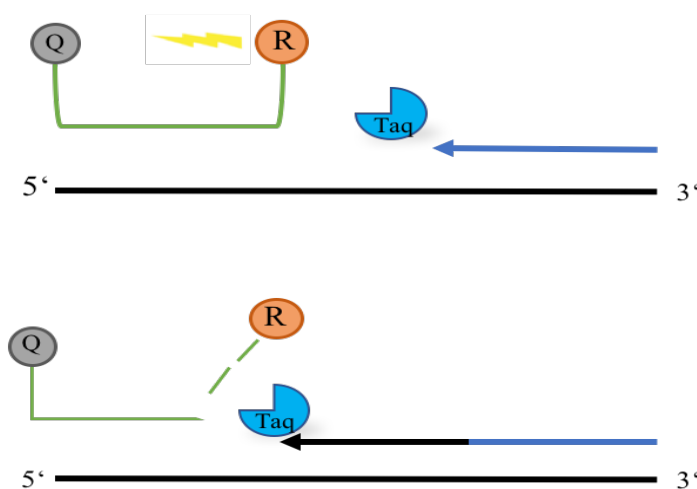


Abbildung 8: Signalentstehung der RT-qPCR. Gezeigt ist ein DNA-Molekül Einzelstrang (schwarz). Zu sehen ist die Sonde, welche die zu amplifizierende Sequenz zwischen dem Reporter (R) und Quencher (Q) bindet. Zudem ist die Taq- Polymerase (Taq) und ein Primer (blauer Pfeil) dargestellt. Durch Annähern der Primer an die DNA wird die Replikation mit der Taq gestartet. Die Sonde bindet ebenfalls im zu replizierenden Abschnitt. Das emittierte Licht des Reporters wird vom Quencher absorbiert. Erst durch die Endonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird der Reporter vom Quencher entfernt und das emittierte Licht kann ohne Absorption vom Detektor gemessen werden.

Die Reporteraktivität nimmt also, in Bezug auf die Gesamtmenge der Amplifikationsvorgänge, proportional zur Menge der durchgeführten Amplifikationen zu. Idealerweise wird bei jedem Amplifikationszyklus eine Verdopplung der in der Probe enthaltenen DNA erreicht, was die exponentiell verlaufende Kurve der Reporteraktivität in Abhängigkeit von der Zeit erklärt. Das Plateau der Kurve wird durch die Endlichkeit der Reaktionsprodukte der PCR-Reaktion sowie der Primer und Sonde erreicht.

	Name	Abkürzung	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Reporter:	Fluoreszein	FAM	494 nm	520nm
Quencher:	Black Hole Quencher 1	BHQ1	480-580 nm	

Tabelle 15: Quencher und Reporter der RT-qPCR mit Angaben von Emission und Absorption

Als Vorbereitung für die RT-qPCR wurden die in den Überständen befindlichen Viren lysiert und die enthaltene RNA mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Die RNA-Reinigung erfolgte unter Verwendung des innuPREP-virus-DNA/RNA-Kit von Analytik Jena. Die einzelnen Proben der Virusüberstände wurden ad 200µl mit RNase-freiem Wasser 1:10 verdünnt. Anschließend wurde die virale RNA in 50 µl 70°C-heißem RNase-/DNase-freiem H₂O eluiert und bei -20°C gelagert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Anschließend wurden Plasmid-DNA-Reste von der vorangegangenen Transfektion durch einen DNase-Verdau entfernt. Dafür wurde ein Master-Mix angesetzt, welcher pro Well 2 µl RNase-freie DNase1, 0,9 µl Pufferlösung und 1,1µl Wasser enthält. Anschließend wurden 5 µl der jeweiligen gereinigten Virus-RNA dazugegeben. Als Standardreihe diente eine serielle Verdünnung mit einer Ausgangskonzentration von 1x10⁸ HDV-RNA-Molekülen/ml. Des Weiteren wurde reines Wasser als Negativkontrolle pipettiert. Zuletzt wurde die Platte mit einer Folie abgeklebt, kurz zentrifugiert und im LightCycler für einen Zyklus mit einer Dauer von 60 Min. auf 37°C temperiert und anschließenden einmalig für eine Min. auf 95°C erhitzt. Für die RT-qPCR wurde dann kurz vor Ende des DNase-Verdaus ein PCR-Mastermix angesetzt. Dieser bestand pro Well aus 1µl HDV-F, 1µl HDV-R, 0,5 µl HDV-P, 5 µl 4xFast Virus Mastermix und 3,5 µl RNase-freiem Wasser. Am Ende des DNase-Verdaus erfolgte eine weitere Zentrifugation der Platte, damit kein Kondensat der Proben an der zu verwerfenden Folie verbleibt. Anschließend wurden pro Well 11 µl des PCR-Mastermixes zum zuvor verdauten Wellinhalt hinzu pipettiert und erneut abgeklebt.

Im LightCycler wurde folgendes Programm durchgeführt:

RT-qPCR- Abschnitt	Zyklen	Zieltemperatur in °C	Temperaturänderung in °C/s	Dauer	Messung
Reverse- Transkription:	1	54	4,4	5 Min	keine
Aktivierung:	1	95	4,4	20 Sek	keine
PCR:	45				
Denaturierung		95	4,4	20 Sek	keine
Annealing		64	2,2	30 Sek	keine
Elongation		72	4,4	10 Sek	erfolgt
Abkühlen:	1	40	2,2	30 Sek	keine

Tabelle 16: LightCycler-Programm für RT-qPCR

Die aus der RT-qPCR hervorgehenden Werte stellen die RNA-Konzentration im jeweiligen Well dar und wurden im Anschluss auf die eigentliche Konzentration der Viruskonzentrate zurückgerechnet.

2.2.7.4. Bestimmung des qHBsAg der Viruskonzentrate

Der quantitative Nachweis des HBsAg (qHBsAg) wurde mit dem Abbott Architect durchgeführt (2.2.5). Dafür wurden die Viruskonzentrate 1:100 in PBS verdünnt.

2.2.8. Infektion von HepG2-NTCP Zellen mit Hepatitis-delta-Virus -Konzentraten

Für die Infektion der HepG2-NTCP Zellen wurden diese 72h vor Infektion auf einer 48-Well Platte zu 75% ausgesät. Jedes Well der 48-Well Platte wurde zuvor kollagenisiert und anschließend mit 200µl DMEM complete bedeckt. Für die Expression des NTCP wurden DMEM complete zusätzlich mit Puromycin (1 µg/ml), Doxycyclin (6 µg/ml) und G418 (100 µg/ml) versetzt. Die Zellen wurden bei 37°C für 2 h im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde ein erster Medienwechsel auf HGM mit 2% DMSO sowie Puromycin, Doxycyclin und G418 durchgeführt. Zusätzlich wurden die Wells mit Caspofungin (50µg/ml 1:1000) und EGF (1:1000) versetzt. Die Platte wurde zuvor mit PBS++ gewaschen. Es folgten 72 h (bzw. 24h) Inkubation bei 37°C im Brutschrank. Am Tag der Infektion waren die Zellen zu 75% konfluent. Für die Infektion wurden genau $1 \cdot 10^8$ GE/ml der Viruskonzentrate ad 250µl reinem HGM-Medium verdünnt. Die Zellkulturplatte wurde mit reinem HGM gewaschen und anschließend mit 250 µl HGM mit 2% DMSO f.c. und 4% PEG f.c. sowie Puromycin, Doxycyclin und

G418 aufgefüllt. Die verdünnten Viruskonzentrate wurden anschließend auf die Platte gegeben und die Platte wurde leicht geschwenkt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Am zweiten Tag nach Infektion erfolgte ein erster Medienwechsel. Dafür wurden die Zellen zweimal mit reinem HGM gewaschen und anschließend mit 500 µl HGM mit 2% DMSO aufgefüllt. Ein Medienwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Elf Tage nach Infektion (days post infectionem; dpi) wurden die Zellen fixiert und für die Immunfluoreszenz vorbereitet (2.2.9.1).

2.2.9. Neutralisation der Hepatitis-Delta-Viren in HepG2-NTCP

Für die Neutralisation der HDV in HepG2-NTCP Zellen wurden die Zellen 72 h vor Infektion zu 75% auf einer 48-Well Platte ausgesät. Jedes Well der 48-Well Platte wurde zuvor kollagenisiert und anschließend mit 500µl HGM bedeckt. Für die Expression des NTCP wurde das HGM zusätzlich mit Puromycin (1µg/ml), Doxycyclin (6µg/ml) und G418 (100µg/ml) versetzt.

Es wurden $1 \cdot 10^8$ GE/ml der jeweiligen Viruskonzentrate zusammen mit jeweils unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen (10 mIU/ml, 100 mIU/ml und 500 mIU/ml) gereinigter IgG der Anti-S, Anti-LMS und human boost Anti-S ad 250 µl HGM verdünnt und durch Schwenken vermischt. Als weiterer mAk wurden 2,5µl MA18/7 (1µg/ml) ebenfalls mit Viruskonzentrat gemischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 Min. bei 37°C. Derweil wurden die Zellen mit reinem HGM gewaschen und anschließend 250 µl HGM mit 8% PEG und 4% DMSO bedeckt. Zusätzlich wurden die Wells mit Doxycyclin (6 µg/ml 1:1000), Caspofungin (50µg/ml 1:1000) und EGF (1:1000) versetzt. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Wells mit 250 µl der Viruskonzentrat-Antikörpermischung aufgefüllt. Am ersten Tag nach Infektion (dpi) wurden die Zellen zweimalig mit reinem HGM gewaschen und anschließend mit 500µl HGM mit 2% DMSO und Caspofungin (50 µg/ml f.c.) aufgefüllt. Ein Medienwechsel erfolgte alle zwei Tage. Elf Tage nach Infektion (dpi) wurden die Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet (2.2.9.1).

2.2.9.1. Fluoreszenzmikroskopie zur Detektion von infizierten HepG2-NTCP Zellen nach Infektion und Neutralisation

Elf Tage nach Infektion (dpi) wurden die Zellen mit 4% PFA/0,2% Triton-X-100 für 30 Min. bei RT fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.4 vorbereitet.

Als Primärantikörper wurde Anti-HDV in einer 1:200 Verdünnung eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde 568 Goat-Anti-Human in einer 1:400 Verdünnung eingesetzt. Für das Anfärben der Zellkerne wurde DAPI in einer 1:1.000 Verdünnung verwendet. Die Platte wurde dunkel bei 4°C mit PBS bedeckt gelagert. In der Fluoreszenzmikroskopie wurden anschließend die Infektionsereignisse detektiert und mit Übersichtsaufnahmen dokumentiert.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, ob HepG2-Zellen die Fähigkeit besitzen, SVPs der HBV Genotypen F (Subgenotypen F1-F4) und H, sowie HBsAg mit Escapemutanten G145R, P120Q und Q129P im Kontext des Subgenotyps F3 zu produzieren. Dafür wurden HepG2-Zellen mit den in Tabelle 12 genannten Expressions-Plasmiden transfiziert. Anschließend wurden die SVPs auf qHBsAg im Enzygnost-HBsAg 6.0 von Siemens, sowie mittels In-house-Sandwich-ELISA und intrazellulär in der Immunfluoreszenz auf die Expression des HBsAg hin untersucht.

Ziel der Arbeit war es zudem mit HBV-Oberflächenproteinen der Genotypen F und H, sowie solchen mit Escapemutationen psHDV in HuH7 Zellen herzustellen und mittels RT-PCR zu quantifizieren. Anschließend wurden die psHDV auf ihre Infektiosität und Neutralisierbarkeit durch pAk Anti-S und pAk Anti-LMS in HepG2-NTCP-Zellen untersucht. Dafür wurden definierte Mengen psHDV mit den o.g. pAk in einer Titrationsreihe präinkubiert.

Der anschließende Vergleich der Infektion und Neutralisation erfolgte mittels Immunfluoreszenz. Hier sollte besonders der Unterschied zwischen der Neutralisation durch pAk Anti-S und der Neutralisation durch pAk Anti-LMS untersucht werden.

3.1. Nachweis der amplifizierten Plasmid-DNA

Die verwendeten Plasmide wurden in chemisch-kompetente E. coli Stellar transformiert und anschließend mit dem QiagenMidi Kit aufgereinigt. Die quantitative Menge wurde mittels Nanodrop bestimmt. Um DNA-Verunreinigungen auszuschließen und die Korrektheit der Klonierung zu überprüfen, wurde neben einer Sequenzierung auch ein Restriktionsenzymverdau mit den Restriktionsenzymen XhoI und MluI durchgeführt. Anschließend wurden die Konstrukte über eine Gelelektrophorese auf einem Agarosegel (Abbildung 9) dargestellt.

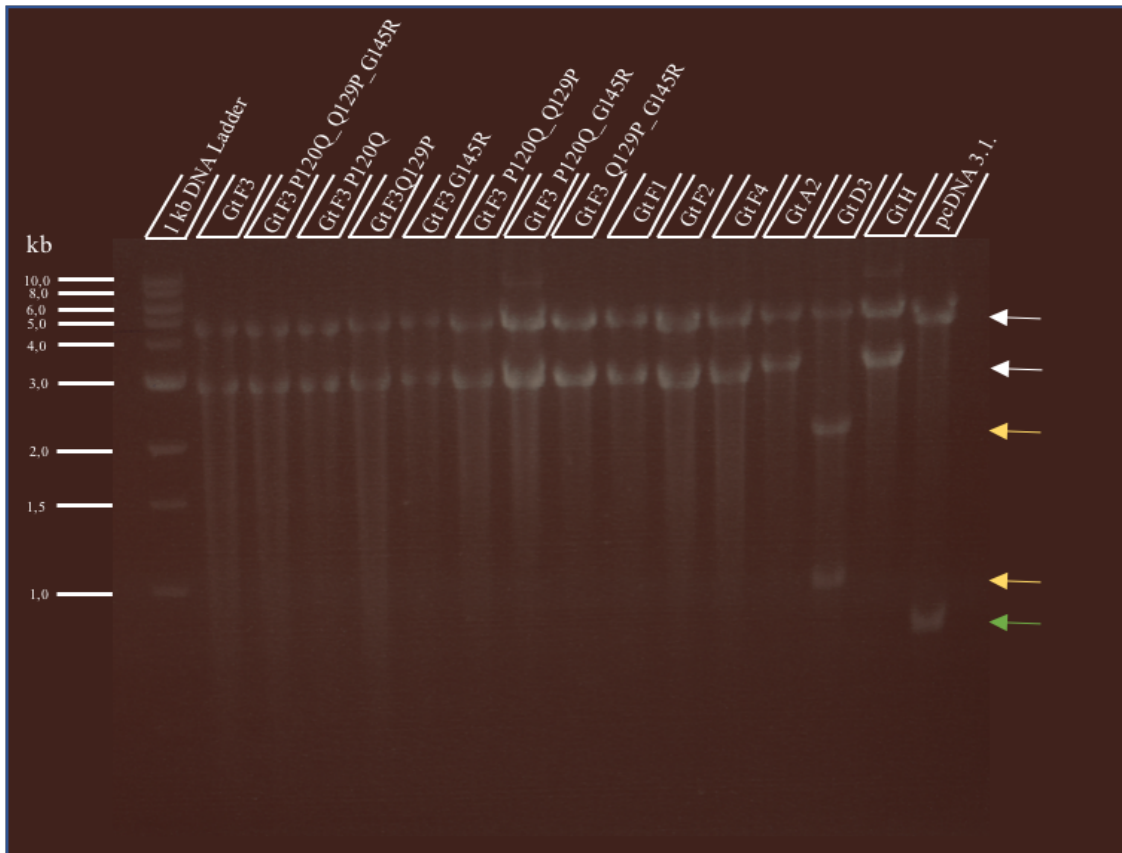


Abbildung 9: Restriktionsanalyse der Plasmide. Zum Nachweis der korrekt isolierten Plasmid-DNA wurde ein Restriktionsenzymverdau durchgeführt. Dafür wurden jeweils 0,5 μ l der Restriktionsenzyme MluI und XhoI mit 1 μ l Fast Digest Green Puffer und 2 μ g der jeweiligen DNA ad 10 μ l H₂O für 10 Min. bei 37°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 2% Agarose/TAE-Gel geladen. Als Marker wurde der NEB Quick load Purple 1 kb (1kb DNA Ladder) verwendet. Banden bei 4,5kb und 3 kb gekennzeichnet mit weißen Pfeilen. Die Banden auf Höhe von 2 kb und 1 kb sind mit gelben Pfeilen markiert. Bande unterhalb der 1kb ist mit einem grünen Pfeil markiert.

Nach dem Restriktionsenzymverdau sind zwei bzw. drei unterschiedlich große DNA-Fragmente entstanden. Bei den meisten Plasmiden sind zwei Banden auf Höhe von 4,5 kb und 3 kb zu sehen (Abbildung 9, weiße Pfeile). Beim Subgenotyp D3 sind zusätzlich zur Bande bei 4,5 kb, zwei weitere Banden auf Höhe von 2 kb und 1 kb zu sehen (Abbildung 9, gelbe Pfeile). Bei der Negativkontrolle pcDNA3.1+ sind zwei Banden zu sehen, wobei sich eine Bande etwas unterhalb der 1 kb (Abbildung 9, grüner Pfeil) Markerbande abzeichnet. Es sind keine Verunreinigungen, im Sinne von nicht zuzuordnenden Banden, ersichtlich.

Im Anschluss wurden die Plasmide eingeschickt und durch die Firma LGC mittels Sanger Sequenzierung auf ihre HBsAg-codierende Sequenz überprüft.

3.2. Produktion subviraler Partikel (SVP) in HepG2-Zellen und Nachweis von HBsAg

Die Antigenität von SVP, bestehend aus den zu untersuchenden HBsAg-Varianten, sollte nach Transfektion von HepG2-Zellen mit entsprechenden HBsAg-Expressionsplasmiden durch verschiedene immunologische Assays untersucht werden.

Zunächst wurden die Zellen mit den in Tabelle 12 beschriebenen HBsAg-Plasmiden transfiziert. Der Überstand wurde 4 dpt gesammelt. Zunächst erfolgte die qualitative Messung von HBsAg mittels diagnostisch zugelassenem Enzygnost-HBsAg 6.0 ELISA (Abbildung 10). Die quantitative Messung des HBsAg (qHBsAg) erfolgte mittels Abbott Architect (Abbildung 11). Um das gemessene qHBsAg an die Transfektionseffizienz einzelner Plasmide anzupassen, wurde zusätzlich mittels SEAP-Plasmid transfiziert (2.2.6). Anschließend wurde ein SEAP-Assay der identischen Überstände durchgeführt. Die Ergebnisse wurden dann auf SEAP normalisiert.

3.2.1. Nachweis von HBsAg mittels diagnostisch zugelassenem ELISA

Im ersten Schritt wurden die Zellkulturüberstände im qualitativen Enzygnost HBsAg 6.0 ELISA untersucht, welcher als kommerzieller ELISA etabliert ist und als klinisch diagnostischer Suchtest verwendet wird (Abb.10).

Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die Ergebnisse wurden nach Angaben des Herstellers validiert. Die Proben der Zellkulturüberstände wurden 1:10 in PBS verdünnt eingesetzt.

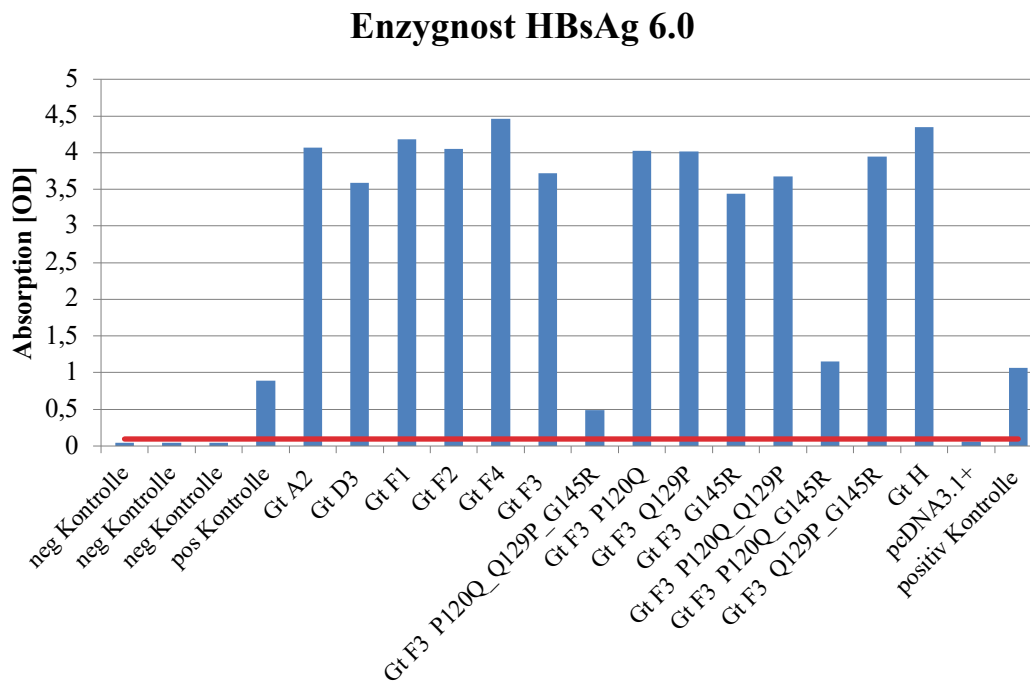


Abbildung 10: HBsAg Nachweis der Transfektionsüberstände im kommerziellen-Enzygnost HBsAg 6.0 von Siemens. Das Testverfahren dient dem qualitativen Nachweis von HBsAg in Blutseren. Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die aus der Transfektion gewonnenen Proben wurden 1:10 in PBS verdünnt eingesetzt. (Gt= (Sub)-Genotyp; P120Q = Mutation von Prolin zu Glutamin an AS-Stelle 120 des SHBs; Q129P = Mutation von Glutamin zu Prolin an AS-Stelle 129 des SHBs; G145R = Mutation von Glycin zu Arginin an AS Stelle 145 des SHBs), pcDNA3.1+ = Plasmid ohne Insert; Negativkontrolle diente als Cut-off-Wert (0,07 OD) und wurde als rote Linie dargestellt.

Alle Proben konnten mittels Enzygnost HBsAg 6.0 von Siemens nachgewiesen werden (Abbildung 10). Die Dreifach-Mutante des Subgenotyps F3 P120Q_Q129P_G145R reagierte im Verhältnis zu den anderen Proben schwächer, lag dennoch oberhalb des Cut-off-Wertes. Die Doppelmutante des Subgenotyps F3 P120Q_G145R zeigte im Verhältnis zu den anderen Proben eine schwächere Absorption, wohingegen die Doppelmutation des Subgenotyps F3 Q129P_G145R besonders gut absorbierte. Im Verhältnis zu den Einzelmutationen des Subgenotyps F3 zeigte die Mutation G145R eine etwas geringere Absorption.

3.2.2. Quantitativer Nachweis von HBsAg (qHBsAg) mittels Abbott Architect

Die Gesamtkonzentration an qHBsAg mittels Abbott Architect, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben, ermittelt (Abbildung 11).

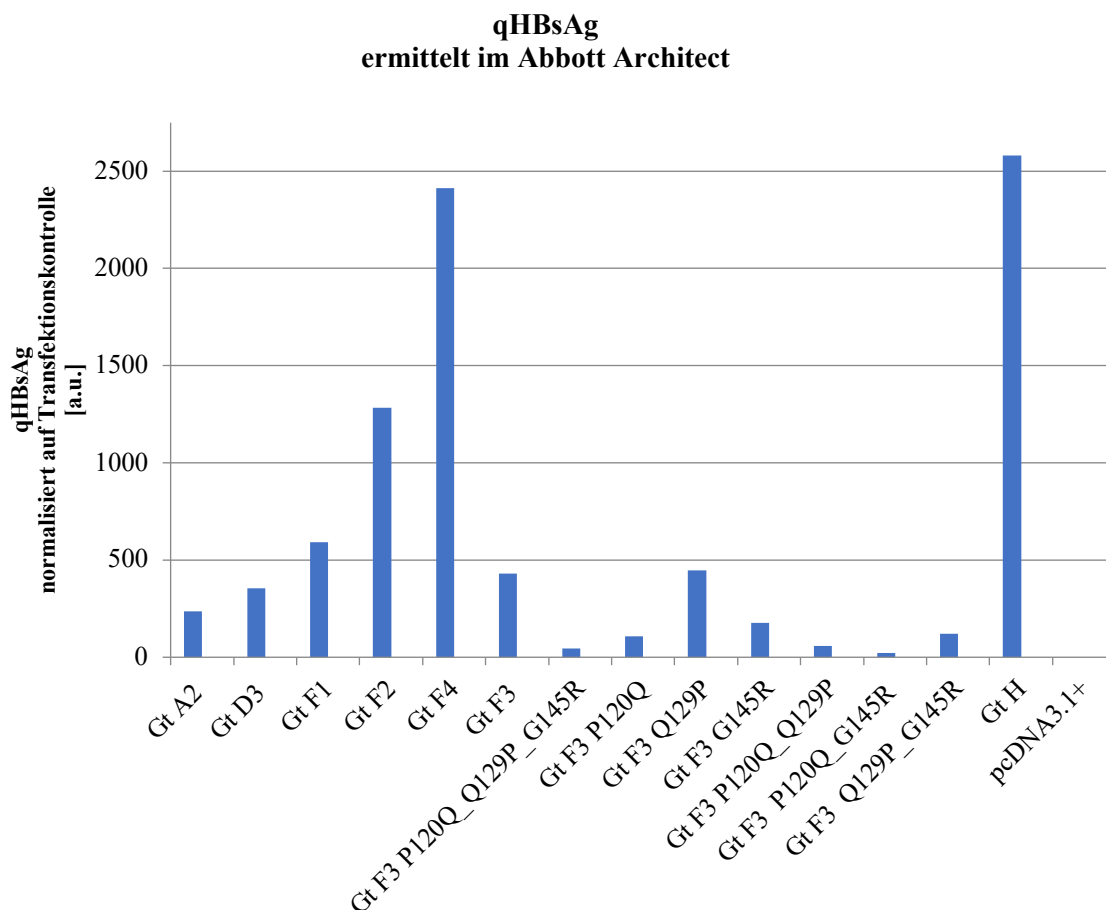


Abbildung 11: qHBsAg der Zellkulturüberstände ermittelt im Abbott Architect. 150µl der 4 dpt gesammelten Zellkulturüberstände von HepG2-Zellen, welche mit HBsAg-codierenden Plasmiden transfiziert wurden, wurden in Probenröhrchen überführt und mittels Abbott Architect auf HBsAg untersucht. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde ein SEAP-Test durchgeführt und die diagnostischen Messwerte normalisiert. Gt = (Sub)-Genotyp; P120Q = Mutation von Prolin zu Glutamin an AS-Stelle 120 des SHBs; Q129P = Mutation von Glutamin zu Prolin an AS-Stelle 129 des SHBs; G145R = Mutation von Glycin zu Arginin an AS-Stelle 145 des SHBs; pcDNA3.1+ = Plasmid ohne Insert, diente als Negativkontrolle; a.u. = arbitrary Unit(s).

Abbildung 11 zeigt die qHBsAg Konzentration der Zellkulturüberstände. qHBsAg konnte in allen Überständen nach Transfektion, mit Ausnahme der Negativkontrolle (pcDNA3.1+), nachgewiesen werden.

Genotyp H sekretierte mit 2580 arbitrary units (a.u.) am meisten qHBsAg. Der Subgenotyp F2 (1284 a.u.) sekretierte etwa 52% mehr im Vergleich zum Subgenotyp F1(591 a.u.). Der Subgenotyp A2 (234 a.u.) sekretierte in etwa 54% mehr als der Wildtyp des Subgenotyps F3 (430 a.u.). Subgenotyp F3 sekretierte etwa gleich viel wie die Escape

Mutante F3 Q129P (445 a.u.), welche unter allen Escape-Mutanten am meisten HBsAg sekretierte. Die andere Einzelmutationen F3 G145R hat etwa zweieinhalbmal weniger produziert (176 a.u.). F3 P120Q (107 a.u.) produzierte etwa viermal weniger. Am wenigsten HBsAg wurde nach Transfektion mit der Doppelmutation des Subgenotyps F3 P120Q_G145R (22 a.u.) sekretiert. Der Subgenotyp F3 P120Q_Q129P_G145R (45 a.u.) sekretierte etwa doppelt so viel. Auffällig ist, dass Subgenotyp F3 P120Q_Q129P (58 a.u.) fast dreimal so viel und Subgenotyp F3 Q129P_G145R 5,3 mal so viel produzieren konnte. Subgenotyp F3 Q129P produzierte besonders viel qHBsAg im Vergleich zu den anderen Escapemutanten. Auffällig ist hier, dass die Doppelmutante des Subgenotyps F3 Q129P_G145R besonders wenig sekretieren konnte. Subgenotyp A2 produzierte von den Wildtypen am wenigsten HBsAg. Zellen, welche mit leerem pcDNA3.1+ transfiziert wurden, produzierten kein HBsAg.

3.2.3. Nachweis der drei Oberflächenproteine LHBS, MHBs und SHBs mittels In-house-Sandwich-ELISA

Der qualitative Nachweis der drei Oberflächenproteine LHBS, MHBs und SHBs erfolgte im Sandwich-ELISA mittels mAk, welche spezifisch an Epitope der Oberflächenproteine binden. Damit die Transfektionseffizienz untereinander verglichen werden kann, wurde, wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben, mit SEAP kotransfiziert. Die mAk wurden als Beschichtungsantikörper verwendet. Der mAk MA18/7, welcher gegen ein Epitop im PräS1gerichtet ist, bindet LHBS. Ebenfalls wurde der mAk Q19/10 verwendet, welcher ausschließlich MHBs bindet. Dieser ist gegen ein glykosiliertes Epitop in der PräS2-Region gerichtet ist, welches nur im MHBs glykosiliert ist. Für die Bindung der S-Domäne wurden der mAk C20/02 und der mAk HB01 verwendet. Diese sind gegen unterschiedliche Epitope im AGL gerichtet. Die Detektion erfolgte mit Biotin gekoppeltem Anti-HBs und POD-gekoppeltem Streptavidin aus dem Enzygnost HBsAg 6.0. Kit.

3.2.3.1. Detektion von LHBS mittels Sandwich ELISA mit MA18/7

In Abbildung 12 ist der Sandwich ELISA mit dem mAk MA18/7 gezeigt, welcher gegen das 20-DPXF-23 Motiv der PräS1-Domäne des HBsAg gerichtet ist und somit an LHBS bindet.

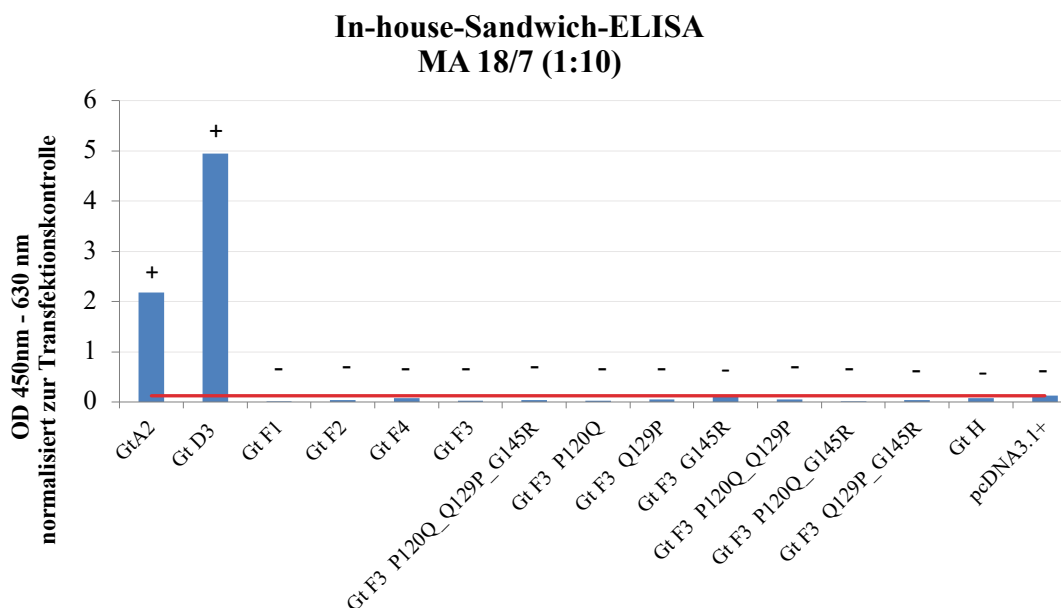


Abbildung 12: In-house-Sandwich-ELISA zur Detektion von LHBs mit mAk MA18/7 verdünnter Zellkulturüberstände. Für den Nachweis von LHBs wurden die ELISA-Platten mit 100 µl in Coating Puffer verdünnte mAk MA18/7 versetzt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde zweimal mit jeweils 300 µl PBS/0,1% Tween bzw. PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl 10% FKS in TNE (pH 7,4) geblockt und für 2 h bei RT geschüttelt. 100 µl der 1:10 verdünnten Zellkulturüberstände wurden auf die Platte pipettiert und für 2 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurden die Platten mit 100 µl Anti-HBs-Biotin Enzygnost HBsAg 6.0 (1:40 in 0,1% Casein/PBS verdünnt) versetzt und für 1 h bei RT geschüttelt. 100 µl Streptavidin-POD 1:500 wurden in 0,1%/Casein/PBS verdünnt. Zuletzt wurden 100 µl TMB X-tra pipettiert und dunkel bei RT inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 0,5 M Schwefelsäure nach 2 Min. und 10 Sek. gestoppt. Die optische Dichte wurde bei 450 nm und 630 nm bestimmt. Die gemessenen Werte wurden mittels SEAP-Assay normalisiert. Gt = (Sub-) Genotyp; P120Q = Mutation von Prolin zu Glutamin an AS-Stelle 120 des SHBs; Q129P = Mutation von Glutamin zu Prolin an AS-Stelle 129 des SHBs; G145R = Mutation von Glycin zu Arginin an AS-Stelle 145 des SHBs; pcDNA3.1+ = Plasmid ohne Insert, diente als Negativkontrolle. Cut-off-Wert (0,12) als rote Linie dargestellt. Bei grenzwertigen Ergebnissen sind Werte oberhalb des Cut-offs mit einem + gekennzeichnet. Werte unterhalb des Cut-offs sind mit einem - gekennzeichnet.

Nur für die Subgenotypen A2 und D3 konnte ein eindeutiger Nachweis des LHBs in den Überständen nachgewiesen werden. Für die übrigen Subgenotypen F1, F2, F3, F4, H und den übrigen F3-Genotypmutanten konnte keine über dem Cut-off-Wert liegende Absorption festgestellt werden.

Um potenzielle Signalverluste durch Verdünnung auszuschließen, wurden die Proben erneut unverdünnt eingesetzt (Abbildung 13).

In-house-Sandwich-ELISA MA 18/7

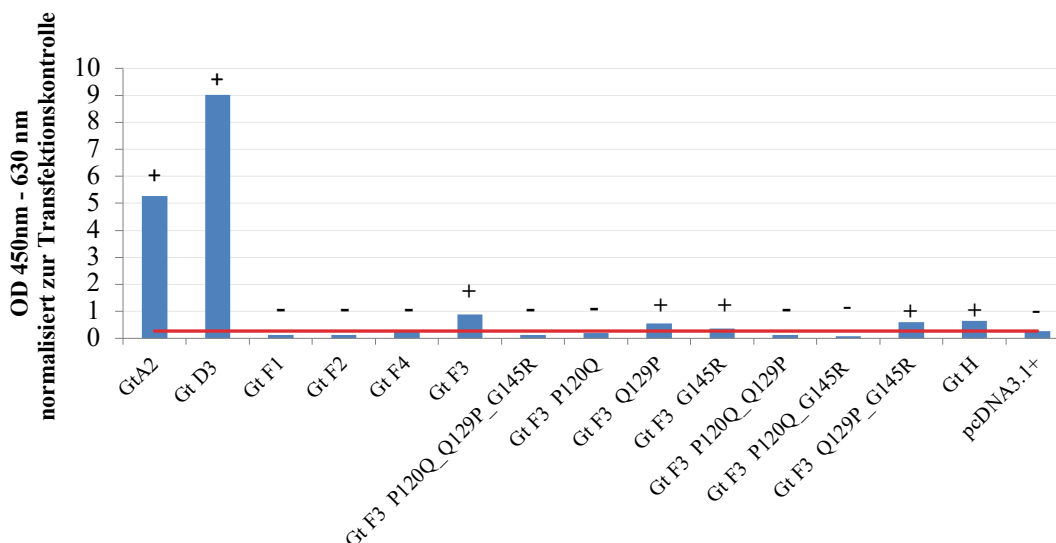


Abbildung 13: In-house- Sandwich-ELISA zur Detektion von LHBs mit mAk MA18/7 unverdünnter Zellkulturüberstände. Für den Nachweis von LHBs wurden die ELISA-Platten mit 100µl in Coating Puffer verdünnte mAk MA18/7 versetzt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde zweimal mit jeweils 300µl PBS/0,1% Tween bzw. PBS gewaschen und anschließend mit 200µl 10% FKS in TNE (pH 7,4) geblockt und für 2 h bei RT geschüttelt. 100µl der unverdünnten Zellkulturüberstände wurden auf die Platte pipettiert und für 2h bei RT geschüttelt. Anschließend wurden die Platten mit 100µl Anti-HBs-Biotin Enzygnost HBsAg 6.0 (1:40 in 0,1%Casein/PBS verdünnt) versetzt und für 1 h bei RT geschüttelt. 100µl Streptavidin POD 1:500 wurden in 0,1%/Casein/PBS verdünnt. Zuletzt wurden 100µl TMB X-tra pipettiert und dunkel bei RT inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 0,5 M Schwefelsäure bei 2 Min. 10 Sek. gestoppt. Die optische Dichte wurde bei 450nm und 630 nm bestimmt. Die gemessenen Werte wurden mittels SEAP-Assay normalisiert. Gt= (Sub)-Genotyp; P120Q = Mutation von Prolin zu Glutamin an AS-Stelle 120 des SHBs; Q129P = Mutation von Glutamin zu Prolin an AS-Stelle 129 des SHBs; G145R = Mutation von Glycin zu Arginin an AS-Stelle 145 des SHBs, pcDNA3.1+ = Plasmid ohne Insert diente als Negativkontrolle. Der Cut-off-Wert (0,27) ist als rote Linie dargestellt. Grenzwertige Ergebnisse sind bei Werten oberhalb des Cut-offs mit einem + gekennzeichnet. Werte unterhalb des Cut-offs sind mit einem - gekennzeichnet.

Zu sehen in Abbildung 13 ist ein deutliches Absorptionssignal für die Subgenotypen D3 und A2. Auch der Subgenotyp F3, Genotyp F3 Q129P_G145R, sowie der Subgenotyp F3 mit den Einzelmutationen F3 Q129P und F3 G145R und auch der Genotyp H zeigen Werte über dem ermittelten Cut-Off und sind mit einem + gekennzeichnet.

Für alle anderen Konstrukte konnte keine Absorption über dem Cut-off Wert nachgewiesen werden.

3.2.3.2. Detektion von MHBs mittels Sandwich ELISA mit Q19/10

Für den Nachweis des MHBs in den Zellkulturüberständen wurde ein Sandwich-ELISA unter der Verwendung des mAk Q19/10 durchgeführt, welcher das N-Glykan in der PräS2-Domäne bindet, welches nur im MHBs vorhanden ist (Abbildung 14).

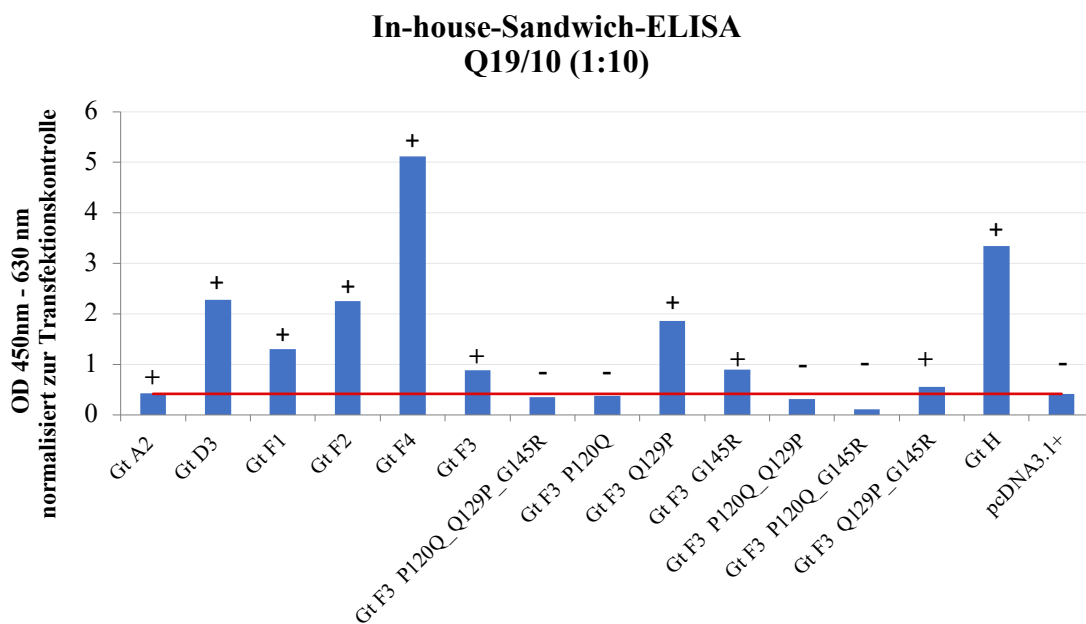


Abbildung 14: In-house-Sandwich-ELISA zur Detektion von MHBs mit mAk Q19/10 verdünnter Zellkulturüberstände. Für den Nachweis von MHBs wurden die ELISA-Platten mit 100 µl in Coating Puffer verdünnte mAk Q19/10 versetzt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde zweimal mit jeweils 300 µl PBS/0,1% Tween bzw. PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl 10% FKS in TNE (pH 7,4) geblockt und für 2 h bei RT geschüttelt. 100 µl der 1:10 verdünnten Zellkulturüberstände wurden auf die Platte pipettiert und für 2 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurden die Platten mit 100µl Anti-HBs-Biotin Enzygnost HBsAg 6.0 (1:40 in 0,1%Casein/PBS verdünnt) versetzt und für 1 h bei RT geschüttelt. 100 µl Streptavidin-POD 1:500 wurden in 0,1%/Casein/PBS verdünnt. Zuletzt wurden 100 µl TMB X-tra pipettiert und dunkel bei RT inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 0,5 M Schwefelsäure nach 6 Min. und 20 Sek. gestoppt. Die optische Dichte wurde bei 450 nm und 630 nm bestimmt. Die gemessenen Werte wurden mittels SEAP-Assay normalisiert. Gt = (Sub)-Genotyp; P120Q = Mutation von Prolin zu Glutamin an AS-Stelle 120 des SHBs; Q129P = Mutation von Glutamin zu Prolin an AS-Stelle 129 des SHBs; G145R = Mutation von Glycin zu Arginin an AS-Stelle 145 des SHBs; pcDNA3.1+ = Plasmid ohne Insert, diente als Negativkontrolle. Der Cut-off Wert (0,42) ist als rote Linie dargestellt. Grenzwertige Ergebnisse sind bei Werten oberhalb des Cut-offs mit einem + gekennzeichnet. Unterhalb des Cut-off liegende Werte sind mit einem - gekennzeichnet.

Sowohl für die (Sub)-Genotypen D3, F1, F2, F3, F4 und H als auch für die Mutanten des Subgenotyps F3 Q129P und F3 G145R konnte ein deutlicher Nachweis für MHBs gezeigt

werden (Abbildung 14). Die Doppelmutante des Subgenotyps F3 Q129P_G145R, sowie der Subgenotyp A2 zeigten einen grenzwertigen Nachweis über dem Cut-off-Wert und sind in Abbildung 14 mit einem + gekennzeichnet.

Zur Überprüfung der schwach positiven Konstrukte wurde ein weiterer Sandwich-ELISA für Q19/10, diesmal mit unverdünnten Zellkulturüberständen durchgeführt (Abb.15).

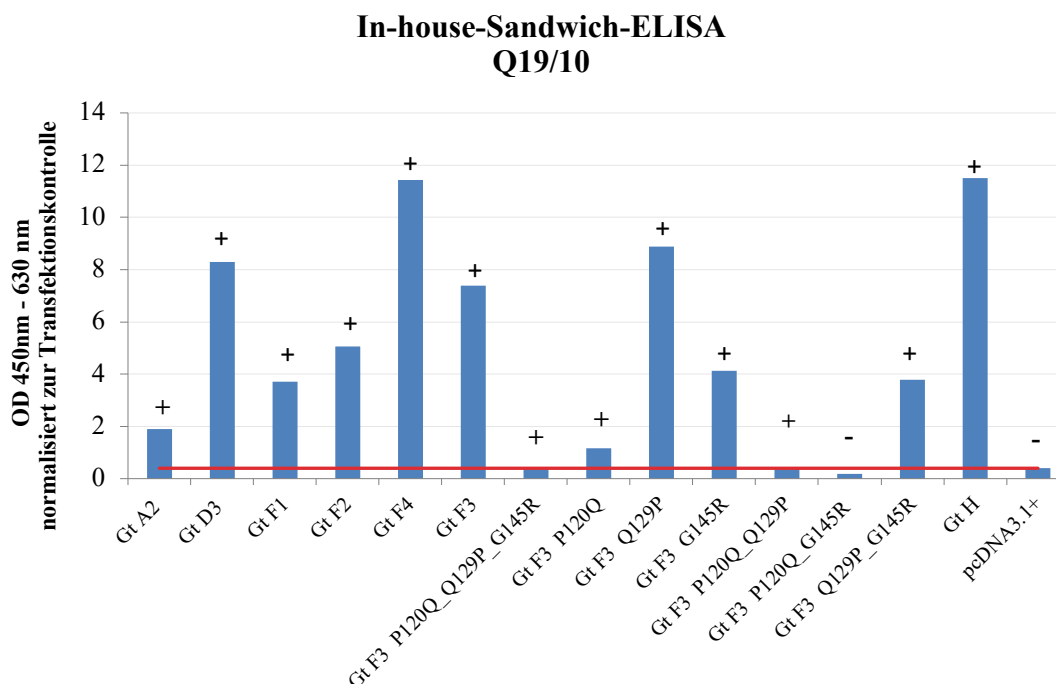


Abbildung 15: In-house-Sandwich-ELISA zur Detektion von MHBs mit mAk Q19/10 unverdünnter Zellkulturüberstände. Für den Nachweis von MHBs wurden die ELISA-Platten mit 100µl in Coating Puffer verdünnte mAk Q19/10 versetzt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde zweimal mit jeweils 300µl PBS/0,1% Tween bzw. PBS gewaschen und anschließend mit 200µl 10% FKS in TNE (pH 7,4) geblockt und für 2 h bei RT geschüttelt. 100µl der unverdünnten Zellkulturüberstände wurden auf die Platte pipettiert und für 2h bei RT geschüttelt. Anschließend wurden die Platten mit 100µl Anti-HBs-Biotin Enzygnost HBsAg 6.0 (1:40 in 0,1%Casein/PBS verdünnt) versetzt und für 1 h bei RT geschüttelt. 100µl Streptavidin POD 1:500 wurden in 0,1%/Casein/PBS verdünnt. Zuletzt wurden 100µl TMB X-tra pipettiert, dunkel bei RT inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 0,5 M Schwefelsäure bei 3 Min. 30 Sek. gestoppt. Die optische Dichte wurde bei 450nm und 630 nm bestimmt. Die gemessenen Werte wurden mittels SEAP-Assay normalisiert. Gt= (Sub)-Genotyp; P120Q = Mutation von Prolin zu Glutamin an AS-Stelle 120 des SHBs; Q129P = Mutation von Glutamin zu Prolin an AS-Stelle 129 des SHBs; G145R = Mutation von Glycin zu Arginin an AS-Stelle 145 des SHBs, pcDNA3.1+ = Plasmid ohne Insert diente als Negativkontrolle. Der Cut-off-Wert (0,40) ist als rote Linie dargestellt. Grenzwertige Ergebnisse sind oberhalb des Cut-offs mit einem + und unterhalb des Cut-offs mit einem - gekennzeichnet.

Für alle Konstrukte außer der Doppelmutation F3 P120Q_G145R konnte eine Absorption oberhalb des Cut-off-Wertes nachgewiesen werden. Die Dreifachmutation F3 P120Q_Q129P_G145R und die Doppelmutation F3 P120Q_Q129P zeigten sich grenzwertig positiv und sind mit einem + gekennzeichnet (Abbildung 15).

3.2.3.3. Detektion von SHBs mittels Sandwich-ELISA mit den Antikörpern C20/02 und HB01

Der in Abbildung 16 gezeigt eingesetzte mAk C20/02 bindet im AGL des SHBs ein konformationelles Epitop.

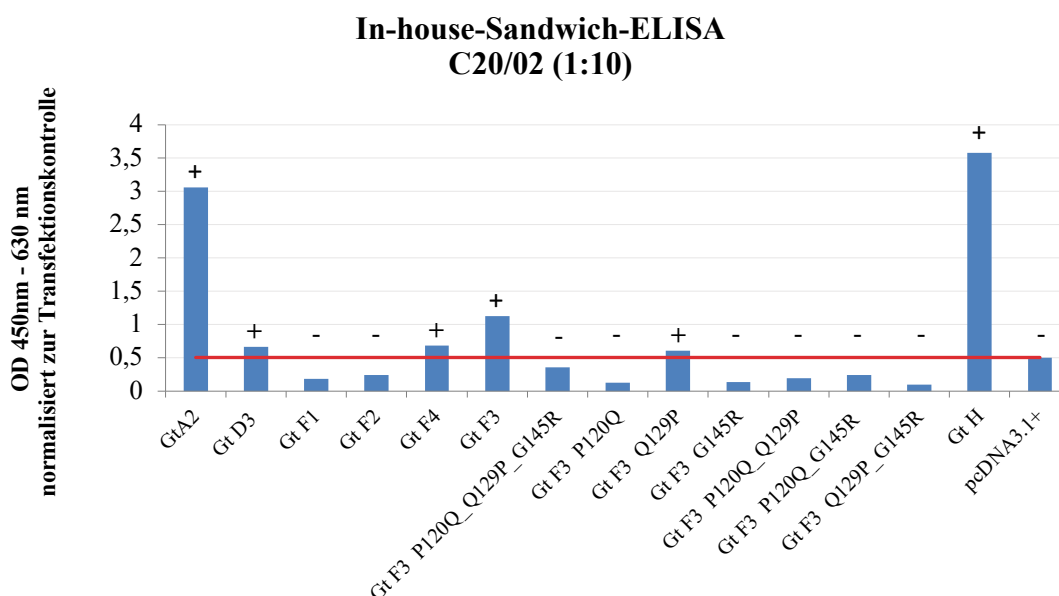


Abbildung 16: In-house-Sandwich-ELISA zur Detektion von SHBs mit mAk C20/02 verdünnter Zellkulturüberstände. Für den Nachweis von SHBs wurden die ELISA-Platten mit 100 µl in Coating Puffer verdünnte mAk C20/02 versetzt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde zweimal mit jeweils 300 µl PBS/0,1% Tween bzw. PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl 10% FKS in TNE (pH 7,4) geblockt und für 2 h bei RT geschüttelt. 100 µl der 1:10 verdünnten Zellkulturüberstände wurden auf die Platte pipettiert und für 2 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurden die Platten mit 100µl Anti-HBs-Biotin Enzygnost HBsAg 6.0 (1:40 in 0,1%Casein/PBS verdünnt) versetzt und für 1 h bei RT geschüttelt. 100 µl Streptavidin-POD 1:500 wurden in 0,1%/Casein/PBS verdünnt. Zuletzt wurden 100 µl TMB X-tra pipettiert und dunkel bei RT inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 0,5 M Schwefelsäure nach 4 Min. gestoppt. Die optische Dichte wurde bei 450 nm und 630 nm bestimmt. Die gemessenen Werte wurden mittels SEAP-Assay normalisiert. Gt = (Sub)-Genotyp; P120Q = Mutation von Prolin zu Glutamin an AS-Stelle 120 des SHBs; Q129P = Mutation von Glutamin zu Prolin an AS-Stelle 129 des SHBs; G145R = Mutation von Glycin zu Arginin an AS-Stelle 145 des SHBs; pcDNA3.1+ = Plasmid ohne Insert, diente

als Negativkontrolle. Der Cut-off-Wert (0,51) ist als rote Linie dargestellt. Grenzwertige Ergebnisse sind oberhalb des Cut-offs mit einem + und unterhalb des Cut-offs mit einem - gekennzeichnet.

Für die (Sub)-Genotypen A2, F3 und H konnte ein eindeutiger Nachweis oberhalb des Cut-off-Wertes nachgewiesen werden. Die Subgenotypen D3, F4 und die Einzelmutation F3 Q129P konnten grenzwertig über dem Cut-off-Wert nachgewiesen werden und sind mit einem + gekennzeichnet. Auch hier wurden die Überstände erneut unverdünnt eingesetzt, damit Verdünnungseffekte ausgeschlossen werden können (Abbildung 17).

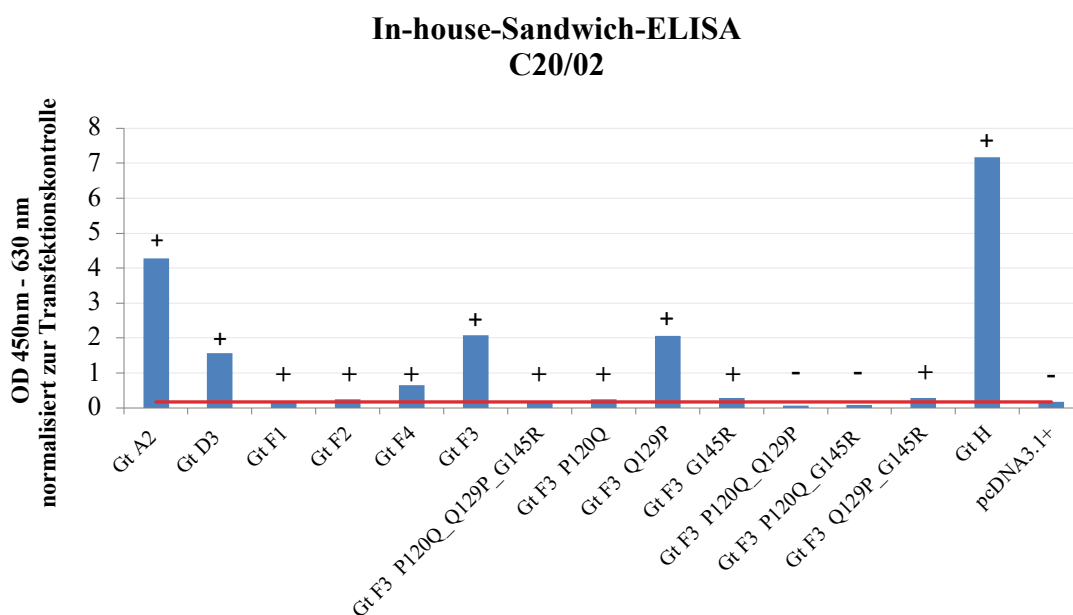


Abbildung 17: In-house-Sandwich-ELISA zur Detektion von SHBs mit mAk C20/02 unverdünnter Zellkulturüberstände. Für den Nachweis von SHBs wurden die ELISA-Platten mit 100µl in Coating Puffer verdünnte mAk C20/02 versetzt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde zweimal mit jeweils 300µl PBS/0,1% Tween bzw. PBS gewaschen und anschließend mit 200µl 10% FKS in TNE (pH 7,4) geblockt und für 2 h bei RT geschüttelt. 100µl der unverdünnten Zellkulturüberstände wurden auf die Platte pipettiert und für 2h bei RT geschüttelt. Anschließend wurden die Platten mit 100µl Anti-HBs-Biotin Enzygnost HBsAg 6.0 (1:40 in 0,1%Casein/PBS verdünnt) versetzt und für 1 h bei RT geschüttelt. 100µl Streptavidin POD 1:500 wurden in 0,1%/Casein/PBS verdünnt. Zuletzt wurden 100µl TMB X-tra pipettiert und dunkel bei RT inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 0,5 M Schwefelsäure bei 2 Min. 30 Sek. gestoppt. Die optische Dichte wurde bei 450nm und 630 nm bestimmt. Die gemessenen Werte wurden mittels SEAP-Assay normalisiert. Gt=(Sub)-Genotyp; P120Q = Mutation von Prolin zu Glutamin an AS-Stelle 120 des SHBs; Q129P = Mutation von Glutamin zu Prolin an AS-Stelle 129 des SHBs; G145R = Mutation von Glycin zu Arginin an AS-Stelle 145 des SHBs, pcDNA3.1+ = Plasmid ohne Insert, diente als Negativkontrolle. Der Cut-off-Wert (0,17) wird als rote Linie dargestellt. Grenzwertige Ergebnisse sind oberhalb des Cut-offs mit einem + und unterhalb des Cut-offs mit einem - gekennzeichnet.

Unverdünnt eingesetzt konnte für alle Konstrukte außer die Doppelmutationen F3 P120Q_Q129P und F3 P120Q_G145R ein Nachweis oberhalb des Cut-off-Wertes erfolgen. Die übrigen Mutationen sowie die Subgenotypen F1 und F2 zeigen nur einen grenzwertigen Nachweis oberhalb des Cut-off-Wertes und sind mit einem + in Abbildung 17 gekennzeichnet.

Als zusätzliche Überprüfung des Vorhandenseins von SHBs wurde der mAk HB01 im Sandwich-ELISA eingesetzt, welcher das lineare Bindungsmotiv 119-GPCRTCT-125 in der S-Domäne erkennt. Hierfür wurden unverdünnte Zellkulturüberstände eingesetzt (Abbildung 18).

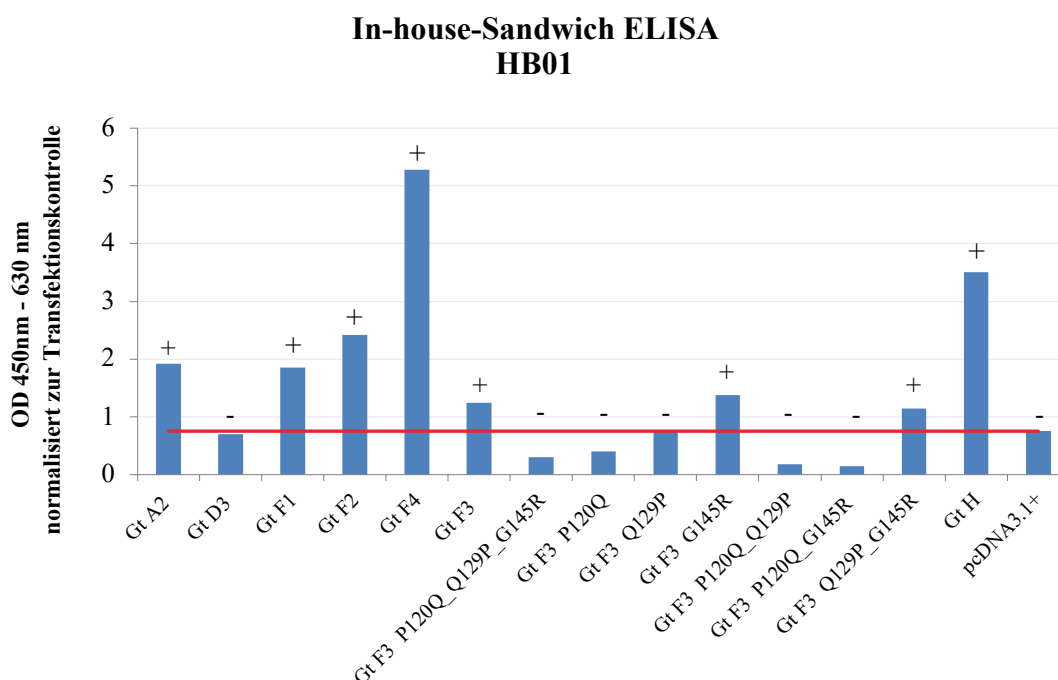


Abbildung 18: In-house-Sandwich-ELISA zur Detektion von SHBs mit mAk HB01 unverdünnte Zellkulturüberstände. Für den Nachweis von SHBs wurden die ELISA-Platten mit 100µl in Coating Puffer verdünnte mAk HB01 versetzt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde zweimal mit jeweils 300µl PBS/0,1% Tween bzw. PBS gewaschen und anschließend mit 200µl 10% FKS in TNE (pH 7,4) geblockt und für 2 h bei RT geschüttelt. 100µl der unverdünnten Zellkulturüberstände wurden auf die Platte pipettiert und für 2h bei RT geschüttelt. Anschließend wurden die Platten mit 100µl Anti-HBs-Biotin Enzygnost HBsAg 6.0 (1:40 in 0,1%Casein/PBS verdünnt) versetzt und für 1 h bei RT geschüttelt. 100µl Streptavidin POD 1:500 wurden in 0,1%/Casein/PBS verdünnt. Zuletzt wurden 100µl TMB X-tra pipettiert und dunkel bei RT inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 0,5 M Schwefelsäure bei 3 Min. 30 Sek. gestoppt. Die optische Dichte wurde bei 450nm und 630 nm bestimmt. Die gemessenen Werte wurden mittels SEAP-Assay normalisiert. Gt= (Sub)-Genotyp; P120Q = Mutation von Prolin zu Glutamin an AS-Stelle 120 des SHBs; Q129P = Mutation von Glutamin zu Prolin an AS-Stelle 129 des SHBs; G145R = Mutation von Glycin zu Arginin an AS-Stelle 145 des SHBs, pcDNA3.1+ = Plasmid ohne Insert, diente als Negativkontrolle. Der Cut-off-Wert (0,75) ist als rote Linie dargestellt. Grenzwertige Ergebnisse sind unterhalb des Cut-off-Wertes mit einem – und oberhalb mit einem + gekennzeichnet.

Bei dem Einsetzen unverdünnter Proben der Zellkulturüberstände konnte mittels HB01 für die (Sub)-Genotypen A2, F1, F2, F4 und H eine stark positive Absorption gemessen werden. Der Subgenotyp F3 und die Mutanten des Subgenotyps F3 G145R und F3 Q129P_G145R zeigte sich ein schwach positives Signal im Vergleich zu den anderen positiven Proben.

Die restlichen Proben zeigten keine positive Absorption oberhalb des Cut-off-Wertes.

3.3. Nachweis von intrazellulärem LHBS, MHBS und SHBS mittels indirekter Immunfluoreszenz in HepG2-Zellen

3.3.1. Testung polyklonaler Antikörper (pAk)

Damit eine Bindung der pAk in der Immunfluoreszenz sichergestellt werden kann, wurden die pAk zuvor auf ihre Bindungsfähigkeit in Abhängigkeit ihrer Konzentration mittels Sandwich-ELISA untersucht. Dafür wurde eine Platte mit dem mAb C20/02 gecoatet und am nächsten Tag mit HBsAg-haltigem Patientenserum abgesättigt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der pAk angesetzt. Die Peroxidasereaktion wurde zu angegebenen Zeiten gestoppt. Die Reaktion wurde im ELISA Reader bei 450 nm und 630 nm gemessen.

3.3.1.1. ELISA Verdünnungsreihe mit pAk Anti-S

Für den Nachweis des totalen HBsAg wurden polyklonale aufgereinigte IgGs aus einem mit HBVaxPro-geimpften Kaninchenserums (Anti-S) verwendet (Abbildung 19).

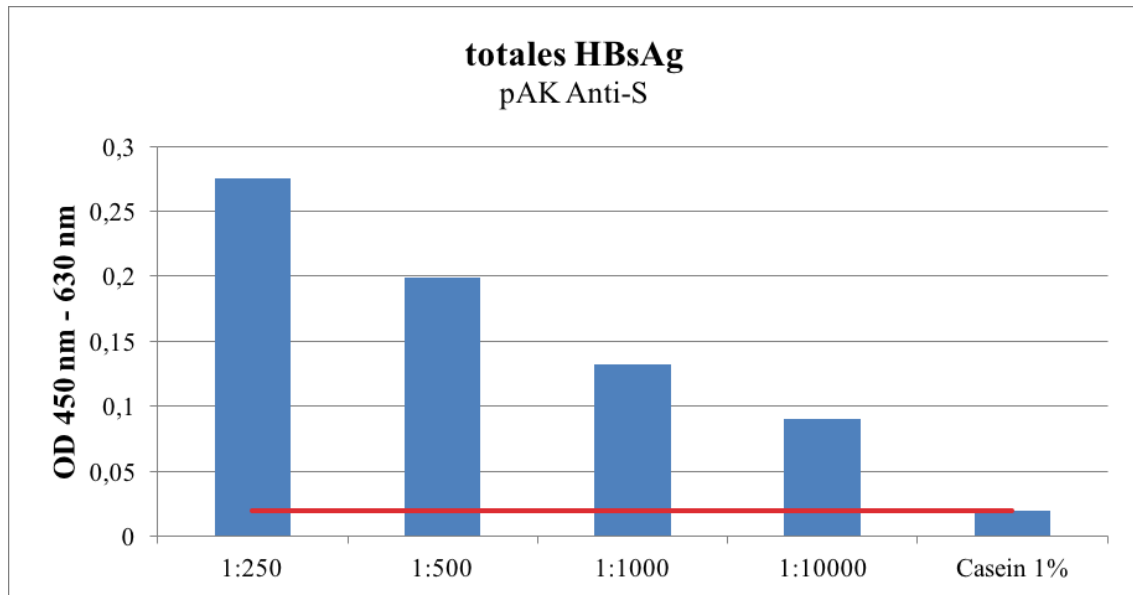


Abbildung 19: ELISA zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit an HBsAg des pAk Anti-S in Abhängigkeit der Konzentration. Die pAk Anti-S wurden aus Kaninchenserum gewonnen, welches zuvor mit einem SHBs-Hefe-Vakzin immunisiert wurde. Für den Nachweis wurde die ELISA-Platte über Nacht mit dem mAk C20/02 gecoatet. Am nächsten Tag wurde mit HBsAg-haltigem Patientenserum inkubiert. Anschließend wurde die Verdünnungsreihe der pAk Anti-S in 1% Casein verdünnt (1:250, 1:500, 1:1000, 1:10000). Die Peroxidasereaktion wurde bei 2 Min. und 30 Sek. mittels Schwefelsäure gestoppt und im ELISA Reader bei 450 nm und 630 nm gemessen. (OD = optische Dichte). 1% Casein diente als Negativkontrolle und bildet den Cut-off-Wert (0,02) gezeigt als rote Linie.

In Abbildung 19 ist zu sehen, dass die in Anti-S enthaltenen pAk auch in einer sehr hohen Verdünnung von 1:10000 noch HBsAg aus dem Serum eines HBV-infizierten Patienten binden können.

3.3.1.2. ELISA Verdünnungsreihe mit pAk Anti-L

Für die Detektion des LHBs wurde der pAk Anti-L verwendet. Der pAk bindet die PräS1-Domäne (AS 20-48) und wurde ebenfalls aus Kaninchenserum gewonnen. Für die Überprüfung der Bindungsfähigkeit wurde auch hier eine serielle Verdünnung in 1% Casein angesetzt (Abbildung 20).

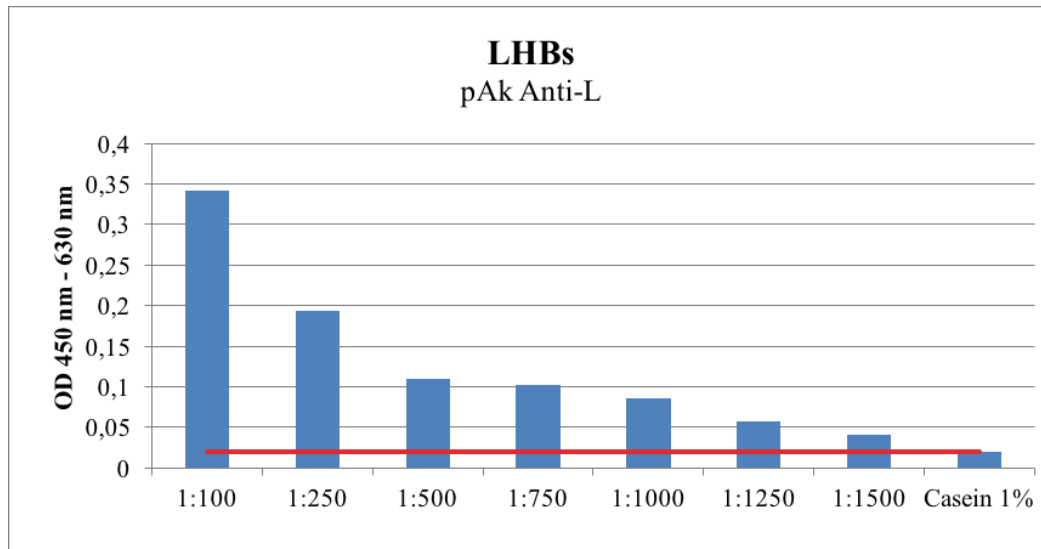


Abbildung 20: ELISA zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit an LHBs durch den pAk Anti-L in Abhängigkeit der Konzentration. Anti-L bindet die PräS1-Domäne des LHBs (AS 20-48). Für den Nachweis wurde die ELISA-Platte über Nacht mit dem mAk C20/02 gecoatet. Am nächsten Tag wurde mit HBsAg-haltigem Patientenserum inhibiert. Anschließend wurde die Verdünnungsreihe pAk Anti-L in 1% Casein/PBS verdünnt (1:100, 1:250, 1:500, 1:750, 1:1000, 1:1250, 1:1500). Die Peroxidase-reaktion wurde nach 5 Min. mittels Schwefelsäure gestoppt und im ELISA Reader bei 450 nm und 630 nm gemessen. (OD = optische Dichte) Casein 1% diente als Negativkontrolle und bildet den Cut-off (0,02) (rote Linie).

Die pAk, gewonnen aus dem mit PräS1-immunisiertem Serum, wiesen eine höhere Bindungsfähigkeit bei niedriger Verdünnung auf. Bei einer Verdünnung von 1:1500 war ein noch schwaches Signal über dem Cut-off-Wert messbar.

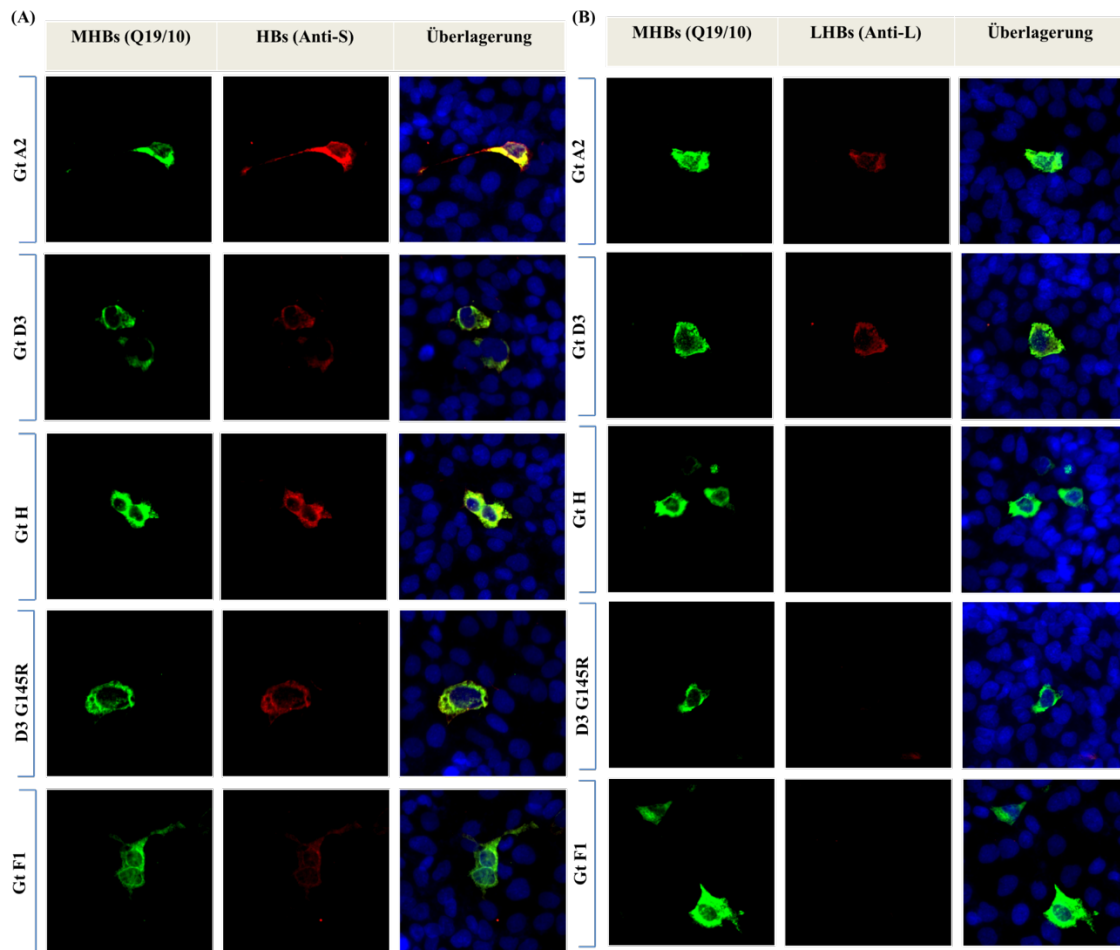
3.3.2. Indirekte Immunfluoreszenz von HepG2-Zellen zum Nachweis von LHBs, MHBs und SHBs

Für den Nachweis von intrazellulärem MHBs, LHBs und SHBs wurden, mittels indirekter Immunfluoreszenz, intrazelluläre Bestandteile der transfizierten HepG2-Zelllinie gezielt angefärbt und via Fluoreszenzmikroskopie betrachtet (Abbildung 21).

Dafür wurden die Zellen auf einer 96-Well-Platte transfiziert und wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, am vierten dpt behandelt und anschließend für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet.

Als Primärantikörper dienten aus Kaninchenserum gewonnene, polyklonale IgGs (Anti-S). Für den Nachweis des intrazellulären HBsAg wurden aufgereinigte IgGs aus einem mit HBVaxPro geimpften Kaninchenserum (Anti-S 10,35 IU/ml f.c.) verwendet.

Die Detektion von LHBs erfolgte ebenfalls mit aus Kaninchenserum gewonnenen Antikörpern (Anti-L), welche die PräS1-Domäne (AS 20-48) binden. Auch diese wurden 1:50 in PBS verdünnt. Für den definitiven Nachweis von HBsAg wurde mit dem mAk Q19/10 (5 µg/ml f.c.) kofärbt. Dieser mAk wurde aus Mausseren gewonnen und bindet das N-Glykan in der PräS2-Domäne. Q19/10 dient dem Nachweis von MHBs. Die hinzugegebenen Sekundärantikörper Anti-Maus IgG (Alexafluor-488) und Anti-Kaninchen IgG (AlexaFluor-594) sind an einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Zusätzlich wurde zum Anfärben der Zellkern-DNA DAPI als Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt.



Ergebnisse

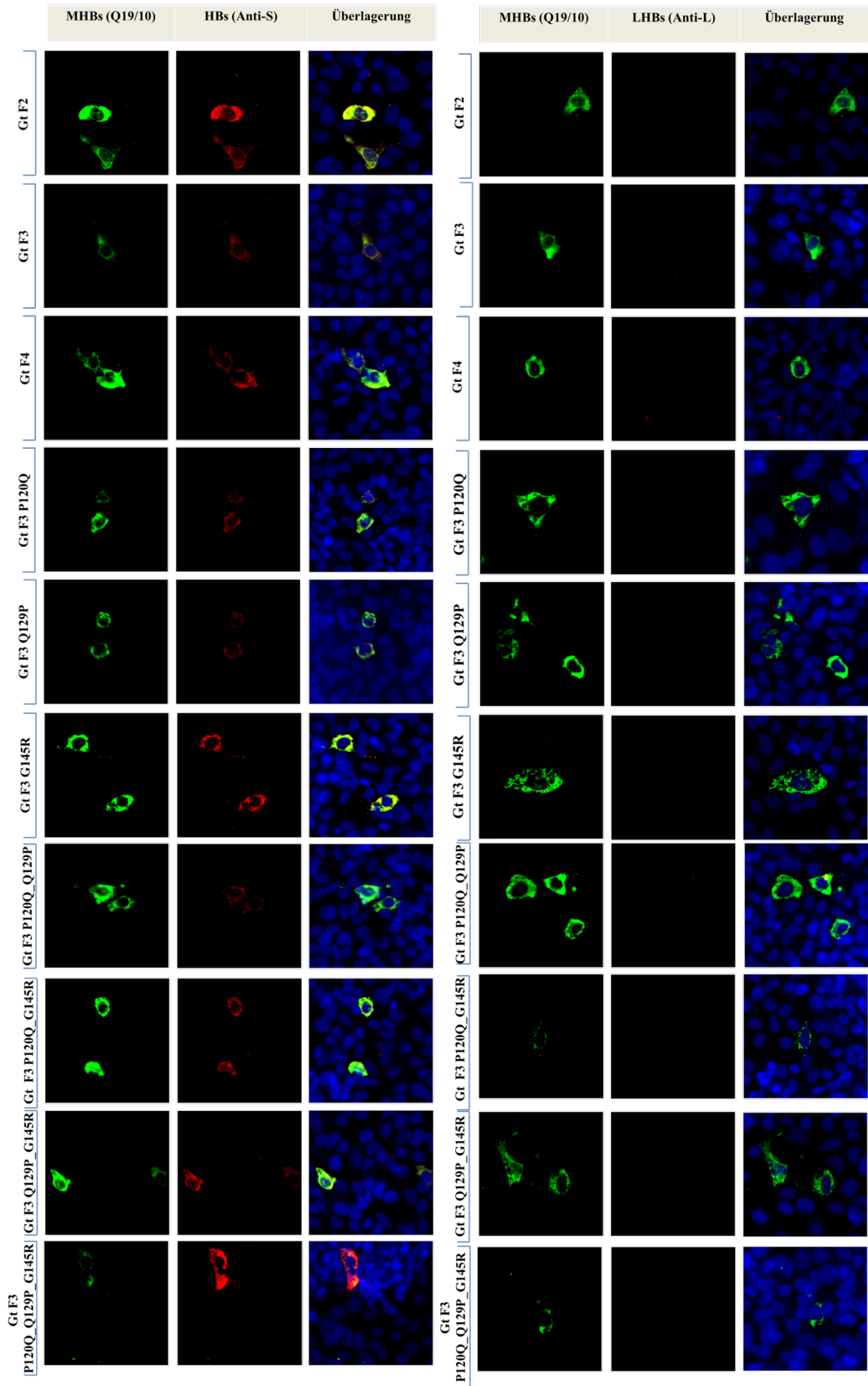


Abbildung 21: Intrazelluläre Expression des HBsAg nach Transfektion von Expressionsplasmiden unterschiedlicher HBV-(Sub)-Genotypen in HepG2-Zellen. Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf einer 96-Well Platte ausgesät und mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. Nach vier dpt wurden die fixierten und permeabilisierten Zellen entweder **(A)** mit dem Primärantikörper Q19/10 gegen das glykosilierte PräS2 des MHBs; sowie mit pAk des Serums Anti-S gegen die S-Domäne inkubiert, oder **(B)** mit pAk aus Serum Anti-L gegen das PräS1 des LHBs und mit dem Primärantikörper Q19/10 gegen das glykosilierte PräS2 des MHBs inkubiert. Diese wurden mit den jeweiligen Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert (anti-mouse AlexaFlour-48 in grün bei Q19/10; sowie anti-rabbit AlexaFlour-594 in rot, bei den pAk des Serum Anti-S gegen die S-Domäne (A), sowie bei den pAk des Serums Anti-L gegen PräS1 des LHBs (B)). Die Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) in der Überlagerung dargestellt. Die Darstellung des MHBs (grün) diente als Positivkontrolle für den Nachweis von intrazellulärem HBsAg.

In allen Proben konnte MHBs mittels Q19/10 und totales HBsAg mittels Anti-S nachgewiesen werden. Die augenscheinliche Intensität der Fluoreszenz wies jedoch Unterschiede innerhalb der (Sub)-Genotypen und den Mutationen auf.

Auffällig war, dass die augenscheinliche Intensität für die Doppelmutanten Subgenotyp F3 P120Q_Q129P und Subgenotyp F3 P120Q_G145R schwächer war als die, des Subgenotyps A2. Die Triple-Mutante des Subgenotyps F3 P120Q_Q129P_G145R zeigte ein augenscheinlich besonders starkes Signal für totales HBsAg, jedoch ein im Vergleich schwaches MHBs-Signal. Des Weiteren unterschied sich die augenscheinliche Intensität für das totale HBsAg der Wildtypen. Die Subgenotypen F1, F3 und D3 zeigten ein schwächeres Signal als die (Sub)-Genotypen H, F2 und F4. Ein auffällig schwaches Signal für das totale HBsAg zeigte die Doppelmutante des Subgenotyps F3 P120Q_Q129P. Hier war das Signal für MHBs im Verhältnis eher stärker anzusehen.

LHBs konnte in den Proben der Subgenotypen A2 und D3 nachgewiesen werden. In den weiteren Proben war die Detektion von LHBs mittels Anti-L nicht möglich.

3.4. Produktion von Hepatitis-delta-Viren mit definierten Hepatitis-B-Virus-Oberflächenproteinen

Für die folgenden Infektions- und Neutralisationsversuche von HepG2-NTCP-Zellen wurde HDV mittels Kotransfektion von HuH7-Zellen hergestellt. Dafür wurden die HBsAg-codierenden Plasmide der Subgenotypen A2, D3, F1, F2, F3 und F4, Genotyp H, sowie die Escapemutationen G145R im Kontext der Subgenotypen F3 und D3 und die

Mutationen F3 P120Q, Q129P und F3 P120Q_Q129P_G145R gemeinsam mit dem pSVL(D3) in Huh7 transfiziert. Das Expressionsplasmid pSVL(D3) enthält das Trimer des HDV Genoms vom Genotyp 1. Die nach Kotransfektion gesammelten Virusüberstände wurden anschließend um den Faktor 100 einkonzentriert. Die in den Viruskonzentraten enthaltenen Genomäquivalente wurden mittels RT-qPCR bestimmt (Abbildung 22). Zusätzlich wurde das qHBsAg der Virusisolate gemessen (Abbildung 23).

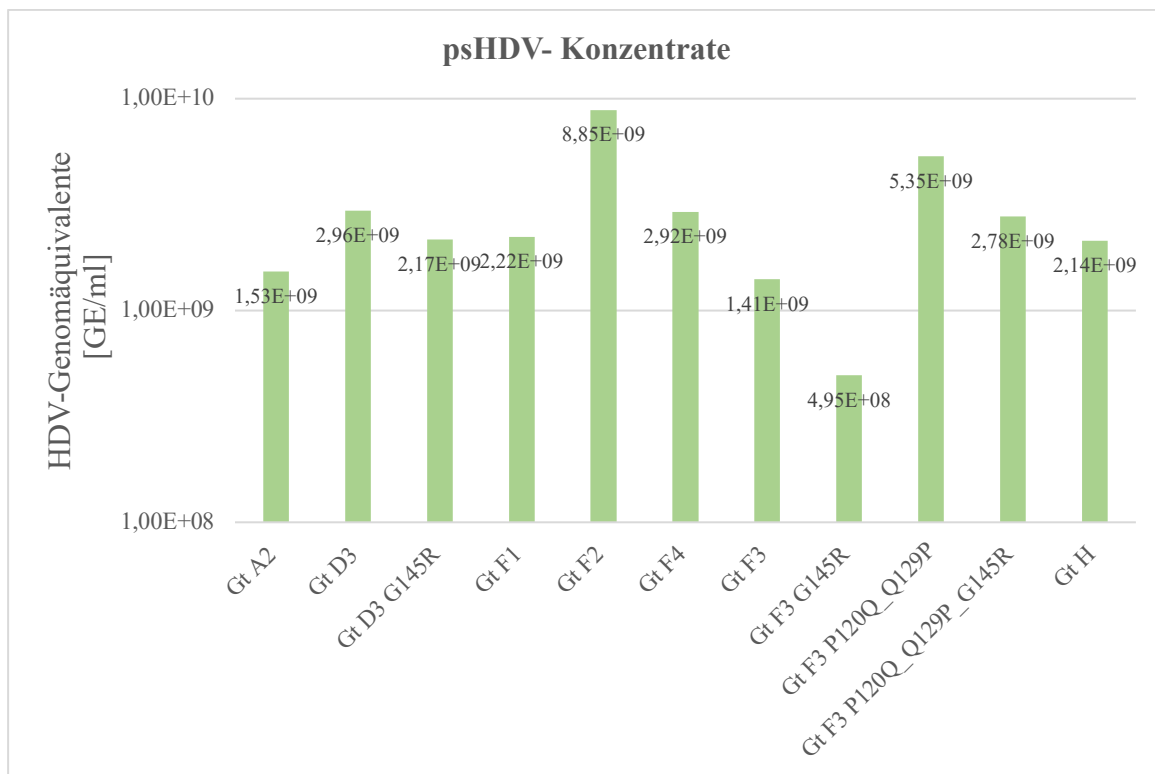


Abbildung 22: Konzentration der psHDV nach Produktion in der Zellkultur. Die Produktion der psHDV wurde in Huh7 wie in Kapitel 2.2.7. durchgeführt. Am ersten Tag nach Transfektion wurden die Huh7 Zellen auf mit Kollagen beschichteten Maxiplatten umgesetzt. Die Zellkulturüberstände wurden vom siebten bis zum 15. dpt gesammelt und anschließend mittels Ultrafiltration um den Faktor 100 einkonzentriert. Die Virusmenge der Isolate wurde mittels RT-qPCR gemessen (2.2.7.3). Die aus der RT-qPCR hervorgehenden Werte pro Well wurden im Anschluss auf die eigentliche Konzentration der Viruskonzentrate zurückgerechnet. Die Konzentrationen sind in Genomäquivalente pro ml (GE/ml) angegeben.

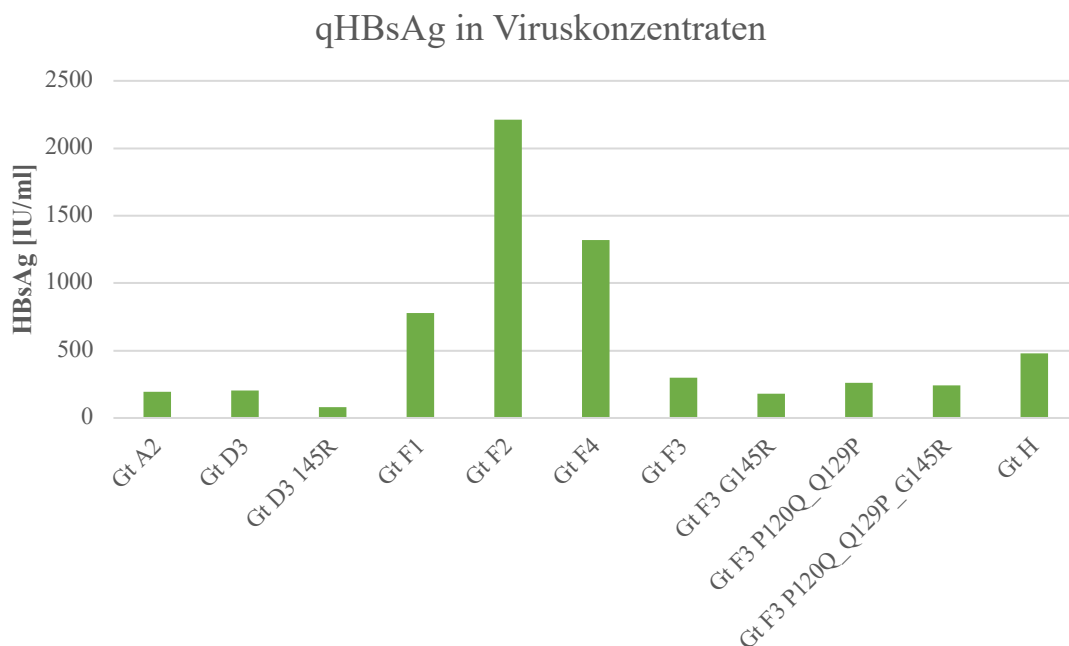


Abbildung 23: Messung des qHBsAg in Zellkulturüberständen der psHDV. Das qHBsAg in den gewonnenen Virusisolaten 15 dpt wurde wie in Kapitel 2.2.5. mit dem Abbott Architect ermittelt. Dafür wurden die Viruskonzentrate 1:100 in PBS verdünnt. Anschließend wurde auf die tatsächliche, unverdünnte Menge zurückgerechnet und in International Units pro ml (IU/ml) angegeben.

In allen Viruskonzentraten konnten Genomäquivalente von $> 1 \cdot 10^8$ pro ml gemessen werden (Abbildung 22). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass alle Viruskonzentrate HBsAg beinhalten (Abbildung 23).

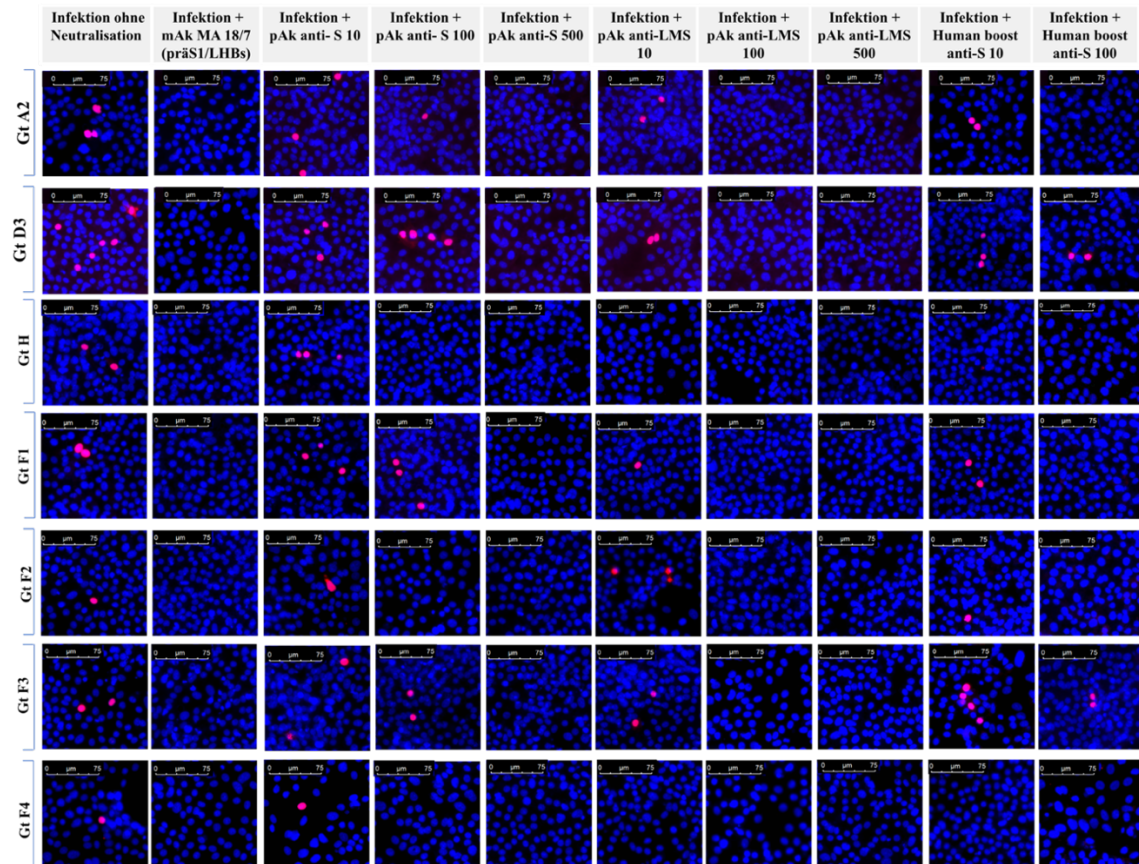
3.5. Fluoreszenzmikroskopie der Infektion und Neutralisation von HepG2-NTCP-Zellen mit pseudotypisierten Hepatitis-Delta-Viren (psHDV)

Die Infektion und Neutralisation von HepG2-NTCP Zellen mit psHDV wurden auf einer 48-Well Platte durchgeführt. Die Zellen wurden 11 dpi wie in Kapitel 2.2.8. beschrieben fixiert und für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet. Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der Infektion und Neutralisationsversuche.

Die Neutralisation erfolgte mit pAk. Zur Abschätzung der Neutralisierbarkeit durch die verwendeten pAk Anti-S und Anti-LMS, wurden diese in unterschiedlichen Titer-Konzentrationen (10 mIU/ml; 100 mIU/ml; 500 mIU/ml) eingesetzt. Das human boost anti-S Serum wurde mit einer Titer-Konzentration von 10 mIU/ml und 100 mIU/ml eingesetzt. Als weitere Kontrolle der Neutralisation wurde der mAk MA18/7 verwendet.

Ergebnisse

(A)



(B)

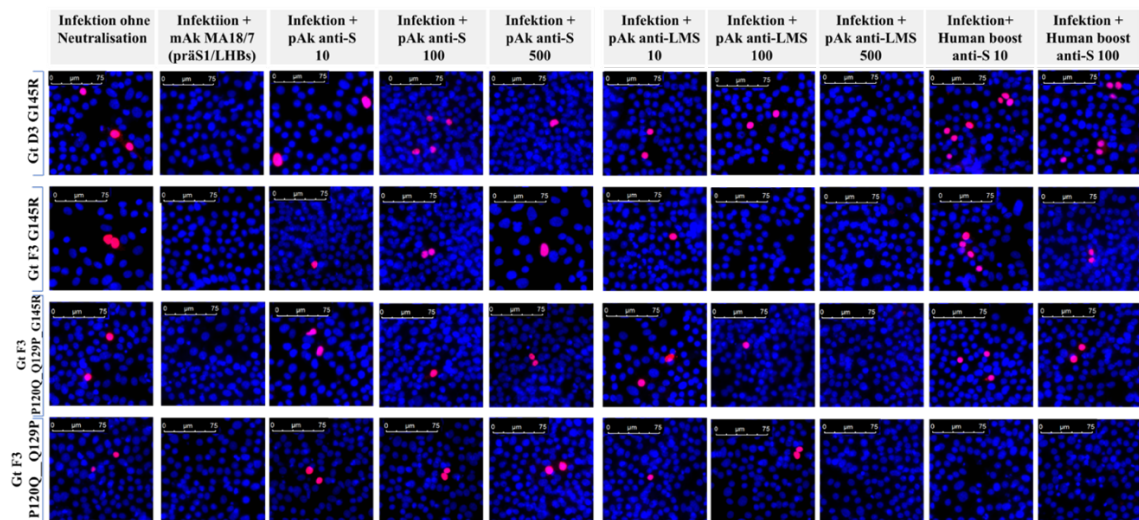


Abbildung 24: Infektion von HepG2-NTCP mit psHDV und Neutralisation mittels mAk Ma18/7, pAk anti-S, anti-LMS und human boost Anti-S. Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf 48-Well Platten ausgesät und nach 72h mit den jeweiligen Viruskonzentraten der jeweiligen psHDV, sowie Viruskonzentrat-Antikörpermischungen mit Anti-S, Anti-LMS und human boost Anti-S infiziert (siehe 2.2.8.) Am 11. dpi und Neutralisation wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. In (A) ist die Immunfluoreszenz der Infektionsversuche mit den psHDV, welche die HBV-Oberflächenproteinen der (Sub-)Genotypen A2, D3, H, und F1-F4 besitzen, mit anschließender Neutralisation durch Anti-S, Anti

LMS und human boost Anti-S gezeigt. In (B) ist die Immunfluoreszenz der Infektionsversuche mit psHDV, welche die HBV-Oberflächenproteinen für die Escapemutationen D3 G145R, F3 G145R, F3 P120Q_Q129_G145R, F3 P120Q_Q129P tragen, und die anschließende Neutralisation durch Anti-S, Anti-LMS und human boost Anti-S gezeigt. Als Primärantikörper wurde Anti-HDV und als Sekundärantikörper der Fluorophor gekoppelte AlexaFluor-568 Goat-Anti-Human eingesetzt. Dieser dient dem Nachweis der infizierten Zellen (rot). Die Zellkerne sind mittels DAPI in blau gezeigt. Die pAk Anti-S stammen aus einem Kaninchen, welches mit in Hefezellen hergestellten SHBs immunisiert wurde und binden SHBs. Die pAk Anti-LMS stammen von einem mit HBV-SVPs der Genotypen A, B und D immunisierten Schaf und binden somit LHBs, MHBs und SHBs. Die pAk human boost Anti-S stammen aus einem Serum von einem mehrfach mit Hefe-Impfstoff immunisierten Menschen und binden ebenfalls SHBs. Als weiterer mAk wurde MA18/7 eingesetzt, welcher spezifisch das PräS1 des LHBs bindet und somit die Bindungsdomäne des Virus mit dem NTCP blockiert.

In der Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass alle eingesetzten Viruskonzentrate mit Genomäquivalenten von $1 \cdot 10^8$ pro Well infizieren konnten (Abbildung 24). Die Infektionseffizienz variierte zwischen den unterschiedlichen (Sub)-Genotypen. Die Zellen, welche zeitgleich zur Infektion mit MA18/7 neutralisiert wurden, wiesen keine Infektion auf.

Die Neutralisationseffizienz variierte innerhalb der (Sub)-Genotypen und innerhalb der verwendeten Antikörper mit unterschiedlichen Titerkonzentrationen.

Die Wildtypen der (Sub)-Genotypen F4 und H verhielten sich in ihrer Neutralisierbarkeit sehr ähnlich. Beide konnten bei einem Antikörpertiter von 10 mIU/ml des pAk anti-S nicht mehr vollständig neutralisiert werden. Allerdings konnte die Infektion durch die Präinkubation mit dem pAk Anti-LMS bereits in der niedrigsten Titration von 10 mIU/ml neutralisiert werden.

Die Einzelmutationen mit G145R konnten sowohl beim Subgenotyp F3 (Gt F3 G145R) als auch beim Subgenotyp D3 (Gt D3 145R) in keiner Titrationsstufe durch Anti-S neutralisiert werden. Auch durch human boost Anti-S konnte in dieser Konstellation keine Neutralisation gezeigt werden. F3 G145R konnte mit einer Titerkonzentration von 100 mIU/ml des Anti-LMS neutralisiert werden. Für den Subgenotyp D3 mit der Mutation G145R wirkte ein Antikörper-Titer von 500 mIU/ml Anti-LMS vollständig neutralisierend. In Bezug auf die Wildtypen der Subgenotypen F3 und D3, unterscheiden sich diese in der Neutralisierbarkeit für die pAk Anti-S. Sowohl der Subgenotyp F3 als auch der Subgenotyp D3 ließ sich mit einem Titer von 500 mIU/ml Anti-S neutralisieren. Die Doppelmutante des Subgenotyps F3 P120Q_Q129P war durch einen Titer von 500 mIU/ml Anti-LMS und durch pAk human boost Anti-S neutralisierbar. Eine

Neutralisation durch die pAk Anti-S war nicht möglich. Der Wildtyp des Subgenotyps F3 verhielt sich wie der von F1. Die beiden Subgenotypen unterschieden sich lediglich in der Neutralisierbarkeit durch die pAk human boost Anti-S. F1 ließ sich im Gegensatz zu F3 durch einen Titer von 100 mIU/ml human boost Anti-S neutralisieren.

Der Wildtypus des Subgenotyps A2 ließ sich durch die pAk Anti-LMS und den human boost anti-S mittels eines Titers von 100 mIU/ml neutralisieren. Für eine vollständige Neutralisation durch das Anti-S war ein Titer von 500 mIU/ml nötig. Für den Subgenotyp F2 war für alle verwendeten Antikörper/Antiseren ein Titer von 100 mIU/ml für eine Neutralisation ausreichend.

4. Diskussion

Weltweit sind 254 Millionen Menschen chronisch mit HBV infiziert (World Health Organization, 2024). Im Jahr 2022 sind schätzungsweise 1,1 Millionen Menschen an den Folgen einer HBV-Infektion verstorben (World Health Organization, 2024). Bis heute gibt es keine kurative Therapie der chronischen HBV-Infektion. Im Jahr 2020 wurde die weltweite Impfquote für Neugeborene auf rund 90% geschätzt (World Health Organization, 2024). Ungeachtet hoher Durchimpfungsraten wird weiterhin ein ausbleibender Impferfolg beschrieben, welcher bedingt, dass trotz stattgehabter Impfung die Gefahr einer HBV-Infektion fortbesteht (Bartenschlager et al., 2019).

Ein besonderes Risiko gilt bei impfstoffernen (Sub)-Genotypen des HBV, sowie bei Kontakt zu sogenannten Escape-Mutationen (Kato et al., 2017).

Die Mutationen können das Virus in Bezug auf die Replikations-, Sekretions- und Infektionsfähigkeit verändern, wodurch diese Escape-Mutationen klinisch zumeist unterdiagnostiziert werden und einen okkulten Verlauf aufweisen (Pollicino et al., 2014). Serotypisch impfstofferne HBV-(Sub)-Genotypen, wie die Genotypen F (*adw4*) und H (*adw4*), welche phylogenetisch besonders weit vom Impfsubgenotyp A2 (*adw2*) entfernt sind, stellen ein potentielles Risiko für eine Impfevasion dar (Gerlich, 2013; Schlabe et al., 2018).

Im Jahr 2018 wurde in Deutschland eine Kombination der Escapemutationen G145R, P120Q und Q129P des Genotyps F bei einem mit HBV infizierten Patienten trotz stattgehabter Impfung beschrieben (Schlabe, et al., 2018).

Der vorliegende Fallbericht macht deutlich, dass ein Kontakt zu einem vakzinfremden Geno- bzw. Subgenotypen, als auch der Kontakt zu Escapemutationen zu einer Infektion mit Chronifizierung trotz erfolgter Impfung und vermeintlich protektivem Titer führen können. Es ist daher von großem Interesse zu prüfen, ob sekretiertes HBsAg der impfstoffernen Genotypen und Subgenotypen, sowie der Escapemutanten von kommerziellen, diagnostischen Assays erkannt wird. In der vorliegenden Arbeit wurden daher SVPs durch Transfektion in HepG2 Zellen hergestellt und auf ihre Detektierbarkeit hin überprüft. Ferner wurden HDV mit definierten HBV-Oberflächenproteinen umhüllt und auf ihre Infektiosität und Neutralisierbarkeit durch impfinduzierte Antikörper, welche die PräS1-, PräS2- und die S-Domäne binden, überprüft.

4.1. Produktion subviraler Partikel und Nachweis von HBsAg mittels Enzygnost HBsAg 6.0 und qHBsAg

Zu Beginn der folgenden Versuche wurden die verwendeten Plasmide mittels Sanger-Sequenzierung durch die Firma LGC auf die Korrektheit ihrer HBsAg-codierenden Sequenz überprüft.

Im ersten Schritt wurden dann die Transfektionsüberstände im Enzygnost HBsAg 6.0 auf die Nachweisbarkeit von HBsAg überprüft (3.2.1., Abbildung 10).

Alle Konstrukte konnten durch den kommerziellen ELISA nachgewiesen werden. Auffällig erscheint hier, dass die Escapemutationen F3 P120Q_Q129P_G145R und F3 P120Q_G145R ein, im Vergleich zu den anderen Konstrukten, schwächeres Absorptionssignal aufwiesen. Ursächlich für die geringe Absorption der beiden Konstrukte könnte die tatsächliche Menge an HBsAg in den Isolaten sein.

Damit die tatsächliche Menge an HBsAg innerhalb der Konstrukte verglichen werden kann, erfolgte im nächsten Schritt die Testung des qHBsAg im Abbott Architect (3.2.2., Abbildung 11).

Im Versuch konnte in allen Überständen nach Transfektion mit HBsAg-Plasmiden qHBsAg nachgewiesen werden (3.2.2., Abbildung 11). Die angegebenen Werte können aufgrund der Normalisierung unabhängig von der Transfektionseffizienz betrachtet werden. Die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.2. zeigen, dass es für alle Konstrukte möglich ist, SVPs durch Transfektion von HepG2 zu produzieren. Da in allen Konstrukten qHBsAg messbar war, können Rückschlüsse auf die Sekretion von SVPs gezogen werden. Die Überstände wiesen Unterschiede in der Menge an produziertem qHBsAg zwischen den Wildtypen und Escapemutanten auf.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass für die (Sub)-Genotypen F4 mit 2412 a.u. und H mit 2580 a.u. am meisten qHBsAg messbar war. Beide zeigten auch in Abbildung 10 gezeigten Enzygnost HBsAg 6.0. eine besonders ausgeprägte Absorption. Die Subgenotypen A2 und D3 zeigten im Vergleich zu den anderen (Sub)-Genotypen besonders wenig Sekretion von qHBsAg. Hinsichtlich der Absorption im Enzygnost HBsAg 6.0 Assay unterscheidet sich die Absorption kaum von solchen, welche im qHBsAg besonders viel qHBsAg sekretierten.

Eine geringere Menge an qHBsAg scheint also für die unterschiedlichen Wildtypen von HBV keinen Einfluss auf die Nachweisbarkeit im verwendeten, diagnostischen Enzygnost Assay zu haben.

Zusätzlich zu der quantitativen Menge an HBsAg und der Detektion der Wildtypen im Enzygnost HBsAg 6.0, ist es von großem Interesse das Sekretionsverhalten von HBsAg innerhalb der unterschiedlichen (Sub)-Genotypen zu vergleichen.

Im qHBsAg Assay konnte gezeigt werden, dass für den Subgenotyp A2 weniger HBsAg messbar war, als es für den Subgenotyp D3 der Fall war. Ursächlich für die Variation der Sekretion könnte die Auswahl der Zelllinie der Versuchsreihe sein. In Kapitel 3.4., Abbildung 23 sind die qHBsAg Messung in den Virusisolaten aufgeführt. Die Virusisolate wurden anders als die Isolate in Abbildung 11, welche in HepG2 transfiziert wurden, in Huh7 produziert. Hier zeigte sich, dass der Subgenotyp A2 auch in Huh7 weniger HBsAg als der Subgenotyp D3 sekretierte. Auffällig ist hier jedoch, dass der Genotyp H in Huh7 deutlich weniger HBsAg sekretierte als der Subgenotyp F4. Wie in Abbildung 23 ersichtlich, zeigte der Subgenotyp F2 am meisten Sekretion von HBsAg in Abbildung 11 hingegen jedoch deutlich weniger. Es ist daher möglich, dass die Auswahl der Zellreihe einen Einfluss auf die Sekretion von HBsAg hat.

In einer Studie von Hassemer et. al wurden Sekretionsunterschiede von HBsAg innerhalb der HBV-Genotypen in Huh7 untersucht (Hassemer et al., 2017). Auch in den Studien aus der Literatur zeigte sich, dass der Subgenotyp A2 weniger HBsAg sekretierte als der Genotyp D3.

In den vorliegenden Experimenten zeigte sich eine besonders starke Sekretionsfähigkeit des Genotypen H, welcher in den vorliegenden Versuchen in HepG2 die meiste Menge an HBsAg innerhalb der untersuchten Konstrukte produzierte. Der Genotyp H wurde hinsichtlich der HBsAg-Sekretion in einer Studie von Sozzi et al. untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass der Genotyp H im Vergleich zum Genotyp D mehr HBsAg produzierte (Sozzi et al., 2018, Fig.3B).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es sinnvoll ist, die Variation der qHBsAg Sekretion innerhalb der der Genotypen zu untersuchen. Damit eine Aussage hinsichtlich der Sekretion getroffen werden kann, ist es sinnvoll in weiteren Versuchen ein antikörperunabhängiges Assay zu verwenden.

Neben den Wildtypen wurden außerdem die Escapemutationen im Kontext des Subgenotyps F3 auf ihre qHBsAg Sekretion und die Detektion im Enzygnost HBsAg 6.0 untersucht.

Betrachtet man die Escapemutanten, so ist ersichtlich, dass die Dreifachmutation Subgenotyp F3 P120Q_Q129P_G145R und die Doppelmutation Subgenotyp F3 P120Q_G145R eine im Verhältnis besonders schwache Absorption im Enzygnost HBsAg 6.0. (Abbildung 10) zeigten. Auch ist für diese Mutationen besonders wenig qHBsAg messbar gewesen.

Die Mutation des Subgenotyps F3 Q129P stellt in den dargestellten Experimenten die einzige Mutation dar, die im Vergleich zum Wildtypen des Subgenotyps F3 keinen Einfluss auf die Sekretion von HBsAg in HepG2 zeigt. Im Gegensatz dazu schränken die Escape Mutationen P120Q und G145R möglicherweise die HBsAg-Sekretion im Kontext des Subgenotyps F3 ein. Vergleicht man die Doppelmutation des Subgenotyps F3 P120Q_Q129P mit F3 Q129P_G145R, so fällt auf, dass die Mutation P120Q einen etwas größeren Effekt auf die Sekretionsfähigkeit von HBsAg zu haben scheint, als die Mutation G145R. Die Kombination beider Mutation scheint den Sekretionsdefekt noch weiter zu potenzieren. Für die beschriebenen Escape Mutationen sind bereits Unterschiede hinsichtlich ihrer Sekretion bekannt (Lazarevic, 2014). In der Literatur wird beschrieben, dass besonders die Escape Mutationen an Stelle 120 und 145, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt, zu einer verminderten Sekretion des HBsAg führen (Gencay et al., 2018). Der Vergleich der vorliegenden Arbeit mit den zitierten Daten ist unter Vorbehalt zu betrachten. Lazarevic und Kollegen verwendeten für die Transfektionsversuche die Zelllinie HuH7 und transfizierten, anders als in der vorliegenden Arbeit, mit replikationsfähigen HBV-Plasmiden. In den vorliegenden Versuchen wurden Konstrukte verwendet, bei denen keine Core-Proteinsequenz enthalten war. Ist diese vorhanden, eröffnet dies die Möglichkeit der vollständigen intrazellulären Virusreplikation. Das Vorhandensein von reifen Kapsiden könnte möglicherweise einen Einfluss auf die Sekretion von HBsAg nehmen.

Es wäre sinnvoll, die hier untersuchten Mutationen ebenfalls in anderen (Sub)-Genotyp-Kontexten und in unterschiedlichen Zelllinien auf die Sekretionsunterschiede von HBsAg weitergehend zu untersuchen und untereinander zu vergleichen.

Eine weitere Mutation, welche in Versuchen von Wang et al. die HBsAg-Sekretion des Genotyps B stark einzuschränken scheint, ist V168A (Wang et al., 2020), welche auch in

den hier vorliegenden Konstrukten, mit Ausnahme des Genotyps A2, vorkommt (Kap.4.2., Abbildung 26).

In Bezug auf die Mutation V168A würde dies gegen einen sekretionsmindernden Einfluss durch die Mutation sprechen. Allerdings wäre es sinnvoll, den Subgenoytpe A2 hinsichtlich dieser Mutation zu untersuchen, um einen Selektionsvorteil dieser Mutation auch für andere Genotypen als den Genotyp B zu bestätigen.

Die tatsächliche Menge an qHBsAg scheint bei genauer Betrachtung der Ergebnisse aus Abbildung 10 und Abbildung 11, nicht der einzige Grund für die im Verhältnis geringere Nachweisbarkeit im kommerziellen Enzygnost HBsAg 6.0 der Escapemutationen zu sein. Es ist auffällig, dass für die anderen Mutationen des Subgenoytpe F3 P120Q und F3 P120Q_Q129P ebenfalls nur wenig qHBsAg messbar war. Die Absorption im Enzygnost HBsAg 6.0. zeigte sich trotz der geringen Menge im qHBsAg ähnlich wie bei Konstrukten, bei denen deutlich mehr qHBsAg messbar war.

Ein weiterer Grund könnte auch eine eingeschränkte Bindungsfähigkeit der im Enzygnost HBsAg 6.0 verwendeten Antikörper aufgrund der Mutationen in der S-Domäne sein. Die Bindungsfähigkeit unterschiedlicher Antikörper gilt es im Folgenden zu untersuchen (4.2.).

4.2. Qualitativer Nachweis der Oberflächenproteine via In-house-Sandwich-ELISA

Der qualitative Nachweis der drei Oberflächenproteine erfolgte mittels mehrerer In-house-Sandwich-ELISA. Dies diente dem gesonderten Nachweis der Sekretion aller HBsAg-Komponenten (LHBs, MHBs, SHBs) nach Transfektion von HepG2, sowie der Überprüfung der Bindungsfähigkeit des Detektionsantikörpers aus dem Enzygnost HBsAg 6.0 Kit. Hierfür wurden Beschichtungsantikörper gewählt, welche spezifisch an die unterschiedlichen Epitope der drei Oberflächenproteine binden. Die Detektion erfolgte durch Anti-HBs-Biotin aus dem kommerziellen Enzygnost HBsAg 6.0. In Kapitel 4.1. konnte bereits gezeigt werden, dass eine Detektion von HBsAg durch den Anti-HBs-Biotin im Enzygnost HBsAg 6.0. möglich ist. Die Zellkulturüberstände nach Transfektion wurden in einer 1:10 Verdünnung bzw. unverdünnt eingesetzt. Alle

Ergebnisse wurden mittels SEAP-Assay normalisiert. Tabelle 17 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse aus Kapitel 3.2.3.

Konstrukte	Ma 18/7 (1:10)	Ma 18/7	Q19/10 (1:10)	Q 19/10	C20/2 (1:10)	C20/2	HB01
Gt A2	+++	+++	+	++	++++	++++	++
Gt D3	++++	++++	+++	++++	+	++	-
Gt H	-	++	++++	++++	++++	++++	+++
Gt F1	-	-	++	+++	-	+	++
Gt F2	-	-	+++	+++	-	+	++
Gt F3	-	++	++	++++	++	++	++
Gt F4	-	-	++++	++++	+	++	++++
Gt F3 P20Q_Q129P_G145R	-	-	-	+	-	+	-
Gt F3 P120Q	-	-	-	++	-	+	-
Gt F3 Q129P	-	++	+++	+++	+	++	-
Gt F3 G145R	-	+	++	+++	-	+	++
Gt F3 P120P_Q129P	-	-	-	+	-	-	-
Gt F3 P120Q_G145R	-	-	-	-	-	-	-
Gt F3 Q129P_G145R	-	++	+	+++	-	+	++

Tabelle 17: Ergebnisübersicht der In-house-Sandwich-ELISA Testung. Zur Detektion der Oberflächenproteine LHBs, MHBs und SHBS wurden In-House-Sandwich-ELISA mit jeweils unterschiedlichen Beschichtungsantikörpern durchgeführt. Die Isolate wurden jeweils in einer 1:10 Verdünnung in PBS und unverdünnt eingesetzt. In der Tabelle werden die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.3. in einer Übersicht dargestellt. Unterschieden wird die Intensität des Farbumschlages gemessen in OD in grenzwertig positiv (+), eindeutig positiv (++), stark positiv (+++), sehr stark positiv (++++) und keine Detektion (-).

Zur Detektion des LHBs wurde der mAk MA18/7 verwendet, welcher die AS 20-DPXF-23 in der PräS1-Domäne bindet (Glebe et al., 2003). In Abbildung 25 ist das Aminosäuren- Alignment der PräS1- und Teile der PräS2-Domäne der untersuchten Konstrukte gezeigt.

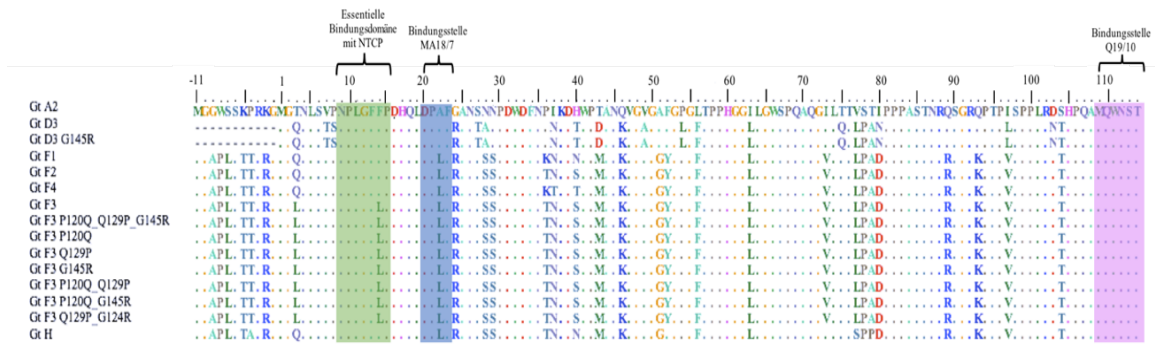


Abbildung 25: Aminosäuren-Alignment der PräS1- und Teile der PräS2-Domäne. Das Epitop des mAk MA18/7 ist in blau gezeigt. Das Bindungsmotiv des mAk Q19/10 ist an Stelle 109MQWN*ST114 (violett hinterlegt) für alle Konstrukte nachgewiesen und stellt die Startsequenz des MHBs dar (*N-Glykosylierung im Epitop essentiell). Die essentielle Bindungsdomäne für LHBs mit NTCP ist grün hinterlegt (Müller et al., 2018).

Im Sandwich-ELISA konnte in der 1:10 Verdünnung lediglich eine Absorption für die Subgenotypen A2 und D3 gemessen werden (Tabelle 17).

Für die unverdünnt eingesetzten Proben wurde eine deutliche Absorption für die (Sub-)Genotypen A2, D3, F3 und H, sowie für die Escapemutationen F3 Q129P_G145R und die Einzelmutation F3 Q129P gemessen. Für die Mutation G145R des Subgenotyps F3 konnte ein grenzwertiger Nachweis oberhalb des Cut-off-Wertes ermittelt werden.

Betrachtet man das Alignment der PräS1-Domäne (Abbildung 25), so fällt auf, dass nur die Konstrukte der Subgenotypen A2 und D3 das vollständige Bindungsmotiv 20-DPAF-23 besitzen. Die weiteren Konstrukte besitzen an Stelle 22 ein Leucin statt eines Alanins. Eine insgesamt schwächere Bindungsfähigkeit des mAk MA18/7 für Konstrukte, welche anstatt eines Alanin ein Leucin an Stelle 22 besitzen, ist daher denkbar. Dies widerspricht jedoch Untersuchungen, welche zeigen, dass Alanin durch Valin ersetzt werden könnte, ohne einen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit des Antikörpers zu haben (D’Mello et al., 1997). Valin und Leucin sind sich sterisch und biochemisch sehr ähnlich, sodass ein Austausch von Alanin zu Leucin eher keinen Einfluss auf die Bindung haben sollte. Denkbar wäre auch, dass die Sekretion der unterschiedlichen Oberflächenproteine genotypspezifisch variiert und somit die Konzentration in den Überständen nicht für eine Detektion ausreicht. Für diese Hypothese würde sprechen, dass die unverdünnt eingesetzten Konstrukte der (Sub-)Genotypen H, F3, sowie der Mutationen F3 Q129P, F3 G145R und auch F3 Q129P_G145R im In-house-Sandwich-Elisa nachweisbar waren. Der mAk Q19/10 bindet das N-Glykan der PräS2-Domäne (glykosilierte Startsequenz des MHBs 1-MQWST-6) (Heermann, K. H., F. Waldeck, et al. 1988; Glebe et al., 2003).

Alle hier vorliegenden Konstrukte wiesen im Alignment das vollständige Bindungsmotiv für Q19/10 auf (Abbildung 25).

Für alle Konstrukte, außer der Doppelmutation des Subgenotyps F3 P120Q_G145R, konnte mittels In-house-Sandwich-Elisa eine Absorption oberhalb des Cut-off-Wertes nachgewiesen werden. Die Dreifachmutation F3 P120Q_Q129P_G145R und die Doppelmutation F3 P120Q_Q129P zeigten einen grenzwertig positiven Nachweis. Quantitativ konnte im qHBsAg nur wenig HBsAg für die beschriebenen Escapemutationen gemessen werden (3.2.2., Abbildung 11). Es ist daher möglich, dass die Konzentration an MHBs für eine Detektion mittels ELISA nicht ausreicht. Auffällig ist jedoch auch, dass für den Subgenotyp A2 deutlich mehr qHBsAg messbar war, als für den Subgenotyp F3 Q129P_G145R. Im In-house-Sandwich-ELISA zeigt sich jedoch eine höhere Absorption für die Escape-Mutante. Eine genotypspezifische Variabilität innerhalb der Sekretion der drei Oberflächenproteine ist daher ebenfalls denkbar. Zudem könnte das Expressionsverhältnis der jeweiligen Oberflächenproteine ebenfalls durch eine Mutation verändert sein. Damit weitere Rückschlüsse auf die unterschiedliche Expression der Oberflächenproteine gezogen werden kann, wäre es sinnvoll in weiteren Versuchsreihen mittels Western Blot die Expression der unterschiedlichen Oberflächenproteine zu vergleichen.

Da sowohl in den quantitativen Assays in Kapitel 3.2.2. in Abbildung 11, als auch in den qualitativen Messungen durch die In-house-Sandwich-ELISA ersichtlich ist, dass die Konstrukte, welche die Mutation P120Q beinhalten, eine geringere bzw. keine Nachweisbarkeit von HBsAg in den Überständen zeigten, ist es möglich, dass die Mutation P120Q zu einer Einschränkung der Sekretion von HBsAg führt. Im Enzygnost HBsAg 6.0 konnten alle Konstrukte mittels Anti-HBs-Biotin detektiert werden. In dem In-house-Sandwich-Elisa, in dem bspw. der mAk Q19/10 als Bindungsantikörper verwendet wurde, war eine Detektion der Mutation P120Q durch Anti-HBs-Biotin nur unverdünnt möglich. Ein Grund hierfür könnte eine zu geringe Menge an sekretiertem MHBs im verdünnten Isolat sein, die dazu geführt haben könnte, dass das durch Q19/10 ausgelöste ELISA-Signal zu gering, bzw. unterhalb der Nachweisgrenze des Systems lag und somit kein bzw. ein geringes Signal detektiert werden konnte. Für den sicheren Nachweis scheint die Menge an sekretiertem HBsAg innerhalb des Isolates eine wichtige Rolle zu spielen.

Unvollständigkeit des Bindungsmotives zurückzuführen ist. Ferner fällt auf, dass der Subgenotyp D3 als einziger an Stelle 122 ein Arginin statt eines Lysins besitzt. Die Stelle 122 gibt an, welchem Serotyp der Genotyp zuzuordnen ist, wobei ein Arginin für *d* und Lysin für *y* steht (Kucinskaite-Kodze et al., 2016). Die Versuche von Kucinskaite-Kodze et al. zeigten, dass sich im Western Blot beide Serotypen durch HB01 detektieren ließen. Die Escapemutationen des Subgenotyps F3, welche die Mutation P120Q beinhalten, konnte durch den ELISA keinen Nachweis über den Cut-off- Wert. zeigen. Da HB01 an Stelle 119-GPR(K)TCT-125 bindet, ist es möglich dass der Austausch der apolaren Aminosäure Prolin zu der polaren Aminosäure Glutamin zu einer Einschränkung der Bindungsfähigkeit im ELISA von HB01 führt. Da die Escapemutation P120Q_G145R durch keinen Antikörper innerhalb des In-house-Sandwich-ELISA sicher über dem Cut-off-Wert messbar war und im qHBsAg (3.2.2., Abbildung 11) sehr niedrige qHBsAg-Werte ergab, besteht zudem die Möglichkeit, dass die Menge an SHBs im verwendeten Überstand in Kombination mit dem Fehlen des vollständigen Bindungsmotives dazu führen, dass diese Konstrukte durch HB01 nicht nachgewiesen werden konnten.

Als weiterer Bindungsantikörper wurde der mAk C20/02 verwendet. In den unverdünnten Proben konnten alle Konstrukte außer die Doppelmutation des Subgenotyps F3 P120Q_Q129P, als auch die Doppelmutation F3 P120Q_G145R eine Absorption oberhalb des Cut-off-Wertes zeigen (3.2.3.3., Abbildung 17). Für die Bindung mittels mAk C20/02 sind mehrere Bindungsstellen nötig (Abou El Nasr, 2011). Der Antikörper C20/02 ist im Gegensatz zum mAk HB01 ein konformationeller Antikörper, was bedeutet, dass mehrere Bindungsstellen in einer dreidimensionalen Konformation ein Epitop bilden. In der Literatur wird deutlich, dass für die Bindung die AS G119, P120, T140, K141 und G145 für eine Detektion gebraucht werden (Abou El Nasr, 2011). Die Bindungsstellen von C20/02 sind in Abbildung 26 gelb hinterlegt. Die Escape Mutanten vom Subgenotyp F3 P120Q_Q129P und P120Q_G145R konnten in der vorliegenden Arbeit mittels C20/02 nicht detektiert werden. Alle anderen Konstrukte konnten nachgewiesen werden. Die Subgenotypen F1, F2, sowie die übrigen Escapemutationen zeigten sich grenzwertig positiv. Alle Subgenotypen des Genotypen F besitzen an Stelle 140 statt des Threonins ein Serin. Die Subgenotypen F4 und F3, sowie die Escapemutation Q129P im Kontext des Subgenotypen F3 zeigten dennoch ein, wenn auch im Verhältnis zu den (Sub)-Genotypen H und A2 schwaches, positives Absorptionssignal. Daraus lässt sich schließen, dass ein T140S-Austausch das C20/02-

Epitop nicht zu zerstören scheint und die Abwesenheit eines Signals für alle anderen F-Isolate daher anders bedingt sein muss. Für den Genotyp H konnte, dicht gefolgt vom Subgenotyp A2, die größte Absorption gemessen werden. Beide Genotypen besitzen alle von El Nasr et al. beschriebenen Bindungsstellen des C20/02 (Abou El Nasr, 2011). Vergleicht man die Ergebnisse der unverdünnten Proben mit denen der 1:10 verdünnten, so zeigt sich, dass die Bindungsfähigkeit des Antikörpers mit der Konzentration der in den Isolaten vorhandenen HBsAg steigt. Dies zeigt, dass eine gewisse Konzentration an Antigen für eine sichere Detektion mittels ELISA vonnöten ist. Genotypen bzw. Mutationen, welche die Sekretion von HBsAg einschränken oder eine intrazelluläre Akkumulation des HBsAg fördern, scheinen sich daher schwerer nachweisen zu lassen.

Zusammenfassend konnte durch die In-house-Sandwich-ELISA, verglichen mit dem qHBsAg und dem Enzygnost HBsAg 6.0 gezeigt werden, dass die Escapemutationen des Subgenotyps F3 P120Q in Kombination mit G145R scheinbar zu einer Herabsetzung der Bindungsaffinität durch Antikörper und auch zu einer verminderten Sekretion von HBsAg führen. Die Kombination der Mutationen hat zur Folge, dass eine Detektion im kommerziellen Enzygnost ELISA 6.0 erschwert sein könnte.

4.3. Nachweis von intrazellulärem LHBs, MHBs und totalem HBsAg mittels indirekter Immunfluoreszenz

4.3.1. Bindungsfähigkeit der polyklonalen Antikörper im Sandwich-ELISA

Für den Nachweis der intrazellulär befindlichen Oberflächenproteine wurden pAk in der Immunfluoreszenz zur Detektion verwendet. Zuvor wurden die pAk im ELISA auf ihre Bindungsfähigkeit in Bezug auf unterschiedliche Verdünnungen getestet (3.3.1.1., Abbildung 19; 3.3.1.2., Abbildung 20).

Für den Nachweis von totalem, intrazellulärem HBsAg wurde der pAk Anti-S verwendet. Die aufgereinigten IgG stammen aus einem Kaninchen, welches mit in Hefe generierten SHBs immunisiert wurde. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die in Anti-S enthaltenen pAk auch in einer sehr hohen Verdünnung noch HBsAg aus dem Serum eines HBV-infizierten Patienten binden können (3.3.1.1., Abbildung 19).

Die Detektion von LHBs erfolgte durch den pAK Anti-L. Dieser wurde aus einem mit PräS1-immunisierten Kaninchen gewonnen. Abbildung 20 aus Kapitel 3.3.1.2. zeigt, dass

eine Verdünnung um das 1.500-fache nur noch einen Nachweis knapp über dem Cut-off Wert aufweist. Demnach sollte in der Immunfluoreszenz eine geringere Verdünnung gewählt werden. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.1. ff., dass die pAk Anti-S und Anti-L totales HBsAg und LHBs in den Isolaten nachweisen und binden können.

4.3.2. Indirekte Immunfluoreszenz von HepG2-Zellen zum Nachweis von intrazellulärem LHBs, MHBs und totalem HBsAg

Um einen Nachweis des intrazellulären LHBs, MHBs und totalem HBsAg in transfizierten HepG2-Zellen erbringen zu können, wurden diese mit den in Kapitel 2.1.8. Tabelle 12 gezeigten Konstrukten transfiziert. Als Primärantikörper für die Detektion von LHBs wurde der pAk Anti-L verwendet. Der pAk Anti-S wurde für den Nachweis von HBsAg verwendet. Zusätzlich wurde mit dem mAk Q19/10 kofärbt, welcher das N-Glykan der PräS2-Domäne des MHBs bindet, die in allen Konstrukten konserviert ist. Für alle Konstrukte konnte mittels Q19/10 MHBs und mittels dem pAk Anti-S totales HBsAg nachgewiesen werden (3.3.2., Abbildung 21 (A)).

Auffällig ist jedoch, dass sich die augenscheinliche Intensität der Fluoreszenzfärbung innerhalb der Wildtypen und Mutanten für SHBs und MHBs unterscheidet. Das Signal für die Subgenotypen F1, F3 und D3 ist augenscheinlich schwächer, als für die (Sub-)Genotypen H, F2 und F4. Für den Subgenotypen F2 fällt auf, dass sich die Intensität der Fluoreszenzfärbung für MHBs und SHBs kaum unterscheidet. Gleiches gilt für den Subgenotyp A2. Vergleicht man nun die Ergebnisse des intrazellulären HBsAg mit den Ergebnissen des qHBsAg (3.2.2., Abbildung 11) der Zellkulturüberstände, so wird ersichtlich, dass der Subgenotyp A2 im Verhältnis zum Subgenotyp F2 weniger HBsAg sekretierte. Es besteht daher die Möglichkeit, dass sich die Akkumulation auch auf die Menge an sekretiertem und somit diagnostisch-nachzuweisendem HBsAg auswirkt. Eine unterschiedliche, intrazelluläre Akkumulation und somit verminderte Sekretion von HBsAg-Varianten innerhalb der Genotypen wurde in der Literatur bereits beschrieben (Peiffer et al., 2015). Nun ist zu hinterfragen, ob sich diese These auch auf die Escape Mutationen oder auf andere Subgenotypen anwenden lässt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Escape-Mutation G145R im Kontext des Subgenotyps D3 und F3 untersucht. Die Wildtypen beider Subgenotypen zeigen eine eher schwache Intensität der Fluoreszenzfärbung im Vergleich zu anderen Wildtypen. Im

qHBsAg konnte für die Wildtypen im Vergleich ähnlich viel HBsAg im Zellkulturüberstand gemessen werden (Gt F3 430 a.u.; Gt D3 350 a.u. 3.2.2., Abbildung 11). Betrachtet man nun die Escapemutationen der Subgenotypen D3 G145R und F3 G145R, so fällt auf, dass beide ein augenscheinlich stärkeres Signal der Fluoreszenzfärbung für MHBs, als auch für SHBs aufwiesen (Abbildung 21). Der Subgenotyp F3 G145R zeigte zusätzlich eine teilweise abgeschwächte Absorption innerhalb der In-house-Sandwich-ELISA durch die mAk C20/02 und HB01 (3.2.3.3., Abbildung 17; Abbildung 18). Dies könnte bedeuten, dass die Escapemutation G145R unabhängig vom (Sub)-Genotyp zu einer intrazellulären Akkumulation von HBsAg führt. Dass durch die intrazelluläre Akkumulation von HBsAg auch die Sekretion beeinflusst wird, ist naheliegend. Vergleicht man das gemessene qHBsAg der Escapemutante G145R im Kontext des Subgenotyps F3 (3.2.1., Abbildung 11) sowie des Subgenotyps D3 (3.4., Abbildung 23), so zeigt sich unabhängig vom (Sub)-Genotyp eine geringere Menge an qHBsAg im Isolat der Escapemutante im Vergleich zu den Wildtypen.

Die Escapemutante Q129P im Kontext des Subgenotyps F3 zeigt nahezu identische Werte (Genotyp F3 430 a.u. , Genotyp F3 P129Q 445 a.u.; 3.2.2., Abbildung 11). Auch im intrazellulär, durch die Immunfluoreszenz nachgewiesenem HBsAg, zeigte sich kein Unterschied in der augenscheinlichen Signalintensität. Es ist anzunehmen, dass die Mutation P129Q im Kontext des Subgenotyps F3 zu keiner verstärkten Akkumulation oder Sekretionsdefiziten führt.

In Kapitel 4.2. wurde für die Escapemutante P120Q im Kontext des Subgenotyps F3 bereits vermutet, dass diese zu einer vermehrten Akkumulation von HBsAg führen könnte. Die Fluoreszenzfärbung zeigt für MHBs eine stärkere Intensität im Vergleich zum Subgenotyp F3. Dies könnte darauf hinweisen, dass nicht das gesamte HBsAg akkumuliert, sondern, dass einzelne Teile des HBsAg wie z.B. MHBs intrazellulär akkumulieren und dadurch die Nachweisbarkeit im Überstand herabgesetzt wird. Betrachtet man zusammenfassend die Doppelmutanten, welche G145R als Mutation beinhalten und die Dreifachmutante, so zeigt sich augenscheinlich eine starke Intensitätssteigerung hinsichtlich des HBsAg im Verhältnis zum Wildtyp. Dies zeigt, dass die Substitution G145R maßgeblichen Einfluss auf die intrazelluläre Akkumulation von HBsAg zu haben scheint.

Für die (Sub)-Genotypen F4 und H konnte im qHBsAg besonders viel HBsAg gemessen werden (3.2.2., Abbildung 11). Betrachtet man die Genotypen in Hinblick auf die

intrazelluläre Detektion von HBsAg in der Fluoreszenzmikroskopie, so wird deutlich, dass für diese auch eine sehr starke augenscheinliche Intensität der Fluoreszenzfärbung zu sehen ist.

Der Vergleich der beiden Nachweismethoden lässt vermuten, dass eine genotypspezifische Variation der Menge an produzierten und somit auch sekretiertem SVP möglich ist. Allerdings könnte sich dieser Effekt auch isolatspezifisch darstellen. Des Weiteren konnten alle Konstrukte durch Q19/10 in der Immunfluoreszenz anders als im In-house-Sandwich-ELISA detektiert werden. Dies zeigt, dass der Antikörper Q19/10 eine bestimmte Menge an MHBs für eine Bindung benötigt. Auffällig ist hier, dass im ELISA die Doppelmutante des Subgenotyps F3 P120Q_Q129P keine Absorption über dem Cut-off-Wert zeigt (3.2.3.2., Abbildung 15), jedoch augenscheinlich eine hohe Intensität des Fluoreszenzstoffes in der Fluoreszenzmikroskopie zu sehen ist. Es ist daher denkbar, dass MHBs produziert wurde, aber für einige Escape-Mutationen eine Sekretion nicht oder in nicht ausreichender Menge möglich ist.

LHBs konnte durch den pAk Anti-L in der Fluoreszenzmikroskopie (3.3.2., Abbildung 21 (B)) für die Subgenotypen A2 und D3 nachgewiesen werden. Das Signal ist als eher schwach zu betrachten. Für die weiteren Konstrukte konnte kein LHBs in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. In den Untersuchungen mittels In-house-Sandwich-ELISA mit dem mAk Ma18/7 (3.2.3.1., Abbildung 13) war ein eindeutiger Nachweis für die Subgenotypen A2 und D3 möglich. Die (Sub)-Genotypen F3, H und die Escapemutationen F3 Q129P und G145R sowie für die Doppelmutanten F3 Q129P_G145R konnten nur ein grenzwertig positiv Nachweis oberhalb des Cut-off-Wertes erfolgen. In der Immunfluoreszenz konnte kein Nachweis für LHBs mittels des pAk Anti-L erfolgen. Ursächlich für die fehlende Detektion sowohl in der Fluoreszenzmikroskopie als auch im In-house-Sandwich-ELISA, könnte eine nicht ausreichende Menge an produziertem LHBs sein. Außerdem ist es möglich, dass der pAk Anti-L, sowie der mAk MA18/7 keine ausreichende Detektionsmöglichkeit der Konstrukte besitzt.

Dies stützt die These, dass der Anteil an produziertem HBsAg nicht ausreichend für den Nachweis in der Fluoreszenzmikroskopie war.

Zusammenfassend sollte in weiteren Versuchen eine quantitative Messung der Fluoreszenzintensität gemessen werden. Bei den vorliegenden Ergebnissen konnte nur eine grobe Einschätzung der Akkumulation durch visuelle Inspektion gegeben werden.

Auch sollte in weiteren Versuchen eine antikörperunabhängige Messung der jeweiligen Oberflächenproteine LHBs, MHBs und SHBs erfolgen.

4.4. Erzeugung und Quantifizierung der pseudotypisierten Hepatitis-Delta-Viren

Für die Produktion von psHDV wurden diese durch Cotransfektion der bereits verwendeten HBsAg-codierenden Plasmide gemeinsam mit einem Trimer des Genoms des HDV in Huh7-Zellen hergestellt. Die Überstände wurden um den Faktor 100 einkonzentriert. Anschließend wurde das qHBsAg der Viruskonzentrate, wie in Kapitel 2.2.7.4 beschrieben, gemessen. Die Quantifizierung der HDV-RNA erfolgte mittels RT-qPCR.

Für alle erzeugten Viruskonzentrate konnte $>1 \cdot 10^8$ GE/ml HDV-RNA gemessen werden (3.4, Abbildung 22).

Des Weiteren konnte in allen Viruskonzentraten qHBsAg gemessen werden (3.4., Abbildung 23). Die erfolgreiche Messung von qHBsAg legt eine erfolgreiche Umhüllung von HDV durch alle HBsAg-Varianten nahe. Dadurch, dass sowohl HBsAg als auch HDV-RNA in den Isolaten nachzuweisen ist, können die Isolate mit psHDV-Partikeln gleich gesetzt werden.

Die Menge an qHBsAg variierte in den unterschiedlichen Viruskonzentraten (3.4, Abbildung 23). Am meisten qHBsAg wurde für den Subgenotyp F2 gemessen. Auch unterschied sich die Menge an SVP, welche durch die psHDV in Huh7 produziert wurden zu der Menge an SVP in dem Zellkulturüberstand der Transfektion in den HepG2 Zellen (3.2.2, Abb.11). Grund dafür könnte das Verwenden unterschiedlicher Zelllinien sein. Trotz der Unterschiede zeigte sich dennoch, dass die (Sub)-Genotypen F1, F2, F4 und H vergleichend mit den anderen (Sub)-Genotypen am meisten HBsAg sekretieren konnten, was mit den Untersuchungen in Kapitel 3.2.2., Abbildung 11 übereinstimmt. Dies unterstreicht die mögliche genotypspezifische Variabilität der Sekretion an HBsAg.

4.5. Infektion und Neutralisation von HepG2-NTCP-Zellen mit pseudotypisierten Hepatitis-Delta-Viren

In der vorliegenden Arbeit sollte die Infektiosität und Neutralisierbarkeit von mit unterschiedlichen HBV-Oberflächenproteinen behüllten HDV untersucht werden. Dafür wurden HepG2-NTCP-Zellen mit rekombinanten HDV infiziert bzw. mit pAk für eine

Neutralisation präinkubiert. Zudem wurde der mAk MA18/7 verwendet. In der Tabelle 18 sind die Ergebnisse aus Abbildung 24 zusammengefasst.

psHDV Konstrukte	Infektion	mAK präS1/LHBs	pAK anti-S 10	pAK anti-S 100	pAK anti-S 500	pAK LMS 10	pAK LMS 100	pAK LMS 500	Human boost Anti-S 10	Human boost Anti-S 100
Gt A2	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
Gt D3	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
Gt H	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Gt F1	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
Gt F2	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Gt F3	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
Gt F4	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Gt D3 G145R	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Gt F3 G145R	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Gt F3 P120Q_Q129P_G145R	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Gt F3 P120Q_Q129P	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-

Tabelle 18: Übersicht der Infektions- und Neutralisationsversuche: In der Tabelle sind die Ergebnisse aus Kapitel 3.5., Abbildung 24 zusammengefasst. Das + stellt eine erfolgreiche Infektion dar. Das – zeigt keine Infektion bzw. erfolgreiche Neutralisation.

Alle untersuchten psHDV konnten HepG2-NTCP-Zellen infizieren und durch den mAk MA18/7 neutralisiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass die mit den beschriebenen HBsAg-Varianten psHDV infektiös sind. Die Infektionseffizienz variierte innerhalb der Konstrukte nur mäßig, wobei die generelle Infektionseffizienz als niedrig einzustufen ist. Eine mögliche Ursache für die insgesamt geringe Infektionseffizienz könnte eine eingeschränkte Expression des NTCP der genutzten Zelllinie innerhalb dieser Versuchsreihe sein. Damit eine generelle Infektionseffizienz innerhalb der Genotypen, Subgenotypen und Mutationen betrachtet werden kann, sollte in zukünftigen Versuchen zuvor das Maß der Expression des NTCP innerhalb der Zelllinie quantitativ bestimmt werden.

Des Weiteren konnte durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden, dass der mAk MA18/7 die Infektion der Zellen verhindert. Aus der Literatur ist bekannt, dass MA18/7 die NTCP-interagierenden Aminosäuren 20-23 der PräS1-Domäne des LHBs bindet, welche den für die Infektion relevanten Bereich darstellt und somit vermutlich kompetitiv die Bindung an NTCP verhindert (König et al., 2014; Sureau et al., 1992).

Da die Infektionseffizienz in der vorliegenden Arbeit als eher niedrig einzustufen ist, sollte in weiteren Versuchen geprüft werden, ob MA18/7 bei höherer Infektionseffizienz

weiterhin eine Infektion suffizient verhindern kann. Eine Übersicht der zur Neutralisation verwendeten pAk ist in Tabelle 19 gezeigt.

Neutralisationsantikörper	Spezies	Immunisierung	Detektion
Anti-S	Kaninchen	SHBs Hefe; Gt A2 (Zweitgenerationsvakzin)	S-Domäne
Anti-LMS	Schaf	LHBS, MHBS und SHBs von Gt A, Gt B, Gt D	PräS1, PräS2 und S-Domäne
Human boost Anti-S	Mensch	Mehrfach SHBs Hefe ; Gt A2 (Zweitgenerationsvakzin)	S-Domäne

Tabelle 19: Übersicht der zur Neutralisation verwendeten pAk. Gt = (Sub)-Genotyp.

Betrachtet man die Neutralisationsversuche mit den verwendeten pAk anhand der Tabelle 18, so fällt auf, dass der pAk Anti-S bei hohen Konzentrationen (500 IU/L) die Infektion durch HDV mit den Oberflächenproteinen der Wildtypen inhibieren konnte. Bei der niedrigsten getesteten Konzentration (10 mIU/ml) war keine Inhibition für diese Konstrukte möglich.

Die pAk Anti-S stammen aus einem mit Hefevakzin, basierend auf SHBs des Genotyps A2, immunisierten Kaninchen. Die Subgenotypen D3 und A2, welche unter anderem auch in Europa vertreten sind, konnten durch die pAk Anti-S erst mit einem Titer von 500 mIU/ml vollständig neutralisiert werden. Für den Subgenotyp D3 konnte zwischen den Titern 10 mIU/ml und 100 mIU/ml kein Unterschied der Neutralisationseffizienz beobachtet werden.

Betrachtet man die Subgenotypen des Genotyps F, so fällt auf, dass lediglich F2 und F4 mit einem Titer von 100 mIU/ml der pAk Anti-S neutralisiert werden konnten. Auffällig ist, dass für die genannten Subgenotypen besonders viel qHBsAg in den Viruskonzentraten messbar war (3.4., Abbildung 23). Dies lässt vermuten, dass eine subgenotypspezifische Variabilität der Sekretion von HBsAg die Neutralisierbarkeit erleichtern bzw. erschweren kann. Die Genotypen D und F werden in der Literatur als besonders pathogen beschrieben (Li et al., 2017). Dies bedeutet, dass sie unter anderem durch eine hohe Viruslast, besonders starke Krankheitssymptome auslösen können. In der vorliegenden Arbeit, konnte für die Subgenotypen F2 und F4 besonders viel qHBsAg gemessen werden (3.4., Abbildung 23). Es ist denkbar, dass die Immunreaktion des Organismus auf die Menge des HBsAg für vermehrte Krankheitssymptome verantwortlich sein könnten.

Vergleicht man die Subgenotypen F2 und F4 mit dem Genotyp H, welcher typischerweise asymptomatische Verläufe zeigt (Ruiz-Tachiquin et al., 2017), so fällt auf, dass dieser genau wie die Subgenotypen F3 und F4 durch einen Anti-S Titer von 100 mIU/ml neutralisiert werden konnte. Für beide Subgenotypen konnte ein niedrigeres qHBsAg als

für die Subgenotypen F2 und F4 gemessen werden. Es ist möglich, dass die Neutralisierbarkeit des (Sub)-Genotyps bei Titern zwischen 10 mIU/ml und 100 mIU/ml mit der Menge an qHBsAg in den eingesetzten Viruspräparaten zusammenhängt. Es ist also zu hinterfragen, ob (Sub)-Genotypen, welche besonders viel qHBsAg produzierten bei geringeren Anti-S Titern neutralisierbar sind, als solche, welche besonders wenig qHBsAg produzierten. Für den Subgenotyp F2 konnte unter allen Konstrukten in der vorliegenden Arbeit am meisten qHBsAg gemessen werden. Der Subgenotyp F2 konnte mit bei einem Titer von 100 mIU/ml Anti-S neutralisiert werden. Allerdings hat der Subgenotyp F1 im Vergleich zum Genotyp H mehr qHBsAg produziert. F1 konnte jedoch erst ab einem Titer von 500 mIU/ml Anti-S vollständig neutralisiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Menge an qHBsAg nicht allein ausschlaggebend für die Neutralisierbarkeit der Konstrukte zu sein scheint.

Alle HBV-Wildtypen ließen sich durch eine Konzentration von 500 mIU/ml des pAk Anti-S neutralisieren.

Betrachtet man die Konstrukte, welche eine Escapemutation beinhalten, so fällt auf, dass keines dieser Konstrukte durch den pAk Anti-S neutralisiert werden konnte. Besonderes Augenmaß gilt der Mutation G145R im Kontext der Subgenotypen D3 und F3. Für beide Konstrukte ist eine vollständige Neutralisation durch Präinkubation mit Anti-S in der Konzentration 500 mIU/ml nicht möglich (3.5., Abbildung 24 (B)). Betrachtet man in Kapitel 3.4. Abbildung 23, so fällt auf, dass die Menge an qHBsAg für beide Subgenotypen mit der Escapevariante im Vergleich zu den Wildtypen niedriger war. Dass sich die HDV mit den Oberflächenproteinen des HBV Wildtyps des Subgenotyps F3 und D3 in der vorliegenden Arbeit mit einem pAk-Titer von 500 mIU/ml neutralisieren ließen, lässt vermuten, dass die Mutation G145R den Neutralisierungserfolg, durch die geringere Menge an sekretiertem HBsAg, maßgeblich senkt.

In Deutschland ist das Erreichen, eines Anti-HBs-Wertes von ≥ 100 IE/L 4 – 8 Wochen nach der letzten Impfstoffdosis als eine erfolgreiche Grundimmunisierung definiert (Robert Koch-Institut, 2024b).

In der vorliegenden in vitro-Versuchsreihe war eine Neutralisation durch den pAk Anti-S mittels 100 mIU/ml für die Subgenotypen A2, D3, F1 und F3 nicht möglich. Auch konnte für keinen der Escapemutanten eine Neutralisation durch den pAk Anti-S erreicht werden.

Die pAk Anti-S entstammen einem Kaninchen, welches mit einem in Hefevakzin generiertem SHBs, basierend auf den Subgenotyp A2 (Serotyp *adw2*), immunisiert wurde. Phylogenetisch betrachtet, haben sich Genotypen F und H sehr früh von den anderen (Sub)-Genotypen abgetrennt. Sie sind phylogenetisch am weitesten vom Subgenotyp A2, welcher als Grundlage des weltweiten Impfstoffs dient, entfernt (Arauz-Ruiz et al., 2002).

Demnach ist es zu hinterfragen, ob ein Titer ≤ 100 mIU/ml auch vor den impfstoffernen Genotypen F (Serotyp *adw4*) und H (Serotyp *adw4*) in vivo ausreichend schützen kann. In einer von Stramer et al durchgeführten Studie wurden Blutspender auf HBV-DNA hin überprüft, welche sich Anti-HBs und Anti-HBc negativ zeigten (Stramer et al., 2011). Obwohl die Probanden in der oben genannten Studie zuvor mit einem HBV-Impfstoff, basierend auf den Subgenotyp A2, immunisiert wurden, zeigte sich bei sechs Probanden eine subklinische Infektion. Bei fünf der sechs geimpften Spendern wurde ein Nicht-Genotyp A dominierter Stamm als Ursache der Infektion festgestellt. Einer der Probanden infizierte sich mit dem Subgenotyp F1. Der Anti-HBs Titer wurde bei den zitierten Probanden <100 IE/L gemessen (Stramer et al., 2011).

Die Ergebnisse von Stramer et al zeigen, dass ein Titer < 100 IE/L eine Infektion nicht mit HBV nicht verhindern konnte.

Vergleicht man die in vivo Versuche von Stramer et al mit den Ergebnissen der hier vorliegenden in vitro Versuchsreihe, so wird deutlich, dass trotz der Anwesenheit von 100 mIU/ml Anti-S im Versuchsansatz eine Infektion der Zellen mit dem Genotyp F1 stattgefunden hat. Dies lässt vermuten, dass impfstofferne Genotypen, wie der Genotyp F, trotz Impfung eine HBV-Infektion auslösen können.

Eine Präinkubation mit dem pAk Anti-LMS zeigte für die (Sub)- Genotypen H und F4, dass dieser bei bereits niedrigen Titern (10 mIU/ml) die Infektion mit psHDV komplett neutralisieren konnte.

Es ist daher denkbar, dass bereits niedrige Titer eines Dritt-Generations-Vakzins vor einer Infektion mit dem Genotyp H schützen können. Die pAk Anti-LMS sind aus einem, mit humanen SVPs der Genotypen A, B und D, immunisierten Schaf gewonnen. Es besteht die Möglichkeit, dass eine bessere Neutralisation der impfstoffernen Genotypen durch Anti-LMS darauf beruht, dass die pAk bzw. das Dritt-Generations-Vakzin auf mehreren Genotypen beruht. Bei allen weiteren Wildtypen konnte eine Infektion durch die psHDV mit einem Titer von 100 mIU/ml der pAk Anti-LMS neutralisiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Verwendung von pAk, welche die PräS1, PräS2 und S-Domäne

binden, zu einer zuverlässigeren Neutralisation führen können. Alle Escapemutanten ließen sich durch die pAk Anti-LMS bei einem Titer von 500 mIU/ml neutralisieren. Betrachtet man erneut die Mutation G145R im Kontext des Subgenotyps D3, so fällt auf, dass durch die Mutation scheinbar höhere Titer an Anti-LMS benötigt werden, um eine Infektion vollständig zu neutralisieren. Für diese Mutation im Kontext des Subgenotyps F3 zeigt sich kein Unterschied zur Neutralisation des Wildtyps. Betrachtet man das qHBsAg der Viruskonzentration, so fällt auf, dass für den Subgenotyp D3 G145R mit 81 mIU/ml weniger als die Hälfte qHBsAg gemessen werden konnte, als für den Subgenotyp F3 G145R mit 178 mIU/ml. Dies lässt vermuten, dass die Menge an sekretiertem qHBsAg ebenfalls die Neutralisation durch Anti-LMS herabsetzen könnte und somit ggf. eine größere Konzentration an pAk für eine vollständige Neutralisation benötigt wird.

Zuletzt wurde die Neutralisierbarkeit der durch psHDV infizierten HepG2-NTCP-Zellen durch human boost Anti-S getestet. Hiermit sollte überprüft werden, ob eine mehrfach durchgeführte Immunisierung Auswirkung auf die Neutralisierbarkeit hat. Die pAk human boost Anti-S stammen von Menschen, welche mehrfach mit einem in Hefe generiertem Zweit-Generations-Vakzin immunisiert wurden.

Lediglich für die (Sub)-Genotypen H und F4, sowie die Escapemutante des Subgenotyps F3 P120Q_Q129P konnten durch die pAk human boost Anti-S, bereits bei niedrigen Titern von 10 mIU/ml, eine effiziente Neutralisation gezeigt werden. Vergleicht man die genannten Genotypen mit den Neutralisationsversuchen durch Anti-S, so könnte eine mehrfache Immunisierung zu einer effizienteren Neutralisation führen. Jedoch ist zu beachten, dass die pAk Anti-S in einem Kaninchen und die pAk human boost Anti-S in einem Menschen generiert wurden. Die unterschiedliche Säugetierspezies könnte also zusätzlich ursächlich für unterschiedliche Neutralisationsergebnisse sein.

Die übrigen Escapemutanten konnten durch die pAk human boost Anti-S unabhängig der Konzentration nicht neutralisiert werden.

Zusammenfassend konnte durch die Infektions- und Neutralisationsversuche gezeigt werden, dass alle Konstrukte durch den mAk MA18/7 neutralisiert werden konnten. Eine Neutralisation durch die pAk Anti-S nach Standardimpfung ist nur vereinzelt möglich. Auch durch häufiges Immunisieren, welches in den vorliegenden Versuchen durch die pAk human boost Anti-S gezeigt werden sollte, konnte nicht in allen Fällen eine vollständige Neutralisation erreicht werden. Ursächlich hierfür kann zudem sein, dass die

Anti-LMS durch humane SVPs exprimiert wurden. In der Literatur ist beschrieben, dass die Expression von neutralisierenden HBsAg-Epitopen in Säugerzellkulturen die Schutzwirkung des Vakzin erhöhen kann (Gerlich, 2022).

Für die Infektion durch die (Sub)-Genotypen und Escapemutanten, welche durch Präinkubation mit Anti-S nicht neutralisiert werden konnten, konnte eine Neutralisation durch Präinkubation mit 500 mIU/ml von Anti-LMS erreicht werden.

Besonders hervorzuheben ist, dass lediglich für die (Sub)-Genotypen H und F4 eine Neutralisation von 10 mIU/ml mit Anti-LMS und human boost Anti-S erzielt werden konnte. Dies zeigt, dass es von großer Bedeutung zu sein scheint, einen Anti-HBs-Titer unabhängig vom Vakzin > 100 mIU/ml zu erreichen.

Wie oben bereits beschrieben gilt in Deutschland eine Grundimmunisierung als erfolgreich, wenn ein Anti-HBs-Wert von ≥ 100 IU/L nach der Standardimpfung erreicht wurde (Robert Koch-Institut, 2024b). Laut der WHO gilt ein Anti-HBs-Titer von > 10 IU/L bereits als protektiv (World Health Organization, 2024). Nach erfolgreicher Grundimmunisierung wird aktuell von einem jahrelangen, wenn nicht sogar lebenslangen, protektiven Schutz vor HBV ausgegangen (Cornberg et al., 2021).

In einer Follow-up-Studie, bei der Anti-HBs-Titer 30 Jahre nach der ersten Impfung überprüft wurde, konnte dargestellt werden, dass bei mehr als 50 % der Probanden nach 30 Jahren ein Anti-HBs-Titer von > 10 IU/L gemessen werden konnte (Bruce et al., 2016). In der zitierten Literatur wird bei einem Titer von > 10 IU/L von einem ausreichendem Schutz und keiner Empfehlung einer Auffrischungsimpfung gesprochen. Die ermittelten Daten von Stramer et al, zeigen, dass trotz einer stattgehabten HBV-Impfung eine Infektion mit HBV nicht ausgeschlossen ist. Auch wenn die Infektionen zumeist nur subklinisch verlaufen und somit nur einen geringen Krankheitswert darstellen, ist das Übertragungspotential einer solchen Infektion trotz Impfung noch nicht ausreichend geklärt (Stramer et al., 2011).

Die hier vorliegende in vitro Versuchsreihe konnte zeigen, dass ein Anti-HBs-Titer > 10 mIU/ml und < 100 mIU/ml nur vereinzelt zu einer Neutralisation der Infektion mit psHDV führen konnte und in vitro höhere Anti-HBs-Titer benötigt werden, um eine Infektion durch Mutationen und impfstoffferne (Sub)-Genotypen zu verhindern.

Die WHO stellt das Ziel vor, die Inzidenz von HBV bis zum Jahr 2030 um 90% zu reduzieren (World Health Organization, 2024). Eine Innovation des Impfstoffes zur Bekämpfung der chronischen HBV-Infektion scheint daher unabdingbar zu sein. Ein Impfstoff, welcher mehr Genotypen umfasst und das komplette HBsAg beinhaltet, könnte

den Schutz steigern bzw. erweitern. Der bereits seit den 90iger Jahren entwickelte Impfstoff Sci-B-Vac kann, ähnlich wie hier mit den in vitro gezeigten Anti-LMS, Antikörper gegen LHBs, MHBs und SHBs des HBsAg induzieren (Krawczyk et al., 2014). In der Literatur wird deutlich, dass präS-haltige Impfstoffe in mehreren Studien im Vergleich zu konventionellen Impfstoffen, deutlich bessere Serokonversionsraten und höhere Anti-HBs-Titer zeigten (Gerlich, 2022). PreHevbrio stellt, wie Sci-B-Vac, einen der präS-haltigen Impfstoffe dar, welcher 2022 auch in Deutschland für Erwachsene zugelassen wurde (Sucher et al., 2023; Paul-Ehrlich-Institut, 2024). Eine Impfdosis beinhaltet alle Teile des HBsAg darunter 6% der PräS1-, 11% der PräS2- und 83% der S-Domäne und zeigte in Vergleichsstudien eine verbesserte Wirksamkeit gegenüber des herkömmlichen Engerix (Sucher et al., 2023). Die Firma VBI, die den Impfstoff PreHevbrio international vertrieben hat, musste jedoch im Jahr 2024 Konkurs anmelden, woraufhin die Auslieferungen des Impfstoffs gestoppt und alle noch verfügbaren Impfchargen vernichtet wurden. Es ist momentan unklar, ob und wann dieser Impfstoff in der Zukunft vertrieben wird (Zoey Becker, 2024). Einen weiteren neuen Impfstoff stellt Heplisav-B dar. Dieser ist ein rekombinanter Hefeimpfstoff, welcher im Vergleich zu Engerix zu einer höheren Immunantwort nach bereits zwei Impfdosen führt und als gute Alternative für Low-Responder verwendet werden kann (Champion, 2021). Im Gegensatz zu PreHevbrio enthält Heplisav-B jedoch keine PräS-Domänen, sondern wiederum nur das SHBs eines HBV-Genotypen. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass es sinnvoll ist, für einen breiteren Schutz, auch gegen impfstoffferne HBV-Genotypen und Escape-Mutanten, flächendeckend ein Dritt-Generations-Vakzin zu verwenden.

5. Ausblick

Das aktuell verwendete Zweit-Generations-HBV-Vakzin, welches aus SHBs des HBV-Subgenotyps A2 besteht, kann einen guten Schutz gegen die endemischen HBV-Subgenotypen bieten. Eine Impfung gilt mit einem Anti-HBs-Titer von >100 mIU/ml im Serum als erfolgreich und soll einen ausreichenden Schutz bieten. Der Subgenotyp A2 ist vornehmlich in Nord- und Westeuropa sowie in Nordamerika verbreitet. HBV-Genotypen unterscheiden sich definitionsgemäß um mehr als 7,5–8% auf Nukleotidebene bezogen auf das Gesamtgenom. Die Divergenz zwischen den Subgenotypen A1 und A2 liegt darunter (Sozzi et al., 2018). Signifikante Sequenzunterschiede können zu einer Abschwächung der Bindungsaffinität der impfinduzierten Antikörper führen und somit zu einem abgeschwächten Schutz, insbesondere bei Infektionen durch nicht endemische (Sub)-Genotypen, führen (Gerlich, 2015).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Schutz durch HDV/HBV-Infektionen mit impfstoffernen (Sub)-Genotypen wie F und H und auch durch häufig auftretende Escapemutationen eingeschränkt sein kann. Die Neutralisation durch Anti-S (Zweit-Generations-Vakzin) zeigte in der vorliegenden Arbeit einen unzureichenden Effekt bei den untersuchten Escapemutationen. Anti-LMS, ein Dritt-Generations-Vakzin, neutralisierte dabei besser als Anti-S-Vergleichssera, insbesondere bei den Genotypen F und H.

Dies zeigt die Notwendigkeit weiterer Forschungen zur Optimierung der HDV/HBV-Prophylaxe. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von HBsAg, die Infektiosität und auch die Neutralisierbarkeit, innerhalb der (Sub)-Genotypen variiert. Es ist bekannt, dass das HBV einen Gallensäuretransporter, den NTCP, auf Hepatozyten nutzt, um in die Zelle zu gelangen. Als Bindungsstelle nutzt HBV die PräS1-Domäne des LHBs. Es könnte daher sinnvoll sein, gerade diese Interaktion zu unterbinden bzw. abzuschwächen, um das Infektionsrisiko zu senken.

Die in der Arbeit angewendeten pAk Anti-LMS repräsentieren die Genotypen A, B, und D und beinhaltet alle Domänen (PräS1, PräS2 und S) des HBsAg in Form von SVPs. Die impfinduzierten IgGs können demnach neben der α -Determinante auch Epitope der PräS1-Domäne des LHBs binden, um so vor einer Infektion zu schützen.

Letztlich konnten in der vorliegenden Arbeit alle produzierten psHDV durch Anti-LMS neutralisiert werden. Auch die Infektion mit einer häufigen Mutation des Genotyps D3

und F3 G145R konnte durch eine Präinkubation mit 500 mIU/ml dieser pAk neutralisiert werden.

Das in Israel bereits seit 1993 etablierte Dritt-Generations-Vakzin Sci-B-Vac stellt ein rekombinantes HBV-Vakzin dar, welches in Hamsteroovarzellen (CHO) produziert wird. Es enthält LHBs, MHBs und SHBs, wodurch ein erweiterter Schutz vor einer HBV-Infektion besteht. Aktuelle Studien zeigen, dass Dritt-Generations-Vakzine, eine robustere und breitere Immunantwort, durch frühere und höhere Anti-HBs-Titer, aufweisen (Gerlich, 2022). Das Dritt-Generations-Vakzin PreHevbrio ist seit 2022 in Europa und auch in Deutschland zugelassen. Die Firma VBI, welche den Impfstoff weltweit vertrieben hat, meldete jedoch 2024 Konkurs an, woraufhin verfügbare Impfdosen vernichtet werden mussten und der weitere Vertrieb gestoppt wurde. Aktuell ist es unklar, ob und wann der Impfstoff erneut vertrieben wird (Zoey Becker, 2024). Die vorliegenden In vitro Untersuchungen zeigen, dass eine Impfung mit einem Dritt-Generations-Vakzin vor einer Infektion durch Escape-Mutationen wie P120Q, Q129P und G145R schützen kann, da diese auch Epitope außerhalb der α -Determinante binden. Auch die Genotypen F und H konnten neutralisiert werden.

Abschließend sollte in weiteren Versuchen geklärt werden, ob die Anti-LMS pAk auch bei einer höheren Infektionseffizienz erfolgreich neutralisieren können.

6. Zusammenfassung

Die HBV-Infektion zählt zu den häufigsten Viruserkrankungen weltweit und endet in ihrer chronischen Form häufig in einer Leberzirrhose, welche oft in ein HCC mündet. HBV kann parenteral, sexuell oder auch perinatal übertragen werden. HDV, ein Satellitenvirus des HBV, benutzt die Oberflächenproteine (HBsAg) des HBV in HDV/HBV-koinfizierten Zellen zur Umhüllung und Infektion von Hepatozyten. Die HDV-Superinfektion von HBV-infizierten Patienten verschlimmert die Lebererkrankung erheblich. Aufgrund der eingeschränkten Heilungsmöglichkeiten einer chronischen HBV-Infektion ist die Impf-Prävention essenziell im Kampf gegen HDV und HBV.

Das aktuell verwendete HBV-Zweit-Generations-Vakzin wird rekombinant in Hefezellen hergestellt, beinhaltet nur das SHBs des HBV-Subgenotyps A2 und induziert neutralisierendes anti-HBs. Dennoch besteht ein Infektionsrisiko durch impfstoffferne HBV-Genotypen oder immunologische Escapevarianten. Dritt-Generations-Vakzine beinhalten meist das komplette HBsAg (LMS), das ein breiteres Epitop-Spektrum aufweist und anti-LMS-Antikörper induziert. Die Impfung kann daher eine robustere und länger anhaltende Immunreaktion gegen HDV/HBV auslösen. Es ist daher von großem Interesse unterschiedliche HBV (Sub)-Genotypen und häufig auftretende Escapemutationen auf ihre HDV/HBV-Infektiosität und Neutralisierbarkeit durch Antikörper nach Impfung mit Zweit- und Dritt-Generations-Vakzinen zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde HBsAg der zwei divergentesten HBV-Genotypen F und H in Hepatomzellen exprimiert und die Sekretion von HBsAg, sowie dessen Antigenität durch unterschiedliche diagnostische Nachweismethoden überprüft. Es wurden psHDV produziert, welche erfolgreich HDV/HBV-suszeptible Hepatomzellen infizieren konnten. Um darzustellen, ob bekannte Escapemutationen einen Einfluss auf die HBsAg-Produktion, Infektiosität und Neutralisierbarkeit von HDV haben, wurden die Mutationen P120Q, Q129P und G145R im Kontext des HBV-Subgenotyps F3 untersucht. Anti-LMS neutralisierte dabei besser als Anti-S-Vergleichssera, insbesondere bei den Genotypen F und H. Die Neutralisation durch Anti-S zeigte einen unzureichenden Effekt bei den untersuchten Escapemutationen. Durch Boostern mit einem Zweit-Generations-Vakzin kann die Konzentration an Anti-HBs im Vergleich zum herkömmlichen Impfschema vermutlich gesteigert werden. Eine Steigerung der Neutralisationsqualität des Anti-S, welches durch Boostern induziert wurde, konnte nicht gezeigt werden.

7. Abstract

HBV infection is one of the most common viral diseases worldwide and in its chronic form often ends in liver cirrhosis, which frequently leads to HCC. HBV can be transmitted parenterally, sexually or perinatally. HDV, a satellite virus of HBV, utilises the surface proteins (HBsAg) of HBV in HDV/HBV-coinfected cells to envelop and infect hepatocytes. The HDV superinfection of HBV-infected patients significantly exacerbates liver disease. Due to the limited possibilities of curing a chronic HBV infection, vaccination prevention is essential in the fight against HDV and HBV.

The currently used HBV second-generation vaccine is produced recombinantly in yeast cells, contains only the SHBs of HBV subgenotype A2 and induces neutralising anti-HBs. Nevertheless, there is a risk of infection from HBV genotypes that are not part of the vaccine or immunological escape variants. Third-generation vaccines usually contain the complete HBsAg (LMS), which has a broader epitope spectrum and induces anti-LMS antibodies. Vaccination can therefore trigger a more robust and longer-lasting immune response against HDV/HBV.

It is therefore of great interest to investigate different HBV (sub)genotypes and frequently occurring escape mutations for their HDV/HBV infectivity and neutralisability by antibodies after vaccination with second- and third-generation vaccines. In the present study HBsAg of the two most divergent HBV genotypes F and H was expressed in hepatoma cells and the secretion of HBsAg as well as its antigenicity was analysed by different diagnostic detection methods. PsHDV was produced, which successfully infected HDV/HBV-susceptible hepatoma cells. In order to demonstrate whether known escape mutations have an influence on HBsAg production, infectivity and neutralisability of HDV, the mutations P120Q, Q129P and G145R were investigated in the context of the HBV subgenotype F3. Anti-LMS neutralised better than anti-S comparison sera, especially for genotypes F and H. Neutralisation by anti-S showed an insufficient effect for the investigated escape mutations. Boosters with a second-generation vaccine can presumably increase the concentration of anti-HBs compared to the conventional vaccination programme. An increase in the neutralisation quality of anti-S induced by boosters could not be demonstrated.

8. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Temperaturangabe Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	
A	Adenosin
a-Determinante	Antigen-determinante
a.u.	arbitrary Units
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
ag-RNA	antigenomische RNA
AGL	Antigenic loop, Antigenschleife
Ak	Antikörper
Anti-	Antikörper gegen
AS	Aminosäure
B	
bar	Druckeinheit
bp	Basenpaar(e)
Bspw.	Beispielsweise
Bzw.	Beziehungsweise
BSA	Bovines Serumalbumin
C	
cccDNA	covalently closed circular DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CaCl ₂	Calciumchlorid
Cm ²	Quadratzentimeter
D	
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

Abkürzungsverzeichnis

DNA	Deoxyribonucleic acid
dpt	Day(s) post transfection; Tag(e) nach Transfektion
E	
E. coli	Escherichia coli (Darmbakterium)
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent Assay
et al.	und andere
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor; Epidermaler Wachstumsfaktor
F	
f.c.	final concentration; Endkonzentration
fwd	Forward; vorwärts
FKS	Fötale Kälberserum
G	
g	Gramm
G	Guanin
G418	Geneticin
g-RNA	Genomische RNA
GE	Genomäquivalent
GRE	Glucocorticoid responsive elements;
GAGs	Glycosaminoglycane
GPT	Alanin-Aminotransferase (ALT, ALAT, früher Glutamat-Pyruvat-Transaminase)
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (AST = Aspartat-Aminotransferase)
H	
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBc	Hepatitis B Core Protein; Hepatitis-B-Kernprotein

Abkürzungsverzeichnis

HBs	Hepatitis B surface Protein; Hepatitis B Oberflächenprotein
HBsAg	Hepatitis B surface antigen; Hepatitis B Oberflächenantigen
HBeAg	Hepatitis B e antigen
HBcAg	Hepatitis B core antigen
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDAg	Hepatitis Delta Antigen
L-HDAg	Large Hepatitis Delta Antigen; Hepatitis Delta Antigen-groß
S-HDAg	Small Hepatitis Delta Antigen; Hepatitis delta Antigen-klein
HDV	Hepatitis-Delta-Virus
HGM	Hepatocyte growth medium
NTCP	Na ⁺ /taurocholate cotransporting polypeptide; Gallensäurerezeptor
HSPG	Heparansulfatproteoglykane
HCl	Salzsäure (Chlorwasserstoffsäure)
I	
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IU	International Unit
IE	Internationale Einheit
J	
K	
kDA	Kilo Dalton
kb	kilobasen
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
L	
l	Liter
LB	Lysogen broth; Nährmedium

Abkürzungsverzeichnis

LHBs	large Hepatitis B surface antigen; großes Hepatitis B Oberflächenprotein
M	
M	Molar
mAk	Monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
MHBs	Middle Hepatitis B surface antigen; mittleres Hepatitis B Oberflächenprotein
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger RNA
MVB	Multivesicular bodies
MgCl	Magnesiumchlorid
N	
N-	Amino- (Aminotermiales Ende)
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NTCP	Na ⁺ /taurocholate cotransporting polypeptide, Gallensäurerezeptor
NLS	Nuclear localization Signal
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
O	
ORF	open reading frame; offener Leserahmen
o.g.	oben genannten
P	
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction; Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pgRNA	prägenomische RNA

Abkürzungsverzeichnis

POD	Peroxidase
PRE	Posttranslationales regulatorisches Element
pmol	Picomol
Q	
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion
qHBsAg	quantitatives HBs-Antigen
R	
rcDNA	Relaxed circular DNA
RNA	Ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute; Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription (früher real Time) Polymerasekettenreaktion
RKI	Robert Koch-Institut
RNP	Ribonukleoprotein
rev	reverse
S	
Sek.	Sekunde
SDM	Side directed Mutagenese
SHBs	small Hepatitis B surface antigen; kleines Hepatitis B Oberflächenprotein
SVP	Subvirale Partikel
sgRNA	Subgenomische RNA
STIKO	Ständige Impfkommission
ssRNA	Single-stranded RNA
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
s-ORF	surface-open-reading-frame
T	
TMD	Transmembrandomäne
Temp	Temperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

Abkürzungsverzeichnis

U	
UV	Ultraviolett
U	Uracil
V	
V	Volt
v.a.	vor allem
VAS	Virus-assembly-Signal
W	
WHO	World health organisation Weltgesundheitsorganisation
X	
x g	Relative Zentrifugalkraft
Y	
Z	

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der HBV cccDNA mit codierenden und regulatorischen Bereichen	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus der HBV- Oberflächenproteine ...	8
Abbildung 3: Replikationszyklus HBV.....	9
Abbildung 4: Serumverlauf der akuten und chronischen HBV-Infektion:	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung des HBV	21
Abbildung 6: Gemeinsamer Replikationszyklus von HBV und HDV	22
Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA.....	48
Abbildung 8: Signalentstehung der RT-qPCR.....	52
Abbildung 9: Restriktionsanalyse der Plasmide.....	58
Abbildung 10: HBsAg Nachweis der Transfektionsüberstände im kommerziellen- Enzygnost HBsAg 6.0 von Siemens.	60
Abbildung 11: qHBsAg der Zellkulturüberstände ermittelt im Abbott Architect.	61
Abbildung 12: In-house Sandwich-ELISA zur Detektion von LHBs mit mAk MA18/7 verdünnter Zellkulturüberstände.....	63
Abbildung 13: In-house Sandwich-ELISA zur Detektion von LHBs mit mAk MA18/7 unverdünnter Zellkulturüberstände.....	64
Abbildung 14: In-house Sandwich-ELISA zur Detektion von MHBs mit mAk Q19/10 verdünnter Zellkulturüberstände.....	65
Abbildung 15: In-house Sandwich-ELISA zur Detektion von MHBs mit mAk Q19/10 unverdünnter Zellkulturüberstände.....	66
Abbildung 16: In-house Sandwich-ELISA zur Detektion von SHBs mit mAk C20/02 verdünnter Zellkulturüberstände.....	67
Abbildung 17: In-house Sandwich-ELISA zur Detektion von SHBs mit mAk C20/02 unverdünnter Zellkulturüberstände.....	68
Abbildung 18: In-house Sandwich-ELISA zur Detektion von SHBs mit mAk HB01 unverdünnte Zellkulturüberstände.. ..	69
Abbildung 19: ELISA zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit an HBsAg des pAk Anti- S in Abhängigkeit der Konzentration.	71
Abbildung 20: ELISA zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit an LHBs durch den pAk Anti-L in Abhängigkeit der Konzentration.	72
Abbildung 21: Intrazelluläre Expression des HBsAg nach Transfektion von Expressionsplasmiden unterschiedlicher HBV-(Sub)-Genotypen in HepG2- Zellen.	75
Abbildung 22: Konzentration der psHDV nach Produktion in der Zellkultur.. ..	76
Abbildung 23: Messung des qHBsAg in Zellkulturüberständen der psHDV.....	77
Abbildung 24: Infektion von HepG2-NTCP mit psHDV und Neutralisation mittels mAk Ma18/7, pAk anti-S, anti-LMS und human boost Anti-S.	78
Abbildung 25: Aminosäuren-Alignment der PräS1- und Teile der PräS2-Domäne.	87
Abbildung 26: Aminosäuren-Alignment des AGL. Dargestellt ist ein Alignment der Antigenschleife des HBsAg.....	89
Abbildung 27: Übersicht über die Verwendeten Plasmid-Konstrukte mit Beschriftung.....	127
Abbildung 27: Phylogenetischer Baum des Hepatitis-B-Virus.....	128

10. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Diagnostik bei unterschiedlicher HBV-Serologie.</i>	14
<i>Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Puffer und kommerziellen Medien.</i>	27
<i>Tabelle 3: Auflistung der eigenständig zusammengemischten Puffer, Lösungen und Medien.</i>	30
<i>Tabelle 4: Auflistung der verwendeten monoklonalen Antikörper (mAk).</i>	33
<i>Tabelle 5: Auflistung polyklonaler Primärantikörper.</i>	33
<i>Tabelle 6: Auflistung der verwendeten, kommerziellen Sekundärantikörper.</i>	35
<i>Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Primer und Probe.</i>	35
<i>Tabelle 8: Verwendete Marker.</i>	36
<i>Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Antibiotika.</i>	36
<i>Tabelle 10: Auflistung verwendeter Enzyme.</i>	36
<i>Tabelle 11: Auflistung der verwendeten, kommerziellen Kits.</i>	37
<i>Tabelle 12: Auflistung der untersuchten Plasmide.</i>	37
<i>Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien.</i>	39
<i>Tabelle 14: Auflistung der Verbrauchsmaterialien.</i>	40
<i>Tabelle 15: Quencher und Reporter der RT-qPCR mit Angaben von Emission und Absorption.</i>	53
<i>Tabelle 16: LightCycler-Programm für RT-qPCR.</i>	54
<i>Tabelle 17: Ergebnisübersicht der In-house-Sandwich ELISA Testung.</i>	86
<i>Tabelle 18: Übersicht der Infektions- und Neutralisationsversuche.</i>	96
<i>Tabelle 19: Übersicht der zur Neutralisation verwendeten pAk.</i>	97

11. Literaturverzeichnis

- Abeywickrama-Samarakoon, N., Cortay, J.-C., & Dény, P. (2016). The hepatitis D satellite virus of hepatitis B virus: Half-opening a new era to control viral infection? *Current Opinion in Infectious Diseases*, 29(6), 645–653. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000321>
- Abou El Nasr, A. A. E. W. A. A. E. N. (2011). Use of peptide microarrays for mapping viral b cell epitopes [Georg-August-University Göttingen]. <https://doi.org/10.53846/goediss-440>
- Abou-Jaoudé, G., & Sureau, C. (2007). Entry of hepatitis delta virus requires the conserved cysteine residues of the hepatitis B virus envelope protein antigenic loop and is blocked by inhibitors of thiol-disulfide exchange. *Journal of Virology*, 81(23), 13057–13066. <https://doi.org/10.1128/JVI.01495-07>
- 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>
- Al-Anazi, M. R., Nazir, N., Colak, D., Al-Ahdal, M. N., & Al-Qahtani, A. A. (2018). Deletion and Functional Analysis of Hepatitis B Virus X Protein: Evidence for an Effect on Cell Cycle Regulators. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(5), 1987–1998. <https://doi.org/10.1159/000493670>
- Alfaiate, D., Dény, P., & Durantel, D. (2015). Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. *Antiviral Research*, 122, 112–129. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.08.009>
- Altiok, E., Bätge, B., Böll, B., & Brandenburg, V. (2018). *Basislehrbuch Innere Medizin* (J. Braun, D. Müller-Wieland, H. Renz-Polster, & S. Krautzig, Hrsg.; 6. Auflage). Elsevier.
- Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Robertson, B. H., & Magnus, L. O. (2002). Genotype H: A new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *The Journal of General Virology*, 83(Pt 8), 2059–2073. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-8-2059>
- Bartenschlager, R., Urban, S., & Protzer, U. (2019). Towards curative therapy of chronic viral hepatitis. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 57(01), 61–73. <https://doi.org/10.1055/a-0824-1576>
- 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>

- Bonino, F., Piratvisuth, T., Brunetto, M. R., & Liaw, Y.-F. (2010). Diagnostic markers of chronic hepatitis B infection and disease. *Antiviral Therapy*, 15 Suppl 3, 35–44. <https://doi.org/10.3851/IMP1622>
- Borgia, G. (2012). Hepatitis B in pregnancy. *World Journal of Gastroenterology*, 18(34), 4677. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i34.4677>
- Botelho-Souza, L. F., Vasconcelos, M. P. A., dos Santos, A. de O., Salcedo, J. M. V., & Vieira, D. S. (2017). Hepatitis delta: Virological and clinical aspects. *Virology Journal*, 14(1), 177. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0845-y>
- Bruce, M. G., Bruden, D., Hurlburt, D., Zanis, C., Thompson, G., Rea, L., Toomey, M., Townshend-Bulson, L., Rudolph, K., Bulkow, L., Spradling, P. R., Baum, R., Hennessy, T., & McMahon, B. J. (2016). Antibody Levels and Protection After Hepatitis B Vaccine: Results of a 30-Year Follow-up Study and Response to a Booster Dose. *Journal of Infectious Diseases*, 214(1), 16–22. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv748>
- Champion, C. R. (2021). Heplisav-B: A Hepatitis B Vaccine With a Novel Adjuvant. *Annals of Pharmacotherapy*, 55(6), 783–791. <https://doi.org/10.1177/1060028020962050>
- Chemin, I. (Hrsg.). (2012). Hepatocellular carcinoma: A global challenge. Nova Biomedical/Nova Science Publishers.
- Cheung, K. W., Seto, M. T. Y., & Lao, T. T.-H. (2019). Prevention of perinatal hepatitis B virus transmission. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 300(2), 251–259. <https://doi.org/10.1007/s00404-019-05190-0>
- Cooreman, M. P., Leroux-Roels, G., & Paulij, W. P. (2001a). Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. *Journal of Biomedical Science*, 8(3), 237–247. <https://doi.org/10.1007/BF02256597>
- Cooreman, M. P., Leroux-Roels, G., & Paulij, W. P. (2001b). Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. *Journal of Biomedical Science*, 8(3), 237–247. <https://doi.org/10.1007/BF02256597>
- Cooreman, M. P., Leroux-Roels, G., & Paulij, W. P. (2001c). Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. *Journal of Biomedical Science*, 8(3), 237–247. <https://doi.org/10.1007/BF02256597>
- Coppola, N., Onorato, L., Minichini, C., Di Caprio, G., Starace, M., Sagnelli, C., & Sagnelli, E. (2015). Clinical significance of hepatitis B surface antigen mutants. *World Journal of Hepatology*, 7(27), 2729–2739. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i27.2729>
- Cornberg, M., Protzer, U., Petersen, J., Wedemeyer, H., Berg, T., Jilg, W., Erhardt, A., Wirth, S., Sarrazin, C., Dollinger, M., Schirmacher, P., Dathe, K., Kopp, I., Zeuzem, S., Gerlich,

- W., & Manns, M. (2011). Aktualisierung der S 3-Leitlinie zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 49(07), 871–930. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1273462>
- Cornberg, M., Sandmann, L., Protzer, U., Niederau, C., Tacke, F., Berg, T., Glebe, D., Jilg, W., Wedemeyer, H., Wirth, S., Höner zu Siederdisen, C., Lynen-Jansen, P., van Leeuwen, P., Petersen, J., & Collaborators: (2021). S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion – (AWMF-Register-Nr. 021-11). *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 59(07), 691–776. <https://doi.org/10.1055/a-1498-2512>
- D’Mello, F., Partidos, C. D., Steward, M. W., & Howard, C. R. (1997). Definition of the Primary Structure of Hepatitis B Virus (HBV) pre-S Hepatocyte Binding Domain Using Random Peptide Libraries. *Virology*, 237(2), 319–326. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8774>
- European Association For The Study Of The Liver. (2012). EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*, 57(1), 167–185. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.02.010>
- Farci, P., & Niro, G. (2012). Clinical Features of Hepatitis D. *Seminars in Liver Disease*, 32(03), 228–236. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1323628>
- Freitas, N., Abe, K., Cunha, C., Menne, S., & Gudima, S. O. (2014). Support of the Infectivity of Hepatitis Delta Virus Particles by the Envelope Proteins of Different Genotypes of Hepatitis B Virus. *Journal of Virology*, 88(11), 6255–6267. <https://doi.org/10.1128/JVI.00346-14>
- Gencay, M., Seffner, A., Pabinger, S., Gautier, J., Gohl, P., Weizenegger, M., Neofytos, D., Batrla, R., Woeste, A., Kim, H. S., Westergaard, G., Reinsch, C., Brill, E., Thuy, P. T. T., Hoang, B. H., Sonderup, M., Spearman, C. W., Brancaccio, G., Fasano, M., ... Kaminski, W. E. (2018). Detection of in vivo hepatitis B virus surface antigen mutations-A comparison of four routine screening assays. *Journal of Viral Hepatitis*, 25(10), 1132–1138. <https://doi.org/10.1111/jvh.12915>
- Gerlich, W. H. (2013). Medical Virology of Hepatitis B: How it began and where we are now. *Virology Journal*, 10(1), 239. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-239>
- Gerlich, W. H. (2015). Prophylactic vaccination against hepatitis B: Achievements, challenges and perspectives. *Medical Microbiology and Immunology*, 204(1), 39–55. <https://doi.org/10.1007/s00430-014-0373-y>

- Gerlich, W. H., Bremer, C., Saniewski, M., Schüttler, C. G., Wend, U. C., Willems, W. R., & Glebe, D. (2010). Occult Hepatitis B Virus Infection: Detection and Significance. *Digestive Diseases*, 28(1), 116–125. <https://doi.org/10.1159/000282074>
- Gerlich, W. H. (2022). Hepatitis-B-Impfstoffe – Geschichte, Erfolge, Herausforderungen und Perspektiven. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 65(2), 170–182. <https://doi.org/10.1007/s00103-021-03484-w>
- Germaschewski, V., & Murray, K. (1995). Screening a monoclonal antibody with a fusion-phage display library shows a discontinuity in a linear epitope within PreS1 of hepatitis B virus. *Journal of Medical Virology*, 45(3), 300–305. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890450311>
- Ghany, M. G., & Doo, E. C. (2009). Antiviral resistance and hepatitis B therapy. *Hepatology*, 49(S5), S174–S184. <https://doi.org/10.1002/hep.22900>
- 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>
- Godoy, B., Gomes, M., Salpini, R., Svicher, V., Silberstein, F. C., Perno, C. F., Pinho, J. R. R., & Fagundes, N. (2019). SAT-193-Evolutionary relationship among hepatitis B virus genotype D in Latin America and Europe. *Journal of Hepatology*, 70(1), e715. [https://doi.org/10.1016/S0618-8278\(19\)31428-8](https://doi.org/10.1016/S0618-8278(19)31428-8)
- Hassemer, M., Finkernagel, M., Peiffer, K.-H., Glebe, D., Akhras, S., Reuter, A., Scheiblaue, H., Sommer, L., Chudy, M., Nübling, C. M., & Hildt, E. (2017). Comparative characterization of hepatitis B virus surface antigen derived from different hepatitis B virus genotypes. *Virology*, 502, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.12.003>
- Heermann, K. H., F. Waldeck, et al. (1988). „Interaction between native human serum and the preS2 domain of hepatitis B virus surface antigen.“ J. Zuckerman, Editor, *Viral Hepatitis and Liver Disease* A. R. Liss (New York): 697–700. (o. J.).
- Heijntink, R. A., Bergen, P. van, Melber, K., Janowicz, Z. A., & Osterhaus, A. D. M. E. (2002). Hepatitis B surface antigen (HBsAg) derived from yeast cells (*Hansenula polymorpha*) used to establish an influence of antigenic subtype (adw2, adr, ayw3) in measuring the immune response after vaccination. *Vaccine*, 20(17–18), 2191–2196. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00145-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00145-7)

- Herold, G. (2020). *Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung: 2020: unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung: mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Gerd Herold.
- Huang, X., Ma, C., Zhang, Q., Shi, Q., Huang, T., Liu, C., Li, J., & Hollinger, F. B. (2017). Impact of “a” determinant mutations on detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in HBV strains from Chinese patients with occult hepatitis B. *Journal of Medical Virology*, 89(10), 1796–1803. <https://doi.org/10.1002/jmv.24859>
- Isaac, O., & Thiemer, K. (1975). [Biochemical studies on camomile components/III. In vitro studies about the antipeptic activity of (—)-Alpha-bisabolol (author’s transl)]. *Arzneimittel-Forschung*, 25(9), 1352–1354.
- Ito, K., Qin, Y., Guarnieri, M., Garcia, T., Kwei, K., Mizokami, M., Zhang, J., Li, J., Wands, J. R., & Tong, S. (2010). Impairment of Hepatitis B Virus Virion Secretion by Single-Amino-Acid Substitutions in the Small Envelope Protein and Rescue by a Novel Glycosylation Site. *Journal of Virology*, 84(24), 12850–12861. <https://doi.org/10.1128/JVI.01499-10>
- Jack, A. D., Hall, A. J., Maine, N., Mendy, M., & Whittle, H. C. (1999). What Level of Hepatitis B Antibody Is Protective? *The Journal of Infectious Diseases*, 179(2), 489–492. <https://doi.org/10.1086/314578>
- Jaoudé, G. A., & Sureau, C. (2005). Role of the antigenic loop of the hepatitis B virus envelope proteins in infectivity of hepatitis delta virus. *Journal of Virology*, 79(16), 10460–10466. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10460-10466.2005>
- Jia, J., Li, Y., Wei, C., Guo, R., Xu, H., Jia, Y., Wu, Y., Li, Y., Wei, Z., Qi, X., Li, Z., & Gao, X. (2019). Factors associated with disease progression and viral replication in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7482>
- Kalinina, T. (2003). Deficiency in virion secretion and decreased stability of the hepatitis B virus immune escape mutant G145R. *Hepatology*, 38(5), 1274–1281. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50484>
- Kato, M., Hamada-Tsutsumi, S., Okuse, C., Sakai, A., Matsumoto, N., Sato, M., Sato, T., Arito, M., Omoteyama, K., Suematsu, N., Okamoto, K., Kato, T., Itoh, F., Sumazaki, R., Tanaka, Y., Yotsuyanagi, H., Kato, T., & Kurokawa, M. S. (2017). Effects of vaccine-acquired polyclonal anti-HBs antibodies on the prevention of HBV infection of non-vaccine genotypes. *Journal of Gastroenterology*, 52(9), 1051–1063. <https://doi.org/10.1007/s00535-017-1316-3>

- König, A., Döring, B., Mohr, C., Geipel, A., Geyer, J., & Glebe, D. (2014). Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 61(4), 867–875. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.05.018>
- Kramvis, A., & Kew, M. C. (2005). Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. *Journal of Viral Hepatitis*, 12(5), 456–464. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2005.00624.x>
- Kramvis, A. (2014). Genotypes and Genetic Variability of Hepatitis B Virus. *Intervirology*, 57(3–4), 141–150. <https://doi.org/10.1159/000360947>
- Krawczyk, A., Ludwig, C., Jochum, C., Fiedler, M., Heinemann, F. M., Shouval, D., Roggendorf, M., Roggendorf, H., & Lindemann, M. (2014). Induction of a robust T- and B-cell immune response in non- and low-responders to conventional vaccination against hepatitis B by using a third generation PreS/S vaccine. *Vaccine*, 32(39), 5077–5082. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.076>
- 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>
- Lazarevic, I. (2014). Clinical implications of hepatitis B virus mutations: Recent advances. *World Journal of Gastroenterology*, 20(24), 7653. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i24.7653>
- Le Seyec, J., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C., & Gripon, P. (1999). Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *Journal of Virology*, 73(3), 2052–2057.
- Lee, S. D., Lo, K. J., Wu, J. C., Tsai, Y. T., Wang, J. Y., Ting, L. P., & Tong, M. J. (1986). Prevention of maternal-infant hepatitis B virus transmission by immunization: The role of serum hepatitis B virus DNA. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 6(3), 369–373. <https://doi.org/10.1002/hep.1840060306>
- Lefkowitz, R. J. (1975). Identification of adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptors with radiolabeled beta-adrenergic antagonists. *Biochemical Pharmacology*, 24(18), 1651–1658. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(75\)90001-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(75)90001-5)
- Li, S., Wang, Z., Li, Y., & Ding, G. (2017). Adaptive evolution of proteins in hepatitis B virus during divergence of genotypes. *Scientific Reports*, 7(1), 1990. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02012-8>

- Li, W. (2015). The Hepatitis B Virus Receptor. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 31(1), 125–147. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125241>
- Lin, C.-L., & Kao, J.-H. (2017). Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 31(3), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2017.04.010>
- Littlejohn, M., Locarnini, S., & Yuen, L. (2016). Origins and Evolution of Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(1), a021360. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021360>
- Livingston, S. E., Simonetti, J. P., Bulkow, L. R., Homan, C. E., Snowball, M. M., Cagle, H. H., Negus, S. E., & McMahon, B. J. (2007). Clearance of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B and genotypes A, B, C, D, and F. *Gastroenterology*, 133(5), 1452–1457. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.08.010>
- Marciano, S., Galdame, O. A., & Gadano, A. C. (2013). HBV genotype F: Natural history and treatment. *Antiviral Therapy*, 18(3 Pt B), 485–488. <https://doi.org/10.3851/IMP2604>
- Martínez, A. A., Zaldivar, Y. Y., CSS-NAT Group, De Castillo, Z., Ortiz, A. Y., Mendoza, Y., Cristina, J., & Pascale, J. M. (2014). High Diversity of Hepatitis B Virus Genotypes in Panamanian Blood Donors: A Molecular Analysis of New Variants. *PLoS ONE*, 9(8), e103545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103545>
- Meisel, H., Sominskaya, I., Pumpens, P., Pushko, P., Borisova, G., Deepen, R., Lu, X., Spiller, G. H., Krüger, D. H., Grens, E., & Gerlich, W. H. (1994). Fine Mapping and Functional Characterization of Two Immuno-Dominant Regions from the preS2 Sequence of Hepatitis B Virus. *Intervirology*, 37(6), 330–339. <https://doi.org/10.1159/000150397>
- Milich, D. R. (2019). Is the function of the HBeAg really unknown? *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 1–5. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1607132>
- 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.
- Nasr, A. A. (2011). Use of peptide microarrays for mapping viral B cell epitopes. Göttingen. Von

- <https://pdfs.semanticscholar.org/7eed/2c65c4c0b6ed7fa717a4a52385ae7da08304.pdf>
abgerufen. (2011).
- 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>
- Panduro, A., Escobedo Meléndez, G., Fierro, N. A., Ruiz Madrigal, B., Zepeda-Carrillo, E. A., & Román, S. (2011). [Epidemiology of viral hepatitis in Mexico]. *Salud Publica De Mexico*, 53 Suppl 1, S37-45.
- Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.-Y., Trassard, S., Sureau, C., & Roingeard, P. (2007). Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking. *Journal of Virology*, 81(8), 3842–3851. <https://doi.org/10.1128/JVI.02741-06>
- Paul-Ehrlich-Institut. (2024, Dezember 3). *Hepatitis- B- Impfstoffe*. Hepatitis- B- Impfstoffe. Paul Ehrlich Institut. https://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoffe/hepatitis-b/hepatitis-b-node.html?cms_gtp=174510_list%253D2&cms_tabcounter=0#anchor
- Peiffer, K.-H., Akhras, S., Himmelsbach, K., Hassemer, M., Finkernagel, M., Carra, G., Nuebling, M., Chudy, M., Niekamp, H., Glebe, D., Sarrazin, C., Zeuzem, S., & Hildt, E. (2015a). Intracellular accumulation of subviral HBsAg particles and diminished Nrf2 activation in HBV genotype G expressing cells lead to an increased ROI level. *Journal of Hepatology*, 62(4), 791–798. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.028>
- Peiffer, K.-H., Akhras, S., Himmelsbach, K., Hassemer, M., Finkernagel, M., Carra, G., Nuebling, M., Chudy, M., Niekamp, H., Glebe, D., Sarrazin, C., Zeuzem, S., & Hildt, E. (2015b). Intracellular accumulation of subviral HBsAg particles and diminished Nrf2 activation in HBV genotype G expressing cells lead to an increased ROI level. *Journal of Hepatology*, 62(4), 791–798. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.028>
- Pollicino, T., Cacciola, I., Saffiotti, F., & Raimondo, G. (2014). Hepatitis B virus PreS/S gene variants: Pathobiology and clinical implications. *Journal of Hepatology*, 61(2), 408–417. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.04.041>
- Pollicino, T., & Caminiti, G. (2021). HBV-Integration Studies in the Clinic: Role in the Natural History of Infection. *Viruses*, 13(3), 368. <https://doi.org/10.3390/v13030368>
- Price, H., Dunn, D., Zachary, T., Vudriko, T., Chirara, M., Kityo, C., Munderi, P., Spyer, M., Hakim, J., Gilks, C., Kaleebu, P., Pillay, D., & Gilson, R. (2017). Hepatitis B serological markers and plasma DNA concentrations: Baseline results from a treatment-monitoring

- practices trial. AIDS, 31(8), 1109–1117.
<https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001454>
- Ren, C.-C., Chen, Q.-Y., Wang, X.-Y., Harrison, T. J., Yang, Q.-L., Hu, L.-P., Liu, H.-B., He, X., Jia, H.-H., & Fang, Z.-L. (2019). Novel subgenotype D11 of hepatitis B virus in NaPo County, Guangxi, bordering Vietnam. *Journal of General Virology*, 100(5), 828–837.
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.001257>
- Revill, P. A., Chisari, F. V., Block, J. M., Dandri, M., Gehring, A. J., Guo, H., Hu, J., Kramvis, A., Lampertico, P., Janssen, H. L. A., Levrero, M., Li, W., Liang, T. J., Lim, S.-G., Lu, F., Penicaud, M. C., Tavis, J. E., Thimme, R., Members of the ICE-HBV Working Groups, ... Zoulim, F. (2019). A global scientific strategy to cure hepatitis B. *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, 4(7), 545–558. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30119-0](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30119-0)
- Robert Koch-Institut. (o. J.). Abgerufen 25. November 2023, von https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/HepatitisB/FAQ-Liste_HepB_Impfen.html
- Robert Koch-Institut. (2024a). *Epidemiologie von Hepatitis-B- und Hepatitis-C-Virusinfektionen in Deutschland im Jahr 2023 – Eine Auswertung der Meldedaten gemäß Infektionsschutzgesetz* (ISSN 2569-5266).
- Robert Koch-Institut. (2024b). *Hepatitis B und D-RKI-Ratgeber*. Robert Koch-Institut RKI Ratgeber.
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HepatitisB.html
- Roman, S. (2013). HBV endemicity in Mexico is associated with HBV genotypes H and G. *World Journal of Gastroenterology*, 19(33), 5446.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i33.5446>
- Roman, S., Tanaka, Y., Khan, A., Kurbanov, F., Kato, H., Mizokami, M., & Panduro, A. (2010). Occult hepatitis B in the genotype H-infected Nahuas and Huichol native Mexican population. *Journal of Medical Virology*, 82(9), 1527–1536.
<https://doi.org/10.1002/jmv.21846>
- Romanò, L., Paladini, S., Galli, C., Raimondo, G., Pollicino, T., & Zanetti, A. R. (2015). Hepatitis B vaccination. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 11(1), 53–57.
<https://doi.org/10.4161/hv.34306>
- Ruiz-Tachiquín, M.-E., Valdez-Salazar, H.-A., Juárez-Barreto, V., Dehesa-Violante, M., Torres, J., Muñoz-Hernández, O., & Alvarez-Muñoz, M.-T. (2007). Molecular analysis

- of hepatitis B virus „a“ determinant in asymptomatic and symptomatic Mexican carriers. *Virology Journal*, 4, 6. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-6>
- Salisse, J., & Sureau, C. (2009). A Function Essential to Viral Entry Underlies the Hepatitis B Virus „a“ Determinant. *Journal of Virology*, 83(18), 9321–9328. <https://doi.org/10.1128/JVI.00678-09>
- Salpini, R., Battisti, A., Piermatteo, L., Carioti, L., Anastasiou, O. E., Gill, U. S., Di Carlo, D., Colagrossi, L., Duca, L., Bertoli, A., La Rosa, K. Y., Fabeni, L., Iuvara, A., Malagnino, V., Cerva, C., Lichtner, M., Mastroianni, C. M., De Sanctis, G. M., Paoloni, M., ... Svicher, V. (2020). Key mutations in the C-terminus of the HBV surface glycoprotein correlate with lower HBsAg levels in vivo , hinder HBsAg secretion in vitro and reduce HBsAg structural stability in the setting of HBeAg-negative chronic HBV genotype-D infection. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 928–939. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1757998>
- Schlabe, S., Bremen, K. van, 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 (Baltimore, Md.)*, 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>
- Sevic, I., Gonzalez Lopez Ledesma, M. M., Flichman, D. M., & Campos, R. H. (2017). HBV DNA genome co-transfection procedure for the evaluation of relative fitness. *PLOS ONE*, 12(5), e0175543. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175543>
- 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>
- Sozzi, V., Shen, F., Chen, J., Colledge, D., Jackson, K., Locarnini, S., Yuan, Z., & Revill, P. A. (2018). In vitro studies identify a low replication phenotype for hepatitis B virus genotype H generally associated with occult HBV and less severe liver disease. *Virology*, 519, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.04.015>

- Stieler, J. T., & Prange, R. (2014). Involvement of ESCRT-II in Hepatitis B Virus Morphogenesis. *PLoS ONE*, 9(3), e91279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091279>
- Sugiyama, M., Tanaka, Y., Kato, T., Orito, E., Ito, K., Acharya, S. K., Gish, R. G., Kramvis, A., Shimada, T., Izumi, N., Kaito, M., Miyakawa, Y., & Mizokami, M. (2006). Influence of hepatitis B virus genotypes on the intra- and extracellular expression of viral DNA and antigens. *Hepatology*, 44(4), 915–924. <https://doi.org/10.1002/hep.21345>
- Sureau, C., Moriarty, A. M., Thornton, G. B., & Lanford, R. E. (1992). Production of infectious hepatitis delta virus in vitro and neutralization with antibodies directed against hepatitis B virus pre-S antigens. *Journal of Virology*, 66(2), 1241–1245. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.2.1241-1245.1992>
- Sureau, C., & Negro, F. (2016). The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *Journal of Hepatology*, 64(1 Suppl), S102–S116. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.013>
- Stramer, S. L., Wend, U., Candotti, D., Foster, G. A., Hollinger, F. B., Dodd, R. Y., Allain, J.-P., & Gerlich, W. (2011). Nucleic Acid Testing to Detect HBV Infection in Blood Donors. *New England Journal of Medicine*, 364(3), 236–247. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1007644>
- Sucher, A. J., Sucher, B. J., & Chahine, E. B. (2023). PreHevbrio: A New 3-Antigen Hepatitis B Vaccine for Adults. *Annals of Pharmacotherapy*, 57(3), 325–332. <https://doi.org/10.1177/10600280221114469>
- Suh, A., Weber, C. C., Kehlmaier, C., Braun, E. L., Green, R. E., Fritz, U., Ray, D. A., & Ellegren, H. (2014). Early Mesozoic Coexistence of Amniotes and Hepadnaviridae. *PLoS Genetics*, 10(12), e1004559. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004559>
- Tacke, F., Amini-Bavil-Olyaei, S., Heim, A., Luedde, T., Manns, M. P., & Trautwein, C. (2007). Acute hepatitis B virus infection by genotype F despite successful vaccination in an immune-competent German patient. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 38(4), 353–357. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.12.024>
- 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>

- Tseng, C.-H., & Lai, M. M. (2009). Hepatitis Delta Virus RNA Replication. *Viruses*, 1(3), 818–831. <https://doi.org/10.3390/v1030818>
- Venkatakrishnan, B., & Zlotnick, A. (2016). The Structural Biology of Hepatitis B Virus: Form and Function. *Annual Review of Virology*, 3(1), 429–451. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042238>
- Vesikari, T., Langley, J. M., Popovic, V., & Diaz-Mitoma, F. (2023). PreHevbrio: The first approved 3-antigen hepatitis B vaccine. *Expert Review of Vaccines*, 22(1), 1041–1054. <https://doi.org/10.1080/14760584.2023.2274482>
- Vivas-Arceo, C. (1999). Hepatocellular carcinoma is rarely present in Western Mexico. *Hepatology Research*, 16(1), 26–35. [https://doi.org/10.1016/S1386-6346\(99\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S1386-6346(99)00035-2)
- Wang, H., Wang, M., Huang, J., Xu, R., Liao, Q., Shan, Z., Zheng, Y., Rong, X., Tang, X., Li, T., Wang, W., Li, C., & Fu, Y. (2020). Novel hepatitis B virus surface antigen mutations associated with occult genotype B hepatitis B virus infection affect HBsAg detection. *Journal of Viral Hepatitis*, 27(9), 915–921. <https://doi.org/10.1111/jvh.13309>
- WHO. (2023, November 25). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
- Wirth, S. (2019). Hepatitis bei Kindern und Jugendlichen. In G. F. Hoffmann, M. J. Lentze, J. Spranger, F. Zepp, & R. Berner (Hrsg.), *Pädiatrie* (S. 1–11). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54671-6_167-2
- World Health Organization. (2024). *Global hepatitis report 2024: Action for access in low- and middle-income countries* (ISBN 978-92-4-009167-2). World Health Organization 2024.
- Zoey Becker. (2024, November 18). *VBI Vaccines recalls hepatitis B shot as it winds down operations* By Zoey Becker. [fiercepharma.com. https://www.fiercepharma.com/pharma/vbi-vaccines-pulls-hepatitis-b-vaccine-prehevbrio-shelves-after-filing-bankruptcy](https://www.fiercepharma.com/pharma/vbi-vaccines-pulls-hepatitis-b-vaccine-prehevbrio-shelves-after-filing-bankruptcy)

12. Anhang

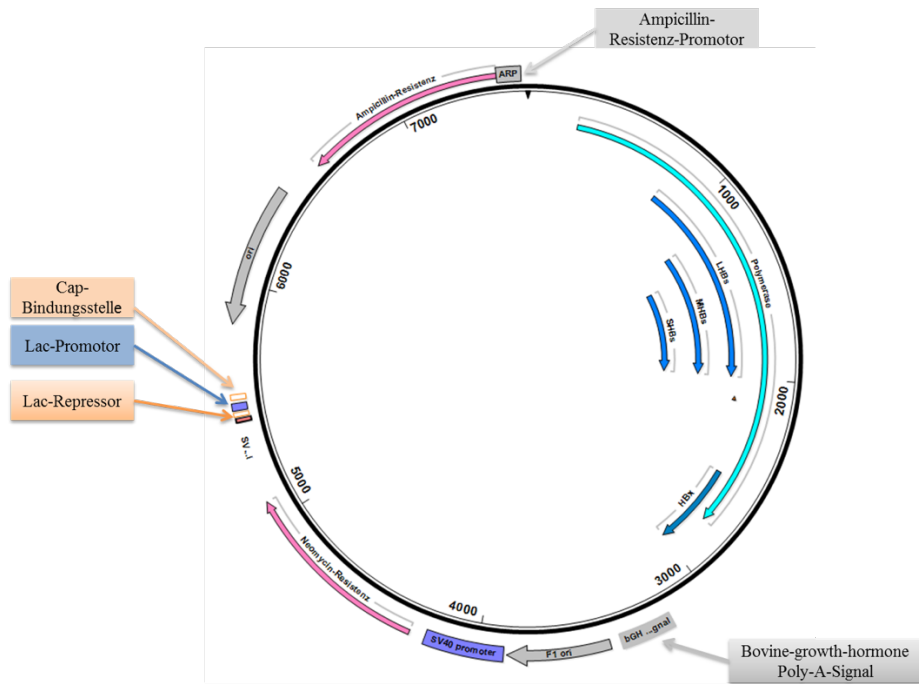


Abbildung 28: Übersicht über die Verwendeten Plasmid-Konstrukte mit Beschriftung. Backbone pcDNA3.1.; ORF der Oberflächenproteine in blau dargestellt.

13. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen , 17.05.2026

Ort/Datum

Nadia Katharina Lopez Pautz

Unterschrift

14. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dieter Glebe für die Möglichkeit zur Promotion am Institut für Medizinische Virologie und die Unterstützung bei dem Verfassen der Dissertation bedanken.

Dem gesamten Team der medizinischen Virologie gilt besonderer Dank. Ich danke für die freundschaftliche, ehrliche und außerordentlich engagierte Zusammenarbeit und Betreuung.

Vor allem möchte ich mich aber für die geduldige Betreuung durch Dr. Felix Lehmann und Dr. Nora Goldmann bedanken. Ohne euren Zuspruch und Eure Zusammenarbeit wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke, dass ich so viel von Euch lernen durfte und ihr mich bis zum Schluss unterstützt habt. Ganz besonderer Dank gilt vor allem Felix, welcher trotz Ortswechsel stets motiviert über mehrere Jahre an meiner Seite stand und bis zuletzt für alle meine Fragen eine Antwort gefunden hat. Vielen Dank Felix.

Ich möchte mich hiermit auch bei meinen Eltern und meiner Familie für die Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken. Ohne Euch hätte ich meinen akademischen Werdegang nicht bestreiten können. Danke, dass Ihr mich immer ermutigt habt meine Ziele zu verfolgen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Verlobten Martin Breiltgens bedanken, welcher meinen gesamten akademischen Werdegang begleitet hat und mir bis heute mit starker Schulter stets zur Seite steht. Ohne Dich wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin. Danke.

