

**Analyse der Infektiosität
des Hepatitis-B-Virus des Wollaffen in vitro**

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

vorgelegt von Steinbeck, Paul
aus Schwerin

Gießen 2022

**Analyse der Infektiosität
des Hepatitis-B-Virus des Wollaffen in vitro**

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

vorgelegt von Steinbeck, Paul
aus Schwerin

Gießen 2022

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

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Glebe

Gutachter: Prof. Dr. Elke Roeb

Tag der Disputation: 21.04.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	1
	Klinischer Verlauf einer Hepatitis B Virus (HBV) Infektion beim Menschen.....	1
1.2	2
	Molekulare Mechanismen der Infektion und der Virusreplikation in der Wirtszelle	2
1.3	4
	Entdeckung und Charakterisierung des Wollaffen Hepatitis B Virus (WMHBV).....	4
1.4	Forschungsschwerpunkte dieser Arbeit.....	6
2	Material.....	8
2.1	Chemikalienliste.....	8
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	11
2.3	Verwendete Geräte.....	11
2.4	Verwendete Kits.....	12
2.5	Eingesetzte Lösungen und Nährmedien.....	12
2.6	Enzyme.....	14
2.7	Antikörper und Fluorophore.....	15
2.8	Verwendete Inhibitoren.....	15
2.9	Primer.....	15
2.10	Plasmide.....	16
2.11	Bakterienstämme und Zelllinien.....	17
3	Methoden.....	19
3.1	Klonierung des Vektorplasmids pCep-Puro-WMHBV-1,1mer.....	19
3.1.1	Polymerase-Chain-Reaction (PCR) des Ausgangs-Vektors pCep-Puro-Backbone.....	19
3.1.2	PCR für das zirkuläre 1,0mer-WMHBV-Genom.....	21
3.1.3	22
	Amplifikation der beiden Inserts aus der WMHBV-cccDNA zur 1,1mer-Konstruktion.....	22
3.1.4	In-Fusion-Reaktion.....	24
3.2	Plasmid-Transformation in E. coli.....	24
3.3	Screening nach Klonen mit WMHBV-1,1mer-Plasmid.....	25
3.4	Zellkultur von HepG2 und Huh7.....	25
3.5	Bestimmung der Plasmid-Transfektionseffizienz in HepG2- und Huh7-Zellen mittels Tecan Spark 10m.....	26
3.6	Transfektion von Zellkulturen mit pCep-Puro-WMHBV-1,1mer und transiente Virusproduktion.....	27

3.7	Bestimmung der Virusgenomzahl aus transfizierten Zellkultur-Überständen mittels quantitativer PCR (qPCR).....	28
3.8	Kotransfektion zur HBV- / WMHBV- / CMHBV- Chimärenbildung.....	28
3.9	Dichtebestimmung der HBV-Viruschimären und des WMHBV mittels CsCl-Gradienten in der Ultrazentrifugation.....	29
3.10	Transfektion von HepG2-tet-on- und Huh7-Zellen mit NTCP.....	30
3.11	Nachweis der Expression von funktionellen Gallensäure-Transportern (NTCP) auf den transfizierten HepG2-Zellen.....	31
3.12	Infektion von HepG2-tet-on- und Huh7-Zellen in vitro	32
3.13	Kultivierung der infizierten Zellen.....	32
3.14	Immunhistochemische Färbung der Zellen.....	33
3.15	Validierung des sekretierten HBeAg aus den Zellkulturen.....	33
3.16	HBeAg-Test der Zellkultur-Überstände.....	33
4	Ergebnisse.....	34
4.1	Generierung eines Expressionsplasmids zur WMHBV-Produktion	34
4.2	Identifikation von pCep-Puro-WMHBV-1,1mer tragenden Bakterienkolonien	36
4.3	Bestimmung der Plasmid-Transfektionseffizienz von humanen Hepatom-Zelllinien.....	37
4.4	Detektion von HBeAg aus WMHBV-transfizierten Zellen.....	38
4.5	Nachweis des WMHBV über die HBc- und HBsAg-Expression	39
4.6	Bestimmung der Viruskonzentrationen der WMHBV-Präparate.....	41
4.7	Trans-Komplementationsanalyse von chimären HBV mit Oberflächenproteinen des WMHBV und CMHBV	41
4.8	Charakterisierung der WMHB-Virionen aus Zellkultur mittels CsCl-Gradienten	44
4.9	Funktionsprüfung der NTCPs unterschiedlicher Spezies.....	45
4.10	Bestimmung des Potentials von WMHBV zur Spezies-übergreifenden Infektion –HBeAg-Sekretion.....	49
4.11	Bestimmung des Potentials von WMHBV zur Spezies-übergreifenden Infektion – HBc- und HBs-Immunfluoreszenz.....	51
5	Diskussion	57
5.1	Klonierungsschritte zum pCep-Puro-WMHBV-1,1mer-Plasmid	57
5.2	Identifikation pCep-Puro-WMHBV-1,1mer-Plasmid-tragender Bakterienkolonien	57
5.3	Optimierung der Transfektions-Effizienz in HepG2-tet-on-Zellen	58

5.4	Validierung des HBeAg-ELISA.....	58
5.5	Nachweis des WMHBV über die HBc- und HBsAg-Expression	58
5.6	Konzentration des WMHBV im Kulturüberstand transfizierter Zellen.....	59
5.7	Konformationsanalyse der chimären Viren nach Transfektion.....	59
5.8	Analyse des WMHBV im CsCl-Gradienten	61
5.9	Nachweis der NTCP-Funktionalität.....	61
5.10	Nachweis der Infektion von NTCP-exprimierenden Hepatomzellen mit WMHBV.....	62
5.11	Limitationen der Studie.....	64
5.12	Schlussfolgerungen und Ausblick	64
6	Zusammenfassung	65
6.1	Deutsche Version.....	65
6.2	Englische Version.....	66
7	Literaturverzeichnis	67
8	Abkürzungsverzeichnis	72
9	Anhang	74
9.1	Ausgangswerte der WMHBV-Analyse in den Fraktionen des CsCl-Gradienten 74	
9.2	Konformationsanalyse der chimären Viren mittels CsCl-Gradienten	75
9.3	Infektionsexperimente mit den chimären Viren.....	77
10	Danksagung.....	78
11	Erklärung	80

1 Einleitung

1.1 Klinischer Verlauf einer Hepatitis B Virus (HBV) Infektion beim Menschen

1.1.1 Infektion und akuter Verlauf

Die Hepatitis B gehört zu den verbreitetsten Viruserkrankungen. Laut Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) waren 2015 ungefähr 257 Millionen Menschen Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) positiv und zeigten somit eine aktive HBV-Infektion. In dem Jahr verstarben laut WHO 887.000 Menschen durch fulminante Verläufe und Komplikationen der Hepatitis B. Daher gehören die Prävention und Therapie von Hepatitis B zu den wichtigsten Aufgaben im Bereich Global Health [WHO 2020].

Zum Erfolg des HBV tragen die gute Anpassung an seinen Wirt und dessen Immunsystem, die hohe Ansteckungsrate und die für ein behülltes Virus hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen und Desinfektionsmittel bei. In die Blutbahn des Wirtes gelangt es durch Kontakt mit infiziertem Blut oder Blutprodukten (parenteral). Eine Ansteckung während des Geburtsvorgangs ist bei HBV-infizierten Müttern wahrscheinlich und erfordert ein gezieltes therapeutisches und präventives Vorgehen.

Nach einer HBV-Infektion treten nach einer Inkubationszeit von 1–6 Monaten erste Symptome auf. Der klinische Verlauf hängt von der Immunantwort des Patienten ab. Bei gesunden Menschen aus westlichen Industrienationen kommt es zu Prodromi wie grippeähnlichen Krankheitsgefühlen, Oberbauchschmerzen, Druckgefühlen unter dem rechten Rippenbogen und Appetitlosigkeit. In über 90 % der Fälle heilt die Erkrankung im weiteren Verlauf vollständig aus. Ein Viertel aller Infektionen verlaufen beim Erwachsenen asymptomatisch. Lediglich ein Drittel aller Infizierten entwickelt eine akute Hepatitis mit Erhöhung der Leberwerte und Ikterus. Fulminante Verläufe bei ca. 1 % der Patienten gehen mit einer massiven Entzündung der Leber und der Gefahr eines lebensbedrohlichen Leberversagens einher. Nach einer akuten Hepatitis ist ein Posthepatitis-Syndrom möglich. Betroffene leiden unter chronischer Müdigkeit und Kraftlosigkeit sowie möglicherweise auch unter gastrointestinalen Beschwerden wie Übelkeit, Oberbauchschmerzen und Appetitlosigkeit. Das HBV-Genom wird zwar auch

wie das Humane-Immundefizienz-Virus-(HIV)-Genom in das Wirtsgenom integriert, diese Integration ist bei HBV jedoch nicht Bestandteil des Replikationszyklus und führt zum Abbruch der Replikation, da diese nur über die episomale HBV cccDNA erfolgen kann. Die cccDNA kann in Hepatozyten sehr lange überdauern, sodass es nach einer überstandenen HBV-Erkrankung unter Immunsuppression zu einer Reaktivierung kommen kann. Eine solche Reaktivierung tritt beispielsweise nach Organtransplantationen und bei leukämischen Erkrankungen auf [Krautzig und Renz-Polster 2012].

1.1.2 Chronischer Verlauf

Die Chronifizierung der akuten HBV ist stark abhängig vom Alter des Patienten. Nach einer postnatalen Mutter-Kind-Übertragung werden ca. 90% der infizierten Säuglinge chronische HBV-Träger. Bei Erwachsenen kommt es in etwa 10 % der Fälle zu einer HBsAg-Persistenz. Hierbei sezernieren infizierte Leberzellen konstant virale Proteine und Viren in unterschiedlichen Konzentrationen. Ein Drittel dieser HBsAg-positiven Patienten entwickelt im weiteren Verlauf eine chronische Entzündung des Lebergewebes. Die restlichen Patienten sind asymptomatische Konduktoren des HBV. Eine chronische Infektion wird definiert als eine HBV-Infektion die nach 6 Monaten nicht ausgeheilt ist. Hierbei sind HBsAg, das HBV-Genom (in Form von Desoxyribonukleinsäure, DNA) und sehr oft das Hepatitis B e Antigen (HBeAg) im Blut des Patienten nachweisbar.

Chronisch Infizierte haben ein erhöhtes Risiko im Verlauf ihres Lebens an einer Leberzirrhose bzw. an einem Leberzellkarzinom zu erkranken [Sinn et al. 2015]. Durch Koinfektionen mit Hepatitis-C- (HCV) oder D-Viren (HDV) oder durch Alkoholabusus steigt das Risiko weiter an. Liegen solche Kofaktoren vor, entwickeln etwa 1% der Infizierten die Leberzirrhose oder ein primäres Leberzellkarzinom. [Krautzig und Renz-Polster 2012].

1.2 Molekulare Mechanismen der Infektion und der Virusreplikation in der Wirtszelle

Über eine Verletzung der Hautbarriere in die Blutbahn eingetretene HBV binden spezifisch an Heparansulfat-Proteoglykane der Hepatozyten [Glebe und Bremer 2013,

Glebe und König 2014]. Hierbei wird die zur Innenseite gekehrte bindende preS1-Domäne des großen (large) Hepatitis B Surface Protein (LHBs) der Virushülle bei der auf die Außenseite gedreht [Seitz et al. 2016, Glebe et al. 2003]. Anschließend bindet das Virion hochspezifisch an den Gallensäuretransporter Natrium/Taurocholat Kotransporter Polypeptid (NTCP) der Hepatozyten [Yan et al. 2012], der auch die Aufnahme des HBV ins Cytosol vermittelt. Das Core-Partikel wird zum Zellkern transportiert, desintegriert an der Kernpore und setzt die relaxed circular (rc)DNA frei. Durch Wirtsenzyme wird die teilweise einzelsträngige rcDNA des Virus zum vollständigen Doppelstrang ergänzt und zu einem zirkulärem DNA-Ring (covalently closed circular DNA, cccDNA) geschlossen [Glebe et al. 2013]. Durch die Bindung an Histone und andere Proteine im Zellkern kann die cccDNA in infizierten Hepatozyten persistieren und wird oft als ein zusätzliches Minichromosom bezeichnet. Dies ist nur eingeschränkt richtig, da die cccDNA (im Gegensatz zu den zellulären Chromosomen) keinen „origin of replication“ besitzt, d.h. bei einer Zellteilung nicht wie die Chromosomen durch Wirtsenzyme vermehrt wird. Jedoch können die zytoplasmatischen, neu synthetisierten „reifen“ Core-Partikel nicht nur verpackt und als Virionen sekretiert werden, sondern auch wieder an die Poren des Zellkerns andocken und auf diese Weise den Zellkern mit neuer cccDNA versorgen. Es ist jedoch noch unklar, ob auf diese Weise nach einer vermehrten Teilung von infizierten Hepatozyten ein ausreichender Pool an HBV-Genomen in den Wirtszellen erhalten werden kann [Levero et al. 2009, Ganem und Prince 2004]. Weil durch diesen Mechanismus das Virusgenom auch nach serologischer Konversion bzw. nach ausgeheilter HBV-Infektion in den Wirtszellen persistieren kann, ist nach einer starken Immunsuppression durch Krankheit oder iatrogen eine HBV-Reaktivierung möglich [Ganem und Prince 2004].

Die cccDNA dient auch als Template für alle viralen messenger Ribonukleinsäuren (mRNAs), die wie die mRNAs der Wirtszelle eine 5'Cap-Sequenz und einen 3'Poly-A Schwanz besitzen. Eine der viralen mRNAs codiert das komplette Virusgenom (prägenomische RNA, pgRNA). Eine zweite Überlängen-mRNA dient als Template für das HBeAg. Aus zwei subgenomischen mRNAs entstehen die drei Oberflächenproteine (large (LHBs), middle-(MHBs) und small (SHBs)), die gemeinsam als HBsAg bezeichnet werden. Das regulatorische virale HBx-Protein wird von der kleinsten, ca. 0,8 Kilobasen (kb) großen mRNA translatiert [Zajackina et al. 2004]. Die pgRNA dient als Matrize zur Replikation des Virusgenoms, aber auch zur Synthese des Hepatitis B core Antigen (HBcAg) und der viruseigenen Polymerase (Pol) [Junker-Niepmann et al. 1990]. Aus der

pgRNA wird mittels reverser Transkription innerhalb der Core-Partikel mit Hilfe der HBV-Pol HBV-rcDNA synthetisiert [Summers und Mason 1982], Wie erwähnt, haben gereifte HBV-DNA-haltige Core-Partikel zwei Möglichkeiten: Entweder docken sie erneut am Zellkern an, um rcDNA in den Zellkern freizusetzen oder sie binden an die preS1-preS2-Domäne des LHBs am endoplasmatischen Retikulum. Hier werden die Core-Partikel umhüllt [Glebe et al. 2003] und über multivesikuläre Vesikel sekretiert [Carsten et al. 2007]. Die Wirtszelle wird durch die Sekretion der Viren nicht geschädigt, da keine Lyse der Zelle erfolgt. Die fulminante Hepatitis bzw. Zerstörung der Hepatozyten wird überwiegend durch die Immunantwort des Wirtes (gegen HBV-infizierte Hepatozyten) verursacht. Der überwiegende Teil des HBsAg wird ohne Beteiligung der Core-Partikel in Form von subviralen Partikeln ins Blut sezerniert. Dies ist klinisch bedeutsam, da die vom Patienten gebildeten Anti-HBs-AK durch den (insbesondere bei chronischen Fällen) kontinuierlich massenhaften Anfall an HBsAg im Serum abgefangen werden und daher nur eingeschränkt die HBV Virionen neutralisieren können.

1.3 Entdeckung und Charakterisierung des Wollaffen Hepatitis B Virus (WMHBV)

Hepatitis-B-Viren wurden bislang in einer Vielzahl von Vertebraten entdeckt (Rasche et al.). Aus Affen wurden in der Vergangenheit recht selten Hepatitis-B-Viren isoliert, insbesondere bei Neuweltaffen.

Der erste wissenschaftliche Artikel zu einem neuen Hepatitis-B-Virus aus einem Neuweltaffe wurde 1998 veröffentlicht. In einem Zoo in Louisville, Kentucky, USA verstarb ein Wollaffe an einer fulminant verlaufenden Hepatitis. Bei der Untersuchung von Blutproben (Routinekontrollen, archivierte Proben) der im Zoo lebenden südamerikanischen Wollaffen-Population auf Hepatitis-Viren stellte sich heraus, dass nahezu die gesamte Population mit einem neuartigen Hepatitis-B-Virus infiziert war. Zu diesem Zeitpunkt war im phylogenetischen Stammbaum der Hepadnaviren noch kein Isolat für Neuweltaffen bekannt [Lanford et al. 1998]. Das Genom des WMHBV unterscheidet sich zu 20% von der Sequenz des HBV des Menschen, so dass es sich nach den Kriterien des Internationalen Komitee zur Klassifizierung von Viren (ICTV) um eine neue Virus-Spezies von Hepadnaviren handelte (Magnius et al. 2020)

2003 gelang es der Arbeitsgruppe um Robert Lanford das Virus zu klonieren und humane Hepatozellen Huh7-Zellen mit der WMHBV-DNA zu transfizieren und mit den aus dem Kulturüberstand gewonnenen Viren, den nahe verwandten südamerikanischen Klammeraffen zu infizieren, bei denen kein WMHBV oder ein anderes Hepadnavirus gefunden wurde. Die Affenarten zeigten aber einen unterschiedlichen Krankheitsverlauf; während die Wollaffen im Zoo von Louisville chronische WMHBV-Infektionen hatten, zeigten die experimentell mit WMHBV infizierten, adulten Klammeraffen eine akute Hepatitis, die letztlich ausheilte. Außerdem zeigten die akut infizierten Klammeraffen eine deutlich niedrigere Viruslast im Blut als die chronisch infizierten Wollaffen. Da Wollaffen zu diesem Zeitpunkt schon unter Artenschutz standen, waren aus ethischen Abwägungen Versuchsreihen mit Wollaffen nicht möglich [Lanford et al. 2003]. Im Jahr 2018 gelang den Arbeitsgruppen von Felix Drexler, Berlin und Dieter Glebe, Gießen die Isolation und Charakterisierung einer zweiten neuartigen HBV-Spezies (CMHBV) aus einem brasilianischen Kapuzineraffen (capuchin monkey) [de Carvalho Dominguez Souza et al., 2018].

1.4 Forschungsschwerpunkte dieser Arbeit

Hepadnaviren bilden ein riesiges Erregerreservoir in verschiedenen Säugerspezies. Für den Erfolg von Präventions- und Eradikationskampagnen ist es entscheidend, inwiefern der Austausch von Virus-Subtypen zwischen Spezies möglich ist. Selbst nach einer erfolgreicher Eradikation des menschlichen HBV könnte möglicherweise eine Gefahr einer Reinfektion mit einem nahe verwandtem HBV aus dem Tierreich bestehen (Zoonose).

Das WMHBV ist in diesem Kontext noch unzureichend charakterisiert. Die Frage, welches Potential WMHBV besitzt, andere Tiere und den Menschen zu infizieren, war Schwerpunkt dieser Arbeit. Außerdem wurde untersucht, inwiefern eine Koinfektion mit dem Capuchin monkey Hepatitis B Virus (CMHBV) bzw. WMHBV und HBV zu chimären Viren mit potentiell neuen Eigenschaften (z. B. Resistenz gegen Impf-HBV-Anti-HBs-AK, differentes Wirtsspektrum) führen könnte.

Da Wollaffen vom Aussterben bedroht sind und die Gewinnung primärer humaner oder tierischer Hepatozyten strengen Auflagen unterliegt, wurde für die Versuche auf etablierte humane Leber-Zelllinien zurückgegriffen.

In der vorliegenden Dissertation wurden folgende Versuche durchgeführt:

Gewinnung von WMHBV aus Zellkultur für Infektionsversuche: Zunächst wurde ein WMHBV-Expressionsplasmid mit der genetischen Information des Virus kloniert. Nach Transfektion von Huh7- und HepG2-Zellen wurden infektiöse WMHBV aus den Kulturüberständen gewonnen.

Infektionsversuche mit den *in vitro* hergestellten WMHBV: Zur Analyse, ob WMHBV die Zellmembranen unterschiedlicher Tiere überwinden kann, wurden HepG2-Zellen mit Expressionplasmiden für den hochaffinen HBV-Rezeptor NTCP aus unterschiedlichen Spezies transfiziert und mit den *in vitro* hergestellten WMHBV inkubiert.

Auswertung der Infektionsversuche: Mit einem HBeAg-Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) wurde gezeigt, dass WMHBV in den HepG2-Teton-Zellen aktiv war. Mittels immunhistochemischer Markierung von HBsAg und HBcAg wurden in den Zellkulturen WMHBV-Ag-produzierende Zellen bestimmt.

Erzeugung / Charakterisierung von chimären Viren aus WMHBV- und CMHBV-Virushüllen und HBV-Core-Protein: Die Fähigkeit, chimäre Virionen zu bilden, wurde

in Kotransfektionsexperimenten analysiert. Weiter wurde im Kulturüberstand eine Konformationsanalyse mittels Cäsiumchlorid-(CsCl)-Gradienten durchgeführt.

2 Material

2.1 Chemikalienliste

Name	Hersteller	Katalognummer
Absolute SYBR-Green Capillary Mix	Thermo Scientific, Waltham, USA	AB-4166
Agarose	Biozym Scientific, Oldenburg	840004
Bacto-Agar	BD Biosciences, Heidelberg	214010
Carbenicillin-Dinatriumsalz	Roth, Karlsruhe	6344.3
Caspofungin-Acetat	Sequoia, Pangbourne, UK	SRP05500c
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	D4902
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe	4720.2
Dinatriumhydrogen-phosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt	1197530250
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	D9891-5G
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies, Carlsbad, USA	41966-029
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) ohne Phenolrot	Life Technologies, Carlsbad, USA	21063-029
DNA-Marker (1 kb DNA-Ladder)	Life Technologies, Carlsbad, USA	15615016
Desoxyribonukleotid-Triphosphate-Mix (dNTPs) (10 mM)	Thermo Scientific, Waltham, USA	R0199
Entecavir, Nukleosidanalogen	Sequoia, Pangbourne, UK	SRP010887e

Essigsäure	Roth, Karlsruhe	6755.2
Ethanol	Roth, Karlsruhe	5054.3
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg	21238.01
Elektrophorese-Laufpuffer (10x Tris / Glycerin / SDS)	Bio-Rad Laboratories, München	1610732
Formaldehyd	Merck, Darmstadt	104003
Fetales Kälberserum (FKS, Tetracyclin-frei)	PAN, Aidenbach	P30-3602
Gel-Auftragspuffer (6 x), blau	New England Biolabs	87021S
Gentamycin	Life Technologies, Carlsbad, USA	15750-045
Glutamax	Thermo Scientific, Waltham, USA	25030-024
Hepes-Buffer-Solution (1 M)	Life Technologies, Darmstadt	15630-056
HyClone™ FetalClone IITM	Thermo Scientific, Waltham, USA	SH30066.03
Isopropanol	Merck, Darmstadt	1070222511
Kollagen Typ I	BD Biosciences, Heidelberg	354236
Magnesiumchlorid-Lösung, 1 M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	M1028
Methylenblau	Roth, Karlsruhe	0648.2
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	31434
Natriumpyruvat	Thermo Scientific, Waltham, USA	11360-039
Polyethylenglykol (PEG)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	M1028
Penicillin/Streptomycin Lösung (100x)	PAA, Pasching, Österreich	P11-010
Pyruvat (100 mM)	PAA, Pasching, Österreich	S11-003

Puromycin	Roth, Karlsruhe	0240.1
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt	101516
Super Optimal Growth with Catabolite repression (SOC) Medium	Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich	636963
Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) –(5 x)	PAA, Pasching, Österreich	L11-003
TAE-Puffer (50 x)	Applichem, Darmstadt	A1691.1000
Triton-X-100	Life Technologies, Darmstadt	28313
Wasser für die Molekularbiologie	Applichem, Darmstadt	A7398.1000
Williams-E-Medium (GlutaMAX™ Supplement)	Thermo Scientific, Waltham, USA	32551020
WST-1	Roche Diagnostics, Mannheim	50159440001

2.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Bakterienschalen	BD Biosciences, Heidelberg
Einwegpipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einweg-Skalpell	MAGV, Rabenau-Londorf
LightCycler 96-Well Platte	Roche Diagnostics, Mannheim
Mikrotiterplatten Maxisorb	Nunc, Wiesbaden
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Gilson, Limburg.Offheim
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, gestopft	Nerbe plus, Winsen
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße FALCON (15 mL, 50 mL)	BD Biosciences, Heidelberg
Vivaspin 20 centrifugal concentrators	Sartorius, Göttingen
Zellkulturschalen 6, 12, 24 48, und 96 Well	BD Biosciences, Heidelberg

2.3 Verwendete Geräte

Name	Hersteller und Standort
Bakterienschüttler Innova 44	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank MCO-19AICUV-PE	Panasonic, Hamburg
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Durchlichtmikroskop	Zeiss, Wetzlar
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Invitrogen, Carlsbad, USA
Leica DM 5500 B	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Laborschüttler Swip KS 10	Edmund Bühler, Tübingen
LightCycler 480 II	Roche, Mannheim
Photometer Picodrop	Biozym Scientific, Oldenburg
Pipetten Biohit	Sartorius, Göttingen
Pipettierhilfen	Integra Biosciences, Fernwald

Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn
Sterilbank KS-12	Thermo Scientific, Schwerte
Vortexer	IKA, Staufen

2.4 Verwendete Kits

Name	Hersteller, Standort	Katalognr.
FuGENE-HD-Transfection-Reagent	Promega, Mannheim	E231A
High-Pure-Viral-Nucleic-Acid-Kit	Roche, Mannheim	11858874001
In-Fusion-HD-Cloning-Kit	Clontech, Frankreich	639643
		845-KS-
InnuPREP-Gel-Extraction-Kit	Analytik Jena Biometra, Jena	5030050
		845-KS-
InnuPREP-Mini-Kit	Analytik Jena Biometra, Jena	5041010
Plasmid-Plus-Midi-Kit	Quiagen, Venlo	12943
Verso-1-Step QRT-PCR Kit plus ROX	Thermo Scientific, Schwerte	28704
Xtreme-Gene-HP-Transfection-Reagent	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	6366236001

2.5 Eingesetzte Lösungen und Nährmedien

Alle selbst angesetzten Lösungen wurden mit Reinstwasser aus der Reinstwasseranlage hergestellt.

Basismedium zur Kultivierung der Zelllinien HepG2-tet-on und Huh7

Zur Kultivierung und Passage von HepG2-tet-on- und der Huh7-Zellen wurde DMEM mit Phenolrot mit 10 % FKS verwendet. Für eine prophylaktische Antibiose wurde Penicillin/Streptomycin-Lösung zugesetzt. Damit das Tet-on-System in den HepG2-Zellen erhalten bleibt, wurde der DMEM-Lösung zusätzlich Geneticin (G418) zugefügt. Für die Langzeitkultivierung und nach zytotoxischen Prozeduren wurde für Huh7-Zellen Williams-E-Medium mit 1 % Hepes-Buffer-Solution (1 M) und 2–10 % FKS verwendet. Bei HepG2-tet-on-Zellen wurde in diesen Fällen eine Hepatocyte Growth Medium (HGM) Lösung eingesetzt.

Hepatocyte Growth Medium (HGM)

DMEM ohne Phenolrot

IST-Mix

BSA Fr. V, endotoxinarm

Glutamax

Dexamethason

Gentamycin

Natriumpyruvat

Casprofungin-Acetat

Phosphat-Puffer (phosphate buffered saline, PBS)

137 mM NaCl

3,4 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O

1,8 mM KH₂PO₄

auf pH=7,4 eingestellt mit HCl

PBS++

Stocklösung (100 x): 1,32 g CaCl₂ und 2,133 g MgCl₂ mit Reinstwasser auf 100 mL auffüllen. Für die gebrauchsfertige-Lösung mit PBS 1:100 zurückverdünnen

Trypsin/EDTA-Lösung

100 mL Trypsin/EDTA (5x) wurde zu 400 mL PBS (1 x) hinzugegeben.

Methylenblau-Lösung

Die 2 %ige Methylenblau Stocklösung wurde 1:100 verdünnt eingesetzt.

Lysogeny Broth (LB) Medium

Auf 1 Liter Reinstwasser kommen 5 g Hefe-Extrakt, 10 g Bacto-Trypton und 10 g NaCl

Agaroseplatten mit LB-Medium

7,5 g Bacto-Agar wurden mit 400 mL LB-Medium aufgekocht und nach kurzem Abkühlen mit 800 µL Carbenicillin (50 µg/mL) versetzt. Anschließend wurden ca. 20 mL

Lösung in sterile 10 cm Bakterialschalen gegeben. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Schritte unter der Sterilbank KS-12 durchgeführt.

TAE-Pufferlösung 50 x Stock

242 g	Tris-Puffer
57,1 mL	Essigsäure
100 mL	EDTA (0,5 M)

auf pH=8,0 mit der Essigsäure einstellen

PBS/Tween20

PBS (1 x)
0,1% Tween20 (v/v)

TNE (1 x)

20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
140 mM	NaCl
1 mM	EDTA

Secreted embryonic alkaline phosphatase-(SEAP)-Puffer

2 M	Diethanolamin (100 %)
1 mM	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
20 mM	L-Homoarginin
50 mL	H ₂ O aqua dest.

SEAP-Substrat

p-Nitrophenolphosphat (50 mM) in 5 mL H₂O

2.6 Enzyme

KpnI-HF (NEB) Restriktionsenzym

DpnI Restriktionsenzym

T4-Ligase

2.7 Antikörper und Fluorophore

WMHBV-spezifische Primärantikörper (Kreuzreaktivität mit WMHBV und HBV)

Anti-HB1-Maus-AK

Anti-HBc-Kaninchen-AK

Zweitantikörper gekoppelt mit fluoreszierendem Farbstoff

Ziege-Anti-Maus-AK 488 nm

Ziege-Anti-Kaninchen-AK 568 nm

2.8 Verwendete Inhibitoren

Entecavir: Durch Hemmung der viralen reversen Transkriptase durch das Nukleotid-Analogen Entecavir wird die Virusreplikation unterbunden.

Puromycin: Antibiotikum, das in der Forschung zur Selektion von stabilen Klonen häufig genutzt wird.

2.9 Primer

Hope-Primer

Klonierungsprimer:

CEPU-30nt-fw	gctagcaagcttgctagcgg
CEPU-30nt-rev	ggaggtctatataagcagagctcgt
Will-WMHBV-P1-11-fw	TTTCACCTCTGCCTGATCATC
Will-WMHBV-P2-11-rev	GCCTCACCATGCATCTT
11-A-fw	ataagcagagctcgttcacatgcATCTTTTTCACC
11-D-fw	TGGATGTGTCTGCGGC
11-N-rev	GCTGGATGTGTCTGCGG
11-I-rev	GCCTGCTGACTTCTTTCCTTCgctagcaagcttget

2.10 Plasmide

pSEAP2-Control (SEAP-Plasmid): Das Plasmid exprimiert plazentare sekretierte alkalische Phosphatase. Über den Substratverbrauch ist eine quantitative Aussage möglich, wie viel Plasmid-DNA in die Zellen gelangt ist. In den vorliegenden Versuchsreihen meist nur als Negativkontrolle verwendet, weil das Plasmid nach Transfektion keine HBV-Antigene exprimiert.

pZ-Donor-N3825-C1-1,5mer: HBV-Expressionsplasmid (1,5mer) des HBV-Genotyp C; mit diesem Plasmid transfizierte Zellen sezernieren HBV, HBsAg und HBeAg. Er wurde unter anderem für die Validierung des HBeAg-ELISA (Abbot Architect) als Positivkontrolle verwendet

pCWM-9/3088MroLan: Das WMHBV-kodierende Plasmid wurde von Professor Michael Nassal bereitgestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Plasmid als Template genutzt, um das 1,1mer-Genom des WMHBV zu klonieren.

pCep-Puro-WMHBV-1,1mer: WMHBV-Expressionsplasmid mit dem WMHBV-Komplettgenom mit einer 200 bp Überlänge (1,1mer). Daneben verfügt es über einen Cytomegalievirus-(CMV)-Promotor für die Expression der WMHBV-pgRNA und eine Puromycin-Resistenz zur Selektion der Plasmid-tragenden Zellen.

pCH9-3091: HBV-Expressionsplasmid (1,1mer) des HBV-Genotyp D, das das gesamte HBV-Genom kodiert und infektiöse Viren in Zellkultur produziert.

pCH9-3091-XXX: HBV-Expressionsplasmid (1,1mer) des HBV-Genotyp D, das das gesamte HBV-Genom kodiert. Die Startcodons für die HBV-Oberflächenproteine (LHBs, MHBs und SHBs) wurden durch Punktmutation inaktiviert. Eine HBV-Produktion und Sekretion ist nur bei einer Kotransfektion mit einem Plasmid möglich, das *in trans* die HBV-Oberflächenproteine zur Verfügung stellt.

pcH9-200nurLHBsWMHBV: Expressionsplasmid, das für die WMHBV-Oberflächenproteine kodiert.

pcH9-200nurLHBsCMHBV: Expressionsplasmid, das für die CMHBV-Oberflächenproteine kodiert.

pcH9-200mitLHBsHuman: Expressionsplasmid, das für die HBV-Oberflächenproteine kodiert.

pZFN-tupaiaNTCP-Flag: Expressionsplasmid, das für das NTCP aus *Tupaia belangeri* (Südostasiatisches Spitzhörnchen) kodiert.

pZFN-hNTCP-Flag: Expressionsplasmid, das für das humane NTCP kodiert.

pZFN-saimiriNTCP-Flag: Expressionsplasmid, das für das NTCP aus *Saimiri sciureus* (Gewöhnlicher Totenkopffaffe) kodiert.

pZFN-mmulNTCP-Flag: Expressionsplasmid, das für den Wildtyp von NTCP aus *Macaca sinica* (Ceylon Hutaffe) kodiert

pZFN-mmulR158GNTCP-Flag: Expressionsplasmid, das für die Mutante R158G von NTCP aus *Macaca sinica* kodiert.

pZFN-chimpNTCP-Flag: Expressionsplasmid, das für das NTCP aus *Pan troglodytes* (Schimpanse) kodiert.

Green-fluorescent-protein-(GFP)-Plasmid: Das Plasmid exprimiert ein grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria* und wurde zur Bestimmung des optimalen Verhältnisses von Transfektionsreagenz zu Plasmid-DNA eingesetzt.

2.11 Bakterienstämme und Zelllinien

HepG2: Zelllinie, die 1975 aus einem menschlichen Lebertumor isoliert wurde. HepG2-Zellen zeichnen sich durch einen hohen Differenzierungsgrad und durch den Erhalt der Fähigkeit, Plasmaproteine (z. B. Alpha-Fetoprotein, Albumin) zu synthetisieren, aus. Sie bilden den physiologischen Stoffwechsel primärer humaner Hepatozyten besser ab als vergleichbare Zelllinien [Aden et al. 1979].

Huh7: Zelllinie, die 1982 in Japan aus einem menschlichen Lebertumor isoliert wurde und ebenfalls viele Plasmaproteine sezerniert. Sie zeichnet sich durch ein schnelles Wachstum in künstlichen Kulturmedien aus [Nakabayashi et al. 1982].

Star-Competent-Cells: *Escherichia (E.) coli*, die von der Fa. Clontech in Saint Germain en Laye bezogen wurde.

3 Methoden

3.1 Klonierung des Vektorplasmids pCep-Puro-WMHBV-1,1mer

3.1.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR) des Ausgangs-Vektors pCep-Puro-Backbone

Aufgrund seiner Größe musste das Vektorplasmid pCep-Puro zunächst linearisiert werden. Hierfür wurde ein Restriktionsverdau mit KpnI-HF durchgeführt.

Reaktionsansatz

4 µg	Plasmid-DNA
2 µL	10x Puffer (NEB)
3 µL	KpnI-HF (NEB)
20 µL	H ₂ O

Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei 37°C inkubiert und die geschnittene Plasmid-DNA anschließend mit dem PCR-Purification-Kit von Analytik Jena gereinigt. Für die PCR-Amplifikation des linearisierten Plasmids wurde jeweils ein Reaktionsansatz und ein PCR-Hotstart-Mix, der zeitversetzt zugegeben wurde, angesetzt.

Reaktionsansatz

33,0 µLH ₂ O
10,0 µL 5 x HF-Puffer
1,0 µL dNTPs (10 mM)
3,0 µL CEPU-30nt-fw-Primer (10 µM)
3,0 µLCEPU-30nt-rev-Primer (10 µM)
2,5 µL DMSO
5,0 µLVerdautes Plasmid

Hotstart-Mix für 1 x Reaktionsansatz

3,5 µLH ₂ O
1,0 µL HF-Puffer
0,5 µLPhusion TAC High Fidelity Polymerase

Reaktionsbedingungen im Thermocycler

98 °C für 60 sec

80 °C für 60 sec

Zugabe des Hotstart-Mix

98 °C für 30 sec

Nächste Zyklen 35 x wiederholen:

98 °C für 10 sec

64 °C für 30 sec

72 °C für 360 sec

Abschließend 72 °C für 10 min

Kontrolle des Backbone-PCR Produktes

Einsatz von 5 µL des PCR-Produktes in einer Ethidiumbromid-Gelelektrophorese: Die Größe des PCR-Amplifikats sollte bei 10 kb liegen.

Aufreinigung des Backbone-PCR-Produktes des Plasmids pCep-Puro

Nicht-amplifizierte Plasmide, die aus der Vermehrung in Bakterien stammten, wurden 1 h mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. Anschließend wurde für 20 min bei 80 °C das Enzym inaktiviert.

Reaktionsansatz

50 µL PCR-Produkt

5 µL 10 x Tango Puffer

1 µL DpnI

Reinigung des verdauten Backbone-Vektors

50 µL des Verdaus wurde auf ein großes Agarosegel ohne Ethidiumbromid aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färbung mit Methylblau wurde die erwartete 10 kb DNA-Bande ausgeschnitten. Die im Agarosegel enthaltene DNA-Bande wurde mit dem Gel Extraction Kit von Analytik Jena herausgelöst.

3.1.2 PCR für das zirkuläre 1,0mer-WMHBV-Genom

Zur Gewinnung eines 1,0mer zirkulären WMHBV-Genoms wurde das pCWM-9/3088MroLan-Plasmid als WMHBV-codierendes Template in die PCR eingesetzt. Für diese PCR wurde ein Reaktionsansatz und ein Hotstart-Mix angesetzt.

Reaktionsansatz

33,0 µLH₂O
10,0 µL 5 x HF-Puffer
1,0 µL dNTPs (10 mM)
3,0 µL Will-P1-11-fw-Primer (10 µM)
3,0 µL Will-P2-11-rev-Primer (10 µM)
5,0 µL Plasmid WMHBV (1:1000 verdünnt)

Hotstart-Mix

3,5 µLH₂O
1,0 µL HF-Puffer
0,5 µLPhusion TAC High Fidelity Polymerase

Reaktionsbedingungen

98 °C für 60 sec

80 °C für 60 sec

Zugabe Hotstart-Mix

98 °C für 30 sec

Nächste Zyklen 35 x wiederholen:

98 °C für 10 sec

64 °C für 30 sec

72 °C für 70 sec

Abschließend 72 °C für 10 min

Kontrolle des PCR-Produktes

Einsatz von 5 µL des PCR-Produktes in einer Ethidiumbromid-Gelelektrophorese: Die Größe des PCR-Amplifikats sollte bei 3 kb liegen.

Aufreinigung des PCR-Produktes

Das restliche Material aus der PCR wurde mit dem PCR-Purification-Kit von Analytik Jena aufgereinigt.

Ligationsreaktion zur Formierung der cccDNA

Zur Ringbildung des linearen PCR-Amplifikat wurde für 3 h bei Raumtemperatur (RT) (ca. 22 °C) eine Ligationsreaktion durchgeführt.

Reaktionsansatz

10 µL PCR Produkt
2 µL 10 x-Puffer
4 µL T4-Ligase
4 µL H₂O

Kontrolle des Reaktionsproduktes

Einsatz von 5 µL des PCR-Produktes in einer Ethidiumbromid-Gelelektrophorese: Die zu erwartenden Banden sollten kleiner und größer als die Ganzgenomlänge von 3 kb sein.

3.1.3 Amplifikation der beiden Inserts aus der WMHBV-cccDNA zur 1,1mer-Konstruktion

Aus der cccDNA wurden mittels PCR zwei Inserts hergestellt, die zusammen das komplette WMHBV-Genom abdecken. Diese PCR wurde ebenfalls mit dem Hotstart-Mix eingeleitet. Die Inserts wurden einzeln in einer PCR amplifiziert.

Reaktionsansatz

24,5 µL H₂O
10 µL 5 x HF-Puffer
1,0 µL dNTPs (10 mM)
2,5 µL DMSO

Erstes Insert

6 µL 11-A-fw-Primer (10 µM)

6 µL 11-N-rev-Primer (10 µM)

Zweites Insert

6 µL 11-D-fw-Primer (10 µM)

6 µL 11-I-rev-Primer (10 µM)

5 µL Ligationsprodukt (1:100 verdünnt, ca. 1000 ng/µL)

Hotstart-Mix

3,5 µL H₂O

1,0 µL HF-Puffer

0,5 µL Phusion TAC High Fidelity Polymerase

Reaktionsbedingungen

98 °C für 30 sec

80 °C für 30 sec

Zugabe des Hotstart-Mix

98 °C für 30 sec

Folgende Zyklen 35 x wiederholen:

98 °C für 10 sec

64 °C für 30 sec

72 °C für 180 sec

Abschließend 72°C für 10 min

Kontrolle des PCR-Produktes

Einsatz von 5 µL der PCR-Produkte in einer Ethidiumbromid-Gelelektrophorese: Für das erste Insert sollte eine Bande auf der Höhe von 1,6 kb und für das zweite Insert auf der Höhe von 1,8 kb sichtbar werden.

Aufreinigung des PCR-Produktes

Jeweils 50 µL des Amplifikats wurden auf ein großes Agarosegel ohne Ethidiumbromid aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färbung mit Methylblau wurden

die erwarteten 1,6 und 1,8 kb-DNA-Banden ausgeschnitten. Die im Agarosegel enthaltenen DNA-Banden wurde mit dem Gel-Extraction-Kit von Analytik Jena herausgelöst.

3.1.4 In-Fusion-Reaktion

Im letzten Schritt wurden die linearen DNA-Stränge des pCep-Puro-Backbone-Plasmids und die beiden Inserts in einer In-Fusion-Reaktion miteinander ligiert. Dazu wurde der Reaktionsansatz bei 50 °C für 20 min inkubiert und das Reaktionsgefäß im Anschluss auf Eis gestellt.

Reaktionsansatz

Das relative Verhältnis vom Backbone-Vektor, Insert 1 und Insert 2 soll 1:2:2 betragen. Da die Menge der aus dem Agarose-Gel extrahierten DNA variiert, mussten die Volumina angepasst werden. In diesem Fall wurden eingesetzt:

8 µL	pCep-Puro Plasmid
1 µL	Insert 1
1 µL	Insert 2
2 µL	5 x In-Fusion-Premix

3.2 Plasmid-Transformation in E. coli

Um für die Versuche ausreichend Plasmid-DNA zur Verfügung zu haben, wurde das Reaktionsprodukt aus der In-Fusion-Reaktion in E. coli transformiert und vervielfältigt.

Durchführung

In einer Eiswanne wurde ein Gemisch aus 1 µL Plasmid und 30 µL E. coli (Stellar™ Cells) in einem 1,5 mL Eppendorf-Gefäß für 20 min inkubiert. Danach wurde Reaktionsansatz für 50 sec in einem auf 42 °C vorgeheizten Hitzeblock inkubiert, um in den E. coli einen Hitzeschock auszulösen, der die Zellmembran durchlässig für das WMHBV-1,1mer-Plasmid macht. Danach wurde das Eppendorf-Gefäß wieder für 2 min auf Eis gestellt. Nun wurden 250 µL Super Optimal Growth with Catabolite repression

(SOC) Medium zugefügt und der Ansatz für 1 h bei 37 °C auf einem Schüttler bei 220 rpm inkubiert. Unter einer sterilen Arbeitsbank wurden 20 µL der trüben Bakterienlösung entnommen und auf einer LB-Agarplatte mit Penicillin/Streptomycin-Zusatz verstrichen. Abschließend wurde die Kulturplatte für 12 h bei 37°C im Bakterienbrutschrank inkubiert.

3.3 Screening nach Klonen mit WMHBV-1,1mer-Plasmid

Für das Screening wurden 24 Bakterienkolonien von der Kulturplatte mit einer sterilen Pipettenspitze unter sterilen Bedingungen aufgepickt und in ein Reagenzglas mit 5 mL LB-Medium gegeben. Das verschlossene Reagenzglas wurde über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Aus jedem Bakterienklon wurde die DNA mittels des InnuPREP-Mini-Kits von Analytic Jena isoliert. Zur Linearisierung des Vektors wurden die Proben mit KpnI-HF verdaut.

Reaktionsansatz

4 µg	Plasmid-DNA
2 µL	10 x Puffer (NEB)
3 µL	KpnI-HF (NEB)
20 µL	H ₂ O

5 µL von jeder der 24 DNA-Proben wurde auf einem Ethidiumbromid-Agarosegel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Eine Bande bei ca. 3000 bp entspricht dem Vektorkonstrukt.

3.4 Zellkultur von HepG2 und Huh7

Die HepG2- und die Huh7-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) bei einer Luftfeuchte von 95 % in einem Brutschrank kultiviert. Die HepG2-Zellen wurden auf Petrischalen kultiviert, die zuvor mit Kollagen Typ I Lösung benetzt wurden. Durch eine regelmäßige Passage lag die Konfluenz der Zellen auf den Platten bei 60–

90 %. Für Huh7-Zellen wurde entsprechend vorgegangen, lediglich die Benetzung mit Kollagen Typ I konnte ausgelassen werden.

Für das Passagieren wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für 10 min in PBS mit Trypsin/EDTA (1:5) im Brutschrank inkubiert. Nun wurden die Zellen mit frischem Kulturmedium vom Boden der Kulturschale abgelöst und auf zwei neue Petrischalen verteilt.

3.5 Bestimmung der Plasmid-Transfektionseffizienz in HepG2- und Huh7-Zellen mittels Tecan Spark 10m

Zur Erarbeitung eines effizienten Transfektionsprotokolls für die Zellkulturversuche wurde eine Versuchsreihe mit einem GFP-Expressionsplasmid durchgeführt. Zunächst wurden HepG2-tet-on-Zellen auf eine mit Typ I Kollagen beschichtete 96-Well-Platte gegeben. Die Zellen wurden in DMEM mit Phenolrot und 10 % FKS bis zu einer Konfluenz von ca. 90 % inkubiert.

Für die Transfektion wurden acht Ansätze in der vom Hersteller angegebenen minimalen Menge vorbereitet (s. Tab. 1). Zuerst wurde das Xtreme-Gene-HP-Transfection-Reagent auf RT (ca. 22 °C) angewärmt. Währenddessen wurden an einer sterilen Arbeitsbank jeweils 100 µL DMEM ohne Phenolrot in acht Eppendorfgefäße gefüllt. Danach wurde in jedes Eppendorf-Gefäß 2 µg GFP-Plasmid DNA gegeben. Das vermischte Xtreme-Gene-HP-Transfection-Reagent wurde in verschiedenen Volumina zugefügt.

Tab. 1: Reaktionsansätze zur Optimierung der Transfektionseffizienz

DNA = Desoxyribonukleinsäure; GFP = Green-Fluorescent-Protein

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
Xtreme-Gene-HP-Transfection-Reagent (µl)	8	7	6,5	6	5,5	5	4	3
GFP-DNA (µg)	2	2	2	2	2	2	2	2 µg
Verhältnis Reagenz/DNA	4	3,5	3,25	3	2,75	2,5	2	1,5

Die acht Transfektionsansätze wurden für 20 min bei RT inkubiert. 6,6 µL Transfektionsansatz mit 0,132 µg Plasmid-DNA wurden vorsichtig in die Wells einer 96-Well-Platte, ohne den Rand der Wells zu berühren, gegeben. Mit jedem der acht Transfektionsansätze wurden jeweils zwölf der Wells transfiziert. Nach einer Inkubation der 96-Well-Platte für ca. 24 h im Brutschrank wurde das Kulturmedium gewechselt und durch frisches DMEM mit Phenolrot und 2 % FKS und 2 % DMSO ersetzt.

Nach 3 d Inkubation im Brutschrank wurde das Kulturmedium abermals gewechselt und durch PBS ersetzt, um die GFP-Transfektion auszuwerten. Dazu wurde der Gehalt an GFP in den Wells mit dem Tecan Spark 10m gemessen. In diesem Gerät wurde das GFP mit Licht der Wellenlänge 488 nm und für die Fluoreszenz mit Licht der Wellenlänge 533 nm angeregt. Die Stärke des emittierten Lichtes war direkt proportional zu der Menge an GFP in den Wells, so dass Rückschlüsse auf die Transfektionseffizienz möglich waren.

3.6 Transfektion von Zellkulturen mit pCep-Puro-WMHBV-1,1mer und transiente Virusproduktion

Mit dem klonierten WMHBV-1,1mer-Expressionsplasmid sollte WMHBV in HepG2 tet-on-Zellen und Huh7-Zellen für Infektionsexperimente hergestellt werden. Auf jeweils fünf Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser wurde ein Zellrasen mit ca. 90 % Konfluenz kultiviert. Als Kulturmedium diente für beide Zelllinien DMEM mit Phenolrot und 10 % FKS. Direkt vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Für die Transfektionsansätze wurde für die HepG2-tet-on-Zellen Xtreme-Gene-HP-Transfection-Reagent und für die Huh7-Zellen FuGENE-HD-Transfection-Reagent auf RT vorgewärmt. Zehn Eppendorf-Gefäße (1,5 mL) wurden mit 500 µL DMEM ohne Phenolrot befüllt. Anschließend wurde 10 µg des pCep-Puro-WMHBV-1,1mer-Plasmids in jedes Eppendorf-Gefäß gegeben. In jeweils fünf Eppendorf-Gefäße wurde 30 µL Xtreme-Gene-HP-Transfection-Reagent bzw. 40 µL FuGENE-HD-Transfection-Reagent zugefügt. Beide Agenzien wurden zuvor kurz gevortext und vorsichtig direkt ins Medium pipettiert. Nach 20 min Inkubationszeit wurde der Inhalt eines Eppendorf-Gefäßes auf einer Kulturschale gleichmäßig verteilt. HepG2-tet-on-Zellen wurden mit Xtreme-Gene-HP-Transfection-Reagent transfiziert und Huh7-Zellen mit FuGENE-HD-Transfection-Reagent. Die zehn Kulturschalen wurden für 24 h im Zellkultur-Brutschrank inkubiert. Danach wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Viren-Produktion erfolgte im

Langzeit-Kulturmedium (HepG2-tet-on-Zellen: DMEM ohne Phenolrot, 2 % FKS, 2 % DMSO; Huh7-Zellen: Williams-E-Medium, 5 % FKS). In Abhängigkeit von der Zahl der toten Zellen im Kulturüberstand wurde alle 4–6 d ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei der alte Überstand bei -20°C gelagert wurde. Sofern es die Viabilität zuließ, wurde die Zellen bis zu Tag 16 kultiviert. Bei manchen Huh7-Kulturen musste die Inkubation an Tag 12 durch Fixierung der Zellen beendet werden. Bei den Überständen aus beiden Zelllinien fielen jeweils etwa 200 mL an. Diese wurden mittels Ultrafiltration in der Zentrifuge auf ca. 2 mL aufkonzentriert.

3.7 Bestimmung der Virusgenomzahl aus transfizierten Zellkultur-Überständen mittels quantitativer PCR (qPCR)

Zur Abschätzung der Konzentration der Viren in der konzentrierten Lösung wurden 10 µL entnommen und mit dem Aufreinigungskit der Fa. Machery/Nagel nach den Herstellerangaben aufgereinigt, sodass die Virus-DNA in destilliertem H₂O vorlag. Hierbei wurden die 10 µL Viruskonzentrat auf 50 µL H₂O verdünnt. Von der gewonnenen DNA-Lösung wurden 8 µL für die Light-Cycler qPCR eingesetzt. Für die PCR wurden 12 µL SYBR-Green Premix verwendet.

3.8 Kotransfektion zur HBV- / WMHBV- / CMHBV-Chimärenbildung

Mit dieser Methode sollten chimäre HBV-Virionen mit viralen Oberflächenproteinen anderer Primaten-HBV-Spezies (WMHBV und CMHBV) erzeugt werden. Zur Generierung der chimären Viren wurden zwei Plasmide in molarem Verhältnis 1:1 in die Zellen transfiziert. Es kamen Kombinationen des Expressionsplasmids für den HBV-Wildtyp (pcH9-3091-XXX, keine HBV-Oberflächenprotein-Expression) und Expressionsplasmide ausschließlich für virale Oberflächenproteine von CMHBV (pcH9-200nurLHBsCMHBV) und WMHBV (pcH9-200nurLHBsWMHBV) zum Einsatz. Untersucht wurde, ob in den Zelllinien Huh7 und HepG2 chimäre Viren gebildet und sekretiert werden. Als Positivkontrolle wurde das HBV-Wildtyp-Plasmid (pcH9-3091) zusammen mit dem SEAP-Plasmid transfiziert. Als Negativkontrolle diente eine

Transfektion mit dem mutierten HBV-Plasmid pcH9-3091-XXX und dem SEAP-Plasmid, wobei ein Plasmid für die viralen HBV-Oberflächenproteine fehlte.

Zur Transfektion wurden Huh7 und HepG2-Zellen in 24-Well-Platten in einer Dichte ausgesät, dass sie am Folgetag eine Konfluenz von ca. 90 % aufwiesen. Am Tag der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Anschließend wurde der Transfektionsansatz für jedes Well zubereitet. Zu 200 μ L DMEM + Phenolrot (HepG2) bzw. 200 μ L Williams-E-Medium (Huh7) wurden 0,25 μ g Plasmid DNA (gleiche molare Anteile des HBV-Core- und Virushüll-Plasmid) zugefügt. Zu den Transfektionsansätzen für HepG2-Zellen wurden 0,75 μ L Xtreme-Gene-HP-Transfection-Reagent und zu den Ansätzen für Huh7 1 μ L FuGENE-HD-Transfection-Reagent zugegeben. Die Ansätze wurden bei RT für 20 min inkubiert und dann gleichmäßig in die Wells gegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation der Proben für 24 h im Zellkulturbrutschrank erfolgte ein Mediumwechsel auf HGM-Kulturmedium mit 2 % DMSO (Langzeitkultur). Je nach Zustand der Zellen wurde das Medium alle 3–5 Tage gewechselt. Der Überstand der Zellkulturen wurde für nachfolgende Versuche aufbewahrt und bei -20 °C verwahrt.

3.9 Dichtebestimmung der HBV-Viruschimären und des WMHBV mittels CsCl-Gradienten in der Ultrazentrifugation

Zunächst wurde ein Teil der Viruslösungen mit einer Lösung aus einem Detergenz (1 % NP40) und eines Reduktionsmittels (50 mM TCEP) vorbehandelt. Durch den Verlust der äußeren Hülle aus Lipiden und Oberflächenproteinen wurden aus den Virionen physikalisch dichtere virale Core-Partikel generiert. Auf diese Weise wurde ein Referenzwert ermittelt, bei welcher Konzentration an CsCl im Gradienten (als Maß für die Dichte des Mediums) die viralen Core-Partikel (behandelt/nicht infektiös) sedimentierten. Die korrekt zusammengesetzten und unbehandelten Viren sollten daher eine niedrigere Dichte als die Core-Partikel aufweisen.

Für jeden Versuchsansatz wurde ein 4 mL Zentrifugenröhrchen mit einer CsCl-Lösung befüllt, deren Konzentration bzw. Dichte vom Röhrchen-Boden nach oben stetig abnahm. Für diesen Effekt wurde die Röhrchen mit einer Mischkammer befüllt (s. Abb. 1): Die zwei Zylinder A und B der Mischkammer waren durch ein verschließbares Verbindungsstück miteinander verbunden. Kammer B konnte über einen Schlauch an eine Pumpe angeschlossen werden. Außerdem befand sich in Kammer B ein Rührstab.

Die beiden CsCl-Lösungen enthielten für Kammer A 1,1 g CsCl auf 1 mL TNE-Pufferlösung und für Kammer B 1,45 g CsCl auf 1 mL TNE-Pufferlösung. Das maximale Füllvolumen betrug insgesamt 3,7 mL Lösung. Vor dem Befüllen der Kammern wurde das Verbindungsstück geschlossen und Kammer B auf einen Magnetrührer gestellt. Die Pumpe wurde auf eine Flussrate von 1 mL pro Minute eingestellt. Für das Befüllen des Zentrifugenröhrchens wurde zeitgleich das Verbindungsstück geöffnet und die Pumpe eingeschaltet. Bei dem Vorgang hatte die Schlauchöffnung stets Kontakt zur bereits eingeflossenen Lösung und das Röhrchen wurde leicht schräg gehalten. Um den vollen Konzentrationsbereich abzudecken, mussten die Kammern A und B vollständig entleert werden. Im Anschluss wurde jedes Röhrchen mit 300 μ L Viruslösung überschichtet, ohne die Lösungen zu vermischen. Die Teströhrchen wurden bei 37.000 rpm und 10°C für 18 h ultrazentrifugiert.

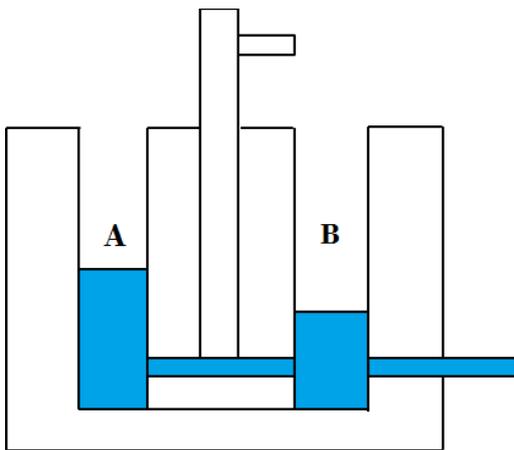


Abb. 1: Schematische Darstellung des Gefäßes zur Erstellung eines Cäsiumchlorid-(CsCl)-Gradienten im Proberöhrchen vor der Ultrazentrifugation

Die zwei Kammern (A und B) wurden mit zwei unterschiedlich konzentrierten CsCl-Lösungen befüllt (blau). Das Verbindungsstück wurde erst bei eingeschalteter Pumpe über den Glasbolzen geöffnet.

3.10 Transfektion von HepG2-tet-on- und Huh7-Zellen mit NTCP

HepG2-tet-on- und Huh7-Zellen wurden auf einer 24-Well-Platte ausgesät. Die HepG2-tet-on-Wellen wurden vorher mit einer Typ I Kollagen Lösung beschichtet. Die Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10 % FKS kultiviert, bis der Zellrasen eine Konfluenz von ca. 80 % erreichte. Für die Transfektionsreaktion wurde das Kulturmedium durch frisches ersetzt. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch vorbereitet. Dazu wurden

das Xtreme-Gene-HP-Transfection-Reagent, DMEM -Kulturmedium und die DNA-Plasmide für die NTCP-Rezeptoren auf RT vorgewärmt. Für jedes Well wurde ein Eppendorf-Gefäß mit 100 µL Kulturmedium und 0,25 µg DNA vorbereitet. Danach wurde das Xtreme-Gene-HP-Transfection-Reagent direkt in die DNA-Lösung (1 µg DNA auf 3 µL Xtreme-Gene-HP-Transfection-Reagent) gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde der gesamte Inhalt des Eppendorf-Gefäßes gleichmäßig in ein Well gegeben und die Wellplatte vorsichtig geschwenkt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Anschließend wurde der Erfolg der Transfektion evaluiert, bzw. mit dem Infektionsprotokoll begonnen. Für die Infektionsversuche wurden Plasmide, die für NTCP-Rezeptoren des Menschen (pZFN-hNTCP-Flag), des Spitzhörnchens (pZFN-tupaiaNTCP-Flag), des Totenkopffaffen (pZFN-saimiriNTCP-Flag) und des Schimpansen (pZFN-chimpNTCP-Flag) kodieren, verwendet. Für den NTCP-Rezeptor aus Hutaffen wurden Plasmide mit Wildtyp-Sequenz (pZFN-mmulNTCP-Flag) und mit einer Mutation (pZFN-mmulR158GNTCP-Flag) eingesetzt.

3.11 Nachweis der Expression von funktionellen Gallensäure-Transportern (NTCP) auf den transfizierten HepG2-Zellen

Zur Überprüfung der in den Zellkulturen exprimierten NTCP-Rezeptoren wurde eine Nitrobenzoadiazol (NBD) markierte Taurocholat-Lösung (10 µM NBD Taurocholat/PBS) auf die Zellen gegeben. Nach dem Absaugen des alten Kulturmediums wurden die Wells einmal mit PBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurden 200 µL der NBD Taurocholat/PBS-Lösung auf jedes Well gegeben. Nach 20 min Inkubation wurde die zelluläre Aufnahme des NBD-Taurocholat im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Intensität des durch Fluoreszens emittierten Lichtes steht in direktem Zusammenhang mit dem Gehalt an aufgenommenem Taurocholat, welches von der Anzahl an exprimierten NTCP-Transportern abhängt.

3.12 Infektion von HepG2-tet-on- und Huh7-Zellen in vitro

Am Tag vor der Infektion wurden die mit den NTCP-Plasmiden transfizierten HepG2-tet-on- und die Huh7-Zellen auf 24-Well-Platten ausgesät, so dass sie nach 24 h Inkubation eine Konfluenz von 90 % aufwiesen. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium durch HGM-Lösung ersetzt. Die Infektionslösung wurde wie folgt angesetzt:

HGM-Lösung (2 mL)

10 µg/mL	Casprofungin-Acetat
4 %	PEG
2 %	DMSO

Aufgrund der schlechten Löslichkeit des PEG wurde die Lösung gründlich im Vortexmischer vermischt. Erst danach wurde die Viruslösung zugegeben:

900 µL	aufkonzentrierte Viruslösung für HepG2-Zellen
700 µL	aufkonzentrierte Viruslösung für Huh7-Zellen

Nun wurde das Kulturmedium vorsichtig durch die Infektionslösung ersetzt.

3.13 Kultivierung der infizierten Zellen

Am Tag 1 nach Infektion wurden die Kulturen mit HGM-Medium zweimal vorsichtig gewaschen und anschließend in 1 mL HGM-Lösung mit 2 % DMSO weiterkultiviert. An den Tagen 4, 7 und 15 wurde der Kulturüberstand abgenommen, eingefroren und durch frisches Medium ersetzt. Auf diese Weise entstanden für jedes Well drei Proben:

1	Tag 1–4
2	Tag 5–7
3	Tag 8–15

Nach der letzten Probenentnahme an Tag 15 wurden alle Zellen mit PBS gewaschen, in einer 3,7 %igen Formaldehyd-Lösung 30 min bei 6 °C fixiert, mit PBS gewaschen und anschließend ins PBS Lösung bei 6 °C gelagert.

3.14 Immunhistochemische Färbung der Zellen

Die in Formaldehyd fixierten Zellkulturen wurden 30 min bei RT (ca. 22°C) mit PBS + 0,2 % Triton-X-100 permeabilisiert, anschließend mit PBS gewaschen und danach 30 min mit PBS + 10 % FKS geblockt. Nach dem Wechsel der PBS-Lösung wurden die beiden Primär-AK Dako (Anti-Core, aus Kaninchen) und HB1 (Anti-S, aus Maus) auf die Zellkulturen gegeben; die Ansätze wurden 1 h bei 37° C inkubiert. Nach fünf Waschschritten mit PBS wurden die fluoreszierenden Sekundär-AK Goat-Anti-Rabbit und Goat-Anti-Mouse verdünnt in PBS zugefügt und die Ansätze ½ h bei 37 °C inkubiert. Nach weiteren fünf Waschschritten mit PBS wurden die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Höchst-Färbung) für 15 min bei 37 °C angefärbt. Zuletzt wurde erneut fünf Mal mit PBS gewaschen. Die Kulturschalen konnten bei 4 °C in PBS für einige Wochen gelagert werden.

3.15 Validierung des sekretierten HBeAg aus den Zellkulturen

Auf 6-Well-Platten wurden in drei mit Kollagen Typ I beschichteten Wells HepG2-tet-on-Zellen und in den anderen drei Wells Huh7-Zellen ausgesät. Bei einer Konfluenz des Zellrasens von 90 % wurde beide Zellentypen in jeweils einem Well mit dem pCep-Puro-WMHBV-1,1mer transfiziert. Im zweiten Well wurden die Zellen jeweils mit dem HBV-Plasmid (pcH9-3091 HBV Genotyp D, Positivkontrolle) und im dritten Well mit dem GFP-Plasmid (Negativkontrolle) transfiziert. Ein Tag nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und bei den HepG2-tet-on-Zellen durch DMEM mit Phenolrot, 2 % FKS und 2 % DMSO und bei den Huh7-Zellen durch Williams-E-Medium + 2 % FKS ersetzt. Sechs Tage nach der Transfektion wurde 200 µL des Kulturmediums im diagnostischen ELISA-Test auf HBeAg (Abbot Architect) eingesetzt.

3.16 HBeAg-Test der Zellkultur-Überstände

200 µL der Zellkulturüberstände von Tag 12–15 wurden in ein Proberöhrchen für den HBeAg-Test gefüllt. Dort wurde dann das diagnostische Programm für einen qualitativen ELISA als Suchtest für HBeAg gefahren.

4 Ergebnisse

4.1 Generierung eines Expressionsplasmids zur WMHBV-Produktion

Mit Hilfe des Expressionsplasmids sollte das für die weiteren Infektionsschritte verwendete WMHBV *in vitro* in Zellkultur hergestellt werden (s. Kap. 3.1). Die korrekte Größe der in den einzelnen Klonierungsschritten synthetisierten DNA-Teilstücke des Vektors wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid überprüft. Das pCep-Puro-Backbone-Expressionsplasmid wurde zunächst mittels PCR amplifiziert. Ein Aliquot des Amplifikats wurde für die Kontrolle in der Gelelektrophorese mittels Restriktionsverdau linearisiert. Abbildung 2 zeigt die amplifizierte und linearisierte DNA des Vektors (pCep-Puro-Backbone) mit der erwarteten Größe von 10 kb (s. Kap. 3.1.1).

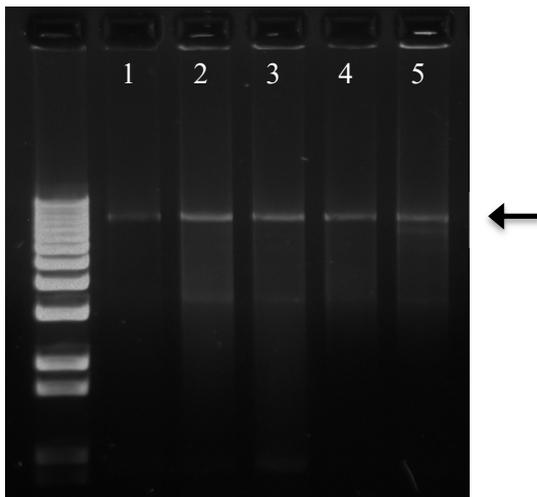


Abb. 2: Gelelektrophorese des Plasmids pCep-Puro-Backbone

In der Gelelektrophorese wurde für das pCep-Puro-Backbone des WMHBV-Expressionsvektors eine Bande bei ca. 10 kb erwartet. Eine solche Bande wurden in allen fünf Proben detektiert (siehe Pfeil). In der linken Spur ist ein Größenmarken (DNA-ladder) aufgetragen. Für die weiteren Klonierungsschritte wurde die Probe 1 aufgrund der zu geringen Plasmid-Konzentration verworfen.

Für die Synthese des 1,0mer zirkulären WMHBV-Genoms wurde das pCWM-9/3088MroLan-Plasmid als WMHBV-codierendes Template in die PCR eingesetzt (s. Kap. 3.1.2). Abbildung 3 zeigt in der vierten Spur eine Bande im 3 kb-Bereich, die der Genomgröße des WMHBV (ca. 3.200 bp) entspricht.



Abb. 3: Gelelektrophorese der PCR-Proben für das 1,0mer-WMHBV-Genom

In Spur 4 konnte das 1,0mer-Insert als Bande im 3 kb Bereich (Pfeil) nachgewiesen werden. In der linken Spur ist ein Größenmarken (DNA-ladder) aufgetragen. In den anderen Laufspuren wurden DNA-Abschnitte in falscher Länge amplifiziert. Diese wurden verworfen.

Aus dem 1,0mer zirkulären WMHBV-Genom (cccDNA-Ring) wurden mittels PCR zwei Inserts hergestellt, die zusammen das komplette WMHBV-Genom abdecken (s. Kap. 3.1.3). In Abbildung 4 sind die beiden Inserts bei 1,6 kb und 1,8 kb sowie das pCep-Puro Backbone bei 10 kb erkennbar. Die Größe der DNA-Fragmente entspricht den theoretischen Werten.

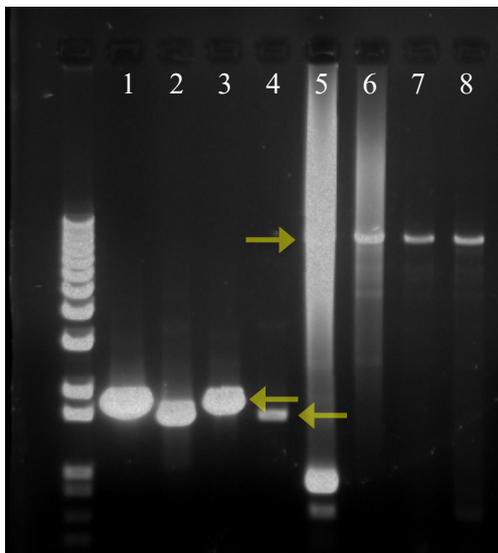


Abb. 4: Überprüfung aller DNA-Teilstücke des WMHBV-Expressionsplasmids vor der In-Fusion-Reaktion in einer Agarose-Gelelektrophorese

In der linken Spur ist ein Größenmarken (DNA-ladder) aufgetragen. Spur 1 und 3: 1,8 kb Insert (Pfeil); Spur 2 und 4: 1,6 kb Insert (Pfeil); Spur 5–8: pCep-Puro-Backbone (ca. 3 kb). Für die weiteren Versuche wurden die Proben 7 und 8 verwendet, da hier eine deutliche Bande ohne Verunreinigungen zu erkennen war.

Nach der Bestätigung, dass alle Teilstücke in der richtigen Länge amplifiziert wurden, wurde die In-Fusion-Reaktion durchgeführt, um das pCep-Puro-WMHBV-1,1mer Expressionsplasmid (Abb. 5) zu generieren (s. Kap. 3.1.4).

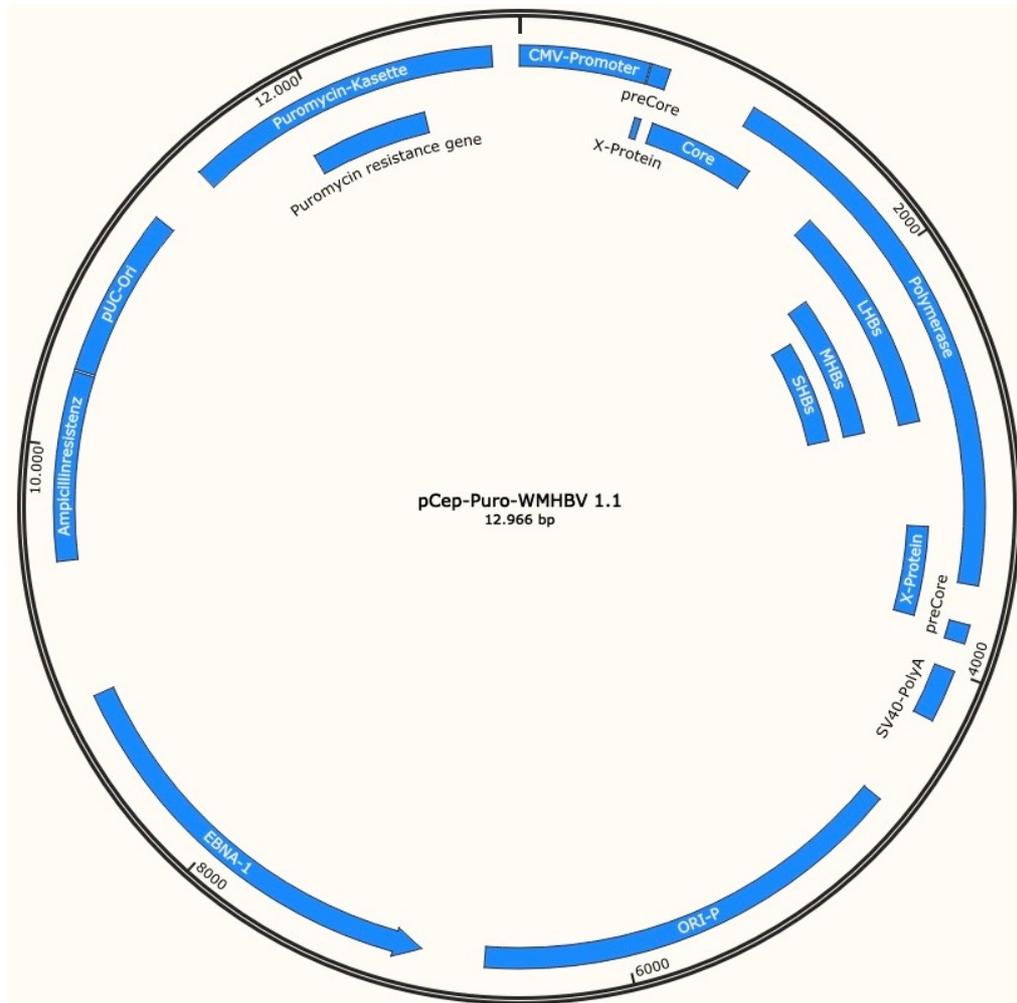


Abb. 5: Schematische Darstellung des pCep-Puro-WMHBV-1,1mer-Plasmids nach allen Klonierungsschritten

Im Abschnitt rechts oben befinden sich alle WMHBV-kodierenden Abschnitte in 1,1mer-Überlänge. Der restliche Teil des Plasmids kodieren Expressionsplasmid pCep-Puro-WMHBV-1,1mer mit Cytomegalievirus-(CMV)-Promotor und Puromycin-Resistenz. Erstellt mit Snap Gene Viewer.

4.2 Identifikation von pCep-Puro-WMHBV-1,1mer-tragenden Bakterienkolonien

Zur Synthese einer ausreichend großen Menge an pCep-Puro-WMHBV-1,1mer-Plasmid für die Transfektion der Zellen wurden E. coli transformiert (s. Kap. 3.2). Im Anschluss

daran wurde die DNA aus den entstandenen genetisch identischen Bakterienkolonien getrennt aufgereinigt, um die Kolonien zu identifizieren, die das gewünschte Plasmid in voller Länge trugen (s. Abb. 6 und Kap. 3.3). Dieses Vorgehen war erforderlich, weil bei der Ligationsreaktion von pCep-Puro-Backbone, WMHBV-Insert 1 und -Insert 2 auch Plasmide mit fehlenden WMHBV-Inserts entstehen können. Die Antibiotika-Resistenz lag auf dem Ausgangsplasmid pCep-Puro-Backbone, so dass auch Bakterienkolonien mit solchen Plasmiden möglich waren. Die aus den einzelnen Bakterienkolonien isolierte und linearisierte Plasmid-DNA wurde mittels Gelelektrophorese analysiert. Die Spuren 4, 6 und 8 (s. Abb. 6) zeigten Banden der erwarteten Größe von 13'000 bp. Die zugehörigen drei Bakterienklone wurden für die nachfolgenden Transfektionsversuche in einem größeren Ansatz inkubiert, um das pCep-Puro-WMHBV-1,1mer-Plasmid zu vervielfältigen.

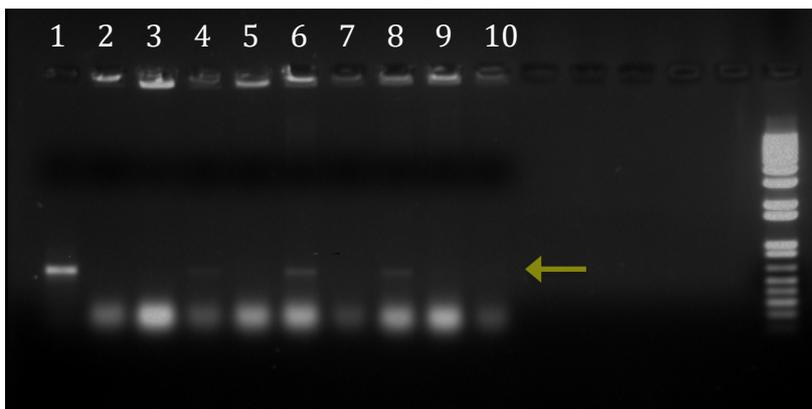


Abb. 6: Agarose-Gelelektrophorese der linearisierten Plasmid-DNA aus Bakterienkolonien nach Transfektion mit dem Produkt der In-Fusion-Reaktion (pCep-Puro-WMHBV-1,1mer Expressionsplasmid)

In den Spuren 4, 6 und 8 wurden die linearisierten DNA-Stränge des pCep-Puro WMHBV-1,1mer-Plasmids in der richtigen Länge nachgewiesen (Pfeil). In der rechten Spur ist ein Größenmarker (DNA-ladder) aufgetragen.

4.3 Bestimmung der Plasmid-Transfektionseffizienz von humanen Hepatom-Zelllinien

Entscheidend für die erfolgreiche Produktion von den WMHBV in HepG2- und Huh7-Zellen ist eine hohe Transfektionseffizienz der Zellen, die durch ein optimales Verhältnis zwischen Xtreme-Gene-HP-Transfection-Reagent und Plasmid-DNA erreicht werden kann. HepG2-tet-on-Zellen in jeweils 12 Wells einer 96-Well-Platte wurden mit acht verschiedenen Mischungsverhältnissen aus Xtreme-Gene-HP-Transfection-Reagent und

GFP-Plasmid-DNA transfiziert (s. Kap. 3.4 und Tab. 1). Nach einer mehrtägigen Inkubation wurde der Gehalt an GFP mit dem Tecan Spark 10m gemessen. Dazu bestimmte der Tecan Spark 10m an vier Punkten in jedem Well die Intensität des durch die Fluoreszenz des produzierten GFP-Proteins emittierten Lichtes. Aus den Werten wurde ein Durchschnittswert pro Well und anschließend ein Durchschnittswert aller zwölf Wells mit gleichem Verhältnis der Transfektionsreagenzien ermittelt (s. Abb. 7). Für die folgenden Transfektionsversuche wurde ein Verhältnis von 1:3 (2 µg Plasmid-DNA auf 6 µl Transfektionsreagenz) eingesetzt, da hier die WMHBV-Ausbeute aus der transienten Virusproduktion am höchsten war.

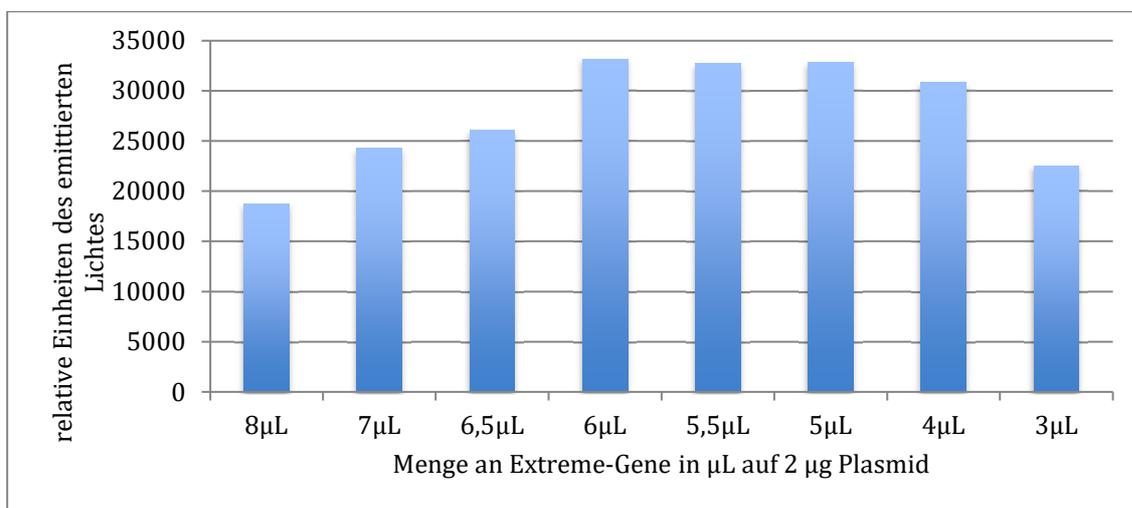


Abbildung 7: Bestimmung des optimalen Verhältnisses von Transfektionsagens (Xtreme-Gene-HP-Transfection-Reagent) zu Plasmid-DNA im Tecan Spark 10m

Nach Transfektion von HepG2-tet-on-Zellen mit einem Green-Fluorescent-Proteine-(GFP)-exprimierenden Plasmid in den angegebenen Reagenz/Plasmid-Verhältnissen wurde die Fluoreszenz des in den Zellen gebildeten GFP bei 488 nm gemessen. Maximale Intensitäten wurden bei Mischungsverhältnissen von 6:2; 5,5:2 und 5:2 detektiert.

4.4 Detektion von HBeAg aus WMHBV-transfizierten Zellen

Die Infektion der NTCP-exprimierenden HepG2- und Huh7-Zellen mit HBV und WMHBV wurde über die Sekretion von HBeAg in den Überstand der Zellkulturen (ELISA-Suchtest für HBeAg; Abbot Architect) nachgewiesen. In mit dem pCep-Puro-WMHBV-Plasmid transfizierten HepG2-tet-on-Zellen wurde ein spezifischer positiver Wert von 2,8 oberhalb des Signal-to-Cut-off-Werts (S/CO) von 1 nachgewiesen. Im Vergleich dazu wurde mit der Transfektion eines HBV-kodierenden Plasmids ein Wert von 826 S/CO erreicht. Die Ausbeute an HBeAg war in diesen HepG2-Zellen also ca.

600 mal höher. In den Huh7-Zellen wurden 90 S/CO HBeAg für das HBV-Plasmid und 6 S/CO für das WMHBV-Plasmid nachgewiesen. Hier sekretierten die mit pCep-Puro-WMHBV-1,1mer transfizierten Zellen also 15 mal weniger HBeAg (s. Abb. 8).

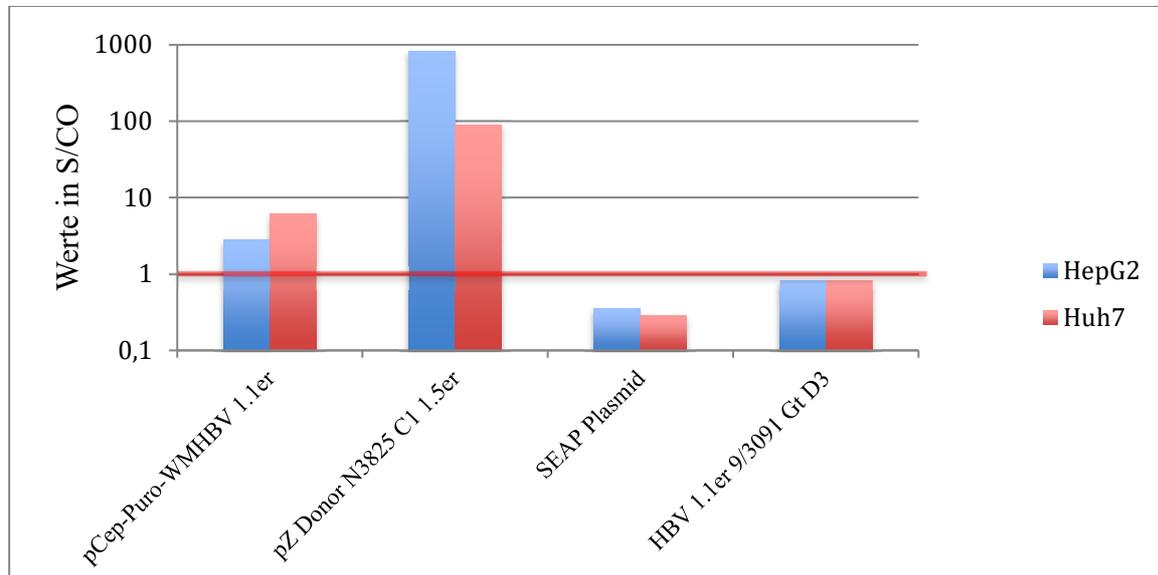


Abb. 8: Bestimmung des HBeAg-Gehalts der Kulturüberstände von HepG2-Zellen und Huh7-Zellen nach Transfektion

Die Zellkulturen wurden mit pCep-Puro-WMHBV-1,1mer Plasmid, HBV pZ-Donor-N3825-C1-1,5mer, SEAP-Plasmid (secreted embryonic alkaline phosphatase, Negativkontrolle) und HBV 1.1er 9/3091 Gt. D3 Plasmid transfiziert. Auf der Y-Achse sind die Werte im Vergleich zum Signal-to-Cut-off-Wert (S/CO) von 1 angegeben.

4.5 Nachweis des WMHBV über die HBc- und HBsAg-Expression

Zur Analyse, ob mit dem pCep-Puro-WMHBV-1,1mer-Plasmid transfizierte HepG2- und Huh7-Zellen Virionen bilden, wurden die Zellen nach der Transfektion 12–15 d inkubiert (s. Kap. 3.12 und 3.13). Nach der anschließenden Fixierung wurde die Anwesenheit viraler Proteine immunhistochemisch untersucht (s. Kap. 3.14). Abbildung 9 und 10 zeigen deutliche HBc- und HBsAg-spezifische Signale im Zytoplasma. Somit eigneten sich sowohl HepG2- als auch Huh7-Zellen zur Produktion von WMHBV-Virusmaterial. Ein Vergleich der Anzahl der HBcAg- und HBsAg-positiven Zellen mit der Gesamtzellzahl (Höchst-Kernfärbung) ergab eine Transfektionsrate von circa 20 %.

Da in den mit dem SEAP-Plasmid transfizierten Zellkulturen (Negativkontrolle) keine Bindung der Sekundär-AK stattfand, ist von einer spezifischen HBsAg- und HBcAg-Markierung auszugehen (s. Abb. 9 und 10 E und F).

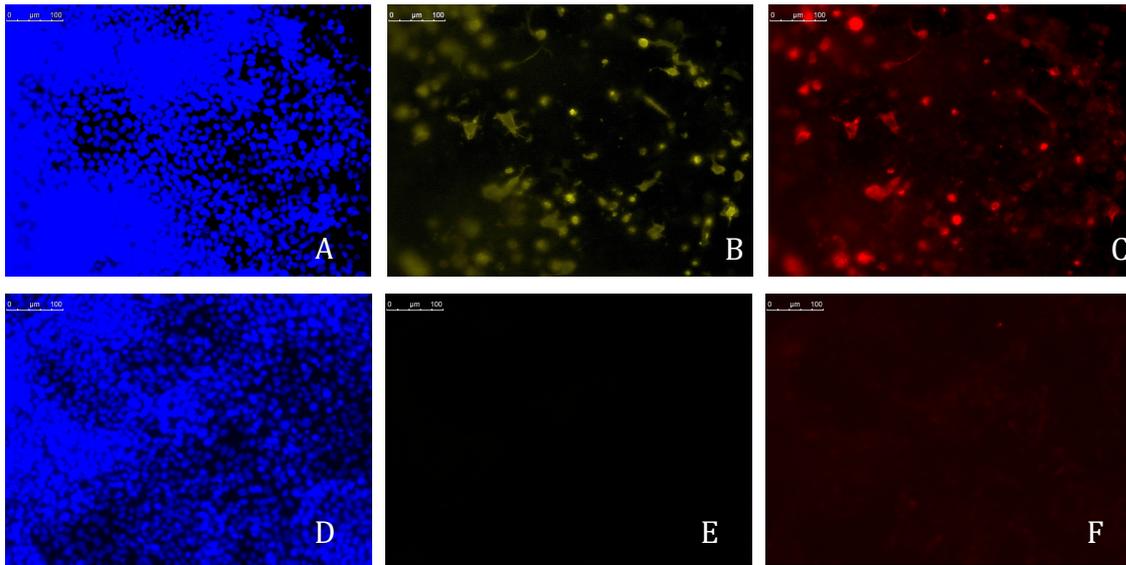


Abb. 9: Expression von HBsAg und HBcAg in HepG2-Zellen transfiziert mit pCep-Puro-WMHBV-1,1mer-Plasmid (A, B, C) und Negativkontrolle (SEAP-Plasmid; D, E, F)

A / D: Nachweis der Zellkerne mittels Höchst-Färbung; **B / E:** Mouse-Anti-HB1-AK plus Goat-Anti-Mouse-AK 488 nm Belichtung. Indirekter Nachweis des HBs-Proteins durch Fluoreszenz-Signal (gelb) im Zytoplasma der Zellen; **C / F:** Rabbit-Anti-HBc-AK plus Goat-Anti-Rabbit-AK 568 nm Belichtung. Indirekter Nachweis des HBc-Proteins durch Fluoreszenz-Signal (rot) im Zytoplasma der Zellen.

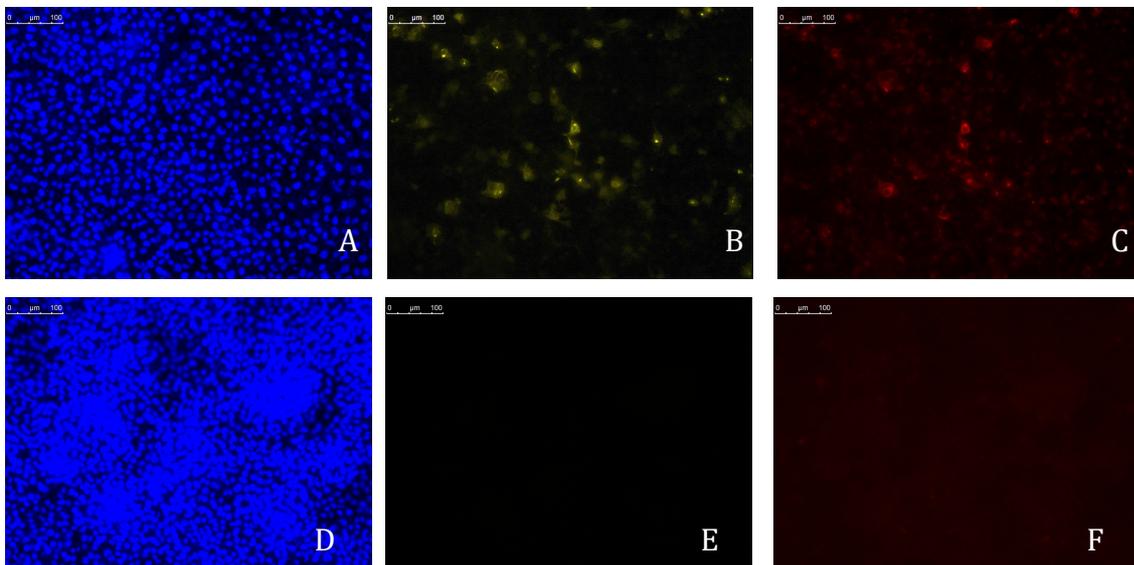


Abb. 10: Expression von HBs- und HBc-Antigen in Huh7-Zellen transfiziert mit pCep-Puro-WMHBV-1,1mer-Plasmid (A, B, C) und Negativkontrolle (SEAP-Plasmid; D, E, F)

A / D: Nachweis der Zellkerne mittels Höchst-Färbung; **B / E:** Mouse-Anti-HB1-AK plus Goat-Anti-Mouse-AK 488 nm Belichtung. Indirekter Nachweis des HBs-Proteins durch Fluoreszenz-Signal (gelb) im Zytoplasma der Zellen; **C / F:** Rabbit-Anti-HBc-AK plus Goat-Anti-Rabbit-AK 568 nm Belichtung. Indirekter Nachweis des HBc-Proteins durch Fluoreszenz-Signal (rot) im Zytoplasma der Zellen.

4.6 Bestimmung der Viruskonzentrationen der WMHBV-Präparate

Zur Quantifizierung der WMHBV-Virusproduktion in den mit pCep-Puro-WMHBV-1,1mer transient transfizierten Zellen (s. Kap. 3.6) wurde eine quantitative qPCR mit den Zellkulturüberständen durchgeführt (s. Kap. 3.7). Mit dieser Methode wurde die Amplifikation des Virusgenoms und die Zahl der sekretierten Viren im Kulturüberstand abgeschätzt. Für Huh7-Zellen wurden $4,6 \times 10^8$ WMHBV-Genomäquivalente/mL Kulturüberstand ($4,6 \times 10^5/\mu\text{l}$) und für HepG2-Zellen $5,4 \times 10^8$ WMHBV-Genomäquivalente/mL ($5,4 \times 10^5/\mu\text{l}$) Kulturüberstand nachgewiesen (s. Abb. 11, jeweils Probe 1). In den Produktionszyklen schwankte die Zahl der WMHBV-Genomkopien im Kulturüberstand erheblich. Für die folgenden Infektionsversuche wurden für die WMHBV-Produktion aus HepG2-Zellen und aus Huh7-Zellen nur die konzentrierten Kulturüberstände der beiden Proben 1 verwendet.

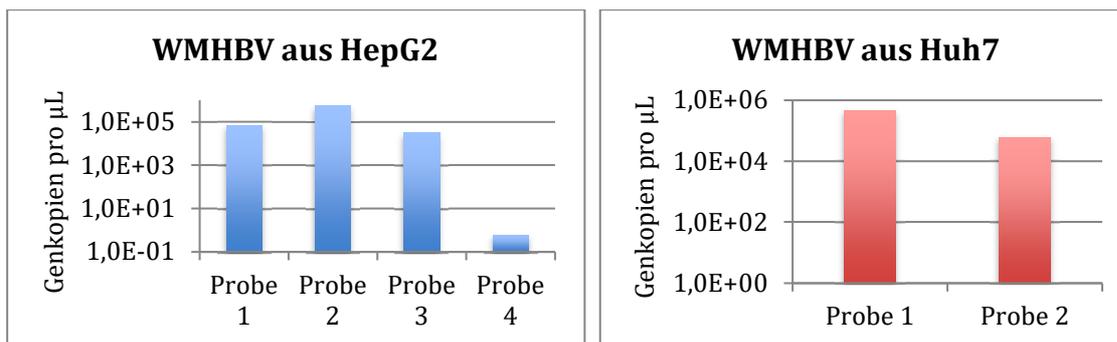


Abb. 11: Quantitative Bestimmung der Virusausbeute aus den konzentrierten Überständen aus mit pCep-Puro-WMHBV-1,1mer transient transfizierten HepG2- (links) und Huh7-Zellen

Die Zahl der Genkopien von WMHBV aus transient transfizierten Zellen schwankte erheblich (Probe 1–4 bzw. Probe 1–2). Für die folgenden Infektionsexperimente wurden Kulturüberstände mit maximaler Viruslast ausgewählt.

4.7 Trans-Komplementationsanalyse von chimären HBV mit Oberflächenproteinen des WMHBV und CMHBV

Zur Generierung von chimären HBV-Virionen mit Oberflächenproteinen des CMHBV und WMHBV wurden HepG2- bzw. Huh7-Zellen kotransfiziert (s. Kap. 3.8). Welche Plasmide kombiniert wurden, ist in Abb. 12.2 veranschaulicht. Bei einer Kotransfektion mit dem pCH9-3091-HBV-Plasmid (kodiert für das gesamte Virus) und dem SEAP-Plasmid (ohne Beitrag für die Virus-Expression) waren in HepG2-Kulturüberständen 10^{10}

Virus-DNA-Kopien/mL und in Huh7-Kulturüberständen 10^9 Virus-DNA-Kopien/mL nachweisbar (Abb. 12). Die transiente Produktion von HBV-Viruspartikel nach einer Ko-Transfektion mit dem pcH9-3091-XXX-HBV-Plasmid (enthält das Vollgenom, kodiert jedoch nicht für HBV-Oberflächenproteine) und dem pcH9-200mitLHBsHuman (kodiert für die HBV-Oberflächenproteine) war im Vergleich zur Produktion von HBV-Virionen ausgehend vom pcH9-3091-HBV-Plasmid um etwa einen Faktor 1000 geringer (ca. $1,25 \times 10^4$ Virus-DNA-Kopien/mL Kulturüberstand). In HepG2-Kulturen, die mit Expressionsplasmiden für den HBV-Core und Expressionsplasmiden für WMHBV- bzw. CMHBV Oberflächenproteine transfiziert wurden, wurde ebenfalls HBV-DNA im Kulturüberstand nachgewiesen. Aus den Daten der Negativkontrollen (Ansatz 5 und 6 in Abb. 12.1) ist zu entnehmen, dass bis zu 1250 Genkopien/mL ($1,25/\mu\text{l}$) Kulturüberstand auf eine unspezifische Amplifikation in der qPCR zurückzuführen waren. Daher wurde ein Cutoff-Wert bei $1,0 \times 10^4$ Virus-DNA-Kopien/mL Kulturüberstand festgelegt.

Zur Beschreibung der chimären Viren wurde ein CsCl-Gradient der Kulturüberstände angefertigt (s. Kap. 3.9). Diese Gradienten lieferten nicht erklärbare, unspezifische Kurvenverläufe (s. Abb. 33–35 im Anhang). Trotz der niedrigen Ausbeute an chimären Virionen wurde der Kulturüberstand nach 15 Tagen in der Zentrifuge konzentriert und in Infektionsexperimenten mit das humane NTCP-exprimierende HepG2-Zellen eingesetzt. Bei der Bestimmung von HBeAg im Kulturüberstand nach 15 Tagen Inkubation lagen alle Proben bis auf die Positivkontrolle mit 3091 + SEAP Plasmid unterhalb des Cutoffs (s. Anhang Abb. 36).

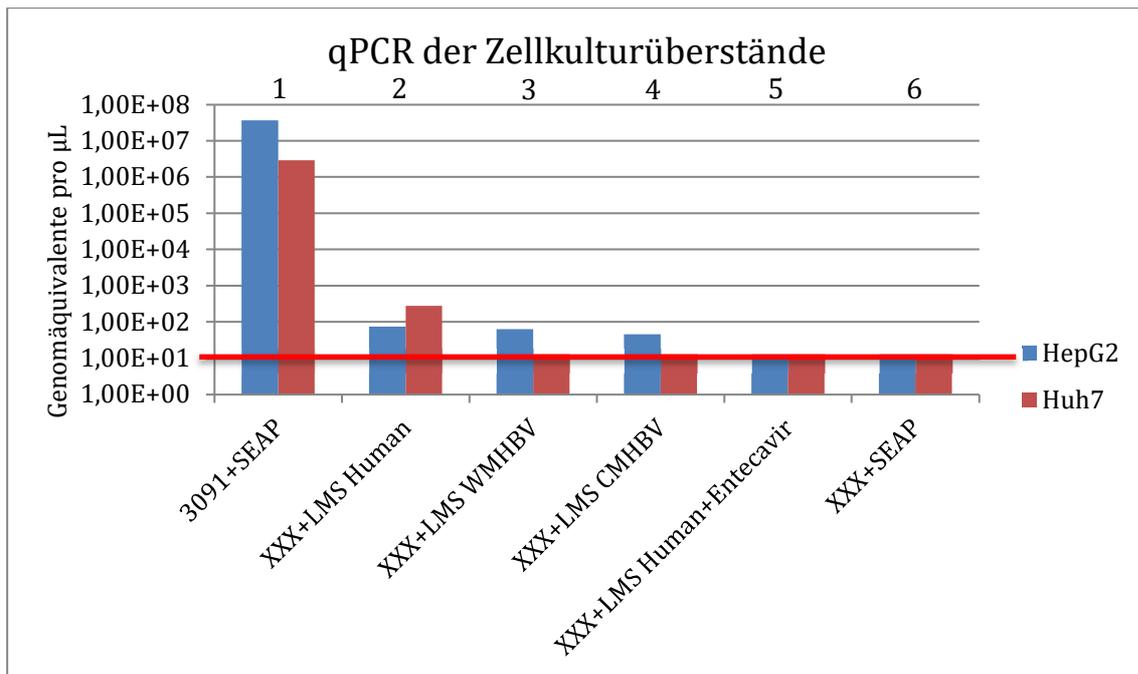


Abb. 12.1: Trans-Komplementationsanalyse von chimären HBV-Virionen mit humanem HBV-Core und Oberflächenproteinen des WMHBV und CMHBV

Für die Untersuchung wurden HepG2 oder Huh7-Zellen jeweils mit zwei Expressionsplasmiden transfiziert. **1.** Positivkontrolle: HBV-3091-Plasmid + SEAP-Plasmid. Alle Informationen für das HBV liegen auf einem Plasmid. Hohe Anzahl an Viruskopien im Kulturüberstand. **2.** Positivkontrolle: HBV-3091-XXX-Plasmid mit Punktmutationen in allen Startcodons für HBsAg (nur Core) + HBV-LMS-Plasmid (kodiert für HBV-Oberflächenproteine). Die Informationen für das HBV lagen auf zwei Plasmiden. **3.** HBV-3091-XXX-Plasmid (nur Core) + LMS-WMHBV-Oberflächenprotein-Plasmid. Chimäre Viren in Überständen von HepG2-Zellen. Messwert knapp oberhalb des Cutoffs ($1,00 \times 10^1$ Virus-DNA-Kopien/ μL). **4.** HBV-3091-XXX-Plasmid (nur Core) + CMHBV-Oberflächenprotein-Plasmid. Chimäre Viren in Überständen von HepG2-Zellen. Messwert knapp oberhalb des Cutoffs. **5.** Negativkontrolle: Plasmidkombination entsprechend **2.** sowie Unterbindung der Replikation durch Entecavir. **6.** Negativkontrolle: HBV-3091-XXX-Plasmid mit Punktmutationen in allen Startcodons für HBsAg (nur Core) + SEAP-Plasmid.

Ansatz-Nr.: Virionen:	1 HBV	2 HBV	3 Chimäre Virionen HBV- WMHBV	4 Chimäre Virionen HBV- CMHBV	5 HBV	6 HBV
Expressions Plasmid 1	komplette s HBV- Plasmid (3091)	HBV- Plasmid ohne Oberfläche n-proteine (XXX)	HBV- Plasmid ohne Oberfläche n-proteine (XXX)	HBV- Plasmid ohne Oberfläche n-proteine (XXX)	HBV- Plasmid ohne Oberfläche n-proteine (XXX)	HBV- Plasmid ohne Oberfläche n-proteine (XXX)
Expressions Plasmid 2	P-SEAP , kein Beitrag zum HBV	HBV- Oberfläche n-proteine (LMS human)	WMHBV- Oberfläche n-proteine (LMS WMHBV)	CMHBV- Oberfläche n-proteine (LMS CMHBV)	HBV- Oberfläche n-proteine (LMS human)	P-SEAP , kein HBV Plasmid
Hemmung der Replikation durch Entecavir	nein	nein	nein	nein	ja	nein

Abb. 12.2 Aufbau der Ko-Transfektionsversuche mit zwei Plasmiden zur Bildung chimärer Viren mit unterschiedlichen Core- und Hüll-Strukturen

4.8 Charakterisierung der WMHB-Virionen aus Zellkultur mittels CsCl-Gradienten

Nach dem Nachweis von Virusproteinen im Zellkulturabstand und der Bestimmung der Genomzahl sollte im Folgenden abgeschätzt werden, wie viele infektiöse WMHBV (Core + Hülle) in den transfizierten HepG2-teton Zellen gebildet wurden. Dazu wurde die spezifische Dichte der Viruspartikel mittels eines CsCl-Gradienten analysiert. Hierzu wurde jeweils eine unbehandelte und mit 1 % NP 40 / 50 mM TCEP vorbehandelte Probe zentrifugiert (s. Kap. 3.9). Durch diese Behandlung sollte die Virushülle entfernt werden, sodass sich nur die Core-Partikel im CsCl-Gradienten befanden (s. Abb. 13). Die isolierten Core-Partikel (rote Kurve) zeigten ein Maximum bei 1,3 g/mL (Dichte des CsCl-Gradienten). Die beiden Peaks bei 1,22 g/mL und 1,36 g/mL stellen Ausreißer. Die unbehandelten Viren (blaue) zeigten zwei Maxima bei 1,345 g/mL und 1,18 g/mL. Nun kann anhand der Position der blauen und roten Gipfel der Kurven auf die Konformation geschlossen werden. Es ist aus der NP40/TCEP behandelten Kurve zu entnehmen, dass sich reine Core-Partikel bei einer Dichte von 1,3 g/mL sammeln. Somit steht der blaue Gipfel bei 1,345 g/mL für reine Core Partikel und der Gipfel bei 1,22 g/mL für die richtig zusammengesetzten WMHB-Viren mit Core- und Hüllstruktur. Der Anteil an korrekt zusammengesetzten Viren ist also um den Faktor 10 kleiner als eine quantitative PCR

suggeriert. ($1,4 \times 10^6$ Genkopien/ μL bei $1,350 \text{ g/mL}$ Dichte im Vergleich zu $0,4 \times 10^6$ Genkopien/ μL bei $1,22 \text{ g/mL}$)

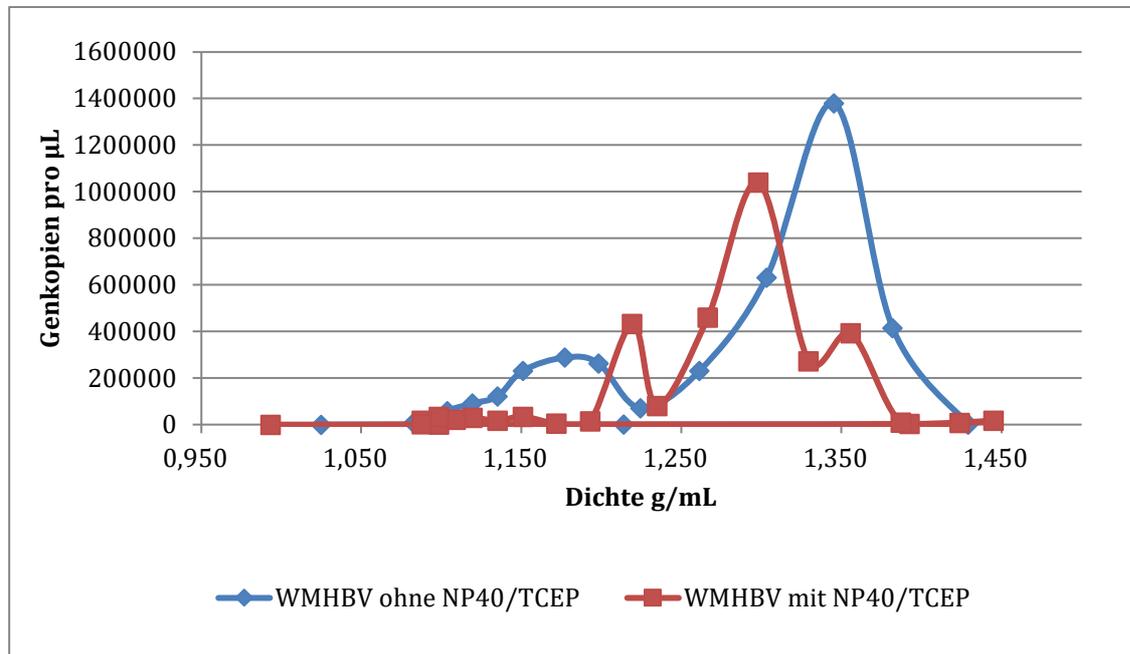


Abb. 13: Zahl der Genomäquivalente in Abhängigkeit von der lokalen Dichte des Cäsium-Chlorid-(CsCl)-Gradienten

400 μL des Virus-Konzentrats aus dem Kulturüberstand der HepG2-teton Zellkulturen wurden mit der CsCl-Gradienten-Lösung bis auf ein Gesamtvolumen von 2 mL aufgefüllt. In den Dichte-Fractionen nach der Ultrazentrifugation (X-Achse) wurden die Genomkopien bestimmt (Ausgangswerte s. Tab. 2 und Tab. 3 im Anhang).

4.9 Funktionsprüfung der NTCPs unterschiedlicher Spezies

Zur Analyse der Infektiosität von WMHBV in verschiedenen Spezies wurden HepG2-Zellen mit NTCP aus verschiedenen Spezies transfiziert. NTCP ist ein Gallensäure-Transporter, den das Virus als Rezeptor nutzt. Zunächst wurde die Expression und Funktionsfähigkeit der Transporter in HepG2-Zellen analysiert (s. Kap. 3.11). Dazu wurde mit NBD markiertes Taurocholat auf die transfizierten HepG2-Zellen gegeben. Die über den Transporter in die Zellen aufgenommene NBD-Taurocholat wurde anhand seiner Fluoreszenz mit einem konfokalen Lasermikroskop nachgewiesen.

Die HepG2-Zellen exprimierten funktionsfähige NTCPs. Das markierte Taurocholat reicherte sich im Zytoplasma an. Eine starke Anreicherung von markierten Taurocholat konnte bei der Transfektion der Zellen mit Plasmiden für das Schimpansen-NTCP (s. Abb. 14), Tupaia-NTCP (s. Abb. 15), Saimiri-NTCP (s. Abb. 16) und für das Makaken-Wildtyp-NTCP (s. Abb. 17) nachgewiesen werden.

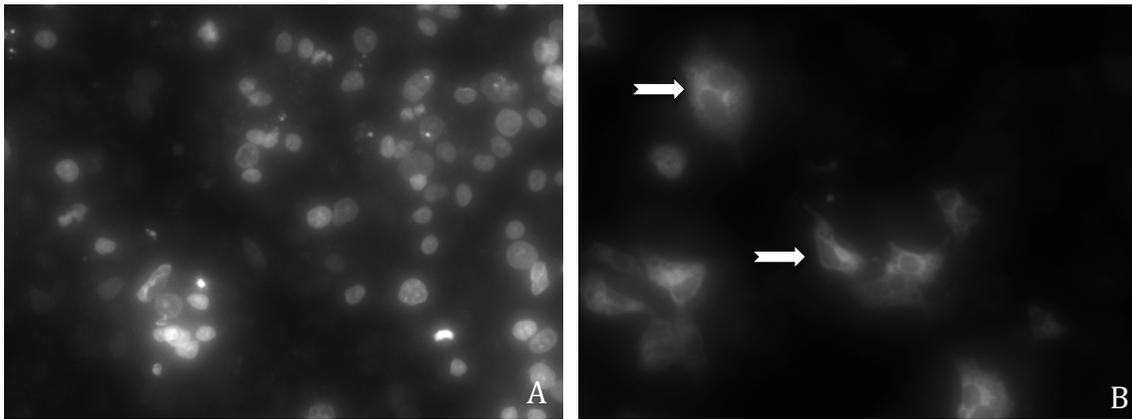


Abb. 14: Nachweis von Nitrobenzoadiazol-(NBD)-markiertem Taurocholat in HepG2-Zellen transfiziert mit dem Natrium/Taurocholat Kotransporter Polypeptid (NTCP) aus Schimpansen

A Nachweis der Zellkerne mittels Höchst-Färbung; B NTP-Fluoreszenz-Signal im Zytoplasma der HepG2-Zellen (weiße Pfeile).

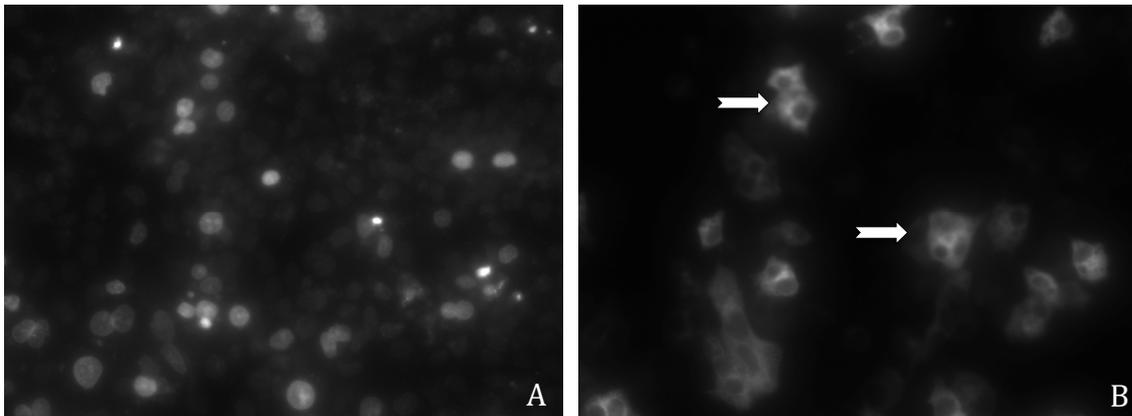


Abb. 15: Nachweis von Nitrobenzoadiazol-(NBD)-markiertem Taurocholat in HepG2-Zellen transfiziert mit dem Natrium/Taurocholat Kotransporter Polypeptid (NTCP) aus Tupaia

A Nachweis der Zellkerne mittels Höchst-Färbung; B NTP-Fluoreszenz-Signal im Zytoplasma der HepG2-Zellen (weiße Pfeile).

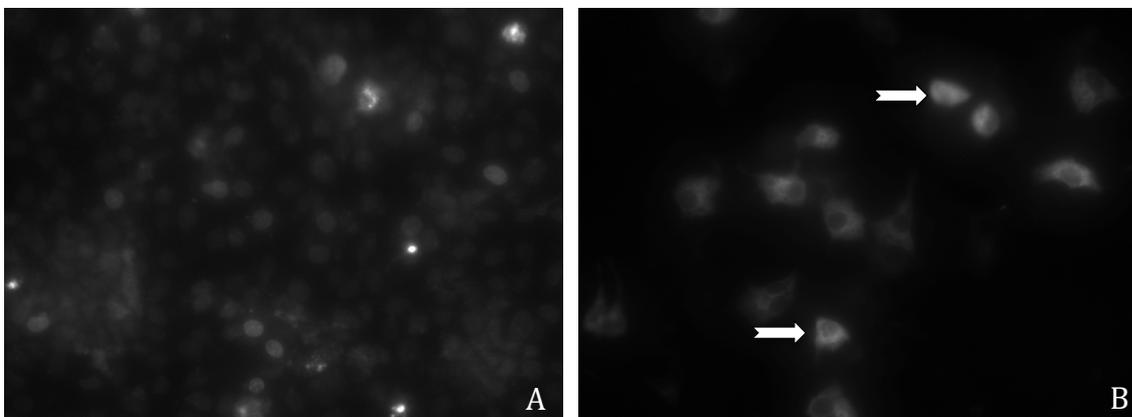


Abb. 16: Nachweis von Nitrobenzoadiazol-(NBD)-markiertem Taurocholat in HepG2-Zellen transfiziert mit dem Natrium/Taurocholat Kotransporter Polypeptid (NTCP) aus Saimiri

A Nachweis der Zellkerne mittels Höchst-Färbung; B NTP-Fluoreszenz-Signal im Zytoplasma der HepG2-Zellen (weiße Pfeile).

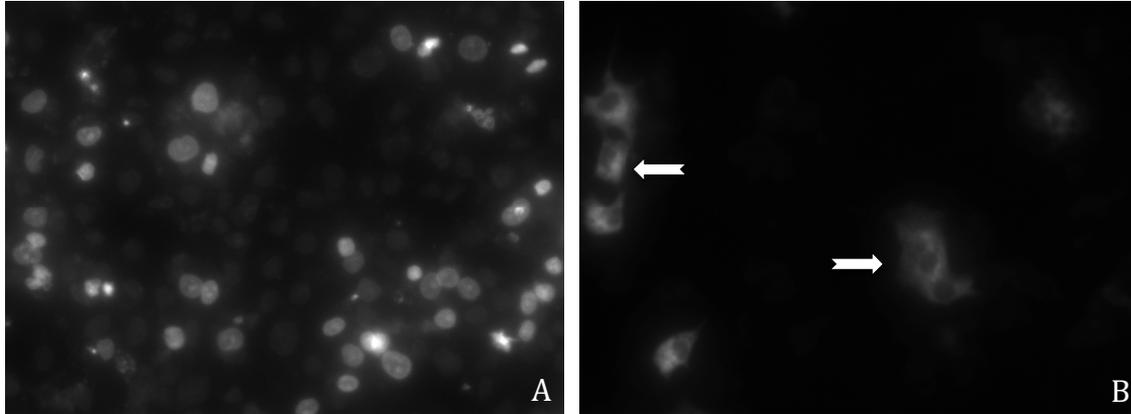


Abb. 17: Nachweis von Nitrobenzoadiazol-(NBD)-markiertem Taurocholat in HepG2-Zellen transfiziert mit dem Natrium/Taurocholat Kotransporter Polypeptid (NTCP) aus Makaken (Wildtyp)

A Nachweis der Zellkerne mittels Höchst-Färbung; B NTP-Fluoreszenz-Signal im Zytoplasma der HepG2-Zellen (weiße Pfeile).

Bei einer Transfektion der HepG2-Zellen mit einem Plasmid für das Makaken-NTCP mit der Mutation R158G fiel das Fluoreszenzsignal im Zytoplasma deutlich schwächer aus (s. Abb. 18).

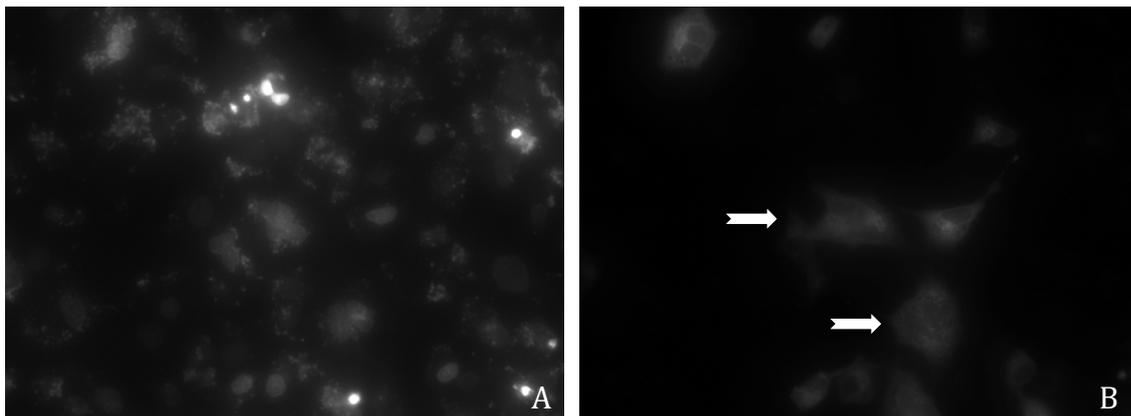


Abb. 18: Nachweis von Nitrobenzoadiazol-(NBD)-markiertem Taurocholat in HepG2-Zellen transfiziert mit dem Natrium/Taurocholat Kotransporter Polypeptid (NTCP) aus Makaken (Mutante R158G)

A Nachweis der Zellkerne mittels Höchst-Färbung; B NTP-Fluoreszenz-Signal im Zytoplasma der HepG2-Zellen (weiße Pfeile).

HepG2-Zellen, die mit einem Plasmid für das humane NTCP transfiziert wurden, fluoreszierten unter dem Mikroskop nur schwach (s. Abb. 19).

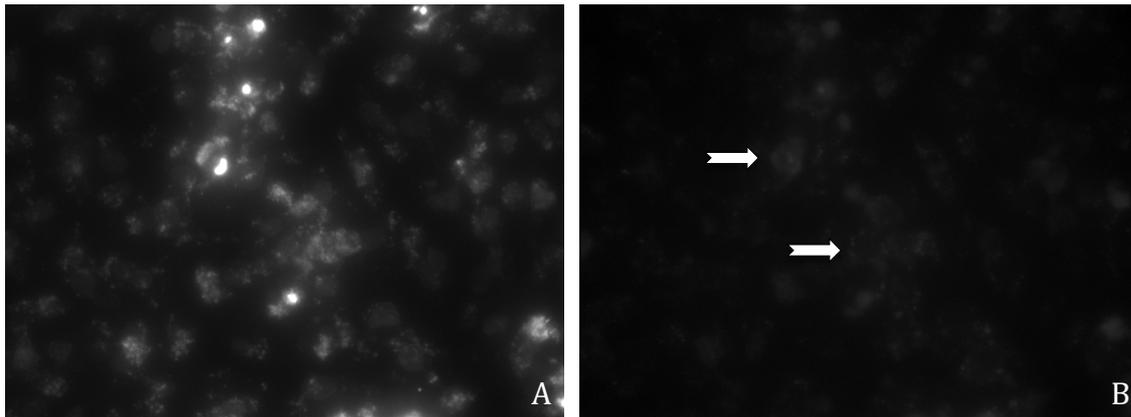


Abb. 19: Nachweis von Nitrobenzoadiazol-(NBD)-markiertem Taurocholat in HepG2-Zellen transfiziert mit dem humanen Natrium/Taurocholat Kotransporter Polypeptid (NTCP)

A Nachweis der Zellkerne mittels Höchst-Färbung; **B** NTP-Fluoreszenz-Signal im Zytoplasma der HepG2-Zellen (weiße Pfeile).

Über den Vergleich der Anzahl der Zellkerne (Höchst-Färbung) mit der Anzahl der NBD-Taurocholat positiven Zellen ließ sich die Transfektionseffizienz mit maximal ca. 20–50 % der Zellen beziffern.

Als Negativkontrolle wurde das SEAP-Plasmid transfiziert. Nach Zugabe von NBD-Taurocholat war erwartungsgemäß kein Fluoreszenzsignal im Zytoplasma erkennbar (s. Abb. 20).

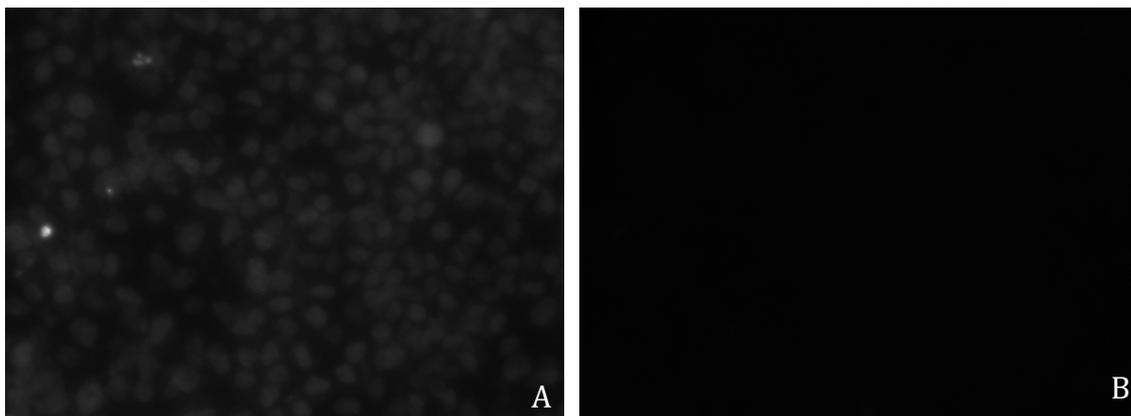


Abb. 20: Nachweis von Nitrobenzoadiazol-(NBD)-markiertem Taurocholat in HepG2-Zellen transfiziert mit dem SEAP-Plasmid (Negativkontrolle)

A Nachweis der Zellkerne mittels Höchst-Färbung; **B** fehlendes NTP-Fluoreszenz-Signal im Zytoplasma der HepG2-Zellen.

4.10 Bestimmung des Potentials von WMHBV zur Spezies-übergreifenden Infektion –HBeAg-Sekretion

Das WMHBV wurde bislang nur bei Wollaffen detektiert. Da Spezies-übergreifende Infektionen bei Hepadnaviren eher selten vorkommen [Rasche et al. 2016], sollte in der vorliegenden Dissertation untersucht werden, ob WMHBV an HepG2-Zellen binden und von ihnen aufgenommen werden können. In diesem Szenario spielt das NTCP als hochaffiner viraler „Eintritts-Rezeptor“ eine essentielle Rolle. Im Folgenden wurden WMHBV-Infektionsexperimente mit den in Kap. 4.9 charakterisierten HepG2-Zellen durchgeführt, die NTCPs unterschiedlicher Spezies exprimierten. Als Marker einer erfolgreichen Infektion diente die HBeAg-Sekretion der infizierten Zellen. Eine eindeutige WMHBV-Infektion war nur in mit dem Tupaia-NTCP-Plasmid transfizierten HepG2-Zellen nachweisbar (s. Abb. 21). Über das Schimpansen-NTCP waren grenzwertige HBeAg-Signale erzielbar. Eine Expression der anderen NTCPs, inklusive des humanen NTCPs, führten zu keiner detektierbaren WMHBV-Infektion. Eine HBV-Infektion war erwartungsgemäß über das humane NTCP, auch über das Tupaia-NTCP möglich. Grenzwertige HBeAg-Signale wurden wiederum in mit dem Schimpansen-NTCP-Plasmid transfizierten Zellen erzielt. In den Saimiri- und Makaken-NTCP exprimierenden Zellen waren keine HBeAg-Signale nachweisbar.

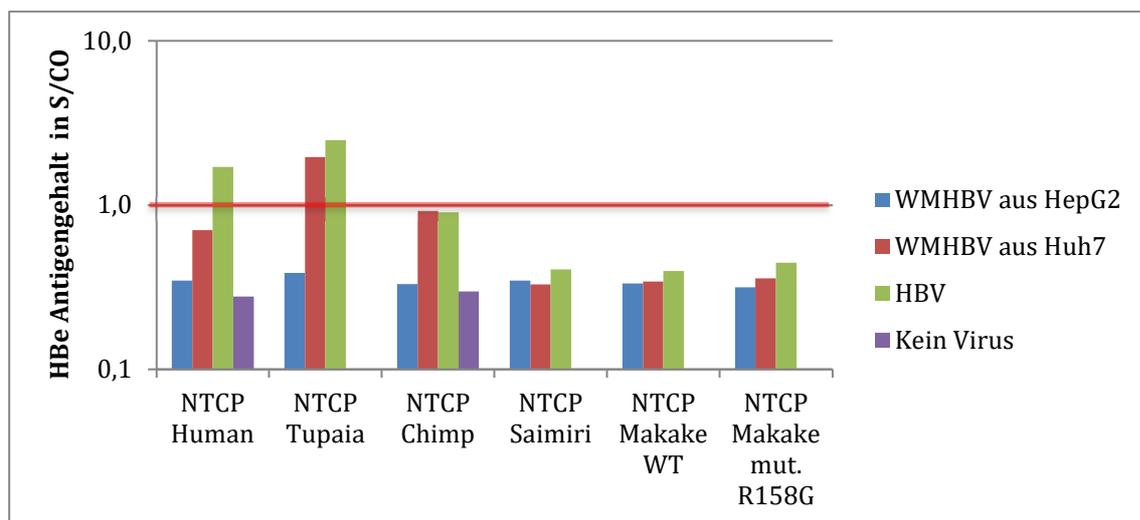


Abb. 21: Nachweis des Potentials von WMHBV zur Spezies-übergreifenden Infektion HepG2-Zellen wurden mit NTCP-exprimierenden Plasmiden unterschiedlicher Spezies transfiziert und nachfolgend mit WMHBV oder HBV aus Huh7- oder HepG2-Zellen inkubiert. Als Marker einer viralen Infektion diente die HBeAg-Sekretion 15 Tage nach der Inokulation mit WMHBV/HBV. WMHBV aus Huh7-Zellen infizierten nur Zellen, die das NTCP aus Tupaia exprimierten, HBV dagegen Zellen, die das NTCP aus Tupaia oder das humane NTCP exprimierten. Die WMHBV/HBV-Infektion bei Expression des Schimpansen-NTCPs ist bei

grenzwertigem HBeAg fraglich. WMHBV aus HepG2-Zellen konnten laut HBeAg-Produktion keines der exprimierten NTCP nutzen. Werte über 1,0 gelten als positiv
S/CO: signal-to-cutoff; Tupaia: Tupaia belangeri; Chimp: Pan troglodytes; Saimiri: Saimiri sciureus;

Während die HBeAg-Detektion in Zellkulturüberständen nur bei einer ausreichenden Anzahl von mit WMHBV/HBV-infizierten Zellen gelingt, erlaubt eine Immunfluoreszenz-Färbung der neu synthetisierten viralen Proteine eine Bestimmung von Infektionsereignissen auf Einzelzellebene.

4.11 Bestimmung des Potentials von WMHBV zur Spezies-übergreifenden Infektion – HBc- und HBs-Immunfluoreszenz

Zum Nachweis einer erfolgreichen HBV-Infektion wurde die Expression von HBc und HBs in den HepG2-Zellen immunhistochemisch untersucht. Über die Höchst-Färbung wurde die Anzahl vitaler Zellen im Bildausschnitt abgeschätzt.

Infektiosität von in Huh7-Zellen produzierten WMHBV

Die in Huh7-Zellen produzierten WMHBV konnten Zellen über das humane NTCP (s. Abb. 22) und Tupaia-NTCP (s. Abb. 23) infizieren.



Abb. 22: Nachweis von in Huh7-Zellen produzierten WMHBV in den humanen Gallensäure-Transporter (NTCP) exprimierenden HepG2-Zellen

A Nachweis der Zellkerne mittels Höchst-Färbung; B Nachweis des HBcAg (Rabbit-Anti-HBc Antikörper (AK) plus Goat-Anti-Rabbit-AK 568 nm Belichtung); C Nachweis des HBsAg (Mouse-Anti-HBs-AK plus Goat-Anti-Mouse-AK 488 nm Belichtung).

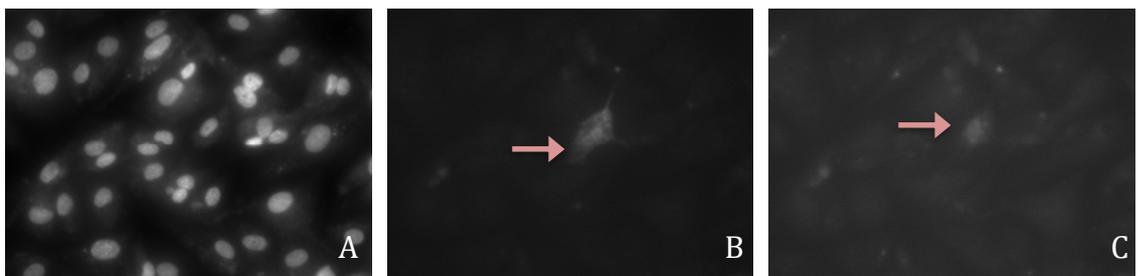


Abb. 23: Nachweis von in Huh7-Zellen produzierten WMHBV in Tupaia-Gallensäure-Transporter (NTCP) exprimierenden HepG2-Zellen

A Nachweis der Zellkerne mittels Höchst-Färbung; B Nachweis des HBcAg (Rabbit-Anti-HBc Antikörper (AK) plus Goat-Anti-Rabbit-AK 568 nm Belichtung); C Nachweis des HBsAg (Mouse-Anti-HBs-AK plus Goat-Anti-Mouse-AK 488 nm Belichtung).

Infektiosität von in HepG2-Zellen produzierten WMHBV

Die in HepG2-Zellen hergestellten WMHBV konnten HepG2-Zellen, die das Schimpansen-NTCP exprimierten, infizieren (s. Abb. 26). Die Fluoreszenz-Signale bei den mit dem Tupaia-NTCP-Expressionsplasmid transfizierten HepG2-Zellen waren

schwach, so dass eine unspezifische AK-Bindung nicht ausgeschlossen werden kann (s. Abb. 25). In den HepG2-Zellen, die das humane NTCP exprimierten, konnte keine Infektion nachgewiesen werden (s. Abb. 24).

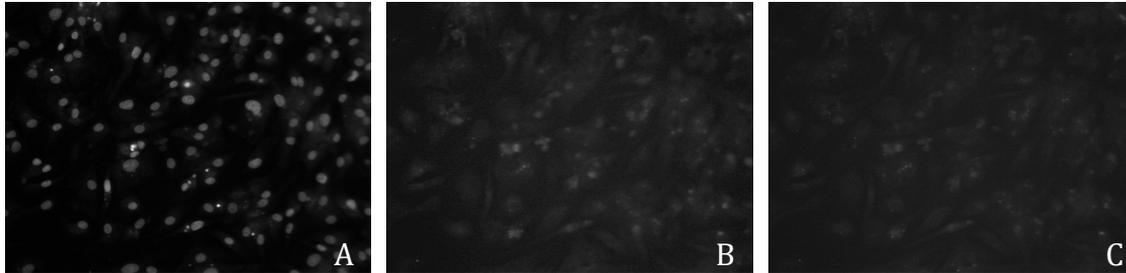


Abb. 24: Nachweis von in HepG2-Zellen produzierten WMHBV in den humanen Gallensäure-Transporter (NTCP) exprimierenden HepG2-Zellen
A Nachweis der Zellkerne mittels Höchst-Färbung; **B** Nachweis des HBcAg (Rabbit-Anti-HBc Antikörper (AK) plus Goat-Anti-Rabbit-AK 568 nm Belichtung); **C** Nachweis des HBs-Ag (Mouse-Anti-HB1-AK plus Goat-Anti-Mouse-AK 488 nm Belichtung).
 Nachweis von HB1Ag zweifelhaft.



Abb. 25: Nachweis von in HepG2-Zellen produzierten WMHBV in Tupaia-Gallensäure-Transporter (NTCP) exprimierenden HepG2-Zellen
A Nachweis der Zellkerne mittels Höchst-Färbung; **B** Nachweis des HBcAg (Rabbit-Anti-HBc Antikörper (AK) plus Goat-Anti-Rabbit-AK 568 nm Belichtung); **C** Nachweis des HBsAg (Mouse-Anti-HB1-AK plus Goat-Anti-Mouse-AK 488 nm Belichtung).
 Nachweis von HBsAg zweifelhaft.

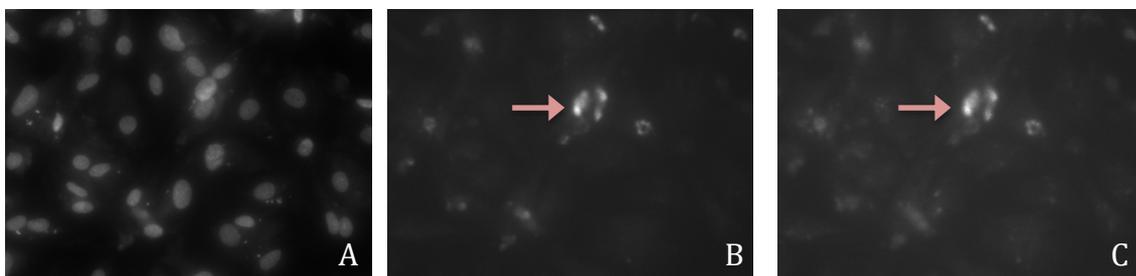


Abb. 26: Nachweis von in HepG2-Zellen produzierten WMHBV in Schimpansen-Gallensäure-Transporter (NTCP) exprimierenden HepG2-Zellen
A Nachweis der Zellkerne mittels Höchst-Färbung; **B** Nachweis des HBcAg (Rabbit-Anti-HBc Antikörper (AK) plus Goat-Anti-Rabbit-AK 568 nm Belichtung); **C** Nachweis des HBsAg (Mouse-Anti-HB1-AK plus Goat-Anti-Mouse-AK 488 nm Belichtung). Deutliche HBc- und HBs-Fluoreszenz innerhalb des Zytoplasmas.

Kontrolle der Infektion über exprimierte NTCPs mit HBV

Als Positivkontrolle wurden NTCP-(Mensch, Schimpansen, Tupaia)-exprimierende HepG2-Zellen mit HBV infiziert. Bei den Zellen, die das humane NTCP exprimierten, war der Anteil der infizierten Zellen hoch (s. Abb. 27). Bei Tupaia-NTCP exprimierenden Zellen wurden vereinzelt Zellen infiziert; diese zeigten jedoch ein deutliches Fluoreszenz-Signal (s. Abb. 28). Dagegen wurde bei den Schimpansen-NTCP exprimierenden Zellen nur eine schwache Fluoreszenz beobachtet (s. Abb. 29).

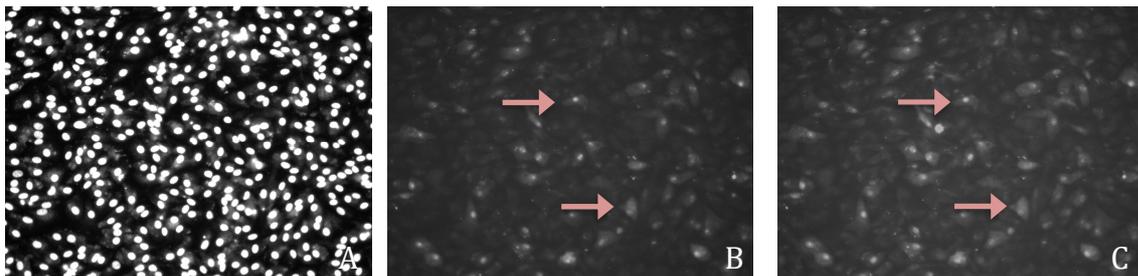


Abb. 27: Nachweis von HBV in den humanen Gallensäure-Transporter (NTCP) exprimierenden HepG2-Zellen

A Nachweis der Zellkerne mittels Höchst-Färbung; **B** Nachweis des HBcAg (Rabbit-Anti-HBc-AK plus Goat-Anti-Rabbit-AK 568 nm Belichtung) **C** Nachweis des HBsAg (Mouse-Anti-HB1-AK plus Goat-Anti-Mouse-AK 488 nm Belichtung). Zahlreiche fluoreszierende Zellen kennzeichnen eine hohe Infektionsrate.



Abb. 28: Nachweis von HBV in Tupaia-Gallensäure-Transporter (NTCP) exprimierenden HepG2-Zellen

A Nachweis der Zellkerne mittels Höchst-Färbung; **B** Nachweis des HBcAg (Rabbit-Anti-HBc-AK plus Goat-Anti-Rabbit-AK 568 nm Belichtung) **C** Nachweis des HBsAg (Mouse-Anti-HB1-AK plus Goat-Anti-Mouse-AK 488 nm Belichtung). Zahlreichende fluoreszierende Zellen kennzeichnen eine hohe Infektionsrate. Fluoreszierende Zellen entsprechen den infizierten Zellen.

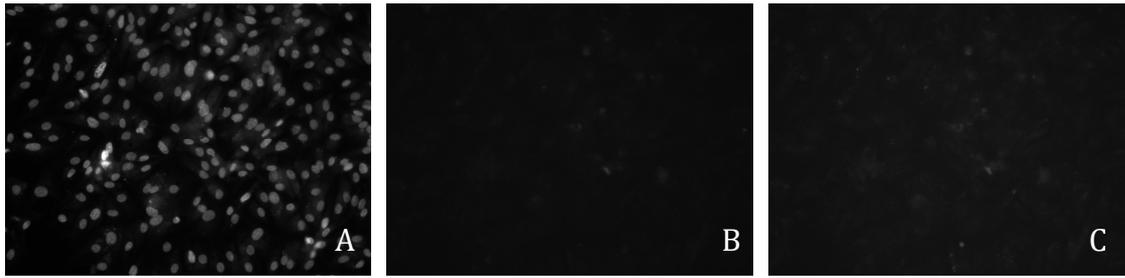


Abb. 29: Nachweis von HBV in Schimpansen-Gallensäure-Transporter (NTCP) exprimierenden HepG2-Zellen

A Nachweis der Zellkerne mittels Höchst-Färbung; **B** Nachweis des HBcAg (Rabbit-Anti-HBc-AK plus Goat-Anti-Rabbit-AK 568 nm Belichtung) **C** Nachweis des HBsAg (Mouse-Anti-HB1-AK plus Goat-Anti-Mouse-AK 488 nm Belichtung). Aufgrund der schwachen Fluoreszenz Nachweis von HBcAg und HBsAg zweifelhaft.

Negativkontrolle

Als Negativkontrolle dienten HepG2-Zellen, die das humane, Schimpansen- oder Tupaia-NTCP exprimierten ohne Virusinfektion. Auch in diesen Ansätzen ließen sich die Zellkerne (Höchst-Färbung) anfärben (s. Abb. 30). Fluoreszenz-Signale, die auf AK-Bindung an unspezifische Zellproteine hinweisen würden, fehlten. Damit ist davon auszugehen, dass die verwendeten Primärantikörper spezifisch an HBsAg und HBcAg binden.

	NTCP Human	NTCP Tupaia	NTCP Schimpanse
Höchst			
Anti HBc 568 nm			
Anti HBs 488 nm			

Abb. 30: Nachweis der Spezifität der Immunfluoreszenz-Färbung der Antikörper gegen die WMHBV / HBV Antigene in NTCP-exprimierenden HepG2-Zellen

Obere Reihe: Nachweis der Zellkerne mittels Höchst-Färbung; **mittlere Reihe:** Nachweis des HBcAg (Rabbit-Anti-HBc-AK plus Goat-Anti-Rabbit-AK 568 nm Belichtung); **untere Reihe:** Nachweis des HBsAg (Mouse-Anti-HB1-AK plus Goat-Anti-Mouse-AK 488 nm Belichtung). Zahlreiche fluoreszierende Zellen kennzeichnen eine hohe Infektionsrate. Fehlende Immunfluoreszenzsignale belegen die Spezifität der verwendeten AK.

Abbildung 31 fasst die Ergebnisse der Infektionsversuche mit den NTCP-exprimierenden HepG2-Zellen (Immunfluoreszenz, HBeAg-ELISA) und die Funktionsprüfung der Rezeptoren (Taurocholat-Essay) zusammen.

Die mit einem Schimpansen-NTCP-Expressionsplasmid transfizierten HepG2-Zellen exprimierten den Rezeptor deutlich. Einige Zellen zeigten auch eine HBsAg- und HBcAg-Expression. Der HBeAg-ELISA aus dem Kulturüberstand lieferte keinen eindeutigen Infektionsnachweis mit Werten knapp unterhalb des S/CO (**s. Abb. 31A**). Die mit einem Tupaia-NTCP-Expressionsplasmid transfizierten HepG2-Zellen zeigten ebenfalls eine deutliche Rezeptor-Expression. Auch die hellen Immunfluoreszenz-Signale sprachen für eine HBsAg- und HBcAg-Expression. Im HBeAg-ELISA mit den WMHBV aus Huh7 konnte eine eindeutige Infektion oberhalb des S/CO nachgewiesen werden (**s. Abb. 31B**). Die mit einem Schimpansen-NTCP-Expressionsplasmid transfizierten HepG2-Zellen exprimierten den Rezeptor deutlich schwächer als die anderen NTCPs. Es ließen sich dennoch vereinzelt HBsAg- und HBcAg-exprimierende Zellen finden. Im HBeAg-ELISA konnte keine eindeutige Infektion nachgewiesen werden. Die Werte lagen unterhalb des S/CO (**s. Abb. 31C**).

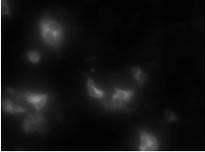
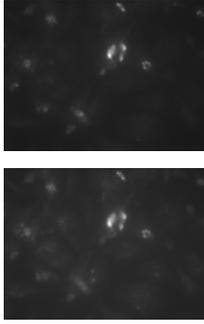
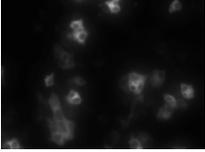
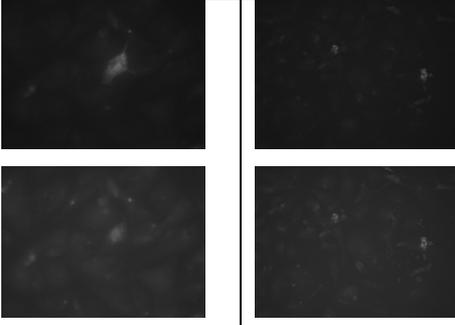
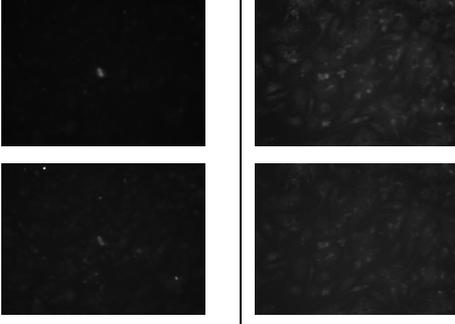
	NTCP Taurocholat- Assay	WMHBV-Antigene nach Infektion		HBeAg-ELISA	
		WMHBV aus		WMHBV aus	
		Huh7	HepG2	Huh7 (S/CO) Cutoff bei 1,0	HepG2 (S/CO) Cutoff bei 1,0
A Schimpanse				0,922	0,330
B Tupaia				1,955	0,386
C Human				0,701	0,347

Abb. 4.11.11: Zusammenfassende Darstellung der Versuche mit den NTCP-exprimierenden HepG2-tet-on Zellen

NTCP-Taurocholat-Assay: Nachweis von Nitrobenzoadiazol-(NBD)-markiertem Taurocholat (Funktionsassay der Rezeptoren); **WMHBV-Antigene nach Infektion:** Immunhistochemischer Nachweis des HBeAg und HBsAg nach WMHBV-Infektion; **HBeAg-ELISA:** Nachweis der HBeAg-Sekretion nach WMHBV-Infektion

A: Schimpansen-NTCP exprimierende HepG2-Zellen: deutliche Expression des Schimpansen-NTCPs / vereinzelte HBsAg- und HBeAg exprimierende Zellen / grenzwertige HBeAg-ELISA-Befunde mit Werten knapp unterhalb des signal-to-cutoff (S/CO). **B: Tupaia-NTCP exprimierende HepG2-Zellen:** deutliche Expression des Schimpansen-NTCPs / HBsAg- und HBeAg-exprimierende Zellen mit deutlichem Fluoreszenz-Signal / positive HBeAg-ELISA-Befunde mit Werten oberhalb des S/CO. **C: menschliches NTCP exprimierende HepG2-Zellen:** schwache Expression des menschlichen NTCPs / vereinzelte HBsAg- und HBeAg exprimierende Zellen / fehlende eindeutige HBeAg-ELISA-Befunde Werten unterhalb des S/CO.

5 Diskussion

5.1 Klonierungsschritte zum pCep-Puro-WMHBV-1,1mer-Plasmid

In vivo geht die Translation des Virus aus der pgRNA hervor, die 200 bp länger als das HBV-Genom ist [Gunther et al. 1995]. In Zellkultur kann diese pgRNA in Überlänge entweder aus dem zirkulären Ganzgenom (cccDNA) des Virus [Durantel et al. 2005], oder aus einem linearen Überlängenkonstrukt generiert werden [Gunther et al. 1995]. Daher wurde ein Expressionsplasmid mit 1,1mer Überlänge kloniert. Weiter war in dem verwendeten pCep-Puro-Vektor ein CMV-Promotor enthalten, da davon auszugehen ist, dass der natürliche HBV-Promotor nur die Expression des X-Proteins und der Oberflächenproteine induziert [Niekamp 2013]. Das Plasmid verfügte außerdem über ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion Plasmid-tragender E. coli Zellen.

5.2 Identifikation pCep-Puro-WMHBV-1,1mer-Plasmid-tragender Bakterienkolonien

Die Selektion der erfolgreich mit dem pCep-Puro-WMHBV-1,1mer-Plasmid transformierten Bakterienkolonien erfolgte über das Ampicillin-Resistenz-Gen. Denkbar wäre, dass auch Plasmid-Einzelstücke in die Bakterienzellen gelangt sind, die eine Antibiotika-Resistenz induzieren, ohne die vollständigen Informationen für das WMHBV zu tragen. Eine InFusion Reaktion hat die Einzelstücke ursprünglich miteinander verbunden, es ist jedoch nicht von einer 100%igen Ausbeute auszugehen. Es kann also eine Pucomycin-Resistenz ohne den WMHBV-Vektor transfiziert worden sein.

Mit Hilfe der Ethidiumbromid-Gel-Elektrophorese wurden daher Bakterienkolonien mit dem kompletten Expressionsplasmid pCep-Puro-WMHBV-1,1mer identifiziert. Weiter erlaubte das Verfahren eine Auswahl von Kolonien mit einer hohen Plasmid-Kopienzahl. In drei Bakterienkolonien konnte eine deutliche Bande auf der zu erwartenden Höhe von 13.000 kb nachgewiesen werden (s. Abb. 6). Im abschließenden Schritt wurde mittels Midi-Präparationsprotokoll eine große Menge pCep-Puro-WMHBV-1,1mer-Plasmid generiert und gereinigt.

5.3 Optimierung der Transfektions-Effizienz in HepG2-tet-on-Zellen

Laut Herstellerangaben schwankt das effektivste Verhältnis zwischen Xtreme-Gene-HP-Transfection-Reagent und Expressionsplasmid-DNA bei unterschiedlichen Zelllinien unter Laborbedingungen deutlich. In der vorliegenden Arbeit wurden die besten Transfektionsergebnisse mit Verhältnissen von 3:1 bis 2:1 (μL Xtreme-Gene-HP-Transfection-Reagent zu μg Plasmid-DNA) erzielt (s. Abb. 7). Da die Amplifikation des Expressionsplasmids wesentlich kostengünstiger war als der Ankauf von Xtreme-Gene-HP-Transfection-Reagent und keine signifikant höhere Transfektionsleistung mit größeren Mengen an Xtreme-Gene-HP-Transfection-Reagent erzielt werden konnte, wurden für alle nachfolgenden Transfektionsversuche ein Verhältnis von 3:1 verwendet.

5.4 Validierung des HBeAg-ELISA

Mit dem gewählten Versuchsdesign (HBeAg-ELISA) konnten HBV- bzw. WMHBV-Zellkulturen zuverlässig von Negativkontrollen mit GFP-Plasmid unterschieden werden. Beachtenswert war aber, dass mit dem pCep-Puro-WMHBV-1,1mer transfizierte Zellen wesentlich geringere Mengen an HBeAg produzierten als mit einem HBV-Plasmid transfizierte Zellen. Dieser Unterschied war in den transfizierten Huh7-Zellen weniger deutlich ausgeprägt als in den transfizierten HepG2-Zellen (s. Abb. 8). Das HBeAg wurde zwar relativ schnell nach der Transfektion von HepG2-Zellen exprimiert, möglicherweise reichert sich aber das HBeAg in den mit dem pCep-Puro-WMHBV-1,1mer transfizierten HepG2-Zellen bei einer längeren Inkubationsdauer an. Es ist auch möglich, dass die Kreuzreaktivität des diagnostischen Tests gegenüber dem HBeAg des WMHBV geringer ist, als gegenüber dem humanen HBV.

5.5 Nachweis des WMHBV über die HBe- und HBsAg-Expression

HepG2-Zellen haben sich als *in vitro* Modell zur Produktion von HBV seit 1987 etabliert. Wie in der Publikation von Sells et al. wurde in der vorliegenden Analyse ein Expressionsplasmid (pCep-Puro-WMHBV-1,1mer) verwendet, dass für das WMHBV-Genom in Überlänge codiert [Sells et al. 1987]. Zielstruktur des Immunfluoreszenz-

Nachweises waren das HBcAg und das HBsAg des WMHBV. Die Proteine kamen nur in erfolgreich transfizierten Zellen vor. Die Translation beider Proteine bildet die Grundlage für den Zusammenbau vollständiger Virionen. Beide Proteine konnten in den mit pCep-Puro-WMHBV-1,1mer transfizierten Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 9 und 10).

5.6 Konzentration des WMHBV im Kulturüberstand transfizierter Zellen

Die Anzahl der Viren wurde mithilfe einer qPCR bestimmt (s. Abb. 11). Zur spezifischen Amplifikation der WMHBV-Genome und nicht der transfizierten Plasmide wurde die 2011 von Andreas Geipel etablierte Hope-PCR genutzt [Geipel 2011]. Zur Optimierung der Infektionsversuche bedarf es stabiler Zelllinien, die höhere Virustiter ins Kulturmedium ausscheiden können. 2015 erzielten Xin und Weiwei et al. mit stabil transfizierten Zelllinien Virustiter von bis zu 10^7 Virusgenome/mL [Cheng et al. 2015]. In dem vorliegenden Versuchsaufbau wurden nach einer transienten Transfektion und der Aufkonzentrierung der Zellüberstände in der Zentrifuge Titer bis zu 4×10^6 Genome/mL erreicht. Bei der Bewertung des Titers ist aber zu berücksichtigen, dass die qPCR eine limitierte Aussagekraft hat, da sie nicht zwischen infektiösen Virionen und sezernierten Virus-Kapsiden unterscheiden kann.

5.7 Konformationsanalyse der chimären Viren nach Transfektion

Die DNA-Abschnitte, die für die Assemblierung von HB-Core-Partikeln und der HBs-Virushülle entscheidend sind, befinden sich in der cccDNA am Übergang von preS1 (Aminosäuren 92–108) zu preS2 (Aminosäuren 1–5) [Glebe und Urban 2007]. Die Varianz der Aminosäuresequenzen an dieser Stelle entscheidet über die Effizienz der Assemblierung von HBV-Core mit CMHBV- und WMHBV-Hüllproteinen und damit über die Bildung chimärer Viren. Nach Transfektion von HepG2-Zellen mit einem Plasmid für den HBV-Core und einem Plasmid für Virushüllen aus unterschiedlichen Spezies (WMHBV, CMHBV, HBV) wurde in allen Ansätzen HBV-DNA im Überstand der Zellkultur nachgewiesen (s. Abb. 12). Zu beachten ist aber, dass sowohl vollständige

Virionen als auch Core-Partikel die Wirtszelle verlassen können [Bardens et al. 2011]. In den vorliegenden Versuchen wurden signifikant mehr Viruskopien in den Zellkulturen nachgewiesen, die mit Plasmiden für den HBV-Core und für Hüllproteine transfiziert wurden, als in Zellen denen ein Plasmid für die Hüllproteine fehlte (HBV-Core-Plasmid + SEAP-Plasmid). Somit war von einer korrekten Assemblierung des HBV-Core und der Neuweltaffen-Virushüllen und damit einer Produktion von chimären Viren, die die Wirtszelle verlassen konnten, auszugehen. Laut Ellen Gerhardt und Volker Bruss assemblieren Woodchuck (Waldmurmeltier) Hepatitis B Oberflächenproteine und ein HBV-Core ebenfalls zu chimären Viren; eine Verbindung von HBV-Core und Enten-Hepatitis-B Hülle ist jedoch nicht möglich [Gerhardt und Bruss 1995]. Die Ergebnisse der Publikation und der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Bildung von chimären Viren zwischen zwei Orthohepadnaviren möglich ist, nicht aber zwischen einem Orthohepadnavirus und einem Avihepadnavirus, da diese Virusstämme phylogenetisch zu weit voneinander entfernt sind. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Chimärenbildung in Zellkulturen, könnte als Hinweis interpretiert werden, dass der gleichzeitige Befall eines Wirtes mit zwei Orthohepadnaviren möglicherweise zu chimären Virionen mit von bekannten HBV-Stämmen abweichenden Eigenschaften führt.

Weiter war in der vorliegenden Arbeit die HBV-Ausbeute bei der Transfektion der Zellen mit einem Plasmid um den Faktor 10 höher als bei einer Transfektion mit zwei Plasmiden (1x HB-Core und 1x HB-Surface). Die höhere Effizienz bei der Nutzung eines Plasmids liegt darin begründet, dass nach einer Transfektion nur ein Bruchteil aller Zellen das Plasmid enthalten. Bei einer Doppeltransfektion kommen daher auch Zellen vor, die nur eines der beiden Plasmide tragen. Diese Zellen können keine Viren in den Kulturüberstand ausscheiden. Die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Doppeltransfektion ist daher geringer als eine die Transfektion eines einzelnen Plasmids. Auch die Wahl der Zelllinie beeinflusste in der vorliegenden Arbeit die Virusproduktion. Chimäre Viren mit einer CMHBV- und WMHBV-Hülle wurden in HepG2-Zellen, nicht aber in Huh7-Zellen gebildet. HepG2-Zellen gelten als besser differenzierte Tumorzellen und sind für diesen Versuchsaufbau besser geeignet.

5.8 Analyse des WMHBV im CsCl-Gradienten

In einem CsCl-Gradienten ordnen sich Virionen in Abhängigkeit von ihrer Dichte nach der Ultrazentrifugation auf unterschiedlichen Höhen im Proberöhrchen an. Nach einer Fraktionierung der Flüssigkeit im Proberöhrchen kann mittels einer qPCR ermittelt werden, wie viele Virionen sich in den einzelnen Dichtestufen befinden. Eine NP40/TCEP löst die Core-Partikel von der Virushülle. So behandelte Virionen zeigen eine höhere Dichte als unbehandelte komplette Virionen. Eine korrekte Assemblierung der WMHBV vorausgesetzt, sollten sich die Virionen mit und ohne NP40/TCEP-Behandlung in unterschiedlichen Fraktionen befinden (s. Abb. 13). Bei den unbehandelten WMHBV zeigten sich zwei Maxima bei einer Dichte von 1,345 g/mL und 1,18 g/mL. Die behandelten WMHBV wiesen dagegen ein singuläres Maximum bei einer Dichte von 1,300 g/mL auf. Es ist davon auszugehen, dass lediglich das wesentlich kleinere Maximum bei 1,18 g/mL in den Ansätzen mit den unbehandelten WMHBV der Fraktion mit den behüllten Virionen entsprach, da das zweite höhere Maximum bei einer etwas höheren Dichte lag als bei den chemisch isolierten WMHBV-Cores. Laut der vorliegenden Ergebnisse assemblierten nur ca. 20 % der WMHBV-Genome korrekt mit Kapsid und Hülle. Somit war nur etwa ein Fünftel der WMHBV infektiös.

Ein Vergleich der Ergebnisse mit Literaturdaten ist schwierig, da ein solcher Versuch für WMHBV noch nicht publiziert wurde. Bei Versuchen mit humanen HBV reicherten sich die kompletten Virionen bei einer Dichte von 1,20 g/mL und Viruskapside bei einer Dichte von 1,31 g/mL im CsCl-Gradienten an [Wang et al. 2015]. Unter der Annahme, dass beide Virussubtypen im CsCl-Gradienten eine ähnliche Verteilung aufweisen, unterstützt die Übereinstimmung der Dichtefractionen der Maxima die These, dass in der vorliegenden Arbeit das Maximum in der Fraktion mit einer Dichte von 1,18 g/mL den behüllten WMHBV-Virionen entsprach.

5.9 Nachweis der NTCP-Funktionalität

Das HBV infiziert Zellen über den Gallensäuren-Transporter NTCP [Yan et al. 2012]. Der Aufbau dieses Rezeptors variiert zwischen den Spezies. Abbildung 32 zeigt die beiden entscheidenden Aminosäureabschnitte für die Bindung und das Eindringen von HBV. Die absolute Übereinstimmung zwischen der Sequenz in diesen Abschnitten im

Schimpansen- und Menschen-NTCP erklärt, warum sich Schimpansen mit dem humanen HBV infizieren können. Bei phylogenetisch weiter voneinander entfernten Spezies unterscheiden sich die NTCP-Aminosäuresequenzen deutlicher, was eine Infektion unwahrscheinlicher macht. Eine Ausnahme bildet das Spitzhörnchen *Tupaia belangeri*, dessen NTCP-Aminosäuresequenz trotz einer fehlenden nahen phylogenetischen Verwandtschaft in großen Teilen mit der von Menschenaffen übereinstimmt. Dieser Befund ist epidemiologisch interessant, da Spitzhörnchen ein Erregerreservoir darstellen können. Zudem bieten sich Spitzhörnchen auch als Tiermodell für die Erforschung von HBV an.

In der vorliegenden Arbeit spielten die Unterschiede bei den NTCP-Aminosäuresequenzen zwischen den Spezies eine Rolle für die Wahrscheinlichkeit einer Infektion von NTCP-exprimierenden HepG2-Zellen mit dem HBV.

Mit NTCP-Subtypen transfizierte Zellen zeigten im Vergleich zu Hepatozyten eine Rezeptor-Überexpression. Aufgrund der geringen Effektivität der nachfolgenden Infektion war dieser Effekt durchaus erwünscht.

NTCP Rezeptor	Aminosäuresequenz 80–92										Aminosäuresequenz 155–168																	
Mensch	G	K	V	F	R	L	K	N	I	E	A	L	A	P	Y	K	G	I	V	I	S	L	V	L	V	L	I	
Schimpanse
Tupaia	P	.	N	V	I
Totenkopffaffe	Q	.	N	K	G	.	.	M	.	.	.	I
Makake (WT)	Q	.	N	G	R	.	I	L	.	.	.	P
Makake (R158G)	Q	.	N	G	G	.	I	L	.	.	.	P

Abb. 32: An der HBV-Bindung (hellrot) und Überwindung der Zellmembran (hellblau markiert) beteiligte Aminosäuresequenzen des NTCP-Rezeptors verschiedener Spezies [Müller et al. 2018]

5.10 Nachweis der Infektion von NTCP-exprimierenden Hepatomzellen mit WMHBV

Zum Nachweis der Infektion wurden ein HBeAg-ELISA in den Zellkulturüberständen durchgeführt. Dazu wurde ein in der Humanmedizin verwendetes Gerät (Architekt) eingesetzt. Die Programmierung des Gerätes (Festlegung des Grenzwertes für positive HBeAg-Befunde = 1,0 S/CO) entsprach den Vorgaben aus der Humanmedizin, bei denen

eine möglichst hohe Sensitivität ohne Verlust der Spezifität auf einen nicht tolerierbaren Wert erreicht wird. Unter diesen Bedingungen wurden nach HBV-Infektion HBeAg lediglich in den Überständen von das humane NTCP und Tupaia-NTCP exprimierenden Zellen detektiert. Nach einer WMHBV-Infektion zeigten lediglich Tupaia-NTCP exprimierende Zellen positive Befunde. Die grenzwertig positiven HBeAg-Befunde für die Kombination HBV / Schimpansen-NTCP ($S/CO = 0,91$) und WMHBV / Schimpansen-NTCP ($S/CO = 0,92$) machen bei dem gewählten Versuchsaufbau die Möglichkeit einer Infektion ebenfalls wahrscheinlich. Daher stellt sich zwangsläufig die Frage nach der Wahl eines geeigneten Cutoff-Wertes. Da auch Zellkulturen ohne Virus-Infektion S/CO -Werte von fast 0,3 erreichten, ist davon auszugehen, dass Proben unterhalb dieses Wertes mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit negativ sind. Damit kann eine WMHBV-Infektion über den Makaken- (Wildtyp, Mutante R158G) oder Totenkopf-NTCP ausgeschlossen werden.

Ansätze mit NTCPs aus Menschen, Schimpansen und Tupaia wurden weiter mittels eines intrazellulären Immunfluoreszenz-Nachweises von HBcAg und HBsAg analysiert, um einzelne infizierte Zellen untersuchen zu können. Bei einer angenommenen geringen Infektionsrate sind negative Befunde im HBeAg-ELISA möglicherweise auch dadurch zu erklären, dass nur ein kleiner Anteil der Zellen HBeAg produziert haben.

Erstaunlicherweise ergaben in vivo Experimente und die vorliegenden in vitro Analysen gegenteilige Ergebnisse. Neuweltaffen wie der Klammeraffe können anders als Altweltaffen mit aus transfizierten Huh7-Zellen isolierten WMHBV infiziert werden [Lanford et al. 2003]. In dem vorliegenden Versuchsaufbau gelangen Infektionen von Altweltaffen, nicht aber von Neuweltaffen. Dieser Befund passt aber zu den Ergebnissen einer anderen Studie von Drexler et al., in der HDV-Partikel mit WMHBV-Hüllproteinen in vitro Zellen von Altweltaffen, nicht aber von Neuweltaffen infizieren konnten [Drexler et al. 2013].

In der vorliegenden Studie fiel zudem die Ineffektivität der WMHBV-Infektion von HepG2-Zellen auf. Auch eine andere Studie [Müller et al. 2018], in der NTCP-exprimierende HepG2-Zellen mit HDV-Viren unter Nutzung von WMHBV Oberflächenproteinen infiziert wurden, kam zu vergleichbar niedrigen Infektionsraten. Auch auf HDV-Ebene ließen sich die Zellen mit NTCPs aus Neuweltaffen nicht infizieren [Müller et al. 2018]. Die Infektionsrate lag bei der Kombination HDV-Core / WMHBV-Hülle um den Faktor 100 niedriger als bei der Kombination HDV-Core / HBV-Virushülle. Diese Ergebnisse sind auf WMHBV übertragbar.

5.11 Limitationen der Studie

Über transient transfizierte Zellkulturen ließ sich ausreichendes Virusmaterial für Infektionen nur eingeschränkt herstellen. WMHBV scheint sich nach Überwindung der Zellmembran in Hepatomzellen weitaus schlechter zu replizieren als im Tiermodell. Außerdem unterliegt der Versuchsaufbau den üblichen Einschränkungen einer In-Vitro Studie, die nur bedingt auf die in der Natur vorkommenden Infektionen übertragen werden kann.

5.12 Schlussfolgerungen und Ausblick

Schon 1998 wurde das Fehlen eines hocheffektiven Zellkultur- oder Tiermodells zur Erforschung von HBV beklagt [Lanford et al. 1998]. Bis heute wurde ein solches Modell nicht gefunden.

Die HBV-Infektion läuft im Tiermodell nach Erreichen der Blutbahn ohne künstliche Verstärkung ab. Bei Infektionsversuchen mit Zelllinien hat sich seit 2002 ein Versuchsaufbau etabliert, bei dem die Zellteilung der HepG2-Zellen unterdrückt und die Proteinbiosynthese gefördert wird, indem dem Kulturmedium DMSO zugesetzt wird. Weiter wird das Virusgemisch mit PEG versetzt, um den Kontakt der Viren mit der Zellmembran der Wirtszellen zu verbessern [Gripon et al. 2002].

Zur Charakterisierung von WMHBV ist eine Zelllinie erforderlich, die die natürlichen Vorgänge in primären Wollaffen-Leberzellen besser abbildet als HepG2- und Huh7-Zellen. Zur Analyse der Infektionsvorgänge mit dem vorliegenden Modell müsste die Produktion des WMHBV optimiert werden (z. B. Generierung von stabil mit dem pCep-Puro-WMHBV-1,1mer-Plasmid transfizierten HepG2- und Huh7-Zellen), um die Viruslast und nachfolgend die Infektionsrate bei den Infektionsexperimenten zu erhöhen.

6 Zusammenfassung

6.1 Deutsche Version

Das Ziel der Arbeit war die Analyse des zoonotischen Potentials von Woolly Monkey Hepatitis B Viren (WMHBV) über Infektionsversuche in HepG2-Zellen, die das Natrium/Taurocholat Kotransporter Polypeptid (NTCP) verschiedener Menschenaffen und *Tupaia belangeri* exprimierten. Weiter sollte über Kotransfektionsexperimente untersucht werden, ob aus dem humanen Hepatitis B Virus (HBV) Core und WMHBV bzw. Capuchin-monkey Hepatitis B Virus (CMHBV) Hüllproteinen chimäre Viren entstehen können.

Für die WMHBV-Produktion wurde ein Expressionsplasmid bestehend aus einem pCep-Puro-Vektor und einem WMHBV-1,1mer-Überlängenkonstrukt kloniert. Anschließend wurden HepG2- und Huh7-Zellen mit diesem pCep-Puro-WMHBV-1,1mer transfiziert. In den konzentrierten Zellüberständen wurde der Virusgehalt mittels quantitativer Polymerase-Chain-Reaction (qPCR) bestimmt. Wie mittels Cäsiumchlorid-(CsCl)-Gradient nachgewiesen wurde, assemblierten das Kapsid und die Hülle bei weniger der Hälfte der Virionen zu infektiösen Partikeln.

Für die Infektionsexperimente wurden HepG2-Zellen mit NTCP-Subtypen aus Neuweltaffen und Altweltaffen transfiziert und mit WMHBV infiziert. Der Nachweis der Infektion erfolgte über die immunhistochemische Markierung des Hepatitis B core und surface Antigens (HBcAg, HBsAg) sowie über einen Hepatitis B e Antigen (HBeAg)-Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Das WMHBV war in der Lage humanes, Schimpansen- und *Tupaia*-NTCP exprimierende Zellen nicht aber Neuweltaffen-NTCP exprimierende Zellen zu infizieren.

Mit WMHBV- und CMHBV-Hüllprotein-Plasmiden und HBV-Core-Plasmiden doppelt transfizierte HepG2-Zellen sezernierten chimäre Virionen (Nachweis von HBV-DNA im Kulturüberstand). Für Analysen der chimären Virionen im CsCl-Gradienten und für Infektionsversuche war die Viruslast im Überstand der Zellkulturen zu gering.

Die vorliegenden Befunde bestätigen vorangegangene Versuche, wonach in Zellkultur produzierte WMHBV Altweltaffen, nicht aber Neuweltaffen infizieren können. Weiter wurde *in vitro* die Möglichkeit der Entstehung chimärer Viren nachgewiesen. Dieser Befund spricht dafür, dass auch *in vivo* bei einer Koinfektion *in vivo* chimäre Viren mit neuen Eigenschaften auftreten können, die potentiell schwieriger zu behandeln sind.

6.2 Englische Version

This work was aimed at further describing the zoonotic potential of Woolly Monkey Hepatitis B through infection protocols. HepG2 cells were transfected with the Sodium/Taurocholate Cotransporting Peptide of Old-world- and New-world-Apes as well as *Tupaia belangeri*. After short incubation the cells were infected with WMHBV from cell culture. Also, chimeric virions were generated by co-transfecting two plasmids. One had all HBV-Core-proteins encoded, the other one either Woolly Monkey or Cebus Monkey surface proteins.

The means by which WMHBV was obtained, were through cloning the overlength viral genome onto a pCep-Puro-vector-plasmid. This pCep-Puro-WMHBV-1.1 plasmid was amplified in *E. coli* Stellar Cells and then transfected into HepG2 and Huh7 cells. After 12 to 15 days of incubation the supernatant was analysed according to content of viral genomes through qPCR. Also, the viral antigens HBs and HBc were marked in the cytoplasm with fluorescent antibodies. Though all these tests were positive, the CsCl-gradient showed that less than half of the virions assembled correctly and were possibly infectious.

In the NTCP Essay only HepG2 cells with tupaia, chimp and human NTCP showed signs of infection. HBe-Antigen was found in the cell's supernatant by the Architect. Furthermore, immunofluorescence pictures showed HBs- and HBc-Antigen in the cytoplasm. So Old-world-Apes but not New-World-Apes were infected in cell-culture-model.

To show whether WMHBV or CMHBV could generate chimeric virions after Co-infection with human HBV, an essay of simultaneous transfection of two plasmids was done. After short incubation the cell cultures supernatant was analysed of HBV-genome content by qPCR. HBV DNA in the supernatant proved a chimeric Virus assembly in HepG2 cell-culture. Unfortunately, the viral loads were too small for further analysis in CsCl-Gradient essays. Earlier studies were backed up in the contradictory claim that in cell culture Woolly Monkey Hepatitis B Virus can infect Old World Apes but not New World Apes, when in nature the very opposite can be observed.

Furthermore, in cell culture HBV can generate chimeric virions by using WMHBV and CMHBV surface proteins to assemble. This indicates that co-infection in vivo might generate virions with completely new properties that require specialized clinical procedures.

7 Literaturverzeichnis

Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282(5739): 615-616.

Bardens A, Döring T, Stieler J, Prange R (2011) Alix regulates egress of hepatitis B virus naked capsid particles in an ESCRT independent manner. *Cell Microbiol* 13(4): 602-619.

Beck J, Nassal M (2007) Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 13(1): 48-64.

Carsten L, Döring T, Prange R (2007) Hepatitis B Virus Maturation Is Sensitive to Functional Inhibition of ESCRT-III, Vps4 and γ 2-Adaptin. *J Virol* 81(17): 9050-9060.

Cheng X, Guan W, Sun S, Li B, Li H, Kang F, Kang J, Yang D, Nassal M, Sin D (2015) Stable Human Hepatoma Cell Lines for Efficient Regulated Expression of Nucleoside/Nucleotide Analog Resistant and Vaccine Escape Hepatitis B Virus Variants and Woolly Monkey Hepatitis B Virus. *PLoS ONE*. 10(12): e0145746.

de Carvalho Dominguez Souza BF, König A, Rasche A, de Oliveira Carneiro I, Stephan N, Corman VM, Roppert PL, Goldmann N, Kepper R, Müller SF, Völker C, de Souza AJS, Gomes-Gouvêa MS, Moreira-Soto A, Stöcker A, Nassal M, Franke CR, Rebello Pinho JR, Soares MDCP, Geyer J, Lemey P, Drosten C, Netto EM, Glebe D, Drexler JF. (2018) A novel hepatitis B virus species discovered in capuchin monkeys sheds new light on the evolution of primate hepadnaviruses. *J Hepatol*. 2018 Jun;68(6): 1114-1122.

Drexler JF, Geipel A, König A, Corman VM, van Riel D, Leijten LM, Bremer CM, Rasche A, Cottontail VM, Maganga GD, Schlegel M, Müller MA, Adam A, Klose SM, Borges Carneiro AJ, Stöcker A, Franke CR, Gloza-Rausch F, Geyer J, Annan A, Adu-Sarkodie Y, Oppong S, Binger T, Vallo P, Tschapka M, Ulirch RG, Gerlich WH, Leroy E, Kuiken T, Glebe D, Drosten C (2013) Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(40): 16151-16156.

Durantel D, Brunelle MN, Gros E, Carrouee-Durantel S, Pichoud C, Villet S, Trepo C, Zoulim F (2005) Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors from genotypic to phenotypic testing. *J Clin Virol* 34 Suppl 1: S34-S43.

Ganem D, Prince AM (2004) Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 350(11): 1118-1129.

Geipel A (2011) Phänotypische Charakterisierung klinisch relevanter Hepatitis-B-Virus-Mutanten. Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Gerhardt E, Bruss V (1995) Phenotypic mixing of rodent but not avian hepadnavirus surface proteins into human hepatitis B virus particles. *J Virol* 69(2): 1201-1208.

Glebe D, Urban S (2007) Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* 13(1): 22-38.

Glebe D, Bremer C (2013) The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 2013 33(2): 103-112.

Glebe D, König A (2014) Molecular virology of hepatitis B virus and targets for antiviral intervention. *Intervirology* 57(3-4): 134-140.

Glebe D, Aliakbari M, Krass P, Knoop EV, Valerius KP, Gehrlich WH (2003) Pre-s1 antigen-dependent infection of *Tupaia* hepatocyte cultures with human hepatitis B virus. *J Virol* 77(17): 9511-9521.

Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C (2002) Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24): 15655-15660.

Gunther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H, Will H (1995) A novel method for efficient amplification of the whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional

analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol* 69(9): 5437-5444.

Junker-Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller H (1990) A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J* 9(10): 3389-3396.

Köck J, Rösler C, Zhang JJ, Blum HE, Nassal M, Thoma C (2010) Generation of covalently closed DNA of hepatitis B viruses via intra- cellular recycling is regulated in a virus specific manner. *PLoS Pathog* 6(9): e1001082.

Krautzig S, Renz-Polster H (2012) *Basislehrbuch Innere Medizin*. 5. Auflage. München: Urban und Fischer, S. 606 ff

Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB 3rd, Rico-Hesse R (1998) Isolation of a hepadnavirus from woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(10): 5757-5761.

Lanford RE, Chavez D, Barrera A, Brasky KM (2003) An infectious clone of woolly monkey hepatitis B virus. *J Virol* 77(14): 7814-7819.

Levero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M (2009) Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 51(3): 581-592.

Magnius L, Mason WS, Taylor J, Kann M, Glebe D, Dény P, Sureau C, Norder H, Ictv Report Consortium. (2020) ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepadnaviridae. *J Gen Virol*. 2020 Jun;101(6): 571-572.

Müller SF, König A, Döring B, Glebe D, Geyer J (2018) Characterisation of hepatitis B virus cross-species transmission pattern via Na⁺/taurocholate co-transportin polypeptides from 11 New World and Old World primate species. *PLoS ONE* 13(6): e0199200.

Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J (1982) Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42(9): 3858-3863.

Niekamp H (2013) Charakterisierung der phänotypischen Resistenz von Hepatitis-B-Virus Mutanten gegenüber antiviralen Nukleosid und Nukleotidanaloga. Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Rasche A, Souza BFC, Drexler JF (2016) A Bat hepadnavirus and the origins of primate hepatitis B viruses. *Curr Opin Virol* 16:86-94.

Seitz S, Iancu C, Volz T, Mier W, Dandri M, Urban S, Bartenschlager R (2016) A Slow Maturation Process Renders Hepatitis B Virus Infectious. *Cell Host Microbe* 20(1): 25-35.

Sells MA, Chen ML, Acs G (1987) Production of the hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(4): 1005-1009.

Sinn DH, Lee J, Goo J, Kim K, Gwak GY, Paik YH, Choi MS, Lee JH, Koh KC, Yoo BC, Paik SW (2015) Hepatocellular carcinoma risk in chronic hepatitis B virus-infected compensated cirrhosis patients with low viral load. *Hepatology* 62(3): 694-701.

Summers J, Mason WS (1982) Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29(2): 403-415.

Wang YJ, Lu D, Xu YB, Xing WQ, Tong XK, Wang GF, Feng CL, He PL, Yang L, Tang W, Hu YH, Zuo JP (2015) A novel pyridazinone derivate inhibits hepatitis B virus replication by inducing genome-free capsid formation. *Antimicrob Agents Chemother* 59(11): 7061-7072.

WHO (2020) Hepatitis B. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> [Zugriff am 20.06.2021]

Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W (2012) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 1: e00049.

Zajakina A, Kozlovska T, Bruvere R, Aleksejeva J, Pumpens P, Garoff H (2004) Translation of hepatitis B Virus (HBV) surface proteins from the HBV pregenome and precore RNAs in Semliki Forest virus-driven expression. *J Gen Virol* 85(Pt 11): 3343-3351.

Zhong G, Yan H, Wang H, He W, Jing Z, Qi Y, Fu L, Gao Z, Huang Y, Xu G, Feng X, Sui J, Li W (2013) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide mediates woolly monkey hepatitis B virus infection of *Tupaia* hepatocytes. *J Virol* 87(12): 7176-7184.

8 Abkürzungsverzeichnis

Ag.....	Antigen
AK.....	Antikörper
bp.....	Basenpaare
cccDNA.....	covalently closed circular DNA
CMHBV.....	Capuchin-monkey Hepatitis B Virus
CsCl.....	Cäsiumchlorid
CMV.....	Cytomegalievirus
DMEM.....	Dulbecco's Eagle Medium
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs.....	Desoxyribonukleotid-Tri-Phosphate
E. coli.....	Escherichia coli
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat
ELISA.....	Enzyme-linked immunosorbent assay
FKS.....	Fetales Kälberserum
GFP.....	Green-fluorescent-protein
HBV.....	Hepatitis B Virus
HBcAg.....	Hepatitis B core Antigen
HBeAg.....	Hepatitis B envelope Antigen
HBsAg.....	Hepatitis B surface Antigen
HDV.....	Hepatitis D Virus
HGM.....	Hepatocyte Growth Medium
kb.....	Kilobasen
LB.....	Lysogeny Broth
LHBs.....	large-sized Hepatitis B surface Antigen
MHBs.....	middle-sized Hepatitis B surface Antigen
mRNA.....	messenger Ribonukleinsäure
NBD.....	Nitrobenzoadiazol
NTCP.....	Natrium/Taurocholat Kotransporter Polypeptid
PBS.....	Phosphatpuffer
PCR.....	Polymerase-Chain-Reaction

PEG	Polyethylenglykol
pgRNA	prägenomische Ribonukleinsäure
qPCR	quantitative Polymerase-Chain-Reaction
rcDNA	relaxed closed DNA
RT	Raumtemperatur
S/CO	Signal-to-Cut-off-Wert
SEAP	Secreted embryonic alkaline phosphatase
SHBs.....	small-sized Hepatitis B surface Antigen
WMHBV	Wollaffen Hepatitis B Virus
WHO	Weltgesundheitsorganisation

9 Anhang

9.1 Ausgangswerte der WMHBV-Analyse in den Fraktionen des CsCl-Gradienten

Tabelle 2 und 3 listen die Rohdaten der Fraktionen nach dem CsCl-Gradienten der in Kapitel 4.8 beschriebenen WMHBV-Analyse

Tab. 2: Ausgangswerte der WMHBV-Analyse in den Fraktionen des CsCl-Gradienten – ohne NP40/TCEP-Behandlung

WMHBV ohne NP40/TCEP			
Probennummer	Refraktionsindex	Dichte g/mL	GE/mL
1	1,336000	1,025	0
2	1,354000	1,214	5,92E+02
3	1,374500	1,429	2,28E+03
4	1,374500	1,429	8,57E+02
5	1,370000	1,382	4,15E+05
6	1,366500	1,345	1,38E+06
7	1,362500	1,303	6,32E+05
8	1,358500	1,261	2,31E+05
9	1,355000	1,225	7,16E+04
10	1,352500	1,198	2,63E+05
11	1,350500	1,177	2,89E+05
12	1,348000	1,151	2,32E+05
13	1,346500	1,135	1,22E+05
14	1,345000	1,120	9,15E+04
15	1,343500	1,104	5,88E+04
16	1,342500	1,093	8,85E+03
17	1,341500	1,083	7,79E+03

Tab. 3: Ausgangswerte der WMHBV-Analyse in den Fraktionen des CsCl-Gradienten – mit NP40/TCEP-Behandlung

WMHBV mit NP40/TCEP			
Probennummer	Refraktionsindex	Dichte g/mL	GE/mL
1	1,333000	0,993	0
2	1,343000	1,099	1,41E+03
3	1,371000	1,393	3,75E+03
4	1,376000	1,445	1,74E+04
5	1,374000	1,424	7,46E+03
6	1,370500	1,387	9,34E+03
7	1,367500	1,356	3,93E+05
8	1,365000	1,330	2,73E+05
9	1,362000	1,298	1,04E+06
10	1,359000	1,267	4,60E+05
11	1,356000	1,235	8,07E+04
12	1,354500	1,219	4,33E+05
13	1,352000	1,193	1,45E+04
14	1,350000	1,172	5,10E+03
15	1,348000	1,151	3,45E+04
16	1,346500	1,135	1,83E+04
17	1,345000	1,120	3,01E+04
18	1,344000	1,109	2,18E+04
19	1,343000	1,099	3,39E+04
20	1,342000	1,088	1,80E+04
21	1,342000	1,088	2,21E+03

9.2 Konformationsanalyse der chimären Viren mittels CsCl-Gradienten

Die Auswertung der CsCl-Gradienten mittels qPCR zeigte nur sehr unspezifische Amplifikationen. Da aber bei der transienten Virusproduktion der Chimären tatsächlich Virusgenom im Kulturüberstand nachgewiesen werden konnte, kann trotz des Ergebnisses des CsCl-Gradienten davon ausgegangen werden, dass sich chimäre Viren in den HepG2-Zellen assemblieren können. Die Ergebnisse aus dem CsCl-Gradienten deuten an, dass eine ausreichende Viruskonzentration für diesen Test nicht erreicht werden konnte(s. Abb. 33–35).

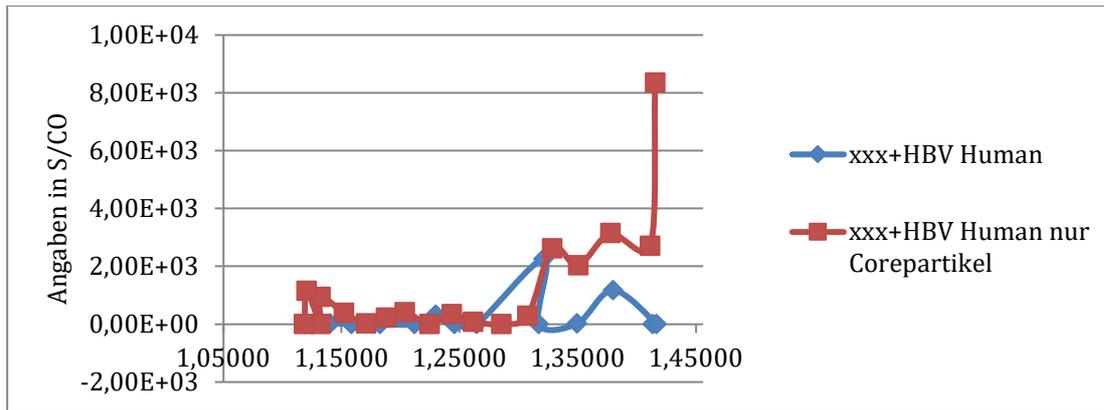


Abb. 33: CsCl-Gradient von HBV – isolierter Core (rot) und HBV-unbehandelt mit Core und Hülle(blau)

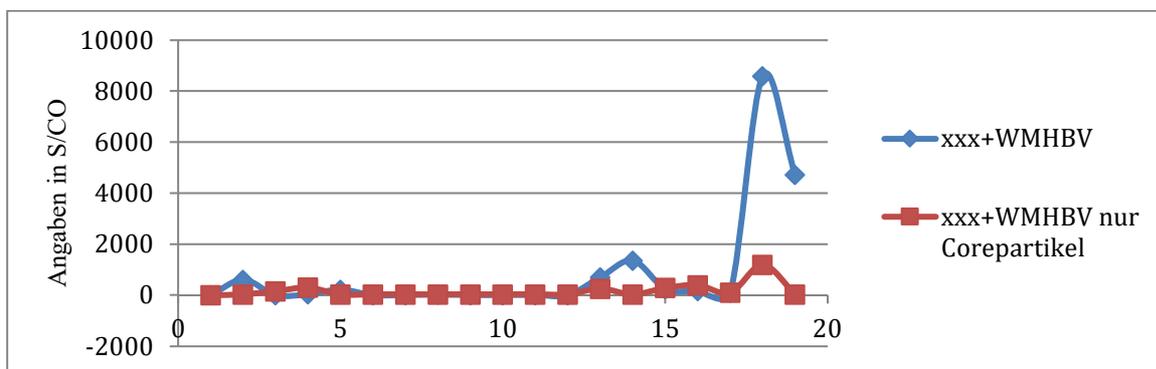


Abb. 34: CsCl-Gradient von WMHBV – isolierter Core (rot) und WMHBV-unbehandelt mit Core und Hülle(blau)

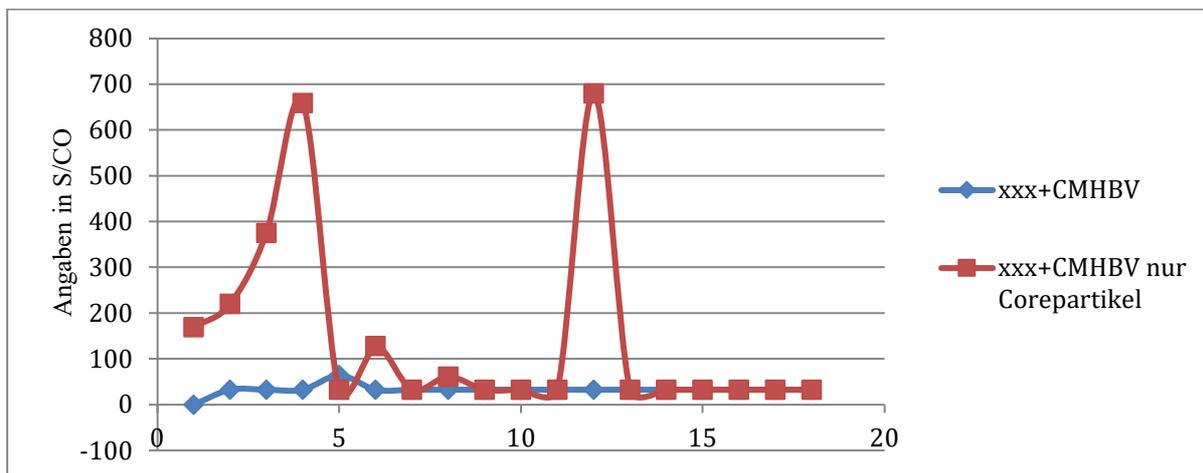


Abb. 35: CsCl-Gradient von CMHBV – isolierter Core (rot) und CMHBV-unbehandelt mit Core und Hülle(blau)

9.3 Infektionsexperimente mit den chimären Viren

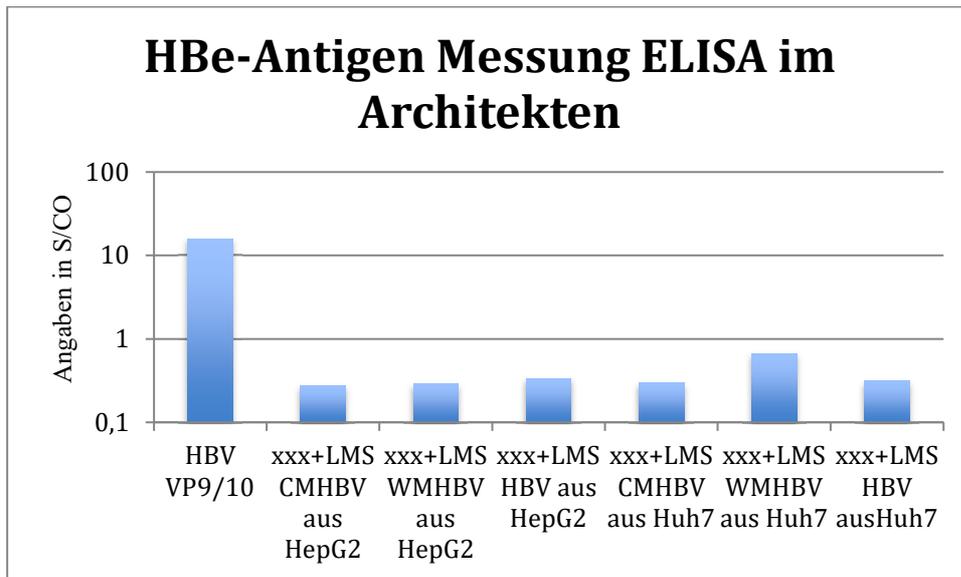


Abb. 36: Infektionsversuches von mit humanem NTCP transfizierten HepG2-Zellen mit chimären Viren aus der Zellkultur

Gemessen wurde die HBeAg-Konzentration im Kulturüberstand. Eine Infektion konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Die Ursache war vermutlich die zu geringe Viruskonzentration. Die Positivkontrolle mit HBV viel mit 15,96 S/CO deutlich positiv aus.

Von links nach rechts: 1. Positivkontrolle: HBV-3091-Plasmid + SEAP-Plasmid. 2. HBV-3091-XXX-Plasmid mit Punktmutationen in allen Startcodons für HBsAg (nur Core) + HBV-LMS-Plasmid (kodiert für HBV-Oberflächenproteine). 3. HBV-3091-XXX-Plasmid (nur Core) + LMS-WMHBV-Oberflächenprotein-Plasmid. 4. HBV-3091-XXX-Plasmid (nur Core) + CMHBV-Oberflächenprotein-Plasmid. 5. Negativkontrolle: Plasmidkombination entsprechend 2. sowie Unterbindung der Replikation durch Entecavir. 6. Negativkontrolle: HBV-3091-XXX-Plasmid mit Punktmutationen in allen Startcodons für HBsAg (nur Core) + SEAP-Plasmid.

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei den zahlreichen Personen zu bedanken, ohne deren Unterstützung die Anfertigung dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Danken möchte ich vor allem Herrn Professor Dieter Glebe, der geduldig und verständnisvoll die fachliche Führung bei dieser Arbeit übernommen hat.

Weiter möchte ich mich bei meinen beiden Betreuerinnen Dr. Corinna Bremer und Dr. Pia Seiz, die mit bei der praktischen Durchführung der Versuche jeden Tag aufs Neue zur Seite standen und mit deren Hilfe jedes Problem im Laborprozess letzten Endes gelöst werden konnte.

Dank gebührt auch Dr. Alexander König, der mir in erster Linie bei allen immunologischen Zellfärbungen sowie deren Auswertung eine große Hilfe war.

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei Siggi Broehl, die mich in die tiefen Geheimnisse der Zelllinien-Kultivierung eingeweiht hat und mir bei einigen praktischen Arbeitsprozessen bei der Kultivierung der Zellen eine große Hilfe war. Außerdem konnte sie mir durch ihr optimistisches, lebensfrohes Auftreten oft Trost spenden, wenn beispielsweise wieder eine Zellkolonie mitten im Infektionsprotokoll abgestorben ist.

Mein Dank gilt außerdem Ramona Kepper, die mir bei der Klonierung des pCep-Puro-WMHBV-1,1mer-Plasmids den ein oder anderen Trick gezeigt hat, ohne den die PCR nicht gelingen wollte.

Das Fluoreszenz-Mikroskop wurde freundlicherweise von der Forschungsgemeinschaft des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie bereitgestellt, mit dessen Hilfe alle Fluoreszenz-Bilder der Zelllinien angefertigt wurden. Hierfür möchte ich Professor Joachim Geyer danken.

Die technische Einweisung erfolgte durch Dr. Simon Müller, der mir genau wie Herr Dr. König stets geduldig und verständnisvoll bei den immunologischen Färbungen zur Seite stand.

Mein Dank gilt Professor Michael Nassal aus Freiburg für die Bereitstellung des pCWM-9/3088MroLan-Plasmides, das als Template für die Klonierung des WMHBV Expressionsvektors pCep-Puro-WMHBV-1,1mer diente.

An dieser Stelle möchte ich auch meine Oma Elvira Steinbeck erwähnen, die mir auf den Weg gegeben hat; „Du kannst alles verlieren, was du besitzt, aber was du im Kopf hast wird dir niemand wegnehmen können.“

Ich möchte mich bei meiner Lebensgefährtin Mia Berit Köhne bedanken, die mir im gesamten Schaffensprozess dieser Dissertation zur Seite stand, sei es bei der Aufkonzentrierung der Kulturüberstände im Biomedizinischen Forschungszentrum Seltersberg bis weit nach Mitternacht oder bei den vielen Stunden des Schreibens in der Cafeteria. Zu Zweit sind die Stunden nie zu lang geworden.

11 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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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.

Hamburg, der 11.05.2023

Ort, Datum

Paul Steinbeck