

Charakterisierung der Genotypen 2 bis 8 des Hepatitis-D-Virus (HDV)

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

vorgelegt von
Giese, Annika
aus Luckau

Gießen 2024

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

1. Gutachter: **Prof. Dr. Dieter Glebe**
2. Gutachter: **Prof. Dr. Michael Kracht**

Tag der Disputation: **05.09.2024**

INHALT

1	Einleitung	1
1.1	Das Hepatitis-D-Virus	1
1.1.1	Entdeckung des HDV	1
1.1.2	Phylogenetische Abstammung des HDV	2
1.1.3	Morphologie und Genom des HDV	4
1.1.4	Infektionszyklus	5
1.1.4.1	Replikation.....	5
1.1.4.2	Assemblierung und Sekretion	6
1.1.4.3	Zellbindung und -eintritt	7
1.1.4.4	Die Rolle des HDAg des HDV	8
1.2	Die Hepatitis-D-Virus-Infektion	10
1.2.1	Epidemiologie	10
1.2.2	Krankheitsverlauf der HDV-Infektion	11
1.2.3	Diagnostik der HDV-Infektion.....	12
1.2.4	Therapeutische Ansätze bei chronischer Hepatitis-D-Virus Infektion	13
1.2.5	Prävention der HDV-Infektion	16
1.3	Ziel der Arbeit	17
2	Material	19
2.1	Geräte.....	19
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	20
2.3	Kommerzielle Puffer, Lösungen und Reagenzien.....	20
2.4	Puffer, Lösungen und Medien	22
2.5	Enzyme	24
2.6	Kits	25
2.7	Antikörper	25
2.8	Primer	27
2.9	Bakterienstämme und Zelllinien	30
2.9.1	Kompetente Bakterien	30
2.9.2	Huh-7	30
2.9.3	HepG2-NTCP	30
2.10	Plasmide und Vektoren	30
2.10.1	p _{CDNA3.1(+)}	30
2.10.2	p _{CH9-200_LMS_3091_HBV}	31
2.10.3	p _{SEAP2-control}	31

3	Methoden	32
3.1	Auswahl und Bearbeitung der HDV-Genomsequenzen	32
3.2	Amplifikation und Präparation der Plasmid-DNA.....	33
3.2.1	Transformation.....	33
3.2.2	Aufreinigung	33
3.2.3	Linearisierung des pcDNA3.1(+)	33
3.3	Klonierung	34
3.3.1	Klonierung der Monomere.....	34
3.3.2	Klonierung der Dimere	35
3.4	Kolonie-PCR	36
3.5	Sequenzierung.....	36
3.6	Side Directed Mutagenesis.....	37
3.7	Zellbiologische Methoden	38
3.7.1	Zellkultivierung	38
3.7.2	Transfektion.....	38
3.7.2.1	Immunfluoreszenz und ELISA	38
3.7.2.2	Für die Produktion der Deltaviren.....	39
3.7.2.3	Für Western Blot	39
3.7.3	Produktion rekombinanter Deltaviren	40
3.7.3.1	Bestimmung der HDV-Konzentration mittels qRT-PCR.....	40
3.7.3.2	HBsAg-Messung.....	41
3.7.3.3	SEAP-Assay	42
3.7.4	Infektion	42
3.8	TRIZOL-Aufreinigung	42
3.9	Immunologische Nachweismethoden.....	43
3.9.1	Immunfluoreszenz.....	43
3.9.2	SDS-PAGE und Western Blot	43
3.9.3	ELISA	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Herstellung eines HDV-Expressionssystems im Vektorsystem pcDNA3.1	45
4.2	Nachweis der Expression von HDAg in humanen Hepatomzellen nach Transfektion mit den HDV-Expressionsplasmiden der GT 2-8	46
4.3	Erzeugung rekombinanter Deltaviren in der Zellkultur.....	50
5	Diskussion.....	55
6	Ausblick.....	66
7	Zusammenfassung.....	68

8	Summary.....	70
9	Publikationsverzeichnis	71
10	Anhang.....	72
10.1	Abkürzungsverzeichnis.....	72
10.2	Abbildungsverzeichnis.....	73
10.3	Tabellenverzeichnis	73
10.4	Literaturverzeichnis.....	74
11	Ehrenwörtliche Erklärung	96
12	Danksagung	97

1 EINLEITUNG

1.1 DAS HEPATITIS-D-VIRUS

1.1.1 ENTDECKUNG DES HDV

Im Jahr 1977 berichteten Rizzetto et al. erstmals von einem neuen Antigen-Antikörper-System, das mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) assoziiert ist und sich immunologisch von den HBV Oberflächen-, Kern- und Exkretorischen-Antigenen unterscheidet (genannt HBsAg, HBcAg und HBeAg). Das neue Antigen, welches sie „Delta“ nannten, wurde durch Immunfluoreszenz nur in Leberzellkernen von Patienten mit HBsAg-positiver chronischer Lebererkrankung nachgewiesen. Gleichzeitig jedoch schien sich die intrahepatische Expression von HBcAg und Delta-Antigen gegenseitig auszuschließen: Unter Immunfluoreszenz reagierte das Anti-Delta-Serum allein mit denjenigen Leberbiopsaten, deren Zellkerne HBc-negativ waren. Weiterhin konnte elektronenmikroskopisch kein dem Antigen entsprechendes morphologisches Korrelat identifiziert werden, wie es für das HBc-Antigen der Fall ist. Damals nahm man an, es könnte sich um einen weiteren serologischen Marker für eine bestimmte Phase der HBV-Replikation handeln, in welcher das HBc-Antigen noch nicht ausgebildet oder bereits eliminiert wurde [190]. Die neu gewonnenen Erkenntnisse gaben Anlass dazu, die Seren weiterer Patienten aus verschiedenen Teilen der Welt zu testen. Daraufhin konnte eine Assoziation zwischen zirkulierenden Anti-Delta-Antikörpern und chronischen Lebererkrankungen festgestellt werden. Ebenso erhärtete sich die Vermutung, dass das Delta-Antigen durch Co- oder Superinfektion mit Hepatitis B übertragen werden muss [195, 196]. Wegweisend waren einige Zeit später schließlich Infektionsversuche mit Schimpansen. So entwickelten die Tiere nach Injektion mit HBsAg- & Delta-Ag-positiven Patientenserum eine Typ-B-Hepatitis und Delta-Marker. Eine hohe Verdünnung des benannten Serums jedoch induzierte eine Typ-B-Hepatitis ohne Delta-Marker. Weiterhin entwickelten sich weder HBV-Infektion noch Delta-Marker bei Tieren mit bereits vorhandenen Antikörper-Titern gegen HBsAg. Bei Schimpansen mit schon zirkulierendem HBsAg zum Zeitpunkt der Infektion trat die Synthese des Delta-Agens nicht nur früher auf, sondern auch Ausmaß und Dauer der Delta-Level waren größer als bei Tieren, die zuvor keinem HBV ausgesetzt waren. Ebenso auffällig war, dass, zeitgleich mit der Produktion von Delta, die Synthese von bereits vorhandenen HBV-Genprodukten vermindert wurde. Erstmals tauchte die Vermutung auf, Delta scheine ein Marker für einen übertragbaren pathogenen Erreger zu sein, womöglich eine HBV-Variante oder sogar ein anderer Erreger, der die Helferfunktionen von HBV erfordert, der

defekt ist und die HBV-Replikation stört [191].

Nur wenige Monate später wurde das Delta-Agens mit einer niedermolekularen RNA in Verbindung gebracht, welche zwar größer als die der höheren Pflanzenviroide, jedoch kleiner als die anderer bekannter RNA-Viren zu sein schien. Gleichzeitig konnte für die Delta-Ag-assoziierten Partikel eine Größe von 35-37 nm ermittelt werden, welche zwischen der von HB-Virionen und der von subviralen Partikeln (SVP) aus HBsAg liegt. So wurde die Helferfunktion des HBV schließlich in der Umhüllung des Delta-Agens mit HBV-Oberflächenproteinen vermutet [194]. Einige Zeit später konnten auch erfolgreiche Infektionsversuche mit Waldmurmeltieren verzeichnet werden, die daraufhin ähnliche Serum- und Lebermarker entwickelten wie Menschen und Schimpansen. Delta konnte also auch in Anwesenheit HBV-ähnlicher Viren replizieren, wie dem WHV (Waldmurmeltier Hepatitis B Virus) [186]. Diesem Delta-Agens, heute als Hepatitis-D-Virus bekannt, wurde aufgrund seiner Einzigartigkeit eine eigene Virus-Gattung zugeordnet, derer es bis heute der einzige Angehörige ist: Das Deltavirus-Genus [147]. Bisher wurden bereits 8 verschiedene HDV-Genotypen identifiziert, welche eine unterschiedliche geographische Verteilung aufweisen und sich in ihren Genomsequenzen vergleichsweise stark unterscheiden [129, 186].

1.1.2 PHYLOGENETISCHE ABSTAMMUNG DES HDV

HDV ist aufgrund seiner Eigenschaften einzigartig unter den tierpathogenen Viren. Sein einzelsträngiges zirkuläres RNA-Genom ist nur ca. 1700 Nukleotide lang, es kodiert nur für ein einzelnes Protein (HDAg) und es ist für seine Replikation auf Wirtszellenzyme angewiesen. HDV erfüllt zudem nicht die Kriterien zur Klassifikation als eigenständiges Virus, sondern wird vielmehr der Gruppe der sog. Satelliten-Viren zugeordnet, deren Merkmal es ist, für ihren Infektionszyklus auf ein sog. Helfervirus (in diesem Falle HBV) in derselben Zelle angewiesen zu sein [147]. Die entwicklungsgeschichtliche Herkunft von HDV wird seit langem kontrovers diskutiert, am weitesten verbreitet ist bisher die Annahme, es stamme von höheren Pflanzenviroiden ab [64, 74]. Pflanzenviroide zeichnen sich, ähnlich wie HDV, durch kurze, einzelsträngige und zirkulär geschlossene RNA-Genome aus. Das Genom von Pflanzenviroiden kodiert nicht für eigene Proteine und so nutzen sie, ebenso wie HDV, Wirtszell-Polymerasen für ihre Replikation [76, 185]. Es wird angenommen, dass diese Replikation bei HDV, wie auch bei einigen Pflanzenviroiden, über einen symmetrischen „Rolling-Circle“-Mechanismus vonstattengeht [49, 74]. Auch die Ribozym-Aktivität, die zum autokatalytischen Schneiden der im Zuge dieser Replikation entstandenen RNA-Multimere befähigt, hat HDV mit den Pflanzenviroiden gemein [74, 262]. Nichtsdestotrotz ist das HDV-Genom mit ca. 1700 Nukleotiden rund 5-mal größer als das von pflanzenpathogenen Viroiden,

welches nur eine Länge von ca. 250 bis 400 Nukleotiden umfasst. Letztgenannte sind des Weiteren nicht auf die Hüllproteine oder andere Eigenschaften eines Helfervirus angewiesen [49, 74]. Weiterhin kodiert die HDV-RNA, anders als bei Pflanzenviroiden, für ein Protein (HDAg), wenngleich auch ohne Polymeraseaktivität [45]. Dies macht die Ausbildung einer mRNA im Zuge der Replikation erforderlich [88], was demnach bedeutet, der „Rolling-Circle“ muss in einer erweiterten Form vonstattengehen, als er es bei pflanzenpathogenen Viren tut. Es bleibt also unter Anderem zu klären, woher der proteinkodierende Anteil in der HDV-RNA stammt, der den Pflanzenviroiden fehlt. Dieser Frage versucht eine weitere Abstammungstheorie gerecht zu werden, nach der HDV während des Spleiß-Prozesses aus der prä-mRNA der Wirtszelle erwachsen ist. Unterstützt wurde dies anfangs durch Studien, die Ribozym-RNA mit ähnlicher Sekundärstruktur und biochemischen Eigenschaften zu der des HDV in menschlichen Zellen identifizierten, nämlich in einem Intron des CPEB3-Gens, welches die Polyadenylierung von mRNA reguliert [206]. Doch solche Pseudoknoten-Ribozyme wurden wenig später in zahlreichen anderen Spezies gefunden [251]. Auch für HDAg wurde ein Ursprung in der Wirtszelle vorgeschlagen. Ein Protein namens DIPA (delta interacting protein A) schien anfangs ein geeigneter Kandidat, wenngleich die tatsächliche Relevanz ihrer Homologie auch später entkräftet wurde [27, 140]. Andere Ansätze zeichnen ein eher ganzheitliches Modell, indem sie die oben beschriebenen Theorien kombinieren. So könnte eine primitive viroid-ähnliche RNA Teile des Transkripts seiner Wirtszelle „eingefangen“ haben [206]. Und wenn jene Wirtszelle zeitgleich mit HBV infiziert gewesen wäre, könnte das auch die enge Beziehung des HDV zu seinem Helfervirus erklären [235]. Nichtsdestotrotz ist HDV jedoch imstande, auch in anderen Zelltypen als Leberzellen zu replizieren [181, 182]. Ein weiterer Schritt hin zum Verständnis der Herkunft von HDV wurde kürzlich durch die Entdeckung HDV-ähnlicher Viren in anderen Spezies gemacht. HDV-verwandte Viren konnten in unterschiedlichen Arten von Wirbeltieren und Wirbellosen nachgewiesen werden, u.a. in Vögeln [259], Reptilien [95], Fischen und Termiten [44] sowie in Säugetieren [15, 114, 171]. Phylogenetische Analysen zeigen, dass die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen HDV und Säugetier-Deltaviren enger sind, als jene zwischen HDV und den Deltaviren der Vögel, Reptilien, Fische oder Amphibien [159]. Die Ähnlichkeit zwischen HDV und den neu-entdeckten Deltaviren besteht im zirkulären, negativ-polaren RNA-Genom, welches aufgrund komplementärer Basenpaarungen ebenfalls eine stabförmige Struktur annimmt. Zudem findet sich ebenfalls eine Ribozymaktivität sowie ein einzelner ORF für das Delta-Antigen [176]. Anders als bei HDV wurden bei den allermeisten HDV-ähnlichen Viren jedoch keine Hepadnaviren in den Zellen nachgewiesen [176]. Ob sie

dennoch auf ein (anderes) Helfervirus angewiesen sind und somit wie HDV zu den Satellitenviren zählen, muss weiter erforscht werden. Immerhin konnte in experimentellen Versuchen gezeigt werden, dass auch andere Viren als HBV als Helferviren für HDV fungieren können. So konnte HDV auch mittels Oberflächenproteinen von u.a. Vesikuloviren, Arenaviren, Metapneumoviren und Flaviviridae umhüllt werden. Die ko-infizierten Zellen sezernierten die rekombinanten HDV-Partikel, welche wiederum imstande waren, weitere Zellen zu infizieren [175]. Diese Erkenntnisse stellen nicht nur die Theorien zur entwicklungsgeschichtlichen Herkunft von HDV infrage, sondern auch die klinische Relevanz der Verbreitung von HDV durch andere Helferviren.

1.1.3 MORPHOLOGIE UND GENOM DES HDV

HDV ist 35-37 nm groß und besitzt ein ca. 1700 Nukleotide langes, einzelsträngiges und zirkulär geschlossenes RNA-Genom mit negativer Polarität. Der Anteil an Guanin- und Cytosin-Basen (sog. GC-Gehalt) liegt bei ~60% und führt zu einem hohen Maß an Komplementarität innerhalb des Genoms. Dies bedingt die Ausbildung intragenomischer Basenpaarungen, welche die HDV-RNA in der Sekundärstruktur eine stabförmige Gestalt annehmen lassen. HDV gilt wegen seiner kurzen Genomsequenz bis heute als das humanpathogene Virus mit dem kleinsten Genom. Einzigartig unter diesen ist es auch in der Hinsicht, dass es obligat ein Helfervirus für seinen Infektionszyklus benötigt, das Hepatitis-B-Virus [148, 247]. Zwar ist HDV in seiner Replikation völlig unabhängig von HBV [79, 80], jedoch benötigt es die HBV-Hüllproteine L-, M- und S-HBsAg, um infektiöse Viren auszubilden [20, 124]. Innerhalb dieser Hülle aus HBV-Oberflächenantigenen befindet sich das 19 nm messende Ribonukleoprotein (RNP) des HDV. Es besteht aus einem Komplex der HDV-RNA und den HDV-Antigenen L- und S-HDAg, welche als Multimere an die RNA binden [9, 86]. Erst aus dieser Komplexbildung resultiert die Resistenz der HDV-RNA gegenüber den Wirtszellnukleasen [59]. Bisher wurden im Genom von HDV mehrere offene Leserahmen identifiziert, jedoch exprimiert HDV lediglich ein Protein in zwei Isoformen: das small-delta-Antigen (S-HDAg, 195 AS) und das large-delta-Antigen (L-HDAg, 214 AS) [14, 144]. Beide Formen des HDAg sind hierbei auf einem gemeinsamen, einzelnen ORF (~ 0,8 kb) im Gegenstrang des Genoms, dem sogenannten Antigenom (ag-RNA), kodiert [258]. Das HDV-RNP (s.o.) wird ausschließlich mit der genomischen RNA (g-RNA) gebildet. Die ag-RNA wird einzig während der Replikation im Wirtszellkern exprimiert und findet sich nicht in den zirkulierenden Viren [49]. Beide RNA-Stränge, die g-RNA und die ag-RNA besitzen eine Ribozymaktivität, welche sie zur enzymatischen Selbstspaltung befähigt [262].

1.1.4 INFektionszyklus

1.1.4.1 REPLIKATION

Nach Eintritt von HDV in den Hepatozyten (Kap. 1.1.4.3) erfolgt der Transport des HDV-RNP in den Nukleus. Maßgebend hierfür ist das *nuclear-localisation-signal* in der AS-Sequenz des S-HDAg (Abbildung 1, NLS) [52, 233]. Im Nukleus erfolgt nun die Amplifikation der HDV-RNA sowie die Transkription der mRNA [88, 98]. Auch für diese Prozesse ist die Existenz von S-HDAg essentiell [82, 91, 124]. Die Amplifikation der HDV-RNA erfolgt nach bisherigen Erkenntnissen wahrscheinlich als sog. „Rolling-Circle-Mechanismus“, ähnlich wie bei Pflanzenviroiden [26, 73]. Die RNA wird hierbei jeweils kontinuierlich in Form von linearen Multimeren synthetisiert, welche im Verlauf durch die Auto-Ribozymaktivität in Monomere geschnitten und schließlich zur zirkulären Form ligiert werden [115]. Die g-RNA dient als Matrize zur Synthese der ag-RNA, aus welcher im Folgenden wiederum g-RNA amplifiziert wird [125, 241]. Auch bei der Transkription der mRNA zur Expression von HDAg dient die g-RNA als Matrize [88, 98]. Da HDAg jedoch keine Polymeraseaktivität besitzt, muss HDV zur Replikation und zur mRNA-Transkription Wirtszellpolymerasen rekrutieren. Anders als bei HBV erfolgt dies ganz ohne DNA-Zwischenprodukte oder chromosomale Integrationsvorgänge als RNA-abhängige RNA-Replikation [151, 241]. Interessanterweise ist HDV imstande, für diese Zwecke die DNA-abhängige RNA-Polymerase II der Wirtszelle zu nutzen. Derzeit wird davon ausgegangen, dass die doppelsträngige Formation der HDV-RNA, bedingt durch die hohe Anzahl komplementärer Basenpaarungen, diesen Vorgang begünstigt. Diese Struktur könnte die doppelsträngige DNA imitieren, welche als Template für die Bindung der RNA-Polymerase II dient [42]. Allerdings belegen Studien, dass auch die RNA-Polymerase I und III HDV-RNA binden können. Die genaue Funktion im HDV-Infektionszyklus ist für diese beiden Polymerasen noch nicht abschließend geklärt. Während die RNA Polymerase I in die Synthese antigenomischer RNA involviert zu sein scheint, kann der RNA Polymerase III bisher keine spezifische Rolle zugeordnet werden [85, 151]. Sicher ist aber, dass S-HDAg für die Replikation und mRNA-Transkription benötigt wird [91, 124]. S-HDAg ist imstande, direkt mit der RNA-Polymerase II zu interagieren und an diese zu binden (Abbildung 1, RNAP II Bindungsstelle). Dies könnte wiederum die Umlenkung der Polymerase auf die HDV-RNA begünstigen [2, 267, 268]. S-HDAg ist im frühen Stadium des HDV-Infektionszyklus in höherer Menge vorhanden als L-HDAg. Denn initial wird aus der mRNA ausschließlich S-HDAg exprimiert. Im Verlauf kommt es schließlich zu einem ADAR-1 Editing im Amber-Stopp-Codon (AUG) der ag-RNA [34]. Das Enzym ADAR-1 (*adenosine deaminase acting on RNA 1*) desaminiert ein Adenosin zu Inosin (UAG→UIG), welches im nächsten

Replikationszyklus als Guanin gelesen wird. Bei Transkription der RNA kodiert das editierte Triplet nun für die AS Tryptophan anstelle des ursprünglichen Stopp-Codons. Es resultiert schließlich die Expression des um 19 AS längeren L-HDAg [34, 144]. Der Anstieg der Konzentration an L-HDAg in der Wirtszelle wirkt inhibierend auf die RNA-Synthese [45, 82] und ist gleichzeitig essentiell für die Virusassemblierung und die Umhüllung mit den HBV-Oberflächenproteinen *small*, *medium* und *large* (S-, M- und L-) HBsAg [40, 131] (Kap. 1.1.4.2).

1.1.4.2 ASSEMBLIERUNG UND SEKRETION

Nach der Replikation der HDV-RNA und der Expression des HDAg im Nukleus (Kap. 1.1.4.1) erfolgt nun der Zusammenbau dieser Elemente zum Ribonukleoprotein (HDV-RNP). Das RNP setzt sich aus der g-RNA sowie aus S- und L-HDAg-Multimeren zusammen. Die Multimerisierung des HDAg erfolgt auf Basis der Coiled-Coil-Oligomerisierungsdomäne in der AS-Sequenz (Abbildung 1) zunächst zu Dimeren und schließlich zu Oktameren [139, 279]. Diese Oktamere sind imstande, die quasi-doppelsträngige HDV-RNA zu binden, ähnlich wie Histon-Oktamere DNA binden [86]. Dieses Histon-Mimikry könnte ebenfalls zur Rekrutierung der RNA-Polymerase II an die HDV-RNA beitragen (siehe Kap. 1.1.4.1) [2]. Die RNA-Bindungsdomäne im HDAg wird inzwischen mehreren Stellen in der AS-Sequenz, insbesondere aber der N-terminalen Region zugewiesen (Abbildung 1, Kryptische RBD) [180, 246]. Die frühere Auffassung, dass dafür allein zwei Arginin-reiche Regionen in der Mitte der AS-Sequenz verantwortlich sind (Abbildung 1, ARM, Haupt-RBD), wurde inzwischen widerlegt [56, 133]. Durch das *nuclear export signal* in der AS-Sequenz des L-HDAg (Abbildung 1, NES) wird das HDV-RNP vom Nukleus ins Zytoplasma transportiert [131, 146]. Bis zu diesem Punkt im Infektionszyklus ist HDV völlig unabhängig von seinem Helfervirus HBV [80]. Das HDV-RNP allein ist nun jedoch weder imstande, die Wirtszelle zu verlassen noch neue Hepatozyten zu infizieren. Hierzu benötigt HDV die Oberflächenproteine von HBV, um eine Hülle um das RNP auszubilden [20, 124]. Jene HBV-Oberflächenproteine werden ihrer Größe nach in S-, M- und L- HBsAg unterschieden. Sie sind in ihrer c-terminalen Region identisch und unterscheiden sich nur in ihrer n-terminalen Region. Von großer Bedeutung für die Infektion neuer Wirtszellen ist insbesondere das L-HBs, da es in seiner N-terminalen Region die Bindungsdomäne für den Leberzellrezeptor NTCP besitzt [231, 269]. Es konnte zwar gezeigt werden, dass für Assemblierung und Sekretion der HDV-Partikel auch allein das S-HBs ausreichend ist, aber die sezernierten Partikel aufgrund des fehlenden L-HBs nicht infektiös sind [230]. Die Interaktion zwischen HDV-RNP und HBs wird durch das CXXQ-Motiv, ein Isoprenylierungssignal in der AS-Sequenz des L-HDAg, gewährleistet (Abbildung 1, IS) [107]. Im Infektionszyklus

von HBV werden neben infektiösen Viren, welche HBV-Genom und Nukleokapsid enthalten, auch in überschießendem Maße „leere“, nicht-infektiöse sog. subvirale Partikel (SVP) gebildet und freigesetzt. Sie bestehen lediglich aus den drei o.g. HBV-Hüllproteinen [77, 78] und besitzen eine immunmodulatorische Wirkung (Antigenämie), wodurch die Persistenz einer HBV-Infektion im Wirtsorganismus erleichtert wird [123, 166, 243]. Es wird angenommen, dass HDV die Überexpression der SVP für seinen Infektionszyklus ausnutzt, um seine Virushülle zu bilden. Die Menge der sezernierten HDV-Partikel während einer akuten Infektion entspricht nämlich am ehesten der Menge sezernierter SVP, anstatt derer sezernierter HBV-Partikel [232, 236]. Aus diesem Grund erscheint es auch naheliegend, dass HDV-Partikel genau wie SVP, aber anders als infektiöse HBV-Partikel, durch das trans-Golgi-Netzwerk ins Blut sezerniert werden [101, 174, 250]. In experimentellen Versuchen konnte gezeigt werden, dass auch andere Viren als HBV als Helferviren für HDV fungieren können. So konnte HDV auch mittels Oberflächenproteinen von u.a. Vesikuloviren, Arenaviren, Metapneumoviren und Flaviviridae (z.B. HCV) umhüllt werden. Die ko-infizierten Zellen sezernierten die rekombinanten HDV-Partikel und diese waren wiederum imstande, weitere Zellen zu infizieren [175]. Im Hinblick auf die weltweite Verbreitung und epidemiologische Relevanz von Hepatitis C ist es von besonderem Interesse, ob HDV-RNA durch eine Umhüllung von HCV-Oberflächenproteinen auch ohne HBV-Infektion übertragen werden könnte. In einer 2020 durchgeführten klinischen Studie von Pflüger et al. mit 323 HCV-RNA-positiven Patienten konnten keine HDV-Marker bei gleichzeitiger HBcAg-Negativität nachgewiesen werden. Die Autoren stufen das Risiko replikativer HDV-Infektionen bei HCV-Monoinfizierten daher als gering ein [179]. Zwar konnte in einer anderen Studie mit 160 HCV-RNA-positiven und HBV-negativen Patienten bei zwei Patienten Anti-HDAg-Antikörper und bei einem Patienten niedrig zirkulierende HDV-RNA nachgewiesen werden. Doch eine okkulte HBV-Infektion kann in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden, da keine Lebergewebeproben vorlagen [46]. Nichtsdestotrotz, falls HCV *in vivo* tatsächlich eine Helferfunktion aufweisen sollte, so scheint diese zumindest nicht von großer Wirksamkeit bzw. Potenz zu sein [159].

1.1.4.3 ZELLBINDUNG UND -EINTRITT

Nachdem die neu-gebildeten HDV-Partikel die Wirtszelle verlassen haben (Kap. 1.1.4.2) besteht der nächste Schritt im HDV-Infektionszyklus darin, weitere Hepatozyten zu infizieren. Da HDV eine Hülle aus HBsAg besitzt, nutzt es für die Bindung und den Eintritt in die Wirtszelle dieselben Mechanismen wie HBV [20, 160]. Zunächst erfolgt dazu die unspezifische Bindung des Virus an Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG), Polysaccharidketten der extrazellulären Matrix [126, 135, 214]. Der eigentliche Eintritt in

den Hepatozyten wird dann wiederum durch die hochaffine Interaktion mit dem Natrium-Taurochlorat-kotransportierenden Polypeptid (NTCP) ermöglicht [269]. Dieses Transportprotein befindet sich an der basolateralen, den Lebersinusoiden zugewandten Seite der Hepatozyten und vermittelt die Aufnahme von Gallensäuren in das Zytosol [223, 224]. Für die Interaktion mit NTCP ist die myristoylierte N-terminale Pre-S1-Domäne im L-HBs der Virushülle verantwortlich [160, 269]. Kürzlich konnte zudem der EGF-Rezeptor (EGFR) als Kofaktor für den Zelleintritt identifiziert werden [113]. EGFR unterstützt die Endozytose von NTCP-gebundenem HBV/HDV ins Zellinnere und vermittelt somit die Aufnahme der Viren in die Endosomen der Wirtszelle [112]. Durch die Kernlokalisierungssequenz im S-HDAg (Abbildung 1, NLS) wird das HDV-RNP nun vom Zytosol in den Nukleus transportiert, wo die Virusreplikation initiiert wird (Kap. 1.1.4.1). *In vivo* infiziert HDV ausschließlich humane Hepatozyten [158, 194]. In experimentellen Versuchen wurde die Replikation von HDV jedoch auch von anderen (humanen und nicht-humanen) Zelltypen unterstützt, z.B. von menschlichen embryonalen Nierenzellen [41], Skelettmuskelzellen der Maus [181] oder Nierenzellen des Hamsters [17]. Der Hepatotropismus von HDV könnte somit womöglich allein auf NTCP als obligaten Oberflächenrezeptor für den Eintritt in die Wirtszelle zurückzuführen sein, da dieser ausschließlich auf Hepatozyten exprimiert wird [223, 270].

1.1.4.4 DIE ROLLE DES HDAg DES HDV

Das HDV-Genom kodiert nur für ein einziges Protein in zwei verschiedenen Isoformen, S- und L-HDAg (Kap. 1.1.3). Sie unterscheiden sich lediglich in 19 zusätzlichen AS im C-Terminus des L-HDAg, die aus einem RNA-Editing während der späten Phase der viralen Replikation resultieren (Kap. 1.1.4.1) [14, 144]. Beiden Isoformen ist gemein, dass sie keine Polymeraseaktivität besitzen, weshalb die Wirtszellpolymerase zur Replikation verwendet wird [42]. Dennoch erfüllt HDAg wichtige Funktionen im HDV-Infektionszyklus. Im frühen Stadium der viralen Replikation ist insbesondere die Anwesenheit von S-HDAg vonnöten. Mittels seines Kernlokalisierungssignals (Abbildung 1, NLS) vermittelt es nach dem Eintritt des Virus in die Wirtszelle den Transport des HDV-RNP in den Nukleus, wo die Replikation stattfindet. Trotz fehlender Polymeraseaktivität ist S-HDAg unabdingbar für die Amplifikation der HDV-RNA. So ist es imstande, direkt an die RNA-Polymerase II der Wirtszelle zu binden und ermöglicht somit auch die Bindung von Chromatin-Remodelling-Komplexen an die HDV-RNA [2, 33, 268]. Darüber hinaus interagiert S-HDAg mit dem zellulären Transkriptionsfaktor YY1 und kann durch seine Strukturähnlichkeit den negativen Elongationsfaktor NELF-A verdrängen, was wiederum die RNA-Synthese fördert [105, 267]. Zudem unterstützt es die Ribozymaktivität [116] und reguliert die mRNA- und ag-RNA-Spiegel [91]. Auf Basis

des RNA-Editings (Kap. 1.1.4.1) nimmt die Menge an L-HDAg erst mit fortschreitendem Verlauf der viralen Replikation zu [144, 161]. L-HDAg hemmt die RNA-Synthese [45, 82] und ist gleichzeitig obligat für die Virusassemblierung [40]. Somit ist es insbesondere im späten Stadium des HDV-Infektionszyklus essentiell. Nach aktuellen Erkenntnissen sind die Strukturmerkmale der RNA rund um die Editierstelle dafür verantwortlich, dass ADAR-1 nur erschwert binden kann [99, 211]. Dementsprechend kann ein suffizientes Editing inklusive Akkumulation von L-HDAg erst im fortschreitenden Verlauf der Replikation erfolgen. Eine zu frühe Inhibierung der RNA-Amplifikation durch hohe L-HDAg-Spiegel wird dadurch verhindert. L-HDAg vermittelt mittels eines Kernexportsignals in der AS-Sequenz (Abbildung 1, NES) den Export des HDV-RNP aus dem Nucleus in das Zytoplasma [131, 146]. Der Kernexport wird nachweislich unterstützt durch die Interaktion mit verschiedenen zellulären Proteinen, u.a. NES1 [102, 249], TAP und Aly [103]. Im Zytoplasma erfolgt die Umhüllung des RNP mit den HBV-Oberflächenproteinen, die für den Austritt aus der Wirtszelle und die Infektion neuer Hepatozyten essentiell ist (Kap. 1.1.4.2) [80]. Entscheidend für die Interaktion zwischen HDV-RNP und HBsAg ist zum einen die Prenylierungsstelle (CXXQ) im c-Terminus des L-HDAg (Abbildung 1, IS) [81, 132]. Die dort gebundene Farnesylgruppe ist wahrscheinlich dafür verantwortlich, das HDV-RNP am Endoplasmatischen Retikulum (ER) zu verankern [165], wo auch die SVP exprimiert werden [39]. Durch die räumliche Nähe wird die Umhüllung des HDV-RNP mit HBsAg ermöglicht. Zum anderen bedeutsam ist nachfolgend die direkte Interaktion einer Prolin-reichen Domäne im c-Terminus des L-HDAg mit einer Tryptophan-reichen Domäne im c-Terminus des HBsAg (sog. HDV-Matrixdomäne) [122, 165].

Generell sind die spezifischen Funktionen des HDAg abhängig von der Existenz posttranslationaler Modifikationen. Wie bereits erwähnt, ist das CXXQ-Motiv im c-Terminus des L-HDAg ein Prenylierungssignal und dient als Substrat für eine Farnesyltransferase, welche eine Farnesylgruppe an das Cystein anhängt [81]. Nur durch diese Farnesylierung ist die Virusassemblierung wie oben beschrieben möglich [21]. Von großer Relevanz ist auch die Phosphorylierung von Serin 177 im S-HDAg, wodurch die Interaktion mit der RNA-Polymerase II und somit die RNA-Amplifikation gewährleistet wird [97]. Zahlreiche weitere posttranslationale Modifikationen konnten identifiziert werden, die vermutlich ebenfalls Einfluss auf RNA-Replikation, RNP-Transport und Virusassemblierung haben. Hierzu gehören u.a. die Sumoylierung verschiedener Lysine [239], die Methylierung an Arginin 13 [138] oder die Acetylierung an Lysin 72 [153] (Abbildung 1).

1.2 DIE HEPATITIS-D-VIRUS-INFektion

1.2.1 EPIDEMIOLOGIE

Seit der Entdeckung von HDV im Jahr 1977 [190] konnten durch phylogenetische Analysen immer mehr Genotypen (Gt) identifiziert werden, zuletzt 2006 von Le Gal et al. [129]. Mittlerweile werden 8 verschiedene Gt unterschieden, die eine unterschiedliche geographische Verteilung aufweisen [127]. Gt 1 ist am häufigsten und tritt weltweit auf, findet sich jedoch überproportional häufig in Nordamerika, Europa, im mittleren Osten und in Australien [127, 186, 216]. In Russland und Asien ist vor allem Gt 2 weit verbreitet [109, 111, 134, 265]. Gt 3 ist dominant in Südamerika [36, 155, 170], Gt 4 in Japan und Taiwan [205, 265]. Die Gt 5-8 sind vorherrschend in Afrika [127, 129, 186]. Die verschiedenen Gt unterscheiden sich untereinander nicht nur durch ihre geographische Verteilung, sondern auch durch ihre Genomvariabilität und teilweise sogar durch ihre Krankheitsausprägung. Innerhalb eines Gt können bis zu 17% Divergenz in der Nukleotidsequenz bestehen, zwischen verschiedenen Gt sogar bis zu 35% (z.B. zwischen Gt 1 und Gt 3) [36, 127]. Bezüglich des klinischen Verlaufes scheinen Gt 2 und Gt 4 (ehem. Gt IIb) eher mit einer mildereren Krankheitsausprägung assoziiert zu sein [134, 229, 263]. Gt 3 hingegen scheint häufiger schwere Infektionen mit fulminanter Hepatitis hervorzurufen [13, 36]. Der häufige und weit verbreitete Gt 1 verursacht ein gemischtes Bild mit milder oder schwerer Erkrankung und geht im fortgeschrittenen Stadium häufig in Leberzirrhose oder -karzinom über [229, 266]. Bislang fehlen systematische Daten über den klinischen Verlauf einer HDV-Infektion mit den selteneren afrikanischen Gt 5-8. Eine Ansteckung mit HDV kann über die gleichen Mechanismen wie eine HBV-Infektion erfolgen. Dies schließt vor allem die parenterale Übertragung ein (z.B. sexuell, durch kontaminierte Nadeln oder durch infizierte Blutprodukte) [226]. Eine vertikale Übertragung von Mutter zu Kind während der Geburt wird hingegen eher seltener beschrieben [193, 215]. Zu den Risikogruppen gehören dementsprechend intravenös Drogenkonsumierende, HCV- oder HIV-positive Menschen (am ehesten aufgrund ähnlicher Risikofaktoren), Sexarbeiter, Empfänger einer Hämodialyse sowie MSM (*men who have sex with men*) [48, 226]. Die weltweite Prävalenz von HDV-Infektionen kann nur vage geschätzt werden, da insbesondere in Hochprävalenzgebieten ein flächendeckendes Screening auf HDV fehlt [128]. Dementsprechend gehen aktuelle Schätzungen über die Anzahl an HDV-Trägern stark auseinander [54]. Während Stockdale et al. weltweit von ca. 12 Mio. Infizierten ausgehen [226], schlagen andere Autoren zwei- [253] oder sogar bis zu fünffach höhere Zahlen vor [150]. Zu den Hochprävalenzgebieten gehören hierbei v.a. die Mongolai, Russland, das Amazonasgebiet, China und Nigeria [150, 226]. In Südafrika und Thailand hingegen liegt

die HDV-Prävalenz unter HBsAg-positiven Individuen bei weniger als 2% [226]. In einkommensstarken Staaten konnte die Anzahl HBsAg-positiver Patienten seit den 1990er Jahren durch die flächendeckende Anwendung der HBV-Impfung stark limitiert werden. Dies führte demnach auch zu einem Rückgang der HDV-Prävalenz [193]. Zu den größten Risikofaktoren in diesen Ländern gehören derzeit v.a. die Migration aus Hochprävalenzgebieten und der intravenöse Drogenkonsum [55, 92]. In einkommensschwachen Regionen sind dies dahingegen v.a. die mangelnde Hygiene im Gesundheitswesen, die sexuelle Übertragung, die Übertragung innerhalb eines Haushalts sowie kulturelle Praktiken, wie z.B. Tätowierungen oder Beschneidungen [16, 58].

1.2.2 KRANKHEITSVERLAUF DER HDV-INFEKTION

HDV ist während seines Infektionszyklus auf die Helferfunktion von HBV angewiesen. [80, 232, 269]. Zudem ist eine HDV-Infektion ausschließlich auf die Leber beschränkt, da HDV wie HBV das leberspezifische NTCP als Eintrittsrezeptor in die Wirtszelle nutzen [270]. Eine HDV-Infektion kann entweder als Koinfektion (simultane Infektion mit HBV und HDV) oder als Superinfektion (HDV-Infektion bei bereits vorliegender chronischer HBV-Infektion) erfolgen [157, 220]. Eine Koinfektion verläuft in über 90% der Fälle als selbstlimitierende akute Hepatitis [32]. Die Symptomatik reicht von grippeähnlichen Beschwerden, Abgeschlagenheit, Übelkeit und Erbrechen bis zum Ikterus, entfärbten Stühlen und braun gefärbtem Urin sowie einem Anstieg der Leberenzyme (AST, ALT) und des Bilirubins [66]. Die HDV/HBV-Koinfektion ist klinisch nicht von einer akuten HBV-Monoinfektion zu unterscheiden, birgt aber ein erhöhtes Risiko für akutes Leberversagen mit Notwendigkeit einer Lebertransplantation [172, 188, 220]. Häufig wird im Rahmen einer Koinfektion ein biphasischer Anstieg der Serumlevel der Leberenzyme beobachtet, der wahrscheinlich auf die zeitliche Abfolge der viralen Replikationszyklen zurückzuführen ist (anfängliche HBV-Vermehrung mit darauffolgender HDV-Ausbreitung) [172, 188]. Das Risiko einer Chronifizierung liegt bei ca. 2-5 % [192, 199]. Eine Superinfektion verursacht initial ebenfalls eine akute Symptomatik mit schwerer Hepatitis, die bei lückenhafter Diagnostik auch als Exazerbation einer bestehenden HBV-Infektion oder (bei unbekanntem HBsAg-Status) auch als HBV-Neuinfektion verkannt werden kann [68, 187]. Das Risiko für akutes Leberversagen ist gegenüber einer HBV-Monoinfektion erhöht [209, 220]. Eine Ausheilung ist selten, in ca. 90 % der Fälle geht die Superinfektion in eine chronische Hepatitis D (CHD) über [66]. CHD ist die schwerste und am schnellsten fortschreitende Form aller chronischen viralen Hepatitiden [232]. Klinisch kann eine CHD entweder symptomfrei verlaufen oder mit einer unspezifischen Symptomatik wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit und

Gewichtsabnahme einhergehen [66]. Bei manifester Leberzirrhose kann es zudem zu typischen assoziierten Symptomen wie Aszites, portaler Hypertension oder hepatischer Enzephalopathie kommen [66]. CHD-Patienten entwickeln im Vergleich zu HBV-Monoinfizierten schneller eine Leberzirrhose und haben ein höheres Risiko für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC), zudem ist die Sterblichkeit erhöht [7, 18, 87, 118, 199]. 70 % aller Patienten mit CHD entwickeln innerhalb von 5-10 Jahren eine Leberzirrhose, 15 % sogar innerhalb von 1-2 Jahren [66, 197, 210]. Das Risiko für eine hepatische Dekompensation bei HDV-bedingter Zirrhose ist zweifach höher als bei HBV-bedingter Zirrhose [70]. Krankheitsverlauf und -schwere werden u.a. beeinflusst durch die HDV-RNA- & HBV-DNA-Level sowie durch den HDV Gt und den HBV Gt. Eine Persistenz der HDV-Replikation ist mit einem schlechteren Outcome, genauer mit einer höheren Rate an Leberversagen, Lebertransplantation und Tod assoziiert [169, 200]. Hohe HDV-RNA-Level dienen daher eher als negativer Prognosefaktor [118, 163]. Eine HBV Virämie im Rahmen einer HDV/HBV-Koinfektion geht ebenfalls mit einem schwereren Leberschaden einher [141, 229], obwohl die HBV-Replikation in den meisten Fällen zugunsten der HDV-Replikation supprimiert wird [8, 145, 264]. Neben dem HDV Gt (Kap. 1.2) hat auch der HBV Gt einen Einfluss auf die Krankheitsausprägung. So ist HBV Gt C mit einem schlechteren Outcome und geringeren Remissionsraten einer HDV/HBV-Koinfektion assoziiert als beispielsweise HBV Gt B [229]. Zudem konnte beobachtet werden, dass HBV/HDV-koinfizierte Individuen, die mit HBV Gt A koinfiziert sind, niedrigere HDV-RNA-Level aufweisen als jene die mit HBV Gt D oder F koinfiziert sind [121].

1.2.3 DIAGNOSTIK DER HDV-INFEKTION

Die *European Association for the Study of the Liver* (EASL) empfiehlt in ihren Richtlinien aus dem Jahr 2023, dass jeder HBsAg-positive Patient mindestens einmal einem Screening auf Anti-HDV-Antikörper (anti-HDAg) unterzogen werden soll [62]. Zudem soll das Screening bei jedem klinischen Verdacht auf eine HDV-Infektion wiederholt werden (z.B. bei einem Anstieg der Leberenzyme oder akuter hepatischer Dekompensation) [62]. Anders als die EASL empfiehlt die AASLD (*American Association for the Study of Liver Diseases*) aus dem Jahr 2018 kein generelles sondern ein ausschließlich risiko-assoziiertes Screening auf anti-HDAg [237]. Studien belegen, dass durch ein rein risiko-assoziiertes Screening zahlreiche HDV-Infektionen unentdeckt bleiben [156, 173], wohingegen wiederum ein sog. *reflex testing* zu einem hohen Anstieg der HDV-Diagnoseraten führt [168]. Nichtsdestotrotz, insbesondere in Niedrigprävalenzgebieten bedarf es weiterer Studien über die Kosteneffizienz eines solchen *reflex testing* [62, 189]. Da der Nachweis von anti-HDAg nur die Exposition des Organismus gegenüber HDV

belegt und auch bei ausgeheilter Infektion persistiert, ist zur Bestätigung einer floriden Infektion der Nachweis von HDV-RNA vonnöten [30]. Die EASL Richtlinie empfiehlt daher, jedes anti-HDAg positive Individuum mittels einer standardisierten Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) auf HDV-RNA zu testen [62, 218]. Die Herausforderung für die derzeit verfügbaren PCR-Assays besteht insbesondere in der hohen Rate komplementärer Basenpaarungen innerhalb des HDV-Genoms und der hohen Sequenzvariabilität. Diese Faktoren mögen höchstwahrscheinlich auch verantwortlich dafür sein, dass zwischen den verschiedenen verfügbaren RT-PCR-Assays eine hohe Variabilität in der diagnostischen Sensitivität besteht [53, 62, 128]. Hinzu kommt, dass insbesondere die Viruslast der in Europa, Amerika und Asien selten vorkommenden afrikanischen Gt 5-8 von den meisten HDV-RNA-Assays unterschätzt wird [29, 62]. Die Messung des Serum HDAg eignet sich nicht zum Nachweis einer aktiven HDV-Infektion [62]. Es bildet Immunkomplexe und kann daher weder in der späten Phase der akuten Infektion noch bei chronischen Infektionen nachgewiesen werden [30]. Um eine Koinfektion von einer Superinfektion zu unterscheiden, sollten zusätzliche diagnostische Parameter hinzugezogen werden. Eine HBV/HDV-Koinfektion ist gekennzeichnet durch den Nachweis von anti-HBc IgM und anti-HD IgM. Geringe oder fehlende Titer von anti-HBc IgM weisen hingegen eher auf eine Superinfektion hin [62, 67]. Aufgrund der Assoziation mit einem schlechteren klinischen Outcome sollten bei CHD auch regelmäßige Kontrollen der HDV-RNA- und HBV-DNA-Spiegel sowie anti-HBe Messungen durchgeführt werden [62, 169, 219]. Weiterhin sollten die AST, ALT und GGT Spiegel überwacht sowie Kofaktoren wie Alkoholabusus, Übergewicht, Diabetes und virale Koinfektionen (HCV, HIV) evaluiert werden [62]. Die ALT- & AST-Level können aufgrund der weitgehenden Leberzelldestruktion bei fortgeschrittener CHD wieder rückläufig sein und markieren häufig den Übergang in eine Leberzirrhose [87, 201]. Leberbiopsien sollten nur in Ausnahmefällen durchgeführt werden, sofern weniger invasive Untersuchungsmethoden nicht aussagekräftig genug sind und daraus eine therapeutische Konsequenz abgeleitet werden kann [62]. Aufgrund schlechter Datenlage und fehlenden spezifischen Cut-off-Werten werden nicht-invasive Tests zur Quantifizierung von Lebererkrankungen (z.B. transiente Elastographie oder Fibrose-Scores) von der EASL derzeit nur eingeschränkt empfohlen [62]. Zur Sekundärprophylaxe des HCC ist zudem eine halbjährliche Oberbauchsonographie bei allen Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose oder -fibrose empfohlen [62].

1.2.4 THERAPEUTISCHE ANSÄTZE BEI CHRONISCHER HEPATITIS-D-VIRUS INFektion

Primäres Ziel aller CHD-Therapeutika ist das Vermeiden bzw. Verzögern erkrankungsassoziierter Komplikationen, wie z.B. Leberzirrhose, hepatische

Dekompensation oder HCC [208]. Insbesondere die Suppression der HDV- & HBV-Replikation sowie die Normalisierung der Leberenzym-Spiegel ist hierbei mit einem verbesserten Outcome assoziiert [169, 208, 237]. Therapeutikum der ersten Wahl ist seit mehreren Jahren pegyliertes Interferon alpha (peg-IFN-alpha) [61, 62]. Es ist ein antiviral wirkendes Medikament, das auch bei anderen Viruserkrankungen (HBV-Monoinfektion, HCV-Infektion) angewendet wird. Der genaue antivirale Wirkmechanismus von peg-IFN-alpha ist noch nicht vollständig verstanden. Einige Autoren vermuten einen inhibitorischen Effekt auf den Eintritt in die Wirtszelle [276] oder eine direkte Suppression der Virusreplikation [108]. Eine neuere Studie konnte derweil zeigen, dass unter peg-IFN-alpha die durch Zellteilung vermittelte HDV-Virusausbreitung vermindert wurde [277]. Zudem ist die Frage nach der immunmodulatorischen Wirkung von Interferonen im Rahmen von HDV-Infektionen weiterhin Gegenstand aktueller Forschung [143]. Klinisch kommt es unter peg-IFN-alpha zu einer Suppression der HDV- und HBV-Infektionsmarker (HDV-RNA & HBsAg), obwohl nur ca. 30% aller behandelten Patienten im 24 Wochen *follow-up* auf die Therapie ansprechen [1]. Zudem sind späte Rückfälle bei mehr als 50% der Responder-Patienten typisch [93, 261]. Weiterhin fehlen valide Daten über die optimale Dauer der Therapie; derzeit wird empfohlen, sie bei guter Verträglichkeit über 48 Wochen fortzusetzen [62]. Therapielimitierend sind hierbei vor allem die Nebenwirkungen (grippeartige Symptome, Depressionen, Zytopenien) [63]. Weiterhin soll peg-IFN-alpha nicht bei dekompensierter Leberzirrhose verabreicht werden [61, 62].

Seit kurzem wurde in der EU ein neues Medikament zur Therapie der CHD mit kompensierter Leberzirrhose zugelassen: Bulevirtide (Hepcludex, Myrcludex-B) [119]. Es handelt sich um ein myristoyliertes Polypeptid aus den aminoterminalen 47 AS der L-HBs-Sequenz und fungiert als Zelleintritts-Inhibitor, welcher die Bindung von HDV an NTCP verhindert [160, 177, 244]. Die Bindung an NTCP wird durch die PräS1-Domäne des L-HBs in der Virushülle vermittelt und ist obligat, damit HDV (und HBV) in die Wirtszelle eintreten können [160, 269, 270]. Das Medikament ist in der EU mittlerweile zugelassen [252]. In Monotherapie führte Bulevirtide zu einer signifikanten Reduktion der HDV-RNA- und ALT-Level. Nichtsdestotrotz, bei keinem der Patienten kam es zu einer Reduktion der HBsAg-Level. Eine HDV-RNA-Negativität konnte bei den wenigsten erreicht werden und zudem kam es nach Beendigung der Therapie häufig zu einem Rebound der HDV-RNA-Level [19, 252, 254]. Die Nebenwirkungen fallen nach den bisherigen Ergebnissen eher mild aus. Sie reichen von grippeartigen Symptomen (Kopfschmerzen, Müdigkeit, Athralgien), Juckreiz und Oberbauchschmerzen über Hautreaktionen an der Einstichstelle, Eosinophilien und milde Anstiege der

Gallensäuren. Schwerwiegende unerwünschte Wirkungen blieben aus [19, 252, 254, 255]. Bulevirtide wird auch in Kombination mit peg-IFN-alpha getestet und zeigt hier vielversprechende Ergebnisse. Peg-IFN-alpha ist anders als Bulevirtide imstande, auch die durch Zellteilung vermittelte HDV-Ausbreitung zu unterbinden [277]. Im Gegensatz zur Bulevirtide-Monotherapie konnte eine HDV-RNA-Negativität bei 50% aller Patienten nach 24 Wochen Therapie erreicht werden, außerdem kam es bei ca. 40% zu einer Reduktion der HBsAg-Level [204, 255]. Die EASL empfiehlt aktuell jeden Patienten mit CHD und kompensierter Leberzirrhose für eine Therapie mit Bulevirtide in Betracht zu ziehen, auch wenn aktuell Daten zur langfristigen Wirksamkeit und Sicherheit sowie zur optimalen Dauer der Therapie fehlen [62]. Bisher ist eine Therapie mit Bulevirtide allerdings noch deutlich teurer als mit peg-IFN-alpha, was insbesondere in einkommensschwachen Regionen eine bedeutende Rolle in der Therapieentscheidung spielen dürfte [164].

Nukleos(t)idanaloga (NAs), wie Famciclovir, Lamivudine, Clevudine, Entecavir, Adefovir und Tenofovir, wurden im Hinblick auf die Repression der HDV-Infektion als unwirksam befunden. Sie sollen nach EASL Richtlinie nur bei Patienten mit dekomensierter Leberzirrhose oder zur Unterdrückung einer floriden HBV-Replikation verabreicht werden [62, 117, 162, 256, 272].

Neben den oben genannten etablierten bzw. bereits zugelassenen Therapeutika befinden sich derzeit einige weitere in Studien. Lonafarnib, ein Farnesyltransferase-Inhibitor, soll die Farnesylierung des L-HDAg hemmen, welche für die Virusassemblierung zwingend notwendig ist [21, 22]. Die Farnesylgruppe vermittelt die Interaktion zwischen dem HDV-RNP und HBsAg und gewährleistet somit die Umhüllung des Virus, ohne welche weder der Austritt aus der Wirtszelle noch die Infektion neuer Zellen möglich ist (Kap. 1.1.4.2, 1.1.4.3 und 1.1.4.4) [165]. Lonafarnib befindet sich aktuell in der Phase III Studie und zeigt insbesondere in Kombination mit peg-IFN-alpha vielversprechende Ergebnisse. Es supprimiert dosisabhängig die HDV-RNA-Spiegel, allerdings sind Daten über die anhaltende antivirale Wirkung nach Beendigung der Therapie noch ausstehend [257]. Da insbesondere in höheren Dosierungen die Nebenwirkungsrate zunahm (vorwiegend gastrointestinale Symptome wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfälle), zeigte sich die Kombination mit Ritonavir günstig. Ritonavir inhibiert das Enzym Cytochrom P450, welches für den Abbau von Lonafarnib verantwortlich ist. Durch die Kombination mit Ritonavir können somit geringere Dosen Lonafarnib bei gleichbleibender antiviraler Wirksamkeit und geringerer Nebenwirkungsrate eingesetzt werden [273, 274]. Ein weiteres CHD-Medikament, welches sich aktuell in der Phase III Studie befindet, ist peg-IFN-lambda. Wirkweise und

Effektivität sind ähnlich derer von peg-IFN-alpha, jedoch ist es mit einer geringeren Nebenwirkungsrate und somit höherer Patientencompliance vergesellschaftet [62, 65, 164]. Grund für die geringere Nebenwirkungsrate ist, dass die Wirkung von peg-IFN-lambda vorwiegend auf Zellen epithelialen Ursprungs beschränkt ist. Dieser Zelltyp wiederum findet sich nur in bestimmten Organen wie Haut, Lunge, Leber oder Darm [221]. Peg-IFN-lambda wird derzeit auch in Kombination mit Lonafarnib getestet [94]. Ähnlich wie Interferone zeigen auch Nukleinsäurepolymere wie REP 2139 vielfältige antivirale Wirkungen. Diese umfassen u.a. die Inhibition des viralen Zelleintritts und der viralen Replikation [89, 130, 242]. Speziell bezogen auf HBV fördert REP 2139 den proteasomalen und lysosomalen Abbau von HBsAg und führt somit klinisch zu einer Suppression der Serum-HBsAg-Spiegel [24]. HBsAg ist auch für HDV essentiell um die Virushülle auszubilden, ohne welche weder der Austritt aus der Zelle noch die Infektion neuer Zellen möglich ist (Kap. 1.1.4.2 und 1.1.4.3) [20, 124, 160]. Die Wirkung von REP 2139 auf HDV wurde erst in einer einzigen Studie an 12 Patienten untersucht. Die Ergebnisse sind bislang vielversprechend. Bei 75% der Probanden kam es am Ende der Therapie zur HDV-RNA-Negativität und bei 64% konnte dieser Status auch 3,5 Jahre nach Beendigung der Therapie erhalten werden. Die Nebenwirkungen zeigten sich vorwiegend in Zytopenien [11, 12]. Nun müssen weitere Studien zur Sicherheit des Medikaments und zur Bestätigung der Ergebnisse folgen.

Ultima ratio bei Patienten mit fortgeschrittener bzw. dekompensierter Lebererkrankung ist die Lebertransplantation. Lebertransplantationen im Zusammenhang mit CHD haben jene im Zusammenhang mit CHB in den letzten Jahren weit überschritten [3, 62]. Nichtsdestotrotz kommt es bei über 70% der transplantierten Patienten zu einem intrahepatischen Wiederauftreten der HDV-Infektion [62, 142, 167, 278]. Sofern der Nachweis von HDsAg im Transplantat ohne begleitende floride HBV-Replikation erfolgt, ist in der Regel nur mit einer leichten Leberschädigung zu rechnen. Prognoseverschlechternd ist allerdings das simultane Auftreten von HDV- und HBV-Infektionsmarkern [57, 62]. Um einer HBV-Virämie nach Lebertransplantation entgegenzuwirken und somit eine Degeneration des Transplantats zu verhindern, empfiehlt die EASL die Gabe von HBV-Immunglobulinen (HBIG) in Kombination mit Nukleos(t)idanaloga (NA) [62]. Dieses Vorgehen verbesserte das Outcome von CHD-Patienten nach Lebertransplantation [6, 60, 207].

1.2.5 PRÄVENTION DER HDV-INFEKTION

Die effektivste Methode, eine HDV-Infektion zu vermeiden ist, eine HBV-Infektion zu vermeiden. Dass eine HDV-Infektion nicht ohne HBV-Infektion stattfinden kann, wurde an anderer Stelle bereits ausführlich beschrieben (Kap. 1.1.4 und 1.2.2). Den sichersten

Schutz vor HBV (und somit auch vor HDV) bietet die Impfung. Epidemiologische Daten belegen eindrücklich, dass in Ländern mit flächendeckenden Impfprogrammen die Inzidenzen insbesondere in der jüngeren Generation stark rückläufig sind. So lag in Italien 1983 die HDV-Prävalenz unter den HBsAg-Trägern noch bei 24 %. Mit Einführung des Impfprogramms in den 1990er Jahren sank diese Rate auf 11,9 % im Jahr 2014 und auf 6,4 % im Jahr 2019. Dabei sind nur 3 % aller HDV-Infizierten unter 30 Jahren [38, 227, 228]. Selbst in Risikogruppen wie IVDU konnte ein Rückgang der HDV-Infektionen verzeichnet werden, wie eine Studie aus Spanien belegt [5]. Auch in Taiwan [106], der Türkei [238] und dem Iran [184, 213] sind die HDV-Inzidenzen nach Einführung der Impfung zurückgegangen. Im Gegensatz dazu haben in Afrika, einem HDV-/HBV-Endemiegebiet, bis dato nur wenige Länder eine HBV-Geburtsimpfung eingeführt [28]. Nach einer Metaanalyse von Stockdale et al. aus dem Jahr 2017 liegt die gepoolte HDV-Seroprävalenz in der Allgemeinbevölkerung bei 25,64 % in Zentralafrika bzw. bei 7,33 % in Westafrika [225]. Alle Versuche eine HDV-Impfung zu entwickeln, um HBV-Infizierte vor einer Superinfektion mit HDV zu schützen, blieben bislang erfolglos [198]. Somit bleibt die Reduktion von HBsAg-Trägern mittels HBV-Impfung neben der Verbesserung von Hygienestandards und Aufklärungskampagnen derzeit der wichtigste Präventionsmechanismus einer HDV-Infektion.

1.3 ZIEL DER ARBEIT

Ziel dieser Doktorarbeit ist es, funktionsfähige HDV-Expressionsvektoren verschiedener HDV-Genotypen (HDV Gt) zu erzeugen, da auch heute noch die Mehrheit der *in vitro* Studien mit einem über 30 Jahre alten cDNA-Klon des HDV Gt 1 durchgeführt werden (pSVL(D3), [124]). Dies steht jedoch im Kontrast zu der Anzahl an HDV Gt und deren weltweiter Verbreitung. Selbst untereinander weisen die einzelnen Gt noch eine sehr große Genomvariabilität auf [127]. Dieser einzigartige Umstand legt nahe, dass sich die verschiedenen Gt in ihrem Replikations- und Infektionszyklus sowie in der jeweiligen Krankheitsausprägung unterscheiden könnten; letzteres konnte bereits durch verschiedene Studien belegt werden [25, 202]. Die hohe Sequenzvariabilität ist auch mitursächlich dafür, dass die Nachweissysteme für HDV vor allem für die seltenen Gt 5-8 mitunter wenig sensitiv sind und HDV-Infektionen nicht nachgewiesen werden [29, 128]. Die interindividuellen Unterschiede der HDV Gt zu verstehen und zu erforschen kann auch helfen, Therapiemöglichkeiten auszubauen und anzupassen. So könnte die Bekämpfung dieser Erkrankung vorangebracht werden, die oft sehr viel schwerwiegender verläuft als eine HBV-Monoinfektion [163, 199]. Die in dieser Arbeit hergestellten HDV-Expressionsplasmide sollen es ermöglichen, HDV-Partikel *in vitro* herzustellen und so die Forschung an diesem Virus und insbesondere auch an den

selteneren HDV Gt zu erleichtern. Hierfür wurden folgende Zielsetzungen formuliert:

1. Klonierung von HDV-Vollgenom-Expressionsplasmiden der Gt 2-8
2. Nachweis der HDAg-Expression der klonierten, unterschiedlichen HDV Gt mittels Immunfluoreszenz und Western Blot
3. Erzeugung rekombinanter, mit HBV-Oberflächenproteinen pseudotypisierten HDV Partikeln
4. Infektionsnachweis in der Zellkultur mittels Immunfluoreszenz

2 MATERIAL

2.1 GERÄTE

Tabelle 1 - Verwendete Geräte

Name	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Carl Roth, Karlsruhe
Blot-Apparatur	Bio Rad Laboratories, München
CCD Kamera Intas ChemoCam	Intas-Science-Imaging, Göttingen
CO2-Inkubator MCO19AICUV-PE	Panasonic Healthcare, Japan
Durchlichtmikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar
Elektrophorese-Netzgerät	Consort, Turnhout
G24 Environmental Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Heizblock	Eigenbau der Werkstatt des Instituts
Hin- und Her-Schüttler 3018	GFL, Burgwedel
Inkubator	Memmert, Schwabach
Nanodrop Photometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Photometer Diagnostics Pasteur LP 400	Anthos Labtec, Heerhugowaard, NL
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn
Schüttler „Vortemp 56“	Labnet International, Edison, NJ
Sterilbank	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Tischzentrifuge „Sprout“	Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL
Thermocycler	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Vortexer	IKA, Staufen
Vakuumpumpe „DIVAC 2,4L“	Leybold, Köln
Waage PM4600 Delta Range	Mettler, Gießen
Zentrifuge „5417C“	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge „Rotina 420R“	Hettich, Tuttlingen

2.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Tabelle 2 - Verwendete Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Bakterienplatten	BD Biosciences, Heidelberg
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Glasbehälter	Schott, Mainz
Pipetten	Sartorius, Göttingen Gilson, Limburg-Offheim Eppendorf, Hamburg
Pipetboy	Integra Biosciences, Biebertal
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, gestopft	Nerbe plus, Winsen/ Luhe
PVDF-Membran	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße Falcon (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Vivaspin 20	Sartorius, Göttingen
Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman Cellulose Filter Papier	Merck, Darmstadt
Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.3 KOMMERZIELLE PUFFER, LÖSUNGEN UND REAGENZIEN

Tabelle 3 - Verwendete kommerzielle Puffer, Lösungen und Reagenzien

Name	Hersteller	Katalognummer
0,5 % Trypsin-EDTA (10x)	ThermoFisher Scientific	15400054
LE-Agarose	Biozym Scientific	840004
β-Mercaptoethanol	ThermoFisher Scientific	31350010
Carbenicillin	Carl Roth	6344.1
Caspofungin	Inresa	PZN-12868910
Clarity Max Western ECL Substrate	Bio Rad Laboratories	1705060
CutSmart Buffer (10x)	New England Biolabs	B7204S
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth	A994.1
DNA-Marker (1kb)	ThermoFisher Scientific	10787018

Name	Hersteller	Katalognummer
dNTP Mix	ThermoFisher Scientific	R0191
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Phenolrot	ThermoFisher	41966-029
Doxycyclin	Sigma Aldrich	D9891
Ethanol	Carl Roth	5054.3
Ethidiumbromid	Serva	21251.01
FastDigest Green Buffer (10x)	ThermoFisher	B72
Fetales Kälberserum	PAA Laboratories	A15-101
FuGene HD	Promega	E2312
Gel-Ladepuffer (6x), blau	New England Biolabs	B7021S
GlutaMAX Supplement	ThermoFisher Scientific	35050061
HEPES Puffer	ThermoFisher	15630056
Isopropanol	Merck	67-63-0
Kollagen Typ I	Becton Dickinson	354236
Lipofectamine 2000	ThermoFisher Scientific	11668019
Natriumpyruvat	ThermoFisher Scientific	11360070
Opti-MEM (1x)	ThermoFisher	31985047
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich	30525-89-4
Penicillin-Streptomycin	ThermoFisher Scientific	15140122
Phusion HF Buffer (5x)	ThermoFisher	F518L
SOC Outgrowth Medium	New England Biolabs	B9020S
Triton X-100	ThermoFisher Scientific	28313
TRIzol Reagenz	ThermoFisher Scientific	15596026
Wasser für Molekularbiologie	AppliChem	A7398
Williams' Medium E	ThermoFisher	A12176-01

2.4 PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN

Tabelle 4 – Selbst hergestellte Puffer, Lösungen und Medien

Name	Zusammensetzung	Hersteller*
Bacto-Agarplatten	400 ml LB-Medium 7,5 g Bacto-Agar 800 µl Carbenicillin	BD Biosciences (214010) Carl Roth (6344.1)
Blocking-Lösung	TBS-T (1x) 5 % Milchpulver	
DNase Puffer	100 mM Tris-HCl 25 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂	
HGM	DMEM ohne Phenolrot 1x ITS-Mix 2 % Albumin Fraktion V endotoxinarm 2 mM L-Glutamin 10 nM Dexamethason 100 µg/ml Gentamycin 1 mM Natriumpyruvat 0,5 mg/ml Caspofungin Acetat	ThermoFisher (21063-029) ThermoFisher (41400-045) Roth (CP77.1) ThermoFisher (25030-024) Sigma-Aldrich (D4902) ThermoFisher (15750-045) ThermoFisher (11360-039) Inresa (PZN-12868910)
Infektionsmedium	HGM EGF (f.c. 200 ng/µl) DMSO (f.c. 4 %) PEG [40 %] (f.c. 8 %) Doxycyclin (f.c. 12 µg/ml) Caspofungin (f.c. 50 µg/ml)	Sigma-Aldrich (E4127) Carl Roth (A994.1) Merck (25322-68-3) Sigma-Aldrich (D9891) Inresa (PZN-12868910)
Laufpuffer (10x)	250 mM Tris 1,9 M Glycin 34,7 mM SDS dH ₂ O	Carl Roth (4855.2) Serva (20771)
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl dH ₂ O (auf 1 L auffüllen)	BD Biosciences (211713) BD Biosciences (212750)

Name	Zusammensetzung	Hersteller*
Optimized Lysis Buffer	25 % Lämmli Puffer 69 % dH ₂ O 5 % DTT 1 % Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich (38733) Sigma-Aldrich (D0632)
PBS	dH ₂ O NaCl, pH 7,4 KCl Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O KH ₂ PO ₄	
Puffer A (<i>für TRIzol-Aufreinigung</i>)	300 mM Guanidin HCl (2.8 g/100 ml) in 95 % EtOH + 2.5 % Glycerin (v/v)	
Puffer A (<i>Lysepuffer für ELISA</i>)	25 mM Tris-HCl pH 8 1 % NP40 0,1 % SDS 0,5 % Na-Desoxycholate 150 mM NaCl	Sigma-Aldrich (74385) Serva (20771) Sigma-Aldrich (6504)
Puffer B (<i>für TRIzol-Aufreinigung</i>)	100 % EtOH + 2.5 % Glycerin (v/v)	
Puffer B (<i>Benzonase-Puffer für ELISA</i>)	25 mM Tris-HCl pH 8 2,5 mM MgCl ₂ (frisch dazu: 0,025 U/μl Benzonase)	Sigma-Aldrich (E8263)
Sammelgel	58 % dH ₂ O 16 % Bis-Acrylamid 25 % Tris-HCl pH 6,8 1 % SDS 1 % APS 0,2 % TEMED	Serva (20771) Carl Roth (9178.1) Carl Roth (2367.1)
SEAP-Puffer (2X)	H ₂ O (auf 50 ml auffüllen) 2 M Diethanolamin (100 %) 1 mM MgCl x 6H ₂ O 20 mM L-Homoarginin	Sigma-Aldrich (D8885) Sigma-Aldrich (H1007)

Name	Zusammensetzung	Hersteller*
SEAP-Substrat	H ₂ O (auf 5ml auffüllen) 50 mM pNitrophenolphosphat	Sigma-Aldrich (N3129)
TAE (Tris-Acetat-EDTA)	2 M Tris-Acetat 5 mM Na ₂ EDTA pH 8,0	
TBS-T (1x)	TBS (1x) 0,1% Tween-20	Merck (817072)
TBS (10x)	200 mM Tris 1,5 M NaCl	
Transferpuffer (1x)	15 % Methanol 10 % Transferpuffer (10x) 75 % dH ₂ O	
Transferpuffer (10x)	250 mM Tris 1,9 M Glycin dH ₂ O; pH einstellen auf 8,3	
Trenngel (12%)	34 % dH ₂ O 40 % Bis-Acrylamid 25 % Tris-HCl pH 8,8 1 % SDS 1 % APS 0,1 % TEMED	Serva (20771) Carl Roth (9178.1) Carl Roth (2367.1)
Zellkulturmedium	DMEM mit Phenolrot 10 % FKS 1 % Penicillin/Streptomycin	ThermoFisher (41966-029) PAA Laboratories (A15101) ThermoFisher (15140122)

* Die in Klammern gesetzte Nummer entspricht der Katalognummer

2.5 ENZYME

Tabelle 5 - Verwendete Enzyme

Name	Hersteller	Kat.-Nr.
Benzonase Nuclease (250U/μL)	Sigma Aldrich	E8263
DNAse I, RNAse-free	ThermoFisher Scientific	EN0521
Dpn I	New England Biolabs	R0176
FastDigest Box I	ThermoFisher Scientific	FD1434
FastDigest Kpn I	ThermoFisher Scientific	FD0524

Name	Hersteller	Kat.-Nr.
FastDigest Xag I	ThermoFisher Scientific	FD1304
GoTaq HotStart Green Master Mix	Promega	M7422
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	ThermoFisher Scientific	F530L
Platinum SuperFi II PCR Master Mix	ThermoFisher Scientific	12368010
Q5 HotStart High-Fidelity 2X Master Mix	New England Biolabs	M0494
Sac II	New England Biolabs	R0157
TaqMan Fast Virus 1-Step MasterMix	ThermoFisher Scientific	4444432

2.6 KITS

Tabelle 6 - Verwendete Kits

Name	Hersteller	Kat.-Nr.
ELISA Kit „ETI-DELTAK-2“	DiaSorin	P2808
In-Fusion HD Cloning Kit	Takara Bio	638920
innuPREP Virus DNA/RNA Kit	Analytik Jena	845-KS-4800250
Monarch Plasmid Miniprep Kit	New England Biolabs	T1010
Monarch DNA Gel Extraction Kit	New England Biolabs	T1020
NucleoSpin Gel & PCR Clean-up Kit	Macherey Nagel	740609.50
Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen	12943

2.7 ANTIKÖRPER

Tabelle 7 - Verwendete Antikörper

	Immunfluoreszenz			
	Name	Hersteller/ Quelle	Kat.-Nr.	Verdünnung
Primär-AK	Anti-HDV	Prof. Dr. D. Glebe, Institut für Med. Virologie JLU- Gießen (<i>Protein-G gereinigtes Antiserum eines HBV/HDV pos. Patienten</i>)		1:200

	Immunfluoreszenz			
	Name	Hersteller/ Quelle	Kat.-Nr.	Verdünnung
Sekundär-AK	Anti-Human-IgG Alexa568	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, MA, USA	A-21090	1:400
	DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, MA, USA	62247	1:1000
	Western Blot			
	Name	Hersteller/ Quelle	Kat.-Nr.	Verdünnung
Primär-AK	Anti-HDV	Prof. Dr. D. Glebe, Institut für Med. Virologie JLU-Gießen (<i>Protein-G gereinigtes Antiserum eines HBV/HDV pos. Patienten</i>)		1:10000
	Anti-Aktin (Maus)	Abcam, Berlin, Deutschland	ab230169	1:50000
Sekundär-AK	Anti-Human-HRP	Nordic-MUbio, Susteren, Niederlande	GAHu/IgG(Fc)/PO	1:5000
	Anti-Maus-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA	sc-2005	1:5000

2.8 PRIMER

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden, mit Ausnahme der Sequenzierungsprimer, von der Firma *IDT – Integrated DNA Technologies* (Iowa, USA) hergestellt. Die Sequenzierungen wurden von der Firma *LGC-Genomics GmbH* (Berlin) durchgeführt.

Tabelle 8 - Primer für Sequenzierungen

Name	Sequenz (5' -> 3')
pcDNA3.1-R	tagaaggcacagtcgaggct
CMV-F	gcaaatgggcggtaggcgt
HDV-2-BoxI-Fwd	ctcgagggtctcctccc
HDV-2-BoxI-Rev	ccagcttcgggaaatc
HDV-3-Backbone-Fwd	cttttcttaccttgagg
HDV-3-SacII-Rev-1	ctcggatcgttgcccag
HDV-3-SacII-Rev-2	ctcccttcacacttcg
HDV-4-Backbone-Fwd	cgggcaacattccgagg
HDV-4-EcoNI-Rev	ctcttcgggtcggcatg
HDV-5-EcoNI-Fwd	aagaggaaacgggtctc
HDV-5-EcoNI-Rev-1	gggctcgccttttcta
HDV-5-EcoNI-Rev-2	ctcggactggggggcg
HDV-5-PshAI-Rev	ggaggaaagtcaactcagc
HDV-6-BoxI-Fwd	ctcgagtttctgatgctct
HDV-6-BoxI-Rev	ctctgggcttctggga
HDV-7-BoxI-Fwd	tctcttcgccgggggag
HDV-7-BoxI-Rev	gctcggactcgggcgga
HDV-8-XagI-Fwd	agactgctggatgcccc
HDV-8-XagI-Rev-1	cactttcctcattccgg
HDV-8-XagI-Rev-2	gctcgggcccgggcg
HDV-8-SacII-Rev	gaagaaggaaggccctc

Tabelle 9 - Primer für Kolonie-PCR

Name	Sequenz (5' -> 3')	T_a [°C]
BGH-Rev	gcatgcctgctattgtcttc	50
CMV-Fwd	gtacatcaatgggcgtgg	

Tabelle 10 - Primer für Vektoramplifikation

Name	Sequenz (5' -> 3')	T _a [°C]
pcDNA3.1+_Fwd	gagctcggatccactagt	60
pcDNA3.1+_Rev	agcttaagtttaaacgctagcc	

Tabelle 11 - Primer für Dimersynthese

Name	Sequenz (5' -> 3')	T _a [°C]
Genotyp 2 – Backbone		
HDV-2-Vektor-Fwd+HDV	caaacgccgaaccgggatgagccgcatgccgg	63
pcDNA3.1-Rev+HDV-2	cccggcatgaggctcatagcttaagtttaaacgctagccag	
Genotyp 2 – Insert		
HDV-2-Fwd+pcDNA3.1	gcgttaaacttaagctatgagccgcatgccgg	64
HDV-2-Rev+HDV	cccggcatgaggctcatcccgggtcgggcggtt	
Genotyp 3 – Backbone		
HDV-3-Vektor-Fwd+HDV	tctcccgaccgctcggatgggcccgttccgg	63
pcDNA3.1-Rev+HDV-3	ttgccggaagcggcccaagcttaagtttaaacgctagccag	
Genotyp 3 – Insert		
HDV-3-Fwd+pcDNA3.1	gcgttaaacttaagcttgggcccgttccgg	63
HDV-3-Rev+HDV	ttgccggaagcggcccatccgagcggtcggga	
Genotyp 4 – Backbone		
HDV-4-Vektor-Fwd+HDV	acgccccgcccggctcgggatgggcccagttccc	63
pcDNA3.1-Rev+HDV4	gggaactgcccggccatcagcttaagtttaaacgctagccag	
Genotyp 4 – Insert		
HDV-4-Fwd+pcDNA3.1	gcgttaaacttaagctatgggcccagttccc	65
HDV-4-Rev+HDV	gggaactgcccggccatcccgaccgggcccggg	
Genotyp 5 – Backbone		
HDV-5-Vektor-Fwd+HDV	<u>ccgccccccagtcgagatagccgagttgccgaaga</u>	61
pcDNA3.1-Rev+HDV-5	<u>ttcggcaactcggctatagcttaagtttaaacgctagcc</u>	
Genotyp 5 – Insert		
HDV-5-Fwd+pcDNA3.1	<u>gcgttaaacttaagctatagccgagttgccgaagagg</u>	66
HDV-5-Rev+HDV	<u>ttcggcaactcggctatctcggactggggggcg</u>	
Genotyp 6 – Backbone		
HDV-6-Vektor-Fwd+HDV	<u>cgccccgggctcgaqcatgagccgcctccgacgaa</u>	67
pcDNA3.1-Rev+HDV-6	<u>Cgtcggaggcggctcatagcttaagtttaaacgctagccagctt</u>	

Name	Sequenz (5' -> 3')	T _a [°C]
Genotyp 6 – Insert		
HDV-6-Fwd+pcDNA3.1	<u>gcg</u> tttaaacttaagctatgagccgcctccgacgaa	66
HDV-6-Rev+HDV	cgtcggaggcggtcatgctcgagcccggggg	
Genotyp 7 – Backbone		
HDV-7-Vektor-Fwd+HDV	<u>tccgccc</u> gagtcgagcatgggccaagtccgacgaaga	67
pcDNA3.1-Rev+HDV-7	<u>gtcgg</u> aactggcccatagcttaagtttaaacgctagccagctt	
Genotyp 7 – Insert		
HDV-7-Fwd+pcDNA3.1	<u>gcg</u> tttaaacttaagctatgggccaagtccgacgaagagt	68
HDV-7-Rev+HDV	<u>gtcgg</u> aactggcccatgctcggactcgggcgga	
Genotyp 8 – Backbone		
HDV-8-Vektor-Fwd+HDV	<u>cccgccc</u> gggcccgagcatgggccaagagccgacgaa	67
pcDNA3.1-Rev+HDV-8	<u>gtcgg</u> ctcttgcccatagcttaagtttaaacgctagccagctt	
Genotyp 8 – Insert		
HDV-8-Fwd+pcDNA3.1	<u>gcg</u> tttaaacttaagctatgggccaagagccgacgaaga	70
HDV-8-Rev+HDV	<u>gtcgg</u> ctcttgcccatgctcgggcccgggcg	
* Die unterstrichenen Anteile stellen den 17-bp Überhang dar		

Tabelle 12 - Primer für SDM

Name	Sequenz (5' -> 3')	T _a [°C]
Gt6-SDM-Fwd	cgagggcttccctcgtcgggatcccgc	72
Gt6-SDM-Rev	caccgaaggaaagccctcgagaacaag	
Gt7-SDM-Fwd	ttgtcctccgggagggtcacatccc	72
Gt7-SDM-Rev	gtgaaccctcccggaggacaaccga	

Tabelle 13 - Primer für qRT-PCR

Name	Sequenz (3' → 5')	Konz.	Publikation
HDV-F* (forward primer)	KGGMWYTCCCTTWGCCATCMG	500nM	Botelho-Souza et al., 2014 [23]
HDV-R (reverse primer)	TTCCTCTTCGGGTCGGCATG	500nM	Ferns et al., 2012 [71]

Name	Sequenz (3' → 5')	Konz.	Publikation
HDV-P (hydrolysis probe)	FAM- CTCCTWCGGATGCCCAGGTCGGA C-BHQ1	250nM	Karatayli et al., 2014 [120]

**Dieser Primer besitzt Wobble-Basen, da dadurch die Bindung an HDV-3 in der qRT-PCR begünstigt.*

2.9 BAKTERIENSTÄMME UND ZELLINIEN

2.9.1 KOMPETENTE BAKTERIEN

Zur Vervielfältigung von Plasmiden und Vektoren sowie für Transformationsreaktionen wurden chemisch kompetente Stellar-Bakterien (Takara Bio, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) der Gruppe Escherichia coli (E. coli) verwendet. Diese Bakterien nehmen DNA durch Hitzeschock auf.

2.9.2 HUH-7

HuH-7-Zellen sind eine immortalisierte humane Hepatom-Zelllinie, welche 1982 einem 57-jährigen männlichen Japaner mit hepatozellulärem Karzinom aus dem Lebergewebe entnommen wurde [154].

2.9.3 HEPG2-NTCP

Bei der HepG2-Zelllinie handelt es sich um Hepatozyten, die 1975 aus dem Hepatoblastom eines 15-jährigen männlichen Amerikaners gewonnen wurden [4]. Für diese Arbeit wurden im Speziellen HepG2 Tet-On Advanced Zellen (Clontech Laboratories) verwendet, die sich dadurch auszeichnen, dass sie ein Tetrazyklin-induzierbares Expressionssystem besitzen. Da für Infektionsversuche mit HDV (und HBV) die Expression des NTCP-Rezeptors auf den Leberzellen zwingend erforderlich ist, wurden in dieser Arbeit stets HepG2 tet-on Zellen mit stabil transfiziertem humanen NTCP verwendet. Die Expression des Rezeptors kann durch Zugabe von Doxycyclin induziert werden. Die Zellen wurden mir freundlicherweise vom Institut für Medizinische Virologie in Gießen (Arbeitsgruppenleiter: Prof Dr. D. Glebe) zur Verfügung gestellt.

2.10 PLASMIDE UND VEKTOREN

2.10.1 pcDNA3.1(+)

Alle HDV-Genomsequenzen wurden in den pcDNA3.1(+)-Vektor von Invitrogen (Kat.-Nr. V790-20) kloniert. Es handelt hierbei sich um einen eukaryotischen Expressionsvektor von 5,4 kb Länge. Er enthält einen CMV-Promotor und ein BGH-Polyadenylierungssignal mit zwischengeschalteter multiple cloning site in forward(+)-Richtung. Hier befindet sich

auch die für die Klonierung verwendete Kpn I Schnittstelle. Ein Ampicillin-Resistenzgen dient der Selektion in Bakterien.

2.10.2 pCH9-200_LMS_3091_HBV

Dieses Plasmid enthält die Sequenzen für die Oberflächenproteine L, M und S des Hepatitis-B-Virus des Gt D3. Es handelt sich ebenfalls um einen eukaryotischen Expressionsvektor mit CMV-Promotorsignal und wurde mir freundlicherweise vom Institut für Medizinische Virologie in Gießen (Arbeitsgruppenleiter: Prof. Dr. D.Glebe) zur Verfügung gestellt.

2.10.3 pSEAP2-CONTROL

Dieses Plasmid der Firma TakaraBio (Kat.-Nr.:631717) wird für das SEAP-Assay benötigt und kodiert für eine Phosphatase (secreted embryonic alkaline phosphatase, 'SEAP'), die in Eukaryonten nicht vorkommt und daher zur Bestimmung Transfektionseffizienz herangezogen werden kann. Das SEAP-Gen steht unter Kontrolle eines SV-40-Promotors.

3 METHODEN

3.1 AUSWAHL UND BEARBEITUNG DER HDV-GENOMSEQUENZEN

Alle hier verwendeten Genomsequenzen wurden der *NCBI* Gendatenbank¹ entnommen. Bei ihrer Auswahl spielten mehrere Faktoren eine Rolle. So erfolgte die erste Orientierung anhand der von Miao et al. im Jahr 2019 vorgeschlagenen HDV-Referenzgenotypen [149]. Die Sequenzen wurden auf unbekannte Basen innerhalb des Delta-Antigen-Leserasters untersucht. Des Weiteren wurden bestimmte Aminosäuren in der HDAg-Sequenz, welche für posttranslationale Modifikationen nötig sind, auf ihre Existenz überprüft [104, 239]. Schlussendlich wurde auch auf das Vorhandensein von Hintergrundinformationen zu den jeweiligen Isolaten in Form von wissenschaftlichen Publikationen wert gelegt. Die daraufhin ausgewählten Sequenzen wurden von der Firma *IDT – Integrated DNA Technologies* (Iowa, USA) in Form von dsDNA synthetisiert. Jene Genomsequenzen konnten von IDT jedoch nicht an einem Stück synthetisiert werden. Zum einen aufgrund von biologischen Sicherheitsaspekten, zum anderen aufgrund des sehr großen Anteils an Guanin- und Cytosinbasen im HDV-Genom, welches daraufhin zu einem hohen Maße intragenomische Basenpaarungen ausbildet. Daher wurden die betreffenden Sequenzen aller Gt in zwei bis drei einzelne Fragmente unterteilt, separat synthetisiert und im Anschluss über Klonierungsreaktionen (siehe Kapitel 3.3) zusammengefügt. Hierbei wurden die Enden der einzelnen Fragmente so gestaltet, dass sie an Head und Tail jeweils 18 komplementäre Basen (sog. „Überhang“) zu den ihnen benachbarten Fragmenten besitzen. Ebenso verhält es sich mit den Enden, die in Richtung des späteren Klonierungs-Vektors (pcDNA3.1(+)) weisen. Da dieser Vektor Kpn I-verdaut werden soll, wurden jene Sequenzenden so entworfen, dass sie komplementär zu dieser Schnittstelle sind.

Tabelle 14 - Ausgewählte Isolate

Genotyp	Subtyp	Zugriffsnr.	Isolat	Land	Publikation
2	a	X60193	7/18/83	Japan	Imazeki et al., 1991 [109]
3	b	AB037947	VnzD8375	Venezuela	Nakano et al., 2001 [155]

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Genotyp	Subtyp	Zugriffsnr.	Isolat	Land	Publikation
4	a	AF018077	TW-2b (Taiwan isolate)	Taiwan	Wu et al., 1998 [265]
5	b	LT594482	dFr3634	Elfenbeinküste	Le Gal et al., 2017 [127]
6	b	JX888102	36036-NIE464	Nigeria	Andernach et al., 2014 [10]
7	a	LT604972	dFr4797	Kamerun	Le Gal et al., 2017 [127]
8	a	AJ584849	dFr-644	Demokratische Republik Kongo	Le Gal et al., 2006 [129]

3.2 AMPLIFIKATION UND PRÄPARATION DER PLASMID-DNA

3.2.1 TRANSFORMATION

Zur Vervielfältigung der Plasmide wurden 2 – 2,5 µl der Plasmid-DNA in 50 µl chemisch kompetente Stellar-Zellen transformiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 40-50 sek. Danach wurden die Zellen erneut 2min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 450 µl SOC-Medium und einstündigem Schütteln bei 37 °C wurden 50-100 µl des Ansatzes auf eine mit Carbenicillin versetzte LB-Agarplatte ausgestrichen. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C. Durch das Antibiotika-Resistenzgen im Vektor wurde gewährleistet, dass sich auf der Platte nur diejenigen Bakterien vermehren konnten, die das Plasmid erfolgreich in sich aufgenommen hatten.

3.2.2 AUFREINIGUNG

Zur anschließenden Isolation der Plasmide aus den Bakterien wurden vereinzelte Kolonien mithilfe einer Pipettenspitze von der Platte gepickt und in einen Kolben mit 50 ml LB-Flüssigmedium und 50 µl Carbenicillin überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Schüttler bei 37 °C. Zur Aufreinigung bzw. Isolation der Plasmid-DNA wurde nach Herstellerprotokoll der verwendeten Kits verfahren.

3.2.3 LINEARISIERUNG DES pCDNA3.1(+)

Für die Klonierung der HDV-Monomer-Plasmide musste das leere pCDNA3.1(+) zunächst linearisiert werden. Dies erfolgte initial über enzymatischen Verdau mit Kpn I und anschließender Gelelektrophorese. Das gewünschte verdaute, lineare Produkt wies

eine Größe von 5,4 kb auf und konnte so von unverdauten, zirkulären Vektoranteilen unterschieden werden. Die entsprechende Bande wurde ausgeschnitten und die DNA gereinigt. Aufgrund schlechter Klonierungsergebnisse (hoher Anteil an Leervektor) erfolgte im späteren Verlauf zusätzlich eine Linearisierung des Vektors mittels PCR-Amplifikation. Die hierbei verwendeten Primer erzeugten dabei dieselben Vektorenden wie nach Verdau mit Kpn I. Die PCR wurde wie folgt durchgeführt.

Vektor (pcDNA3.1(+))	40,0 ng
Platinum Superfi II Master Mix	25,0 µl
Primer pcDNA3.1+_Fwd [10pM]	2,5 µl
Primer pcDNA3.1+_Rev [10pM]	2,5 µl
H ₂ O	Auf 50 µl auffüllen

PCR-Programm:

98 °C	30 sek	} x 35
98 °C	10 sek	
60 °C	10 sek	
72 °C	2 min	
72 °C	5 min	

3.3 KLONIERUNG

3.3.1 KLONIERUNG DER MONOMERE

Im Zuge der Klonierung werden die HDV-Vollgenomsequenzen in den linearisierten Vektor pcDNA3.1(+) eingebracht. Für die Herstellung der Monomere wurde das In-Fusion HD Cloning Kit von Takara Bio verwendet. Wie bereits beschrieben, besitzen die jeweiligen Inserts (HDV-dsDNA-Fragmente) an Head und Tail 18 bp lange komplementäre Enden in Richtung des Vektors bzw. zueinander. Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor wurde mit 3:1 festgelegt, wobei für kleinere ds-DNA-Fragmente mit 150-350 bp Länge ein Verhältnis von 5:1 gewählt wurde. Separat für jeden Gt wurden die dsDNA-Fragmente im entsprechenden Verhältnis nun mit 50 ng des linearisierten pcDNA3.1(+) und 2 µl des 5X In-Fusion HD Enzyme Mix auf 10 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Der gesamte Ansatz wurde für 15 min bei 50 °C inkubiert, woraufhin eine kurze Inkubation auf Eis folgte. Anschließend wurden 2,5 µl des Ansatzes zu 50 µl kompetenten Stellar-Bakterien gegeben und eine Transformationsreaktion wie in Absatz 3.2.1 beschrieben durchgeführt. Aufgrund der anfangs geringen Erfolgsquote der Klonierungen mit Kpn I-verdautem pcDNA3.1(+) wurde im Verlauf der PCR-amplifizierte

Vektor verwendet (Abs. 3.2.3). Nach der Transformation erfolgte eine Kolonie-PCR mit anschließender Gelelektrophorese (Abs.3.4).

3.3.2 KOLONIERUNG DER DIMERE

Für die Herstellung der Dimere wurde die Methode des FastCloning von Li et al. [136] angewandt. Als Template diente hier das vorab hergestellte HDV-Monomer-Plasmid (i. F. ‚Monomer‘) (Absatz 3.3.1). Initial wurden für jeden Gt vier Primer generiert. Eines der Primer-Paare amplifiziert das gesamte Monomer als späteres Backbone und besitzt jeweils 17 bp lange komplementäre Enden in das HDV-Genom (späteres Insert). Das zweite Primer-Paar amplifiziert das HDV-Genom als späteres Insert und besitzt jeweils 17 bp Überhang in Richtung des späteren Backbones.

Für die Herstellung des Backbones und des Inserts wurden jeweils separate PCRs durchgeführt:

5X HF Puffer	10,0 µl
dNTPs [2,5 mM]	5,0 µl
Primer-Mix Backbone [10 pM] <i>bzw.</i>	1,0 µl
Primer-Mix Insert [10 pM]	
Template (Monomer)	10,0 ng
Phusion Polymerase	0,5 µl
H ₂ O	Auf 50 µl auffüllen

PCR-Programm:

98 °C	3 min	} x 35
98 °C	10 sek	
X °C*	30 sek	
72 °C	40 sek (Insert)	
	3 min (Backbone)	
72 °C	5 min	

* Die jeweiligen Annealingtemperaturen sind dokumentiert in Tabelle 11

Im Anschluss an die PCR erfolgte eine Gelelektrophorese mit 1,2 %igem Agarosegel bei 80 V für 30 min zur Überprüfung der entstandenen Produkte. Hierfür wurden jeweils 5 µL der PCR-Ansätze zusammen mit 1 µl 6X-Ladepuffer auf das Gel aufgetragen. Für das Insert wurde eine Bande bei 1,7 kb und für das Backbone bei 7,1 kb erwartet. Der restliche Ansatz des Inserts und des Backbones (je 45µl) wurden anschließend zusammengefügt und mit 2 µl Dpn I für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Für die

Transformationsreaktion wurden schließlich 2 µl des Verdaus mit 50 µl Stellar-Bakterien versetzt und wie in Absatz 3.2.1 verfahren. Am nächsten Tag erfolgte eine Kolonie-PCR (Abs. 3.4).

3.4 KOLONIE-PCR

Einige der nach der Transformationsreaktion auf den Carbenicillin-Agar-Platten gewachsenen Bakterienkolonien wurden einer PCR unterzogen, um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen. Vereinzelte Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze von der Platte gepickt und in 10 µl H₂O überführt. Anschließend wurde für jede gepickte Kolonie nach folgendem Reaktionsansatz verfahren:

GoTaq Hot Start 2X Green Master Mix	12,5 µl
Primer-Mix CMV-Fwd & BGH-Rev [10 pM]	2,5 µl
Template (Kolonie in 10µL H ₂ O)	4,0 µl
H ₂ O	6,0 µl

PCR-Programm:

95 °C	2,0 min	} x 25
95 °C	30,0 sek	
50 °C	30,0 sek	
72 °C	2,5 min (Monomer)	
	4,0 min (Dimer)	
72 °C	5,0 min	

Die hier eingesetzten Primer amplifizieren nur den Teilbereich des Plasmids, in dem das klonierte Insert (HDV-DNA) erwartet wird. In der anschließenden Gelelektrophorese mit 1,2 %igem Agarosegel bei 80 V für 30 min erzeugte der leere Vektor daher eine Bande bei 0,610 kb, das Monomer eine Bande bei 2,282 kb und das Dimer eine Bande bei 3,955 kb. Alle Dimere bildeten im Gel Doppelbanden bei 3,955 kb und 2,282 kb aus. Erfolgreich klonierte Plasmide wurden angeimpft, gereinigt (Abs.3.2.2) und im Anschluss sequenziert (Abs.3.5).

3.5 SEQUENZIERUNG

Die Sequenzierungen zur Kontrolle der klonierten Sequenzen wurden von der Firma *LGC Genomics* (Berlin) durchgeführt. Die hierfür eingesetzten Primer wurden von *LGC* synthetisiert und können der Tabelle 8 entnommen werden. Für die Sequenzierung der Monomere wurden lediglich die Primer CMV-F und pcDNA3.1-R verwendet. Um aber die

gesamte Insert-Sequenz der Dimer-Plasmide zu sequenzieren musste gesondert verfahren werden. Aufgrund dessen, dass im Plasmid zwei identische HDV-Sequenzen hintereinanderliegen, können dort gesetzte Primer entweder in der ersten oder zweiten Sequenz binden. Es ist im Anschluss nicht nachvollziehbar, welcher der Abschnitte sequenziert wurde. Um zu gewährleisten, dass die Primer an der gewünschten Stelle im Dimer binden und somit die komplette Insert-Sequenz auf ihre Richtigkeit hin überprüft werden kann, wurden jeweils einzelne Restriktionsschnittstellen (*unique restriction sites*) in den HDV-Sequenzen jedes Gt gesucht. Die Dimere wurden anschließend mit dem betreffenden Enzym verdaut, welches dementsprechend nun an zwei Stellen schnitt, da zwei HDV-Vollgenome im Plasmid vorlagen. Das hierbei entstandene, kürzere DNA-Fragment, welches auch den Übergang von der ersten in die zweite HDV-Sequenz enthielt, konnte daraufhin gesondert sequenziert werden. Hierfür wurden die Verdau auf einem 1,2 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und das kürzere Fragment aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt und zum Sequenzieren an LGC geschickt. Bei Gt 3 und 4 wurde aufgrund der Lage der Schnittstellen zusätzlich auch das längere Fragment aus dem Verdau sequenziert.

Verdau-Reaktionen:

Dimer-Plasmid	2 µg	}	Inkubation bei 37 °C für 20 min
FastDigest Enzym	1 µl		
FastDigest Green Buffer	1 µl		
H ₂ O	Auf 10 µl auffüllen		

3.6 SIDE DIRECTED MUTAGENESIS

Bei den Monomeren der HDV Gt 6 und 7 wurde aufgrund von Punktmutationen im Genom eine *Side directed mutagenesis* (SDM) durchgeführt. Insbesondere bei Gt 6 betraf diese Mutation das CXXQ-Motiv im Large-Delta-Antigen, welche bereits in der Ausgangssequenz in der *NCBI* Gendatenbank vorhanden war. Dieses Motiv wirkt als Farnesylierungssignal und ist für die Virusassemblierung und -sekretion essentiell [81]. Bei Gt 7 trat eine Mutation nach der Klonierung auf und stellte eine Abweichung zur Ausgangssequenz dar. Aufgrund Ermangelung weiterer Klone für diesen Gt wurde an dieser Stelle eine SDM durchgeführt. Die verwendeten Primer sind Tabelle 12 zu entnehmen. Nachdem nach untenstehendem Reaktionsablauf verfahren wurde, wurde eine Transformationsreaktion (Abs.3.2.1) mit anschließender Aufreinigung (Abs.3.2.2) und Sequenzierung (Abs.3.5) durchgeführt.

SDM-Ansatz:

Monomer-Plasmid	30 ng
PrimerMix SDM [10 pM]	5 µl
Platinum Superfi II MasterMix	25 µl
H ₂ O	18 µl

PCR-Programm:

98 °C	30 sek	} x 35
98 °C	10 sek	
60 °C	10 sek	
72 °C	2 min	
72 °C	5 min	

3.7 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.7.1 ZELLKULTIVIERUNG

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden auf 10 cm-Zellkulturschalen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank gehalten. Die Zellkulturschalen der HepG2-NTCP-Zellen wurden vorab mit Kollagen Typ I beschichtet um eine bessere Haftung zu gewährleisten. Als Zellkulturmedium diente DMEM, welches mit 10 % FKS sowie 1 % Penicillin-Streptomycin versetzt wurde. Um ein zu dichtes Bewachsen der Platten zu unterbinden, wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen passagiert. Hierfür wurde das alte Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen auf der Platte mit 1x PBS gewaschen. Dann wurde 1 ml Trypsin-EDTA in PBS (1:5) auf die Zellen gegeben und diese im Brutschrank für einige Minuten inkubiert. Sobald sich die Zellen abzulösen begannen, wurden diese mit Zellkulturmedium mehrere Male resuspendiert und im gewünschten Verhältnis auf weitere Zellkulturplatten überführt.

3.7.2 TRANSFEKTION

Die Transfektionen wurden zur Deltavirus-Produktion und für die immunologischen Nachweismethoden durchgeführt. Hierfür wurden stets Huh-7-Zellen verwendet, die, wenn nicht anders beschrieben, in DMEM mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin gehalten wurden.

3.7.2.1 IMMUNFLUORESZENZ UND ELISA

Die Zellen wurden so auf 48-Well-Platten ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion zu ca. 60 % konfluent waren. Hierbei wurden für jeden Gt sowohl FuGene als auch Lipofectamine 2000 als Transfektionsreagenzien genutzt. Der Ansatz pro Well belief sich

auf 220 ng Dimer-Plasmid, welches mit 10 µl OptiMEM vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Danach wurde 1 µl FuGene bzw. 1 µl Lipofectamine 2000 zugegeben, gevortext und der Ansatz 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurden 200 µl frisches Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz vorsichtig in die Wells geträufelt und die Platte langsam geschwenkt. Es folgte die Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und frisches Williams Medium E' zugegeben, welches mit 2 % FKS und jeweils 1 % Natriumpyruvat, Penicillin/Streptomycin, GlutaMAX und HEPES Puffer versetzt war. Dieses Medium sollte den Zellmetabolismus etwas verlangsamen, sodass die Vitalität der Zellen auch mehrtägiger Inkubation im Brutschrank gewährleistet werden konnte, welche für die Virussynthese notwendig ist. Während der Inkubation erfolgte ein regelmäßiger Mediumwechsel mit Williams E' + Zusätze (s.o.). Abschließend wurden die Zellen am vierten Tag für die Immunfluoreszenz bzw. am siebten Tag für den ELISA fixiert (Abs. 3.9.1 und 3.9.3)

3.7.2.2 FÜR DIE PRODUKTION DER DELTAVIREN

Für die HDV-Virusproduktion wurden pro Gt drei 10 cm-Zellkulturschalen mit Huh-7-Zellen und einer Konfluenz von ca. 90 % transfiziert. Da HDV eine Hülle aus HBV-Oberflächenproteinen besitzt, ist für die Synthese infektiöser Deltaviren auch die Expression ebendieser HBV-Oberflächenproteine in derselben Zelle vonnöten. Im Zuge dessen erfolgte eine Ko-Transfektion mit dem Expressionsplasmid pCH9-200_LMS_3091_HBV welches für das große, mittlere und kleine (Large, L; middle, M; small, S) Oberflächenprotein des HBV Gt D3 kodiert. Pro Zellkulturschale belief sich der Ansatz auf 3,3 µg HBV-Expressionsplasmid und 6,6 µg HDV-Expressionsplasmid sowie 1 µg pSEAP, welche mit 350 µl OptiMEM ohne Zusätze gut vermischt wurden. Dieser Ansatz wurde zunächst für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, ehe im Anschluss 33 µl FuGene hinzugegeben, erneut gevortext und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Zwischenzeitlich wurde frisches Zellkulturmedium (10 ml pro Platte) auf die Zellen gegeben. Die Transfektionsreagenz wurde nach Abschluss der Inkubationszeit gleichmäßig auf die Zellkulturschale geträufelt, welche im Anschluss vorsichtig geschwenkt wurde. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank gehalten. Tags darauf wurden die Zellen von den 10 cm Zellkulturplatten auf jeweils eine Maxi-Platte umgesetzt und im Anschluss erneut im Brutschrank belassen. Das weitere Verfahren ist in Kap. 3.7.3 beschrieben.

3.7.2.3 FÜR WESTERN BLOT

Um HDV-Protein für den Western Blot zu gewinnen, wurden 6-Well-Platten transfiziert,

die am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 90 % aufwiesen. Für jeden Gt wurden zwei Wells auf jeweils separaten Platten transfiziert. Pro Gt wurde daher ein Premix angefertigt mit 6,5 µg HDV-Expressionsplasmid auf 300 µl OptiMEM. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurden 30 µl FuGene hinzugefügt und gevortext. Es folgte eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min. Währenddessen wurde frisches Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Premix der Transfektionsreagenz auf die zwei Wells aufgeteilt (entsprechend 3,25 µg Expressionsplasmid je Well) und vorsichtig auf die Zellen geträufelt, anschließend erfolgte langsames Schwenken der Platten. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank gehalten und am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel auf Williams Medium E' + Zusätze (Vgl. Abs. 3.7.2.1). Je an Tag 4 und Tag 8 wurden die einzelnen Ansätze eingefroren. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen, welches wiederum abgesaugt wurde. Nun erfolgte die Lagerung bei -20 °C, bis die Zellen der TRIzol-Aufreinigung unterzogen wurden (Abs. 3.8)

3.7.3 PRODUKTION REKOMBINANTER DELTAVIREN

Nach der vorab erfolgten Transfektion der Huh-7-Zellen (Abs. 3.7.2.2) wurde am 4. Tag erstmals mit dem Sammeln der Zellkulturüberstände begonnen. Dies wurde danach alle zwei bis drei Tage wiederholt. Nach dem Abtragen des Überstandes wurde stets neues Medium (Williams Medium E mit 2 % FKS und je 10 mM HEPES und Penicillin/Streptomycin) auf die Zellen gegeben und diese dann bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank gehalten. Die Sammelbehälter mit den Zellkulturüberständen wurden zwischenzeitlich bei 4 °C gekühlt aufbewahrt. Am 14. Tag wurde der Überstand zum letzten Mal von den Platten abgesammelt. Pro Gt belief sich das gesammelte Volumen schlussendlich auf ca. 300mL. Zur Konzentration dieses Volumen wurden die Überstände nun nach und nach den VivaSpin-20 Ultrafiltration Falcons zugeführt und bei 3.000 x g zentrifugiert. So wurde fortgefahren, bis das Ausgangsvolumen auf das ca. 200fache konzentriert worden ist. Die Konzentrate wurden im Anschluss einer PCR unterzogen (Abs. 3.7.3.1) und schließlich für die Infektionsversuche genutzt (Abs. 3.7.4).

3.7.3.1 BESTIMMUNG DER HDV-KONZENTRATION MITTELS QRT-PCR

Um die Konzentration der sezernierten HDV-RNA aus den gesammelten Zellkulturüberständen zu messen wurde eine quantitative Reverse Transkriptase Real Time PCR durchgeführt. Das Enzym Reverse Transkriptase ist imstande, RNA in DNA umzuschreiben, welche daraufhin in der PCR durch die Polymerase amplifiziert werden kann. Zu Beginn wurden Aliquots sowohl der Konzentrate als auch der unkonzentrierten Zellkulturüberstände mittels des innuPREP Kits von Analytik Jena nach

Herstellerangaben aufgereinigt. Damit in der PCR ausschließlich HDV-RNA amplifiziert und der Plasmid-Hintergrund eliminiert wird, wurde danach ein DNase-Verdau durchgeführt. Dieser belief sich je Probe auf 2 µl DNase I, 0,9 µl DNase-Puffer und 5 µl Probenvolumen auf 1,1 µl dH₂O und wurde in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Platte wurde mit einer Folie verklebt, für 1 h bei 37 °C im LightCycler inkubiert und anschließend, um die Reaktion zu terminieren, nochmals für 1 min bei 95 °C. Der Ansatz für die darauffolgende qRT-PCR sowie das dazugehörige Light-Cycler-Programm sind den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen. Als Standard diente in-vitro transkribierte RNA mit 1x10⁹ Genomäquivalenten/5 µl.

PCR-Ansatz/ Well:

HDV-F*	1 µl
HDV-R *	1 µl
HDV-P*	0,5 µl
TaqMan Fast Virus 1-Step MasterMix	5 µl
H ₂ O	3,5 µl
DNase-Verdau	9 µl

**Die Primer-Sequenzen sind Tabelle 13 zu entnehmen*

Tabelle 15 - PCR-Programm qRT-PCR

	Reverse Transkriptase	Denaturierung/ Aktivierung	Amplifikation		
Zyklen	1	1	45		
Typ	/	/	Quantifikation		
Temperatur (°C)	53	95	95	64	72
Inkubationszeit	5 min	20 sek	20 sek	30 sek	10 sek
Temperaturveränderung (°C/s)	4,4	4,4	4,4	2,2	4,4
Messung	/	/	/	1x	/

3.7.3.2 HBsAG-MESSUNG

Die Messung des Hepatitis-B-Surface-Antigens (HBsAg) wurde freundlicherweise von Dr. Felix Lehmann durchgeführt. Das quantitative HBsAg in den Zellkulturüberständen nach Transfektion wurde mittels vollautomatisiertem Architect assay (Abbott, Wiesbaden) bestimmt. Die HBsAg-haltigen Überstände wurden (wenn nötig) mit PBS

verdünnt, um den Messbereich des Assays einzuhalten.

3.7.3.3 SEAP-ASSAY

Um die Virusproduktion der einzelnen Ansätze bzw. Genotypen miteinander vergleichen zu können, muss die Transfektionseffizienz mittels des SEAP-Tests bestimmt werden. Hierfür wurde im Zuge der Transfektion neben den viralen Expressionsplasmiden auch das Plasmid pSEAP-control ko-transfiziert. Dieses Plasmid kodiert für eine Phosphatase (secreted alkaline phosphatase = ‚SEAP‘), die nur von den transfizierten Zellen sezerniert wird. Die Enzymaktivität dieser Phosphatase wird im Assay genutzt, um ein chemilumineszierendes Substrat zu spalten und so messbares Licht zu emittieren. Gegen einen Standard aufgetragen können so verschiedene Transfektionsansätze zueinander ins Verhältnis gesetzt werden. Für den Test werden zunächst 50 µl des Zellkulturüberstandes der einzelnen Gt für 30 min bei 65 °C inkubiert, um etwaige zelleigene endogene Phosphatasen zu deaktivieren. Die Proben werden anschließend zusammen mit 100 µl SEAP-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 4) in eine 96-Well-Platte überführt. Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe eines SEAP-Standards in je 1:2 Verdünnungsschritten auf dieselbe Platte aufgetragen.

Nun werden je 50 µl frisch angesetzt SEAP-Substrat auf die Proben und die Standardreihe pipettiert und sofort die OD₄₅₀ mittels des Photometers gemessen.

3.7.4 INFEKTION

Für die Infektionsversuche mit den vorab produzierten Deltaviren (Abs. 3.7.3) wurden HepG2-NTCP auf 48-Well-Platten ausgesät. Es wurden pro HDV Gt drei verschiedene Ansätze mit 1×10^6 (~10 GE/Zelle) sowie 5×10^6 (~50 GE/Zelle) und 1×10^8 (~1000 GE/Zelle) Genomäquivalenten pro Well angefertigt. 48 h vor Infektion wurden die Hepatozyten mit 2 % DMSO und 3 µg/ml Doxycyclin in HGM (siehe Tabelle 4) inkubiert, um die NTCP-Expression der Zelllinie zu induzieren. Am Tag der Infektion wurde das alte Zellkulturmedium abgesaugt und frisches Infektionsmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 4) auf die Zellen gegeben. Im Anschluss wurden je 500 µl Virusinokulat (HGM + Viruskonzentrat) pro Well auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden danach im Brutschrank gehalten. Nach 24 h wurde das Inokulat abgesaugt, die Zellen mehrfach mit HGM gewaschen und schließlich in HGM + 2 % DMSO + 5 µg/ml Caspofungin erneut im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden unter regelmäßigem Mediumwechsel bis zum neunten Tag gehalten und dann für die Immunfluoreszenz fixiert (Abs. 3.9.1).

3.8 TRIZOL-AUFREINIGUNG

Zur Isolation von Protein aus den transfizierten Zellen der 6-Well-Platten (Abs. 3.7.2.3) wurde das TRIZOL-Reagenz von ThermoFisher verwendet und hierbei nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Das getrocknete Protein-Pellet wurde in 30 µl

optimized Lysis Buffer (siehe Tabelle 4) über Nacht bei 50 °C im Schüttler gelöst. Anschließend wurde dieses bei -20 °C bis zur Verwendung im Western Blot (Abs. 3.9.2) eingefroren.

3.9 IMMUNOLOGISCHE NACHWEISMETHODEN

3.9.1 IMMUNFLUORESCENZ

Die Immunfluoreszenz-Färbung zum Nachweis von Delta-Antigen wurde sowohl nach dem Transfektions- als auch nach dem Infektionsversuch durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden am vierten Tag und die infizierten Zellen am neunten Tag fixiert. Die Fixierung und Färbung erfolgte in beiden Fällen auf die gleiche Art und Weise. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Im Anschluss wurde eine 0,2 %ige Triton-X100- und 4 %ige Paraformaldehyd-PBS-Lösung hinzugegeben, welche der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen diente. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min. Nachfolgend wurde erneut mit 1xPBS gewaschen, bevor die Zellen bei Raumtemperatur für 1 h in 10 % FKS in PBS inkubiert wurden, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Einem erneuten Waschschritt mit 1x PBS folgte nun die Inkubation mit dem Anti-HDV-Primärantikörper (1:200 in 10 % FKS in PBS) bei 37 °C für 1 h. Danach wurden die Zellen drei Mal mit 1x PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Anti-Human-Sekundärantikörper (1:400 in 10 % FKS und PBS) sowie die Kernfärbung mit DAPI (f.c. 0,5 µg/ml in 10 % FKS in PBS) erfolgte daraufhin ebenfalls für 1 h bei 37 °C. Zum Schluss wurde drei Mal mit 1x PBS gewaschen.

3.9.2 SDS-PAGE UND WESTERN BLOT

Der Western Blot diente dem Nachweis des S- und L-HDAg im zeitlichen Verlauf. Vorab wurden die transfizierten Huh-7-Zellen daher im Abstand von jeweils zwei Tagen eingefroren und anschließend einer TRIzol-Aufreinigung zur Isolation von Delta-RNA und -Protein unterzogen (Abs. 3.8). Das Protein musste nun zunächst mittels SDS-PAGE auf einem 12 %igem Polyacrylamid-Gel der Größe nach aufgetrennt werden. Die Zusammensetzung des hierfür verwendeten Trenn- und Sammelgels ist Tabelle 4 zu entnehmen. Die Proteinproben wurden, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden, mit Ladepuffer und dH₂O auf je 15 µl Gesamtvolumen gebracht und bei 90 °C für 5 min denaturiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran geblottet, welche vorab in Methanol getränkt und somit aktiviert wurde. Gel, Membran und Whatman-Paper wurden mit 1x-Transferpuffer behandelt. Nach dem Blotten wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und im Anschluss in Blocking-Lösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 4) inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen.

Schließlich folgte die Inkubation mit den Erstantikörpern Anti-HDV (1:10.000 in 5 %-Milchpulver/TBS-Lösung) sowie Anti-Beta-Aktin (1:50.000 in 5 %-Milchpulver/TBS-Lösung) über Nacht bei 4 °C auf dem Schwenker. Es schlossen sich mehrere Waschschrte in TBS-T-Lösung an. Zum Schluss wurde die Membran mit den Zweitantikörpern Anti-Human-HRP (1:5.000 in 5 %-Milchpulver/TBS-Lösung) und Anti-Maus-HRP (1:5.000 in 5 %-Milchpulver/TBS-Lösung) für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schwenker inkubiert. Nachdem wiederum mehrere Waschschrte in TBS-T-Lösung folgten, konnte nun durch ein kurzes Benetzen der Membran mit Clarity Max Western ECL-Substrat ein Chemilumineszenz-Signal ausgelöst werden, welches mittels ChemoCam-Imager detektiert wurde.

3.9.3 ELISA

Der ELISA zur Detektion von Delta-Antigen aus den transfizierten Zellen (Abs. 3.7.2.3) wurde mit dem ETI-DELTAK-2 Kit von DiaSorin durchgeführt. Die Zellen wurden am siebten Tag nach Transfektion lysiert. Hierfür wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und 50µl Puffer A (Zusammensetzung siehe Tabelle 4) auf die einzelnen Wells pipettiert um anschließend 5 min bei Raumtemperatur zu inkubieren. Nun wurden 200 µl Puffer B (siehe Tabelle 4) + 0,025 U/µl Benzonase zugegeben und wiederum inkubiert bei 37 °C für 1 h. Das Zelllysate wurde mehrfach resuspendiert. Nun wurde der ELISA genau nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Verfahren beruht auf einem direkten, nicht-kompetitiven Sandwich-Assay. Die Wells sind mit humanem anti-Delta-IgG gecoatet an welches das HDAg aus der Probe bindet. Nach mehreren Waschschrten wird das gebundene HDAg schließlich wiederum vom Enzyme tracer (humanes anti-Delta-HRP) gebunden und mittels der Substratlösung eine messbare Farbreaktion erzeugt. Die Messung erfolgte nach 9 min Inkubation im Substrat bei OD₄₅₀ und OD₆₃₀ im Photometer.

4 ERGEBNISSE

4.1 HERSTELLUNG EINES HDV-EXPRESSIONSSYSTEMS IM VEKTORSYSTEM PCDNA3.1

Die Klonierung der HDV Gt 2-8 in den Vektor pcDNA3.1(+) erfolgte mit dem Ziel, stabile Expressionssysteme für jene Gt zu erstellen. Denn ungeachtet der Anzahl verschiedener Gt sowie deren wiederum hoher intergenomischer Variabilität [127] wird auch heute noch in der Mehrheit der Studien mit Zellkultur- und Tiermodellen mit einem cDNA-Klon des HDV Gt 1 gearbeitet (pSVL(D3), [124]). Mit den hier hergestellten HDV-Expressionsplasmiden soll die Arbeit mit den selteneren HDV Gt zukünftig erleichtert und vorangetrieben werden. Hierfür wurde exemplarisch jeweils ein Isolat eines jeden HDV Gt 2-8 aus der NCBI-Gendatenbank (Genbank) ausgewählt (siehe Tabelle 14). Bei der Auswahl berücksichtigt wurden unter anderem die vorgeschlagenen Referenzgenotypen von Miao et al. [149], die Existenz der für posttranslationale Modifikationen notwendigen Aminosäuren in der HDAg-Sequenz [104, 239] sowie die Verfügbarkeit wissenschaftlicher Publikationen zu den einzelnen Isolaten (siehe Kap. 3.1 und Abbildung 1). Mithilfe der in Kap. 3.3 beschriebenen Methode des FastCloning [136] konnten die Genome der HDV Gt 2 bis 8 zuverlässig in den Vektor pcDNA3.1(+) kloniert werden. Die Klonierung erfolgte in zwei separaten Schritten, sodass im endgültigen Konstrukt zwei identische HDV-cDNA-Genomsequenzen hintereinanderliegen. Bei den hergestellten Expressionsplasmiden handelt es sich daher um sog. Dimere („head-to-tail dimers“). Dies sollte die fehlerfreie und vollständige Replikation des Virusgenoms sowie die Expression des HDAg in den Zellen gewährleisten, denn HDV vermehrt sich *in vivo* über einen sog. Rolling-Circle-Mechanismus unter Ausbildung von RNA-Multimeren, die erst durch Auto-Ribozym-Aktivität in RNA-Monomere geschnitten werden [115]. Nach der Klonierung wurden die Plasmide sequenziert und schließlich nur diejenigen Konstrukte für die folgenden Experimente weiterverwendet, deren Sequenzen fehlerfrei waren und mit den Ausgangssequenzen übereinstimmten. Ausnahme bildet hierbei Gt 6, der bereits in der Ausgangssequenz der Gendatenbank eine Mutation im CXXQ-Motiv besaß, welches für die Farnesylierung und die Virusassemblierung essentiell ist [81]. Die Mutation (C210S) wurde daher durch eine Site Directed Mutagenesis beseitigt, und der Wildtyp wiederhergestellt (siehe Kap. 3.6). Somit entspricht die Sequenz im Expressionsplasmid für HDV-6 zwar nicht mehr der Ausgangssequenz des HDV-6 aus der NCBI Gendatenbank (Zugriffsnr. JX888102), repräsentiert aber den HDV-Wildtyp für diesen Genotyp.

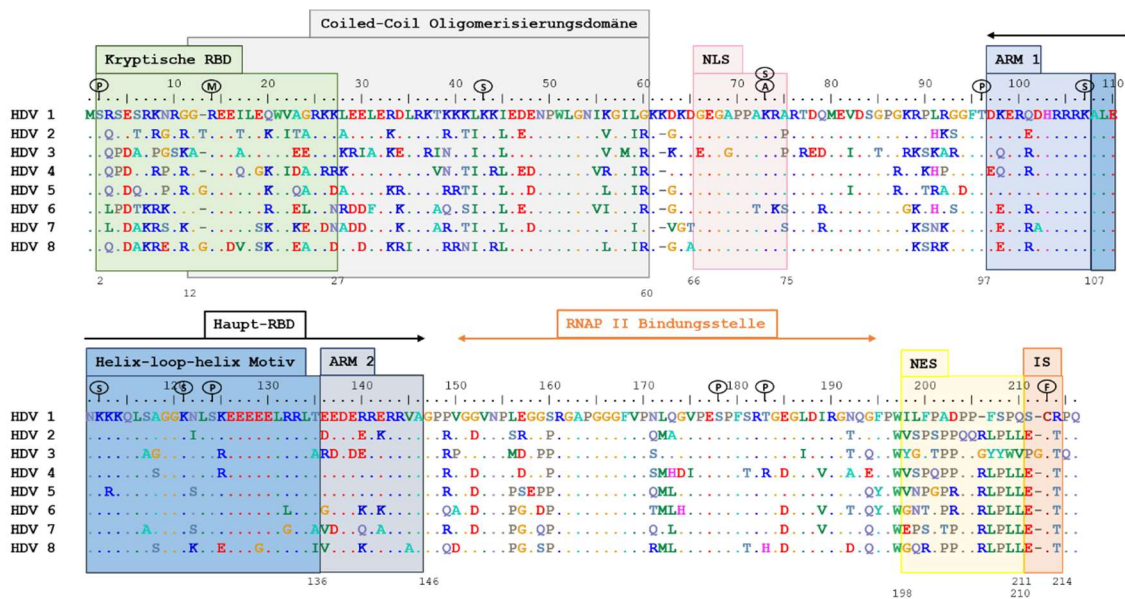


Abbildung 1 - Aminosäurealignment der L-HDAg-Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten HDV Isolate der Genotypen 2-8. Die Genbank Zugriffsnummern sind

Tabelle 14 zu entnehmen. Als Referenz diente die L-HDAg-Sequenz des HDV 1 Isolats von J. Taylor [124]. Die einzelnen Aminosäuren sind als verschiedenfarbige Buchstaben dargestellt, Punkte signalisieren die Existenz der jeweils gleichen Aminosäure in allen Sequenzen. Wichtige funktionelle Bereiche [43, 84] sind in verschiedenfarbigen Boxen und Pfeilen dargestellt (RBD = RNA-Bindungsdomäne; NLS = nukleäres Lokalisierungssignal; ARM = Arginin-reiches Motiv; NES = nukleäres Exportsignal; IS = Isoprenylierungssignal; RNAP II = RNA-Polymerase II). Wichtige posttranslationale Modifikationen [104, 239] sind eingekreist dargestellt (A = Acetylierung; F = Farnesylierung; M = Methylierung; P = Phosphorylierung; S = Sumoylierung). Das Alignment wurde mit BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 durchgeführt [90].

4.2 NACHWEIS DER EXPRESSION VON HDAG IN HUMANEN HEPATOMZELLEN NACH TRANSFEKTION MIT DEN HDV-EXPRESSIONSPASMIDEN DER GT 2-8

Nachdem die HDV-Genome in Form von dsDNA in den DNA-Vektor kloniert wurden, sollte nun gezeigt werden, dass die hergestellten Expressionsplasmide auch imstande sind, HDAG in Leberzellen zu exprimieren. Da die cDNA als Negativstrang vorliegt, ist der Nachweis von HDAG ein erster Hinweis auf die Funktionsfähigkeit der HDV-Expressionsplasmide. Weiterhin können die Transfektionsergebnisse bereits auf eventuelle interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Gt hin untersucht werden. Zunächst wurden hierzu die HDV-Expressionsplasmide in humanen Hepatomzellen (Huh-7) transfiziert und nach Fixierung einem qualitativen Nachweis via Immunfluoreszenz (Abbildung 2a) sowie einem quantitativen Nachweis via ELISA (Abbildung 2b) unterzogen. In der Immunfluoreszenz in Abbildung 2a wurden die Zellkerne von Huh-7-Zellen mittels DAPI in blau sichtbar gemacht. Das HDAG wurde mittels eines Anti-HDAg-spezifischen Primärantikörpers gekoppelt, welcher aus dem Serum eines HDV/HBV-infizierten Patienten gewonnen wurde (siehe Tabelle 7). Es

wurde durch den verwendeten Sekundärantikörper hier in Rot angefärbt. Gut erkennbar ist hier, dass nach der Transfektion bei jedem der HDV Gt in einigen Zellkernen der Huh-7 Zellen HDAg nachweisbar war. Somit konnte jedes der hergestellten Konstrukte die Expression von HDAg in einzelnen Leberzellkernen herbeiführen.

Im ELISA wurde nun die Menge des intrazellulär produzierten HDAg aus den Transfektionsexperimenten bestimmt. Es handelt sich hierbei um einen direkten, nicht-kompetitiven Sandwich-Assay der Firma DiaSorin, bei dessen Durchführung nach Herstellerangaben vorgegangen wurde. In Abbildung 2b ist die gemessene $OD_{450-630}$ der Transfektionsansätze mit FuGene dargestellt. Die optische Dichte ist hierbei proportional zur Menge des exprimierten HDAg in den Zellen. Erkennbar ist, dass jeder der Gt in der Messung über dem Cut-Off-Wert liegt und somit in Hinblick auf die Expression von HDAg als positiv eingestuft werden kann. Es zeigt sich außerdem, dass bei Gt 7 in allen drei Ansätzen am meisten HDAg exprimiert wurde, gefolgt von Gt 4 und Gt 6. Am wenigsten HDAg ließ sich bei Gt 2 und 3 nachweisen.

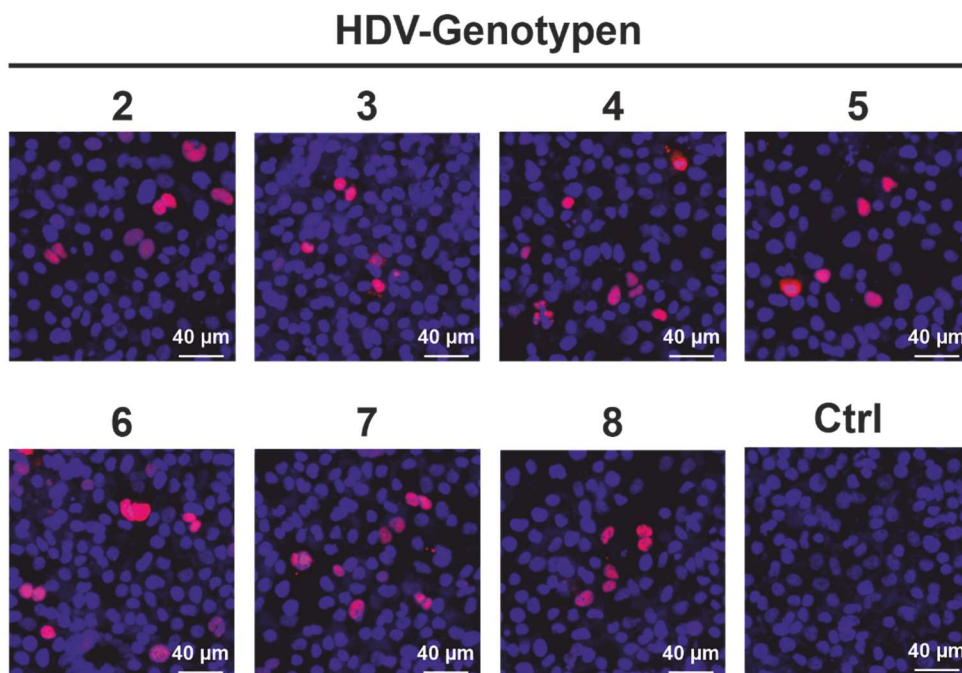
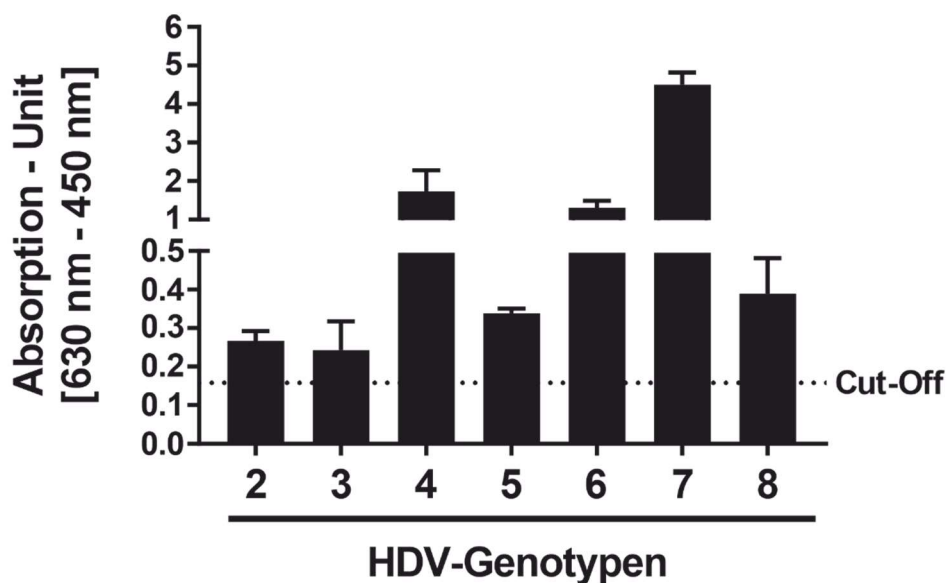
a**b**

Abbildung 2 – Nachweis der Expression von HDV in Huh-7 Zellen nach Transfektion mit den HDV-Expressionsplasmiden der Genotypen 2-8. Huh-7-Zellen wurden auf 48-Well-Platten ausgesät. Es folgte die Transfektion der Zellen mit vorab klonierten HDV-Expressionsplasmiden der Gt 2 bis 8. Für die Leerprobe wurde leeres pcDNA3.1(+) verwendet. Pro Well wurden 220 ng Plasmid-DNA mit 1 µl FuGene oder 1 µl Lipofectamine2000 (Daten nicht gezeigt) transfiziert. **a) Immunfluoreszenz** - Am 4. Tag wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Färbung des HDV (rot) erfolgte durch Inkubation der Zellen in Anti-HDV-IgG und in Alexa-568 gekoppeltem Anti-Human-IgG als Sekundärantikörper. Die Zellkerne sind durch DAPI-Färbung blau markiert. **b) ELISA** - Am 7. Tag wurden die Zellen lysiert. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben mit dem ETI-DELTA-2 Kit von DiaSorin durchgeführt. Die Wells sind mit Anti-Delta-IgG beschichtet und binden das HDV aus der Probe. Nach Inkubation im Sekundärantikörper wird mittels Substratlösung eine Farbreaktion ausgelöst, die im Photometer gemessen wurde. Die Messung erfolgte bei OD₄₅₀ und OD₆₃₀ nach 9 min Inkubation in der Substratlösung. Die Berechnung des Cut-Off-Wertes erfolgte ebenso gemäß der Herstellerangaben.

HDV besitzt nur einen offenen Leserahmen, welcher für zwei Proteine, das Small-Delta-Antigen (24 kDa) und das Large-Delta-Antigen (27 kDa) kodiert [14]. Der Nachweis der gesamten HDAg-Expression erfolgte bereits mittels IF und ELISA (siehe oben), welche allerdings nicht zwischen beiden genannten Isoformen unterscheiden können. Nun sollte mittels SDS-PAGE und Western Blot der spezifische Nachweis der Expression von S- und L-HDAg erfolgen. Weiterhin sollte hier die Kinetik der Expression dargestellt werden. Für SDS-PAGE und Western Blot wurden zunächst Huh-7-Zellen auf mehrere 6-Well-Platten ausgesät und mit den HDV-Expressionsplasmiden transfiziert und inkubiert. Die Zellen der einzelnen Ansätze wurden dann an verschiedenen Tagen lysiert. Abbildung 3 zeigt das HDAg an Tag 4 und Tag 8 nach Transfektion im Vergleich. Bei allen transfizierten HDV Gt zeigten sich an beiden Tagen zwei Proteinbanden, eine etwas größer und die andere etwas kleiner als 25 kDa. Diese Proteinbanden konnten dem Small-Delta-Antigen mit 24 kDa und dem Large-Delta-Antigen mit 27 kDa Größe zugeordnet werden. Beta-Aktin als ubiquitär vorkommendes zelluläres Protein diene als Ladekontrolle. Die Beta-Aktin-Bande liegt bei 42 kDa. Erkennbar ist, dass alle HDV-Expressionsplasmide 2-8 zur Expression beider Formen des HDAg imstande sind. Auffällig ist die Proteinbandenlokalisierung bei Gt 3. Die beiden Formen des HDAg scheinen kleiner als bei den anderen Gt: L-HDAg liegt auf Höhe der 25 kDa-Marke und S-HDAg deutlich darunter bei ~23 kDa. Bei Gt 8 erscheint das L-HDAg ebenfalls kleiner als 27 kDa und liegt auf Höhe der 25 kDa-Marke. Mit Ausnahme von Gt 7 erkennt man bei allen Gt eine Zunahme der Stärke der L-HDAg Bande von Tag 4 zu Tag 8. Bei Gt 2, 4, 6 und 7 ist eine Abnahme der Bandenstärke des S-HDAg von Tag 4 zu Tag 8 erkennbar. Bei Gt 5 kommt es zu einer Zunahme der Bandenstärke sowohl des S-HDAg als auch des L-HDAg im zeitlichen Verlauf. Gt 6 und Gt 4 zeigen nur ein schwaches Signal für L-HDAg bei starker Ausprägung der S-HDAg Proteinbande. Gt 6 und 7 weisen an Tag 8 eine schwächere Aktin-Bande auf als an Tag 4. Zudem weist die L-HDAg-Bande des Gt 7 an Tag 8 ein schwächeres Signal auf als an Tag 4.

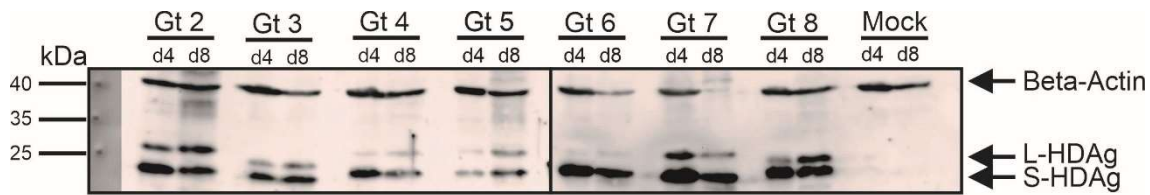


Abbildung 3 – S- und L-HDAg nach Größe aufgetrennt im Western Blot; 4 und 8 Tage nach Transfektion von Huh-7 mit den HDV-Expressionsplasmiden der Genotypen 2-8. Huh-7 wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und mit je 3,25 µg HDV-Expressionsplasmid der Gt 2-8 und 15 µl FuGene pro Well transfiziert. Für die Leerprobe (Mock) wurden die Zellen mit leerem pcDNA3.1(+) transfiziert. Es folgte die Inkubation im Brutschrank über mehrere Tage bei regelmäßigem Mediumwechsel. An Tag 4 (d4) und an Tag 8 (d8) wurde je einer der Ansätze einer TRIzol-Aufreinigung unterzogen. Die Protein-Phase wurde der SDS-PAGE und Western Blot zugeführt. Der Nachweis erfolgte mittels eines anti-HDV Primärantikörpers und eines anti-human HRP-konjugierten Sekundärantikörpers. Als Ladekontrolle wurde Beta-Aktin mittels eines anti-Aktin Primärantikörpers und eines Anti-Maus HRP-konjugierten Sekundärantikörpers nachgewiesen. Gt 2-8: HDV Gt 2 bis 8. kDa: Kilodalton. S-HDAg: Small-Delta-Antigen, 24 kDa. L-HDAg: Large-Delta-Antigen, 27 kDa. Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific).

4.3 ERZEUGUNG REKOMBINANTER DELTAVIREN IN DER ZELLKULTUR

Nachdem in den oben aufgeführten Transfektionsexperimenten mit den HDV-Expressionsplasmiden die Synthese von L- und S-HDAg in humanen Leberzellen bei allen sieben Gt in vitro nachgewiesen werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob die Konstrukte auch imstande sind, infektiöse HDV-Partikel zu erzeugen. Da HDV aus einer Hülle von Hepatitis-B-Oberflächenantigenen besteht [20, 124], ist zur Synthese funktionsfähiger Viren die Ko-Transfektion mit einem Expressionsplasmid für die HBV-Oberflächenproteine S-, M- und L-HBs notwendig. In diesem Falle wurde hierfür das Plasmid pCH9-200_LMS_3091_HBV verwendet, welches für die Oberflächenproteine des HBV Gt D3 kodiert. Zur Virusproduktion wurden erneut Huh-7-Zellen verwendet, die mit den HDV-Expressionsplasmiden der Gt 2-8 und pCH9-200_LMS_3091_HBV ko-transfiziert wurden. Im Verlauf wurde der virushaltige Zellkulturüberstand mehrfach gesammelt. Um die Viruskonzentration zu ermitteln wurde die virale RNA aus den Überständen gereinigt und eine qRT-PCR durchgeführt. Des Weiteren erfolgte eine HBsAg-Messung. Ein SEAP-Assay diente daneben der Vergleichbarkeit der einzelnen Ansätze. Bei Betrachtung der Abbildung 4a, welche die Konzentration des HBsAg aus den Zellkulturüberständen darstellt, fällt auf, dass bei HDV-5 am wenigsten HBsAg im Überstand nachgewiesen werden konnte. Bei HDV-3 und HDV-6 wurde dahingegen die größte Konzentration an HBsAg gemessen. Aus Abbildung 4b lässt sich entnehmen, dass bei allen transfizierten HDV-Konstrukten, HDV-Genome im Überstand nachweisbar

waren. Die geringste HDV-RNA-Konzentration findet sich bei HDV-4 mit $1,03 \times 10^6$ GE/ml und HDV-6 mit $1,93 \times 10^6$ GE/ml wohingegen HDV-7 mit $9,05 \times 10^6$ die höchste Viruskonzentration aufweist, gefolgt von HDV-8 mit $8,9 \times 10^6$ GE/ml. Die Mengenverteilung des nachweisbaren HBsAg im Zellkulturüberstand deckte sich dabei nicht mit der quantitativen Verteilung der gemessenen HDV-Genomäquivalente der einzelnen HDV Gt.

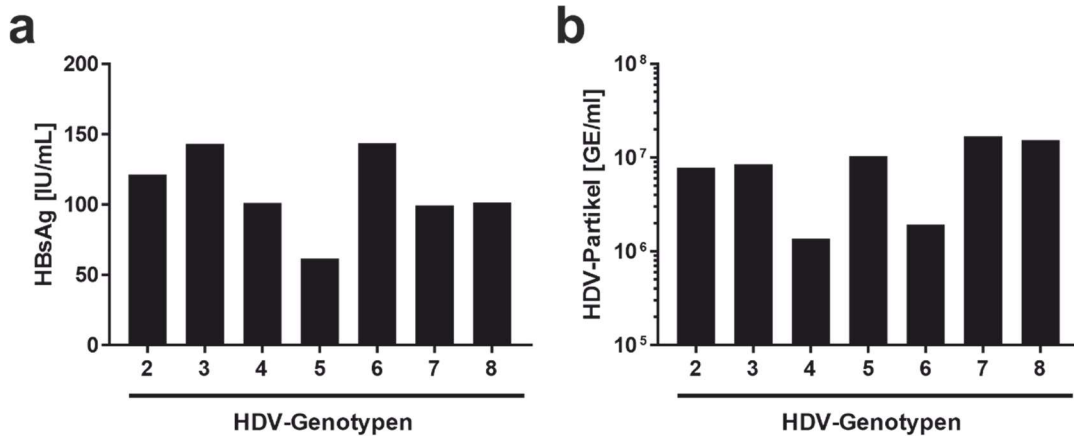


Abbildung 4 – Konzentration der HDV-Genomäquivalente und des HBsAg im Zellkulturüberstand nach Ko-Transfektion von HDV-Expressionsplasmid der Genotypen 2-8 mit pCH9-200_LMS_3091_HBV in Huh-7, normalisiert nach SEAP. Huh-7-Zellen wurden mit den HDV-Expressionsplasmiden der Gt 2-8 und pCH-9-200_LHBsHBV, welches für die Oberflächenproteine des HBV Gt D3 kodiert, ko-transfiziert. Die Zellkulturüberstände wurden mehrere Tage gesammelt und die virale RNA im Anschluss gereinigt. **a)** Quantitative Messung von HBsAg in den Zellkulturüberständen mittels vollautomatisiertem Architect assay (Abbott, Wiesbaden). **b)** Messung der HDV-Genomäquivalente mittels qRT-PCR und Normierung der Transfektionseffizienz mittels SEAP-Assay.

Nachdem mittels qRT-PCR der Nachweis von HDV-Genomäquivalenten in den Zellkulturüberständen erbracht wurde, sollte nun die Infektiosität jener Virusäquivalente auf Leberzellen genauer untersucht werden. Da HDV aus einer Hülle aus HBsAg besteht, benötigt es zum Eintritt in die Zelle, genau wie HBV, den NTCP als Rezeptor [269]. Für die HDV-Infektionsexperimente wurden daher HepG2-NTCP verwendet, eine Leberzelllinie, die den humanen NTCP auf ihrer Oberfläche stabil, aber induzierbar exprimiert. Die Expression des Rezeptors wurde durch Zugabe von Doxycyclin ins Zellkulturmedium induziert. Die Zellen wurden in 48-Well-Platten ausgesät. Zur Infektion wurden die Konzentrate der Zellkulturüberstände aus der Transfektion verwendet (siehe Kap. 3.7.3 und 4.3), deren HDV-Genomkonzentration vorab via qRT-PCR ermittelt wurde. Pro zu untersuchendem HDV Gt wurden die HepG2-NTCP je mit 10 GE/Zelle ($\sim 1 \times 10^6$ GE/Well), 50 GE/Zelle ($\sim 5 \times 10^6$ GE/Well) und 1000 GE/Zelle ($\sim 1 \times 10^8$ GE/Well) infiziert. Die Zellen wurden am neunten Tag nach der Infektion fixiert, gegen neu synthetisiertes intrazelluläres HDAg gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Immunfluoreszenzfärbung in Abbildung 5 zeigt, dass nach HDV-Infektion bei den Gt 2, 3, 5, 7 und 8 HDAg sicher in Leberzellen nachgewiesen werden konnte. Daraus lässt

sich schließen, dass die Infektionsversuche bei diesen HDV Gt erfolgreich waren und die Ko-Transfektion von Huh-7 mit pCH-9-200_LHBsHBV und den HDV-Expressionsplasmiden eine ausreichende Konzentration an infektiösen Viren hervorgebracht hat. Die im Vergleich größte Anzahl an infizierten Zellen fanden sich bei HDV-2 und -3 bei einer Infektion von 1000 GE/Zelle. Bei HDV-2, -3, -7 und -8 konnten bei den Infektionen mit 1000 GE/Zelle deutlich mehr infizierte Zellen nachgewiesen werden als bei Infektionen mit 50 oder 10 GE/Zelle. Bei HDV-5 konnten bei den Infektionen mit 1000 und 50 GE/Zelle ähnlich viele infizierte Zellen gefunden werden. Keine infizierten Zellen konnten dagegen nachgewiesen werden bei HDV-4 und HDV-6 in den Infektionsversuchen mit 1000 und 50 GE/Zelle. Hier konnten lediglich einzelne positive Zellen bei der Infektion mit 10 GE/Zelle nachgewiesen werden.

Anzumerken ist an dieser Stelle, dass aufgrund der zeitlichen Limitation der praktischen Laborarbeiten dieser Arbeit alle im Abschnitt 0 „Ergebnisse“ aufgeführten Daten auf nur einmalig durchgeführten Versuchen basieren. Um (insbesondere die quantitativen) Ergebnisse valide bewerten zu können, sollten zukünftige Daten stets aus mehrfach durchgeführten Versuchen erhoben werden. Da im Sinne des Umfangs dieser Arbeit vorwiegend auf die qualitative Ergebnisführung Wert gelegt wurde, wurde hier jedoch auf eine Wiederholung der Versuche verzichtet.

Inokulum [GE/Zelle]

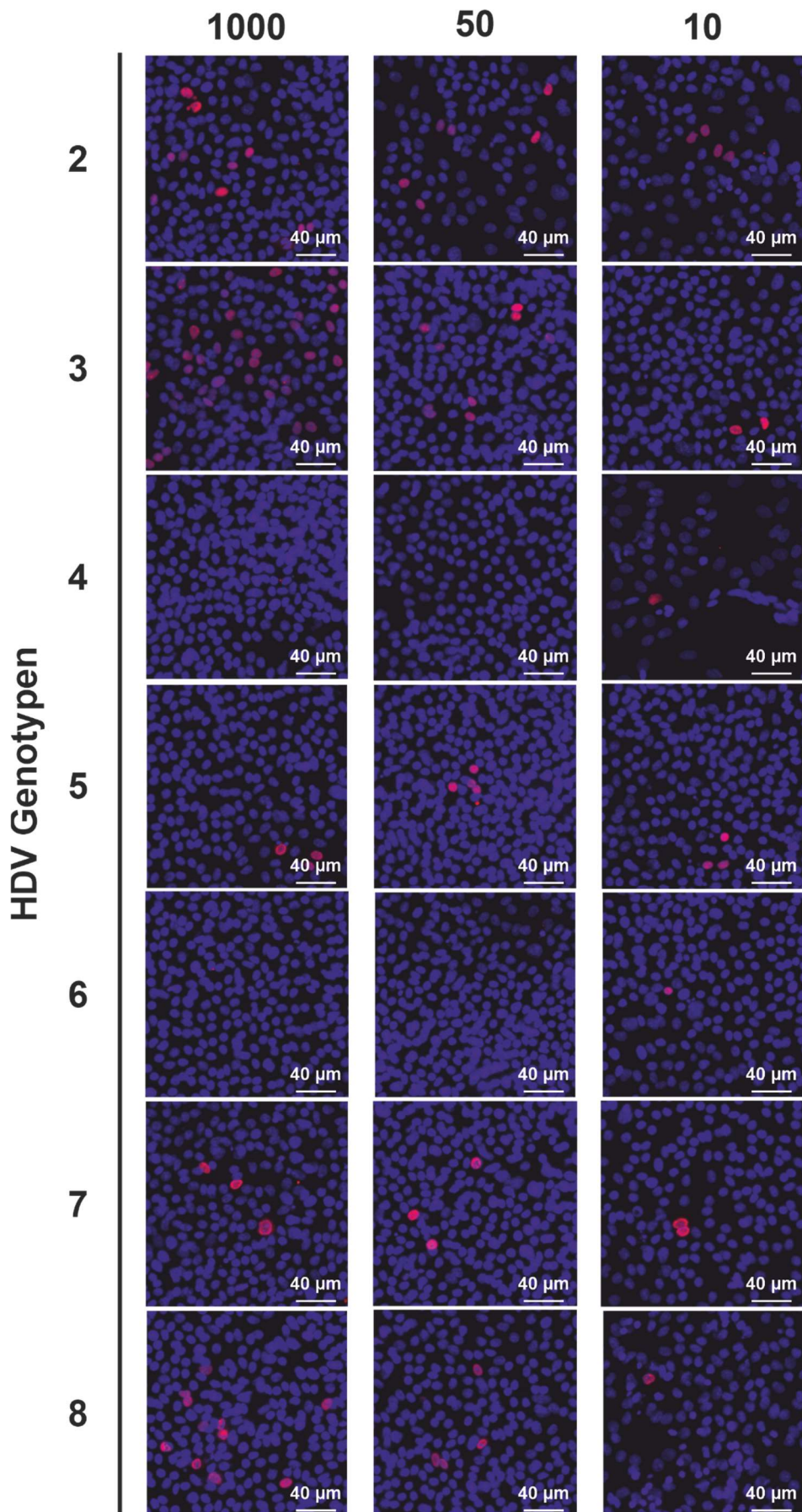


Abbildung 5 - Nachweis von HDaG in HepG2-NTCP nach Infektion mit HDV aus Konzentraten von Zellkulturüberständen. HepG2-NTCP-Zellen wurden auf 48-Well-Platten ausgesät. Zur Induktion der Expression des NTCP-Rezeptors auf der Zelloberfläche wurden die Zellen 48 h vor der Infektion in 2 % DMSO und 3 µg/ml Doxycyclin in HGM inkubiert. Die Infektion erfolgte mit HDV der Gt 2 bis 8, welche aus Zellkulturüberständen von Huh-7-Zellen gewonnen wurden, die vorab mit den Expressionsplasmiden für HDV und HBV-Oberflächenprotein ko-transfiziert wurden. Es wurden je 1×10^6 (~10 GE/Zelle) sowie 5×10^6 (~50 GE/Zelle) und 1×10^8 (~1000 GE/Zelle) Genomäquivalente pro Well eingesetzt. Die Zellen wurden am neunten Tag fixiert und permeabilisiert. Die Färbung des HDaG (rot) erfolgte mittels Anti-HDV-IgG aus humanem Serum und Alexa-568-gekoppeltem Anti-Human-IgG als Sekundärantikörper. Die DNA in den Zellkernen wurde durch DAPI-Färbung in blau sichtbar gemacht.

5 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung replikativer Expressionssysteme für das Hepatitis-D-Virus verschiedener Genotypen. Das heute in den meisten HDV-Studien verwendete Plasmid enthält die cDNA-Sequenz eines Isolats, welches HDV Gt 1 zugeordnet und bereits vor über 3 Jahrzehnten gewonnen wurde (pSVL(D3), [124]). Dementsprechend mangelte es auch 30 Jahre nach der Entdeckung von HDV nicht nur an Studien zu anderen Isolaten des Gt 1, sondern vor allem zu den übrigen Gt 2-8. Dieser Umstand ist keineswegs vernachlässigbar, denn HDV zählt zu den Viren mit überaus großer intra- und intergenotypischer Genom-Variabilität. So beträgt die Variabilität zwischen einzelnen HDV Gt mitunter 35 % und selbst innerhalb eines Gt bis zu 17 % [127]. Über die Konsequenzen dieser Variabilität, sowohl auf biologischer als auch auf klinischer Ebene, ist wenig bekannt. Mittlerweile liegen einige Studien vor, die einen Einfluss des infizierten HDV Gt auf die Krankheitsausprägung nahelegen. So scheint beispielsweise HDV-3 mit einer besonders schweren, fulminanten Form der Hepatitis einherzugehen [13, 36], während HDV-2 eher mit einer milderen Krankheitsausprägung vergesellschaftet ist [134, 229]. Auf Basis dieser Erkenntnisse sollte in dieser Doktorarbeit neben der Herstellung replizierender HDV-Expressionsplasmide der Gt 2-8 auch ein Vergleich jener Konstrukte u.a. hinsichtlich Antigenexpression und Infektionseffizienz erfolgen. Allen voran stand daher die Auswahl repräsentativer Isolate eines jeden Gt. Die hierfür betriebene Literaturrecherche führte zur Auswahl von sieben Isolaten, angehörig jeweils einem der Gt 2-8. Die Sequenzen wurden aus verschiedenen Ländern zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert und konnten verschiedenen Publikationen zugeordnet werden (siehe Tabelle 14). Die Klonierung der cDNA-Sequenzen in den Vektor pcDNA3.1 erfolgte auf Basis eines 2-stufigen Prozesses. So wurde zuerst das einfache Genom kloniert (Monomer) und mit dem entstandenen Konstrukt dann ein zweiter Klonierungsprozess angeschlossen. Im Ergebnis lag das HDV-cDNA-Genom in doppelter Ausführung im Vektor vor (Dimer). Dieser sog. *Tandem, oder head-to-tail repeat* des HDV-Genoms im Vektor ist notwendig, da die HDV-RNA *in vivo* zirkulär vorliegt und die Replikation mittels eines *rolling circle* Mechanismus vollzogen wird [49, 234]. Dabei werden RNA-Multimere generiert, die erst durch eine intrinsische Ribozym-Aktivität in Monomere geschnitten werden (siehe Kap. 1.1) [115]. Die Dimer-Klonierung wurde aufgrund der hohen Effizienz nach der *FastCloning* Methode von Li et al. durchgeführt [136]. Bis auf das Restriktionsenzym DpnI und die Polymerase zur Amplifikation von Vektor und Insert wurden keine zusätzlichen Enzyme wie Ligasen oder Restriktionsendonukleasen

beziehungsweise spezielle Kits zum Klonieren oder zur Gel-Aufreinigung benötigt. Der genaue Mechanismus, der der erfolgreichen Klonierung dieser Methode zugrunde liegt, ist noch nicht vollständig ergründet. Die Autoren selbst nehmen an, die 3'-Exonukleaseaktivität der verwendeten Polymerase generiere während des DpnI-Verdaus sog. *sticky ends* an den überhängenden Anteilen von Vektor und Insert. Dies führe dazu, dass sich das Insert in den Vektor einfüge. Die verbliebenen „Kerben“ zwischen Insert und Vektor würden dann womöglich während der Transformation geschlossen [136]. Nichtsdestotrotz, höchstwahrscheinlich führt die bloße Vereinfachung des gesamten Klonierungsprozesses mit Verminderung der Zwischenschritte und der benötigten Enzyme schon zu geringerer Fehleranfälligkeit und Erhöhung der Effizienz.

Ziel war es, dass die hergestellten Vollgenomplasmide die Replikation von HDV-RNA mit Synthese von S- und L-HDAg initiierten sowie in Ko-Transfektion mit dem Expressionsplasmid für S-, M- und L-HBs zur Bildung infektiöser rekombinanter Deltaviren führten. Der erste Hinweis auf eine stattfindende Replikation erfolgte über die Detektion von HDAg in transfizierten Huh-7 mittels Immunfluoreszenz und ELISA und konnte für alle sieben Gt bestätigt werden (Abbildung 2). Jedoch unterscheiden diese Nachweismethoden nicht zwischen den beiden Isoformen des HDAg. Als Beweis für eine erfolgte Replikation des HDV-Genoms dient in dieser Arbeit der Nachweis des L-HDAg, da das ADAR-1 Editing-Event zur Expression des L-HDAg ausschließlich an der ag-RNA vollzogen wird [37, 183]. So wird die g-RNA zwar kontinuierlich aus der cDNA des Expressionsplasmids synthetisiert, welches unter externer Promotorkontrolle steht. Die Synthese der ag-RNA allerdings erfolgt autonom mittels der zellulären RNA-Polymerase II und erfordert die g-RNA als Matrize (siehe Kap. 1.1) [72, 137]. Der differenzierte Nachweis von L-HDAg wurde daher mittels Western Blot erbracht und war ebenfalls positiv für alle 7 Isolate (siehe Abbildung 3). Zudem zeigt sich hier auch die für HDV typische Kinetik der Proteinexpression: im viralen Infektionszyklus kommt es zuerst zu einer Akkumulation von S-HDAg im Leberzellkern [45], bevor später auch L-HDAg in zunehmenden Maße exprimiert wird und die HDV-RNA-Replikation reduziert [40, 131]. In dieser Arbeit wurden die HDAg-Signale an Tag 4 und Tag 8 p.t. gemessen. Alle HDV Gt zeigten ein frühes Signal für S-HDAg und L-HDAg mit einer Zunahme des L-HDAg-Signals am Tag 8 (Ausnahme HDV-7: verfahrenstechn. Gründe aufgrund abgeschwächtem Beta-Aktin-Signal, s.u.) im zeitlichen Verlauf (Abbildung 3). Die Erkenntnisse über den HDV-Infektionszyklus bestätigten sich somit auch bei den in dieser Arbeit hergestellten HDV-Expressionskonstrukten Gt 2-8. In Übereinstimmung

konnte die HDAg-Kinetik auch in anderen Studien mittels Western Blot nachgewiesen werden. Entsprechend zeigten Harichandran et al. für HDV-1 deutlich detektierbare S-HDAg-Level an Tag 5 nach Transfektion und ansteigende L-HDAg-Level bis Tag 14 nach Transfektion (Vgl. Abb. 1D in [91]). Auch Ni et al. zeigten im Western Blot (ebenfalls für HDV-1) die Expression von S-HDAg bereits an Tag 3 nach Transfektion bei gleichzeitig geringer L-HDAg-Expression. Letztere nahm bis Tag 9 nach Transfektion kontinuierlich zu (Vgl. Abb. 1C in [161]). In einer weiteren Publikation von Wang et al. konnte der zeitliche Verlauf der HDAg-Expression auch für die übrigen HDV Gt verifiziert werden: S-HDAg wurde ab Tag 2 nach Transfektion deutlich ausgeprägt nachgewiesen, während L-HDAg erst im Verlauf bis Tag 12 nach Transfektion an Menge zunahm (Vgl. Abb. 2 in [248]).

Nachdem in dieser Arbeit die Proteinexpression als erster Nachweis der RNA-Replikation für alle Gt erbracht wurde, sollte im Anschluss auch die Sekretion und Infektiosität neuer rekombinanter Deltaviren belegt werden. Hierzu erfolgte nach Ko-Transfektion der HDV-Expressionsplasmide Gt 2-8 mit HBsAg-Expressionsplasmid des HBV Gt D3 eine RT-qPCR des gereinigten Zellkulturüberstandes (Abbildung 4). Schließlich wurden zudem Infektionsversuche durchgeführt, die bei fast allen Gt erfolgreich zur Infektion von HepG2-NTCP führten (Abbildung 5). In Zusammenschau der Ergebnisse kann somit folgende Aussage getätigt werden: Bei den meisten der in dieser Arbeit hergestellten HDV-Expressionsplasmide konnte eine Infektions-abgeleitete HDAg-Expression in Leberzellkernen nachgewiesen werden. Die Infektiosität der HDV Gt 4 und 6 konnte hierbei nicht abschließend geklärt werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass funktionsfähige HDV-Vollgenomplasmide der Gt 2-8 kloniert wurden, die imstande sind, *in vitro* rekombinante HDV-Partikel zu exprimieren.

Im allgemeinen Vergleich der Gt untereinander schien insbesondere HDV-7 in Zusammenschau der Transfektions- und Infektions-abgeleiteten HDAg-Expression durchweg effiziente Ergebnisse zu liefern:

Im ELISA wie auch im Western Blot zeigte HDV-7 das stärkste HDAg-Signal (siehe Abbildung 2 und Abbildung 3). Zwar ist im Western Blot an Tag 8 eine Abnahme der Bandenstärke sowohl für S- als auch L-HDAg zu verzeichnen, doch dies muss in Zusammenhang mit der schwachen Beta-Aktin-Bande für diesen Tag betrachtet werden (dies spricht für eine geringere Gesamtprotein-Auftragungsmenge). In der RT-qPCR konnte für HDV-7 die größte Menge an GE gemessen und auch in der folgenden Infektion konnten in allen Ansätzen HDAg-positive Leberzellkerne nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4 und Abbildung 5). Die hohe Menge an HDV-GE im

Zellkulturüberstand nach Ko-Transfektion mit HBsAg-Expressionsplasmid des HBV Gt D3 könnte in Zusammenhang mit der starken L-HDAg-Expression von HDV-7 stehen. So ist L-HDAg im HDV-Infektionszyklus maßgeblich für die Virusassemblierung: Es verfügt über ein *nuclear export signal* (NES) [131] und sorgt nach Verankerung am Endoplasmatischen Retikulum mittels seines C-Terminus für die Interaktion mit dem HBsAg [81, 122]. Erst mit dieser HBsAg-Hülle ist schließlich der Austritt aus der Zelle sowie die Reinfektion neuer Leberzellen möglich [122, 245]. Dieser Sachverhalt könnte ebenso die verhältnismäßig geringe Menge an GE im Zellkulturüberstand für Gt 4 und 6 erklären (Abbildung 4). Diese Gt zeigten zwar im ELISA nach HDV-7 die höchsten HDAg-Level (Abbildung 2), doch nach Differenzierung im Western Blot ein nur sehr schwaches Signal für L-HDAg (Abbildung 3). Somit könnte es auch bei suffizienter RNA-Replikation sowie Expression von S-HDAg zu einer mangelhaften Virusassemblierung und -freisetzung gekommen sein. Wang et al. verglichen in einem 2021 veröffentlichten Paper alle 8 HDV Gt u.a. hinsichtlich ihrer HDAg-Expression miteinander [248]. Interessanterweise lag HDV-7 nach Transfektion in Huh-7 in jener Studie hinter HDV-2, 3 und 8 deutlich zurück, was die L-HDAg-Expression anbelangte. So zeigten HDV-2, 3 und 8 bereits an Tag 2 sehr hohe Signale für L-HDAg, vergleichbare Level konnten bei HDV-7 erst an Tag 8 bis 10 gemessen werden (Vgl. Abb. 2 in Wang et al. [248]). Doch auch in meiner Arbeit exprimierten HDV-2, 3 und 8 nach HDV-7 relativ hohe Level an L-HDAg, die Signale sind bereits an Tag 4 deutlich sichtbar und steigen bis Tag 8 weiter an (Abbildung 3). Auffällig ist, dass Gt 4 und Gt 6 auch in der Studie von Wang et al. verglichen mit den übrigen Gt nur geringe bzw. spät ansteigende L-HDAg-Level aufzeigen, bei gleichzeitig früh und stark ausgeprägten Signalen für S-HDAg (Vgl. Abb. 2 in Wang et al. [248]). Obwohl Wang et al. andere Isolate verwendeten, zeigen die Ergebnisse starke Ähnlichkeit mit denen aus meiner Arbeit. Im Western Blot sind die Banden für L-HDAg bei Gt 4 und 6 sowohl an Tag 4 als auch an Tag 8 ebenfalls nur sehr schwach ausgeprägt, während insbesondere bei Gt 6 ein vergleichsweise starkes S-HDAg-Signal erkennbar ist (Abbildung 3). Da in dieser Doktorarbeit die HDAg-Level nur bis Tag 8 p.t. gemessen wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es im weiteren zeitlichen Verlauf ähnlich wie bei Wang et al. zu einem Anstieg der L-HDAg-Level gekommen wäre. Nichtsdestotrotz scheinen diese Ergebnisse ein starker Hinweis darauf zu sein, dass die Kinetik der L-HDAg-Expression bei HDV-4 und HDV-6 a) verzögert bzw. insuffizient abzulaufen und b) eher genotyp- als isolat-spezifisch zu sein scheint. Um diese Annahme weiter zu verifizieren benötigt es jedoch mehr Vergleichsstudien mit weiteren Isolaten aller HDV Gt. Die Ursachen für die Unterschiede in der L-HDAg-Expression können vielfältig ausfallen. Da die Transfektionen für den

Western Blot unter Ausschluss von HBV erfolgten, kann zumindest eine Einflussnahme der HBV-Replikation oder -Proteine auf die Replikation von HDV bzw. die Expression des HDAg ausgeschlossen werden. Weiterhin scheint die Quantität der S-HDAg-Expression bei HDV-4 und 6 ähnlich derer der übrigen Gt bzw. zumindest nicht deutlich geringer zu sein (Abbildung 3). Daher könnte eine Ursache der veränderten Proteinkinetik im ADAR-1-Editing der ag-RNA vermutet werden, welches obligat für die Expression von L-HDAg ist. Mehrere Studien belegen, dass die Sekundärstruktur der RNA maßgeblich für die Bindung der ADAR-1 ist. Für HDV-1 betrifft das v.a. das A-C-Mismatch zwischen Position 1012 und 580 sowie die Basenpaarungen ca. 25 nt um diese Editierstelle herum (insbesondere nt 1008-1016 mit nt 576-584) [35, 212]. Doch wie bereits erwähnt, weisen die einzelnen HDV-Genome eine hohe intergenotypische Variabilität von bis zu 35% auf [127]. Dass diese Unterschiede in der Primärstruktur auch Auswirkungen auf die Ausbildung der Sekundärstruktur und somit auf die Editing-Effizienz haben könnten, steht außer Frage. Beispielsweise zeigte die Arbeitsgruppe um Hsu, Syu et al., dass in HDV-2 die o.g. Strukturmerkmale, die für HDV-1 als essentiell für das Editing identifiziert wurden, stark abweichen. Entscheidende Basenpaarungen in der Sekundärstruktur wurden für HDV-2 nicht ausgebildet. Übereinstimmend dazu war die Editing-Effizienz des HDV-1 um das 2,2-fache höher als die des HDV-2. Auch im Hinblick auf die L-HDAg-Expression lag Gt 2 deutlich hinter Gt 1 zurück, während bei der Expression des S-HDAg keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden [100]. Da diese Studie keine weiteren HDV Gt miteinbezog, fehlt der Vergleich der Editing-Effizienz mit den übrigen HDV Gt. Le Gal et al. beschreiben in einer 2017 durchgeführten Analyse von über 2000 HDV-Isolaten, dass die A-C-Mismatch-Stelle bei HDV-4, 6 und 8 fehle und bei HDV-3 und 7 gestört sei. Zudem bestünden multiple Schleifen und Ausbuchtungen in dem Bereich um die Editierstelle herum, die die Ausbildung der für das Editing notwendigen Basenpaarungen verhindere [127]. Welche Auswirkungen diese Änderungen in der Sekundärstruktur auf die L-HDAg-Expression bei diesen Gt nehmen, bleibt in jener Studie offen. Es ist anzunehmen, dass die besagten Gt alternative Strukturmerkmale besitzen um die Bindung von ADAR-1 zu gewährleisten. In Zusammenschau mit den Ergebnissen aus dieser Doktorarbeit könnte jedoch in Betracht gezogen werden, dass die zu HDV-1 abweichenden Strukturmerkmale bei HDV-4 und 6 zu einer (im Vgl. zu den übrigen Gt) verminderten L-HDAg-Expression führen. Im Umkehrschluss könnte es bei HDV-7 zu einer relativ hohen L-HDAg-Expression gekommen sein, da bislang unbekannte alternative Strukturmerkmale zu einer besseren Bindung der ADAR-1 an die HDV-RNA führten. Da HDV-7 in der Publikation um Wang et al. im Vgl. zu den übrigen Gt jedoch deutlich geringere L-HDAg-Level exprimierte (Abb.

2 in [248]), kann derzeit nicht auf eine Genotyp-spezifische Veranlagung geschlossen werden. Womöglich sind die Unterschiede auf spezielle Eigenschaften des jeweiligen Isolates zurückzuführen. Leider fehlt es bislang an weiteren Studien zu diesem seltenen Gt, um die Ergebnisse weiter verifizieren zu können. Bei Betrachtung des HDAg-Aminosäurealignments in Abbildung 1 ist auffällig, dass die Aminosäuren (AS), an denen posttranslationale Modifikationen (PTM) stattfinden, in allen Isolaten stark konserviert sind. Die Existenz dieser AS in der HDAg-Sequenz ist essentiell, da die daran stattfindenden PTM für zahlreiche Funktionen im HDV-Infektionszyklus bedeutsam sind [104]. Eine Ausnahme bildet jedoch T182 bei HDV 4 und 8. Das Threonin an dieser Position ist in den übrigen Gt konserviert und wird posttranslational phosphoryliert [47]. Bei Gt 4 befindet sich an dieser Stelle jedoch die AS Arginin und bei Gt 8 die AS Histidin (siehe Abbildung 1). Die funktionelle Relevanz der Phosphorylierung speziell an dieser Stelle in der HDAg-Sequenz ist nicht vollständig verstanden. Derzeit ist lediglich bekannt, dass das Enzym PKR (*Double-stranded RNA-activated protein kinase R*) die posttranslationale Phosphorylierung an dieser Position im HDAg vermittelt [47]. Im Allgemeinen scheinen Phosphorylierungen am HDAg wesentlichen Einfluss auf die HDV-RNA-Replikation zu nehmen. So wurde bereits beobachtet, dass unter Einfluss von Kinase-Inhibitoren, welche u.a. die Aktivität der phosphorylierenden Enzyme CKII und PKC beeinflussen, der Phosphorylierungsgrad des HDAg signifikant abnahm und dies wiederum die HDV-Replikation beeinträchtigte [271]. Diese Daten könnten somit ein Hinweis darauf sein, dass eine fehlende Phosphorylierung, z.B. bei Mutation an T182, wie hier bei HDV 4 und 8 (Abbildung 1), zu einer insuffizienten HDV-RNA-Replikation führen könnte. Jene insuffiziente RNA-Replikation könnte für die geringere Konzentration an sekretierter HDV-RNA des HDV Gt 4 verantwortlich sein, konnte jedoch nicht bei HDV Gt 8 beobachtet werden (Abbildung 4). Die Rolle der Phosphorylierung im HDV-Infektionszyklus speziell an T182 bleibt jedoch bislang unklar. Da T182 über die meisten Gt konserviert ist, scheint eine funktionelle Relevanz aber zumindest naheliegend. Einigen wenigen konservierten AS, an denen posttranslationale Phosphorylierungen stattfinden, konnten allerdings bereits spezifische Funktionen im HDV-Infektionszyklus zugeordnet werden. Beispielsweise scheint die Phosphorylierung an S177, vermittelt durch ERK 1/2, die Replikation von agRNA zu gRNA sowie die Interaktion mit der RNAP II zu beeinflussen [50]. Bei Mutation von S177 kommt es aufgrund dessen auch zu einer verminderten Expression von L-HDAg [152]. Ähnliche Ergebnisse liegen auch für die Methylierung an R13 und die Acetylierung an K72 vor [240]. Diese AS sind in allen in dieser Arbeit verwendeten Isolaten konserviert, so auch in HDV 4 und HDV 6, und können daher nicht die Erklärung für die geringe L-HDAg-

Expression dieser beiden Gt sein (Abbildung 3).

In dieser Arbeit weiterhin auffällig ist die geringere Größe des L-HDAg bei Gt 3 und 8 (~25 kDa). In zahlreichen Studien wurde belegt, dass S-HDAg eine Größe von 24 kDa und L-HDAg eine Größe von 27 kDa einnimmt [14, 258]. Zwar ist bereits beschrieben, dass das L-HDAg des Gt 4, 6 und 7 aus 213 AS statt der üblichen 214 AS besteht [127], was auch für die in dieser Arbeit verwendeten Isolate zutreffend ist (Abbildung 1). Doch dazu, dass das L-HDAg in einer geringeren Größe als üblich vorkommt, liegt derzeit keine Literatur vor. Auch im Vergleich mit Abb. 2 in Wang et al. [248] kann die geringere L-HDAg-Größe für die Gt 3 und 8 nicht bestätigt werden. Begründet werden könnte diese Auffälligkeit mit einer variablen Ausprägung von posttranslationalen Modifikationen bei diesen Isolaten. Aus dem Alignment in Abbildung 1 ist ersichtlich, dass zumindest HDV 8 an Position 183 statt der AS Threonin, an welcher eine posttranslationale Phosphorylierung stattfindet [84, 104], die AS Histidin besitzt. Dass PTM, im speziellen auch Phosphorylierungen, Auswirkungen auf die Proteinbewegung im Western Blot nehmen, ist mehrfach beschrieben [96, 110, 222]. Dass das Fehlen einer einzelnen Phosphorylierung im Protein das (scheinbare) Molekulargewicht jedoch so weit beeinflusst, dass es im Western Blot sichtbar wird und zu einer Abweichung um ~ 2 kDa führt, ist zumindest fraglich. Zudem zeigte auch das L-HDAg des HDV 3 im Western Blot eine geringere Größe (Abbildung 3), und für dieses Isolat scheinen alle AS, die für PTM notwendig sind, konserviert zu sein (Abbildung 1). Und auch im hier verwendeten Isolat des HDV 4 ist die Position T183, ebenso wie bei HDV 8, nicht konserviert und weist stattdessen die AS Arginin auf (Abbildung 1). Das L-HDAg des HDV 4 zeigt im Western Blot jedoch anders als das des HDV 8 die erwartbare Größe von 27 kDa (Abbildung 3). Schlussendlich scheint die abweichende Größe des L-HDAg bei HDV 3 und 8 nicht zu einer beeinträchtigten Virusassemblierung und -freisetzung geführt zu haben (Abbildung 4). Auch in den Infektionsversuchen lieferten beide Gt stabile Ergebnisse (Abbildung 5).

Die Menge an HDV-GE im Zellkulturüberstand sowie die Infektionsergebnisse (Abbildung 4 und Abbildung 5) können nicht isoliert auf die L-HDAg-Expression zurückgeführt werden. Diese Ergebnisse müssen auch in Zusammenschau mit dem HBV Gt betrachtet werden, dessen Hüllproteine ko-transfiziert wurden. Wie bereits erwähnt, kodiert das HDV-Genom nur für die beiden Isoformen des HDAg und ist nicht imstande, eigene Hüllproteine auszubilden [258]. Für den Austritt aus der Zelle sowie die Reinfektion neuer Leberzellen ist es daher *in vivo* auf die Präsenz von HBV in der gleichen Zelle angewiesen [122, 245]. Das L-HDAg interagiert mittels seines C-Terminus mit einem konservierten Bereich der S-Domäne innerhalb des S-, M- und L-HBs,

wodurch daraufhin eine Hülle um das HDV-RNP gebildet wird [81, 122]. Da HDV ansonsten autonom repliziert [80], wurde in dieser Arbeit zur Vermeidung etwaiger Störfaktoren auf die Ko-Transfektion eines HBV-Vollgenoms verzichtet und lediglich ein Expressionsplasmid für das S-, M- und L-HBsAg des HBV Gt D3 ko-transfiziert (siehe Kap. 3.7.2.2). Zusammenfassend ist die Konzentration an HDV-GE im Zellkulturüberstand wie auch die Infektiosität der rekombinanten Deltaviren maßgeblich abhängig von der Interaktion zwischen L-HDAg und HBsAg. Die Arbeitsgruppe um Freitas et al. zeigte in einer 2014 veröffentlichten Studie, dass die Hüllproteine aller 9 HBV Gt A bis I imstande sind, Assemblierung, Sekretion und Infektiosität für HDV-1 zu unterstützen. Allerdings wurden signifikante Unterschiede in Bezug auf die Infektionseffizienz festgestellt, was nahelegt, dass die HBV-Hüllproteine einen wesentlichen Einfluss auf die HDV-Infektiosität nimmt. Die Hüllproteine des HBV Gt D, welcher auch in dieser Arbeit verwendet wurde, unterstützte bei Freitas et al. die HDV-Infektiosität von allen getesteten HBV-Gt durchschnittlich am besten, gefolgt von Gt B, E und A [75]. Es kann also zunächst davon ausgegangen werden, dass der in dieser Arbeit verwendete HBV Gt D3 die Assemblierung, Sekretion und die Infektiosität der hier zu testenden HDV Gt am effizientesten unterstützte. Nichtsdestotrotz lassen sich Daten, die HDV-1 betreffen, aufgrund der o.g. genomischen Variabilität nicht ohne weiteres auf die übrigen Isolate oder gar ganze HDV Gt übertragen. In dieser Arbeit wurde zunächst die Menge sezernierter HDV-GE im Zellkulturüberstand mittels RT-qPCR gemessen (Abbildung 4). Hierbei konnte festgestellt werden, dass mit Ausnahme von HDV-4 und 6 alle Gt ähnlich viele rekombinante Deltaviren sezernierten. HDV-4 und 6 konnten auch in den Infektionsversuchen im Vergleich zu den übrigen Gt nur wenige Zellen infizieren, sodass deren Infektiosität nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte, obwohl stets die gleiche Konzentration an HDV-RNA-GE / Zelle eingesetzt wurde. Begründen könnte dies einerseits eine Art inhibitorische Wirkung von Nebenprodukten im gereinigten Viruskonzentrat. Aufgrund der geringeren Konzentration von HDV-GE / ml musste bei diesen Gt nämlich ein höheres Volumen des Konzentrats eingesetzt werden, um die entsprechende Konzentration an HDV-RNA-GE / Zelle für die Infektion zu erreichen. Dadurch könnte auch erklärt werden, warum bei diesen Gt der Infektionserfolg nur bei der niedrigsten eingesetzten Konzentration von 10 GE / Zelle detektierbar war. Weiterhin muss bedacht werden, dass in der vorangegangenen qRT-PCR lediglich HDV-RNA quantifiziert wurde und nicht garantiert werden konnte, dass es sich hierbei tatsächlich um intakte HDV-RNP mit HBsAg-Hülle handelt. „Nackte“ HDV-RNA könnte beispielweise aus zerstörten Leberzellen in den Zellkulturüberstand gelangt sein und somit von der RT-qPCR miterfasst werden. Dadurch könnte sich die bei den Infektionsversuchen

tatsächlich eingesetzte Menge an rekombinanten Viren / Zelle von denen der anderen Gt unterscheiden. Die Anwesenheit, bzw. das Verhältnis von HDV-Virionen, freien HDV-RNPs und freier HDV-RNA im Überstand der Zellen könnte man in nachfolgenden Versuchen durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation der HDV-haltigen Überstände zeigen. Dennoch ist es in Zusammenschau mit der geringen L-HDAg-Expression sowie der geringen Menge an HDV-GE im Zellkulturüberstand naheliegend, dass geringe Infektionsergebnisse eher nicht in verfahrenstechnischen Ursachen begründet liegen. Weitaus wahrscheinlicher scheint eine genotyp- bzw. isolatspezifische Varianz im Hinblick auf die L-HDAg-Expression allein oder in Kombination mit der HBV-Pseudotypisierung. Ein weiterer Hinweis für eine mangelhafte Virusassemblierung könnte die Diskrepanz zwischen HDV-GE und HBsAg im Zellkulturüberstand sein: Bei HDV-4 und insbesondere HDV-6 konnten trotz geringer Mengen an HDV-Partikeln verhältnismäßig hohe Mengen an HBsAg gemessen werden. Demgegenüber wurde jedoch in mehreren klinischen Studien gezeigt, dass die HDV-Virämie positiv mit den HBsAg-Leveln im Blut korreliert [31, 275]. Zudem konnten Shih, et al. in *in vitro* Studien nachweisen, dass die Assemblierung von HDV-1, 2 und 4 wesentlich von der HBsAg-Expression abhängig ist. So wurde durchweg eine erhöhte Menge sezernierter HDV-Partikel gemessen, sobald eine vermehrte HBsAg-Expression gewährleistet wurde [217]. Womöglich wurden bei HDV Gt 4 und 6 in dieser Arbeit vermehrt HBsAg sezerniert, sog. SVPs (subvirale Partikel), da die Interaktion zwischen L-HDAg und HBsAg mangelhaft war. Dies könnte auf die generell niedrigere Expression von L-HDAg bei diesen beiden Isolaten zurückzuführen sein (Abbildung 3). Auf der anderen Seite spielt aber auch die HBV-Pseudotypisierung eine entscheidende Rolle für Assemblierung, Sekretion und Infektiosität (s.o.). Ähnlich wie Freitas, et al. [75] konnte die Arbeitsgruppe um Wang et al. zeigen, dass die Infektiosität von HDV-1 am besten unterstützt wurde bei Umhüllung mit HBsAg des HBV-B, D und E (Vgl. Abb. 4 in [248]). Allerdings unterschieden sich diese Ergebnisse deutlich von den übrigen getesteten HDV Gt. Grundsätzlich wurde in der o.g. Arbeit die Infektiosität aller HDV-Isolate bei Umhüllung mit HBsAg des HBV Gt B am besten unterstützt. Bei Umhüllung mit HBsAg des HBV-D konnte insbesondere bei HDV-3 und 8 eine hohe Anzahl infizierter Zellen in der IF bzw. im ELISA nachgewiesen werden. Für HDV-4 jedoch erbrachte die Pseudotypisierung mit HBV-D verglichen mit derjenigen der übrigen HBV Gt die zweitschlechteste Infektionseffizienz (Vgl. Abb. 4 in [248]). Auch in dieser Doktorarbeit infizierte das HDV-4 Isolat, pseudotypisiert mit HBV-D3, nur wenige HepG2-NTCP Zellen und das auch nur in der niedrigsten verwendeten Konzentration von 10 GE / Leberzelle, sodass die Infektiosität dieses Isolats nicht gesichert ist. Dahingegen infizierten die hier

verwendeten Isolate von HDV-3 und 8 in allen Versuchsansätzen deutlich mehr Leberzellen (Abbildung 5). In Zusammenschau dessen könnte die HBV-Pseudotypisierung die hier gewonnenen Ergebnisse der Infektionsversuche zumindest für HDV-4 erklären. Womöglich hätte eine Pseudotypisierung mit HBV-B, C oder E zu besseren Infektionsergebnissen geführt (Vgl. Abb. 4 in [248]). Ähnliche Schlussfolgerungen können auch für HDV-6 herangezogen werden, welcher in dieser Doktorarbeit ähnlich wenige Zellen infizierte wie HDV-4 (Abbildung 5). Nach den Ergebnissen aus Wang et al. führte eine Pseudotypisierung von HDV-6 mit HBV-B, E, C, G oder A zu deutlich mehr HDAg-positiven Leberzellen in der Infektion als jene mit HBV-D. Nichtsdestotrotz, vergleicht man lediglich die Infektionsergebnisse unter HBV-D-Pseudotypisierung miteinander, so infizierte HDV-6 ähnlich viele Zellen wie HDV-7 und zudem deutlich mehr als HDV-5, 2 und 4 (Vgl. Abb. 4 in [248]). Die Infektionsergebnisse unter HBV-D-Pseudotypisierung unterscheiden sich, zumindest betreffend HDV-6, in weiten Teilen von denen aus dieser Doktorarbeit. Zwar sind die Resultate sowohl aus dieser als auch aus der Arbeit um Wang et al. keineswegs repräsentativ für die Gesamtheit des jeweiligen HDV Gt, da jeweils nur mit einem einzelnen Isolat gearbeitet wurde. Dennoch scheinen die in dieser Doktorarbeit gewonnenen Ergebnisse für HDV-6, zumindest nicht ausschließlich, in der HBV-Pseudotypisierung begründet zu sein. Konsistent sind die Ergebnisse jedoch im Hinblick auf HDV-4: In der Arbeit von Wang et al wurde auch unter Pseudotypisierung mit HBV-B von allen 8 HDV Gt am wenigsten Viruspartikel im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Des Weiteren konnten in darauffolgenden Infektionsversuchen in Huh-7-NTCP auch unter äquivalenter MOI bei HDV-4 am wenigsten HDAg-positive Zellen detektiert werden (Vgl. Abb. 5 und 6 in [248]). Auch in dieser Doktorarbeit wurde in der RT-qPCR bei HDV-4 die geringste Menge an GE / ml Zellkulturüberstand gemessen (Abbildung 4), zudem infizierte HDV-4 von allen getesteten Gt neben HDV-6 die wenigsten Leberzellen (Abbildung 5). Die Ergebnisse legen nahe, dass HDV-4 womöglich unabhängig von der HBV-Pseudotypisierung a) generell geringere Virustiter ausbildet und b) unabhängig dessen eine geringere Infektiosität besitzt als andere HDV Gt. Zur Unterstreichung dieser Ergebnisse müssen jedoch weitere Studien mit mehr HDV-Isolaten der Gt 4 und 6 erfolgen. Es finden sich auch klinische Parallelen zu den hier erhaltenen *in vitro* Ergebnissen. In einer 2006 durchgeführten Studie konnten Wu et al. zeigen, dass eine Infektion mit HDV-4 (ehemals HDV-2b) mit einer vergleichsweise mildereren Krankheitsausprägung einhergeht [263]. Womöglich steht dieser Umstand in Zusammenhang mit einer geringeren Replikations- sowie Reinfektionsrate für HDV-4, ähnlich wie es die Ergebnisse aus dieser Doktorarbeit und aus Wang et al. [248] nahelegen. Zudem könnte auch das L-HDAg eine Rolle

spielen. In dieser Doktorarbeit wurden im Western Blot relativ geringe L-HDAg-Signale für HDV-4 detektiert (Abbildung 3). Auch bei Wang et al. stiegen die L-HDAg-Level bei HDV-4 (und HDV-6 und 7) später an als die der übrigen HDV Gt und zeigten zudem insgesamt eine schwächere Signalstärke (Vgl. Abb. 2 in [248]). Diese Ergebnisse deuten auf eine geringe bzw. insuffiziente L-HDAg-Expression bei HDV-4 im Vergleich zu den übrigen HDV Gt hin. Erkenntnisse aus zahlreichen Studien bezeugen, dass insbesondere das L-HDAg in den Zellzyklus einzugreifen scheint. So kann es durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und der Aktivierung des NF-kappa-B-Signalwegs ER-Stress induzieren [260]. Weiterhin fördert es den fibrotischen Umbau der Leber, indem es den TGF- β -Signalweg aktiviert [51]. Zudem führt es durch Aktivierung des SRF-Signalwegs zur Expression von Proto-Onkogenen und wirkt somit potenziell kanzerogen [83]. Zusammenfassend könnte eine verminderte L-HDAg-Expression, wie es hier für HDV-4 beobachtet wurde, zu einem günstigeren klinischen Verlauf führen, so wie es 2006 von Wu et al. [263] gezeigt wurde. Die hier verwendete Sequenz von HDV-6 wurde in der Originalpublikation von Andernach et al. aus der Blutprobe eines nigerianischen Patienten isoliert. Dort wurde festgestellt, dass die Viruslast von HDV-6 im Vergleich geringer ausfiel als bei den anderen untersuchten Gt [10]. Auch in dieser Doktorarbeit wurde für HDV-6 neben HDV-4 die geringste Menge an Viruspartikel im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Diese Beobachtung deckt sich somit zwar mit den Ergebnissen von Andernach et al. [10], dennoch liefert die Publikation keine Auskunft über die klinische Relevanz der verminderten Viruslast. Leider fehlt es bislang an repräsentativen Daten über den klinischen Verlauf und die Krankheitsmerkmale einer Infektion mit den eher selten diagnostizierten HDV Gt 5-8. Eine bessere Datenlage besteht für die Gt 1-3. So scheint HDV-2 ähnlich wie HDV-4 eher mit einem milderen Krankheitsverlauf vergesellschaftet zu sein [100, 229, 266], während HDV-3 eher zu fulminanter Hepatitis und Tod führt [13, 36]. Diese klinische Beobachtung lässt sich mit den aktuellen Daten der *in vitro* Studien aus dieser Doktorarbeit nicht abschließend begründen, zumal es sich nicht um eine HDV-Koinfektion mit HBV, wie *in vivo*, handelte.

6 AUSBLICK

Eine HDV/HBV-Koinfektion geht vermehrt mit einer schwereren Erkrankungslast einher als eine HBV-Monoinfektion. Sie führt häufiger zu Leberzirrhose, zum hepatozellulären Karzinom und zu Leberversagen [69, 70, 163, 199]. Jüngste Meta-Analysen gehen in ihren Schätzungen über die Prävalenz von HDV-Infektionen bei HBV-Trägern zum Teil weit auseinander, so wurde eine Spanne von 12 bis 72 Mio. HDV-Infizierten angegeben [48, 150, 226]. Diese Diskrepanz in der Prävalenz-Schätzung lässt sich vor allem dadurch erklären, dass gemeinhin von einer hohen Dunkelziffer ausgegangen wird. Jene Dunkelziffer ist nicht zuletzt darin begründet, dass die Detektion einer HDV-Infektion mit den bisher etablierten PCR-Systemen leider oft lückenhaft ist [29, 203]. Ursächlich dafür ist allen voran die ausgeprägte genomische Variabilität zwischen den einzelnen HDV Gt, die bis zu 35 % erreichen kann. HDV-3 weist hierbei die größte Sequenz-Variabilität im Vergleich zu den übrigen Gt auf [127]. Insbesondere in Afrika, wo unter anderem die selteneren Gt 5-8 kursieren, sind HDV-Infektionen unterdiagnostiziert [128]. Die Detektion einer HDV-Koinfektion ist für Therapieplanung und klinisches Outcome allerdings enorm wichtig. Die in dieser Arbeit hergestellten HDV-cDNA-Klone sollen helfen, die Forschung an diesem in vielen Punkten einzigartigen Virus voranzutreiben und so insbesondere auch die Diagnostik- und Therapiemethoden auszubauen. Nach Ko-Transfektion des Expressionsplasmids für S-, M- und L-HBsAg des HBV Gt D3 in Leberzellen waren ebendiese HDV-Plasmide imstande, HDV-Partikel zu produzieren, welche aus dem Zellkulturüberstand isoliert werden konnten. Die virale RNA dieser HDV-Partikel konnte bereits mit der in dieser Arbeit verwendeten qRT-PCR detektiert werden. Erfreulicherweise trugen die hier hergestellten Expressionsplasmide für HDV 5-8 ebenso der Entwicklung und Validierung eines neuen voll-automatisierten HDV-PCR-Assays bei, das von Forschern und Forscherinnen der Uniklinik Hamburg-Eppendorf entworfen wurde. Die virale RNA jener HDV-Klone konnte auch in dem neu-etablierten System erfolgreich erkannt werden [178]. Diese jüngste Arbeit der Hamburger Kollegen und Kolleginnen ist ein erster Schritt in die Verbesserung und den Ausbau der HDV-Detektionssysteme, welche so dringend notwendig sind.

Die hier hergestellten HDV-Vollgenomplasmide sind nachweislich imstande, in der Zellkultur HDV-Partikel der Gt 2-8 zu synthetisieren, wobei die Infektiosität der HDV-Partikel der hier generierten Gt 4 und 6 noch nicht hinreichend geklärt ist. Das HDAg der einzelnen Klone ist über verschiedene Nachweismethoden detektiert worden und ihre RNA ist in verschiedenen RT-PCR-Systemen quantifizierbar. Jene Klone, insbesondere auch die der seltenen Gt 5-8, können und sollen anderen Forscherinnen und Forschern

als Basis für weitere wissenschaftliche Untersuchungen dienen. Aufgrund der hohen genetischen Variabilität gibt es immense Unterschiede in der Detektion der Infektion, im klinischen Verlauf und im Therapieansprechen [202]. Daher ist es dringend notwendig, die Forschung an HDV nicht nur an dem weit verbreiteten Gt 1 durchzuführen, sondern sie auf alle bisher bekannten Gt auszuweiten.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Eine Infektion mit dem Hepatitis-D-Virus (HDV) kann akut oder chronisch verlaufen, nimmt aber in den meisten Fällen einen deutlich schwereren Verlauf als eine Hepatitis-B-Monoinfektion. Insbesondere in einkommensschwachen Ländern ohne flächendeckende Screening- und Impfprogramme oder suffizienter medikamentöser Therapie ist die chronische HDV-Infektion eine große medizinische Belastung für den öffentlichen Gesundheitssektor. Obwohl heute 8 verschiedene HDV Gt bekannt sind, wird die molekularbiologische Forschung an HDV weiterhin überwiegend mit einem einzelnen Isolat des Gt 1 durchgeführt. Klinische Daten zeigen aber, dass die Krankheitsausprägung zwischen den verschiedenen Gt unterschiedlich ausfallen kann. Dies mag vielfältige Ursachen haben, die höchstwahrscheinlich nicht allein in der Genomvariabilität von HDV begründet liegen. Zudem zeigen die derzeit verfügbaren etablierten HDV-RNA-Screening-Assays große Unterschiede in der diagnostischen Sensitivität und Spezifität und unterschätzen insbesondere bei den afrikanischen Gt 5-8 häufig die tatsächliche Viruslast. Um das Verständnis und die Forschung der verschiedenen, insbesondere selteneren HDV Gt und die damit verbundenen klinischen Fragestellungen voran zu bringen, sollte in dieser Dissertation eine Charakterisierung der HDV Gt 2-8 erfolgen. Zunächst wurden hierfür entsprechende HDV-Vollgenomplasmide hergestellt. Die Sequenz eines jeden Gt wurde öffentlichen Datenbanken entnommen und die Klonierung erfolgte in den Vektor pcDNA3.1+. Nachfolgend wurden die Vollgenomplasmide in Huh-7 Zellen transfiziert. Mittels Immunfluoreszenz konnte im Anschluss für jeden der Gt erfolgreich der Nachweis der HDAg-Expression erbracht werden. Die Differenzierung zwischen S- und L-HDAg-Expression wurde für jeden klonierten HDV Gt dargestellt, was als Beleg für eine stattfindende autonome Virusreplikation gewertet werden konnte. HDV-Partikel wurden *in vitro* hergestellt, indem die HDV-Vollgenomplasmide mit einem Expressionsplasmid für S-, M- und L-HBsAg des HBV Gt D3 in Huh-7 ko-transfiziert wurden. Der Zellkulturüberstand zeigte nach qRT-PCR für jeden Gt hohe HDV-RNA-Level zwischen $1,03 \times 10^6$ - $9,05 \times 10^6$ GE/ml. Abschließend wurde mit diesen HDV-haltigen Zellkulturüberständen ein Infektionsnachweis erbracht. Hierfür wurden HepG2-NTCP Zellen mit den Virusüberständen der HDV Gt 2-8 infiziert und im Anschluss eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Diese zeigte bei fast allen der sieben Gt eine Infektions-abgeleitete HDAg-Expression in den Leberzellkernen, wobei die Infektiosität der HDV Gt 4 und 6 nicht abschließend geklärt werden konnte. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass in dieser Arbeit funktionsfähige HDV-Vollgenomplasmide der Gt 2-8 kloniert wurden, die imstande sind, *in vitro* rekombinante HDV-Partikel zu

exprimieren.

8 SUMMARY

An infection with the hepatitis D virus (HDV) can be acute or chronic, but in most cases takes a much more severe course than a hepatitis B monoinfection. Especially in low-income countries without comprehensive screening and vaccination programmes or sufficient drug therapy, chronic HDV infection is a major medical burden for the public health sector. Although 8 different HDV Gt are known today, molecular biology research on HDV continues to be conducted predominantly with a single isolate of Gt 1. However, clinical data show that disease expression can vary between the different Gt. This may have multiple causes, which are most likely not solely due to the genome variability of HDV. In addition, the currently available established HDV RNA screening assays show large differences in diagnostic sensitivity and specificity and often underestimate the actual viral load, especially for African Gt 5-8. In order to advance the understanding and research of the different, especially rarer HDV Gt and the associated clinical questions, this dissertation should characterise HDV Gt 2-8.

First, corresponding HDV full-genome plasmids were generated for this purpose. The sequence of each Gt was taken from public databases and cloned into the vector pcDNA3.1+. Subsequently, the full genome plasmids were transfected into Huh-7 cells. Afterwards, immunofluorescence was used to successfully detect HDAg expression for each of the Gt. The differentiation between S- and L-HDAg expression was shown for each cloned HDV Gt, which could be interpreted as evidence of autonomous virus replication taking place. HDV particles were prepared in vitro by co-transfecting the HDV full genome plasmids with an expression plasmid for S-, M- and L-HBsAg of HBV Gt D3 in Huh-7. After qRT-PCR, the cell culture supernatant showed high HDV RNA levels for each Gt ranging from 1.03×10^6 - 9.05×10^6 GE/ml. Finally, these HDV-containing cell culture supernatants were used to detect infection. For this purpose, HepG2-NTCP cells were infected with the viral supernatants of HDV Gt 2-8 and subsequently immunofluorescence was performed. This showed infection-derived HDAg expression in the liver cell nuclei of almost all of the seven Gt. However, the infectivity of HDV Gt 4 and Gt 6 could not be conclusively determined. In summary, the results indicate that functional HDV full-genome plasmids of Gt 2-8 capable of expressing recombinant HDV particles in vitro have been cloned in this work.

9 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Im Folgenden sind die aus dieser Dissertation hervorgegangenen Publikationen aufgelistet:

1. Pflüger LS, Nörz D, Volz T, Giersch K, **Giese A**, Goldmann N, Glebe D, Bockmann JH, Pfefferle S, Dandri M, Schulze Zur Wiesch J, Lütgehetmann M. **Clinical establishment of a laboratory developed quantitative HDV PCR assay on the cobas6800 high-throughput system.** JHEP Rep. 2021 Aug 28;3(6):100356. doi: 10.1016/j.jhepr.2021.100356. PMID: 34712932; PMCID: PMC8531665.
2. Glebe D, Lehmann F, Goldmann N, **Giese A**, Hida Y, Gerlich WH, Ziebuhr J, Slanina H, Schüttler CG. **10 Jahre Nationales Referenzzentrum für Hepatitis-B-Viren und Hepatitis-D-Viren in Gießen: Tätigkeiten und Erfahrungen [Ten years of the National Reference Center for hepatitis B viruses and hepatitis D viruses in Giessen, Germany: activities and experiences].** Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2022 Feb;65(2):220-227. German. doi: 10.1007/s00103-021-03479-7. Epub 2022 Jan 11. PMID: 35015105; PMCID: PMC8813679.

10 ANHANG

10.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C = Grad Celsius

Abb. = Abbildung

Abs. = Absatz

AS = Aminosäure

bp = Basenpaare

bzw. = beziehungsweise

CHD = chronische Hepatitis D

CHB = chronische Hepatitis B

CKII = Casein Kinase II

ddH₂O = doppelt destilliertes Wasser

DNA = Desoxyribonukleinsäure

dpi = day(s) post infection; Tag(e) nach Infektion

dpt = day(s) post transfection; Tag(e) nach Transfektion

dsDNA = doppelsträngige DNA

ERK 1/2 = extracellular signal-related kinases 1 and 2

GE = genome equivalents; Genomäquivalente

Gt = Genotyp

HBsAg = Hepatitis-B-Surface-Antigen, Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen

HDAg = Hepatitis-D-Antigen, Delta-Antigen

HBV = Hepatitis-B-Virus

HDV = Hepatitis-D-Virus, Deltavirus

H₂O = Wasser

IF = Immunfluoreszenz

i. F. = im Folgenden

Kap. = Kapitel

L-HDAg = Large-Delta-Antigen

min = Minuten

MOI = multiplicity of infection; Multiplizität der Infektion

OD₄₅₀ = Optische Dichte bei 450nm Wellenlänge

PKC = Protein Kinase C

PTM = posttranslationale Modifikation

RNA = Ribonukleinsäure

RNAP II = RNA-Polymerase II

sek = Sekunden

S-HDAg = Small-Delta-Antigen

x g = times gravity, Maßeinheit für die relative Zentrifugalkraft

10.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 - Aminosäurealignment der L-HDAg-Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten HDV Isolate der Genotypen 2-8.	46
Abbildung 2 - Nachweis der Expression von HDAg in Huh-7 Zellen nach Transfektion mit den HDV-Expressionsplasmiden der Genotypen 2-8.	48
Abbildung 3 - S- und L-HDAg nach Größe aufgetrennt im Western Blot; 4 und 8 Tage nach Transfektion von Huh-7 mit den HDV-Expressionsplasmiden der Genotypen 2-8.	50
Abbildung 4 - Konzentration der HDV-Genomäquivalente und des HBsAg im Zellkulturüberstand nach Ko-Transfektion von HDV-Expressionsplasmid der Genotypen 2-8 mit pCH9-200_LMS_3091_HBV in Huh-7, normalisiert nach SEAP ...	51
Abbildung 5 - Nachweis von HDAg in HepG2-NTCP nach Infektion mit HDV aus Konzentraten von Zellkulturüberständen.	54

10.3 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 - Verwendete Geräte.....	19
Tabelle 2 - Verwendete Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 3 - Verwendete kommerzielle Puffer, Lösungen und Reagenzien	20
Tabelle 4 - Selbst hergestellte Puffer, Lösungen und Medien	22
Tabelle 5 - Verwendete Enzyme.....	24
Tabelle 6 - Verwendete Kits	25
Tabelle 7 - Verwendete Antikörper	25
Tabelle 8 - Primer für Sequenzierungen	27
Tabelle 9 - Primer für Kolonie-PCR	27
Tabelle 10 - Primer für Vektoramplifikation.....	28
Tabelle 11 - Primer für Dimersynthese	28
Tabelle 12 - Primer für SDM.....	29
Tabelle 13 - Primer für qRT-PCR	29
Tabelle 14 - Ausgewählte Isolate.....	32
Tabelle 15 - PCR-Programm qRT-PCR.....	41

10.4 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abdrakhman A, Ashimkhanova A, Almawi W Y (2021) Effectiveness of pegylated interferon monotherapy in the treatment of chronic hepatitis D virus infection: A meta-analysis. *Antiviral research* 185: 104995.
2. Abeywickrama-Samarakoon N, Cortay J-C, Sureau C, Müller S, Alfaiate D, Guerrieri F, Chaikuad A, Schröder M, Merle P, Levrero M, Dény P (2020) Hepatitis Delta Virus histone mimicry drives the recruitment of chromatin remodelers for viral RNA replication. *Nature communications* 11: 419.
3. Adam R, Karam V, Cailliez V, O Grady J G, Mirza D, Cherqui D, Klemphauer J, Salizzoni M, Pratschke J, Jamieson N, Hidalgo E, Paul A, Andujar R L, Lerut J, Fisher L, Boudjema K, Fondevila C, Soubrane O, Bachellier P, Pinna A D, Berlakovich G, Bennet W, Pinzani M, Schemmer P, Zieniewicz K, Romero C J, Simone P de, Ericzon B-G, Schneeberger S, Wigmore S J, Prous J F, Colledan M, Porte R J, Yilmaz S, Azoulay D, Pirenne J, Line P-D, Trunecka P, Navarro F, Lopez A V, Carlis L de, Pena S R, Kochs E, Duvoux C (2018) 2018 Annual Report of the European Liver Transplant Registry (ELTR) - 50-year evolution of liver transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 31: 1293–1317.
4. Aden D P, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles B B (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282: 615–616.
5. Aguilera A, Trastoy R, Barreiro P, Costa J J, Mendoza C de, Peña J M, Soriano V (2018) Decline and changing profile of hepatitis delta among injection drug users in Spain. *Antiviral therapy* 23: 87–90.
6. Akarsu M, Onem S, Turan I, Adali G, Akdogan M, Akyildiz M, Aladag M, Balaban Y, Danis N, Dayangac M, Gencdal G, Gokcan H, Serteser E, Gurakar M, Harputluoglu M, Kabacam G, Karademir S, Kiyici M, Idilman R, Karasu Z (2021) Recommendations for Hepatitis B Immunoglobulin and Antiviral Prophylaxis Against Hepatitis B Recurrence After Liver Transplantation. *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology* 32: 712–719.
7. Alfaiate D, Clément S, Gomes D, Goossens N, Negro F (2020) Chronic hepatitis D and hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Journal of hepatology* 73: 533–539.
8. Alfaiate D, Lucifora J, Abeywickrama-Samarakoon N, Michelet M, Testoni B, Cortay J-C, Sureau C, Zoulim F, Dény P, Durantel D (2016) HDV RNA replication is associated with HBV repression and interferon-stimulated genes induction in super-infected hepatocytes. *Antiviral research* 136: 19–31.
9. Alves C, Cheng H, Roder H, Taylor J (2010) Intrinsic disorder and oligomerization of the hepatitis delta virus antigen. *Virology* 407: 333–340.
10. Andernach I E, Leiss L V, Tarnagda Z S, Tahita M C, Otegbayo J A, Forbi J C, Omilabu S, Gouandjika-Vasilache I, Komas N P, Mbah O P, Muller C P (2014)

Characterization of hepatitis delta virus in sub-Saharan Africa. *Journal of clinical microbiology* 52: 1629–1636.

11. Bazinet M, Pântea V, Ceboatarescu V, Cojuhari L, Jimbei P, Albrecht J, Schmid P, Le Gal F, Gordien E, Krawczyk A, Mijočević H, Karimzadeh H, Roggendorf M, Vaillant A (2017) Safety and efficacy of REP 2139 and pegylated interferon alfa-2a for treatment-naïve patients with chronic hepatitis B virus and hepatitis D virus co-infection (REP 301 and REP 301-LTF): a non-randomised, open-label, phase 2 trial. *The lancet. Gastroenterology & hepatology* 2: 877–889.
12. Bazinet M, Pântea V, Ceboatarescu V, Cojuhari L, Jimbei P, Anderson M, Gersch J, Holzmayer V, Elsner C, Krawczyk A, Kuhns M C, Cloherty G, Dittmer U, Vaillant A (2021) Persistent Control of Hepatitis B Virus and Hepatitis Delta Virus Infection Following REP 2139-Ca and Pegylated Interferon Therapy in Chronic Hepatitis B Virus/Hepatitis Delta Virus Coinfection. *Hepatology communications* 5: 189–202.
13. Bensabath G, Hadler S C, Soares M C, Fields H, Dias L B, Popper H, Maynard J E (1987) Hepatitis delta virus infection and Labrea hepatitis. Prevalence and role in fulminant hepatitis in the Amazon Basin. *JAMA* 258: 479–483.
14. Bergmann K F, Gerin J L (1986) Antigens of hepatitis delta virus in the liver and serum of humans and animals. *The Journal of infectious diseases* 154: 702–706.
15. Bergner L M, Orton R J, Broos A, Tello C, Becker D J, Carrera J E, Patel A H, Biek R, Streicker D G (2021) Diversification of mammalian deltaviruses by host shifting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118: e2019907118.
16. Besombes C, Njouom R, Paireau J, Lachenal G, Texier G, Tejiokem M, Cauchemez S, Pépin J, Fontanet A (2020) The epidemiology of hepatitis delta virus infection in Cameroon. *Gut* 69: 1294–1300.
17. Bichko V, Netter H J, Taylor J (1994) Introduction of hepatitis delta virus into animal cell lines via cationic liposomes. *Journal of virology* 68: 5247–5252.
18. Bockmann J-H, Grube M, Hamed V, Felden J von, Landahl J, Wehmeyer M, Giersch K, Hall M T, Murray J M, Dandri M, Lüth S, Lohse A W, Lütgehetmann M, zur Schulze Wiesch J (2020) High rates of cirrhosis and severe clinical events in patients with HBV/HDV co-infection: longitudinal analysis of a German cohort. *BMC gastroenterology* 20: 24.
19. Bogomolov P, Alexandrov A, Voronkova N, Macievich M, Kokina K, Petrachenkova M, Lehr T, Lempp F A, Wedemeyer H, Haag M, Schwab M, Haefeli W E, Blank A, Urban S (2016) Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B: First results of a phase Ib/IIa study. *Journal of hepatology* 65: 490–498.
20. Bonino F, Heermann K H, Rizzetto M, Gerlich W H (1986) Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *Journal of virology* 58: 945–950.
21. Bordier B B, Marion P L, Ohashi K, Kay M A, Greenberg H B, Casey J L, Glenn J S (2002) A prenylation inhibitor prevents production of infectious hepatitis delta virus particles. *Journal of virology* 76: 10465–10472.
22. Bordier B B, Ohkanda J, Liu P, Lee S-Y, Salazar F H, Marion P L, Ohashi K, Meuse L, Kay M A, Casey J L, Sebti S M, Hamilton A D, Glenn J S (2003) In vivo antiviral

efficacy of prenylation inhibitors against hepatitis delta virus. *Journal of Clinical Investigation* 112: 407–414.

23. Botelho-Souza L F, dos Santos A d O, Borzacov L M, Honda E R, Villalobos-Salcedo J M, Vieira D S (2014) Development of a reverse transcription quantitative real-time PCR-based system for rapid detection and quantitation of hepatitis delta virus in the western Amazon region of Brazil. *Journal of virological methods* 197: 19–24.
24. Boulon R, Blanchet M, Lemasson M, Vaillant A, Labonté P (2020) Characterization of the antiviral effects of REP 2139 on the HBV lifecycle in vitro. *Antiviral research* 183: 104853.
25. Braga W S M, Oliveira C M C de, Araújo J R de, Da Castilho M C, Rocha J M, Gimaque J B d L, Silva M L C R, Vasconcelos H L, Ramasawmy R, Paraná R (2014) Chronic HDV/HBV co-infection: predictors of disease stage---a case series of HDV-3 patients. *Journal of hepatology* 61: 1205–1211.
26. Branch A D, Robertson H D (1984) A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science (New York, N.Y.)* 223: 450–455.
27. Brazas R, Ganem D (1996) A cellular homolog of hepatitis delta antigen: implications for viral replication and evolution. *Science (New York, N.Y.)* 274: 90–94.
28. Breakwell L, Tevi-Benissan C, Childs L, Mihigo R, Tohme R (2017) The status of hepatitis B control in the African region. *The Pan African medical journal* 27: 17.
29. Brichler S, Le Gal F, Butt A, Chevret S, Gordien E (2013) Commercial real-time reverse transcriptase PCR assays can underestimate or fail to quantify hepatitis delta virus viremia. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 11: 734–740.
30. Buti M, Esteban R, Jardí R, Esteban J I, Guardia J (1986) Serological diagnosis of acute delta hepatitis. *J. Med. Virol.* 18: 81–85.
31. Buti M, Etzion O, Palom A, Yardeni D, Nevo-Shor A, Munteanu D, Choong I, Weissfeld L, Barciela M R, Abu-Freha N, Barreira A, Howard R, Asselah T, Lampertico P (2022) Strong correlation between HBsAg, ALT and HDV-RNA levels in patients with chronic hepatitis D. Results of phase 3 D-LIVR study. *Journal of hepatology* 77: S269.
32. Buti M, Homs M, Rodriguez-Frias F, Funalleras G, Jardí R, Sauleda S, Tabernero D, Schaper M, Esteban R (2011) Clinical outcome of acute and chronic hepatitis delta over time: a long-term follow-up study. *Journal of viral hepatitis* 18: 434–442.
33. Cao D, Haussecker D, Huang Y, Kay M A (2009) Combined proteomic-RNAi screen for host factors involved in human hepatitis delta virus replication. *RNA (New York, N.Y.)* 15: 1971–1979.
34. Casey J L (2012) Control of ADAR1 editing of hepatitis delta virus RNAs. *Current topics in microbiology and immunology* 353: 123–143.
35. Casey J L, Bergmann K F, Brown T L, Gerin J L (1992) Structural requirements for RNA editing in hepatitis delta virus: evidence for a uridine-to-cytidine editing mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 7149–7153.

36. Casey J L, Brown T L, Colan E J, Wignall F S, Gerin J L (1993) A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 9016–9020.
37. Casey J L, Gerin J L (1995) Hepatitis D virus RNA editing: specific modification of adenosine in the antigenomic RNA. *Journal of virology* 69: 7593–7600.
38. Caviglia G P, Ciancio A, Rizzetto M (2022) A Review of HDV Infection. *Viruses* 14.
39. Chai N, Chang H E, Nicolas E, Han Z, Jarnik M, Taylor J (2008) Properties of subviral particles of hepatitis B virus. *Journal of virology* 82: 7812–7817.
40. Chang F L, Chen P J, Tu S J, Wang C J, Chen D S (1991) The large form of hepatitis delta antigen is crucial for assembly of hepatitis delta virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 8490–8494.
41. Chang J, Gudima S O, Tarn C, Nie X, Taylor J M (2005) Development of a novel system to study hepatitis delta virus genome replication. *Journal of virology* 79: 8182–8188.
42. Chang J, Nie X, Chang H E, Han Z, Taylor J (2008) Transcription of hepatitis delta virus RNA by RNA polymerase II. *Journal of virology* 82: 1118–1127.
43. Chang M F, Chen C H, Lin S L, Chen C J, Chang S C (1995) Functional domains of delta antigens and viral RNA required for RNA packaging of hepatitis delta virus. *Journal of virology* 69: 2508–2514.
44. Chang W-S, Pettersson J H-O, Le Lay C, Shi M, Lo N, Wille M, Eden J-S, Holmes E C (2019) Novel hepatitis D-like agents in vertebrates and invertebrates. *Virus evolution* 5: vez021.
45. Chao M, Hsieh S Y, Taylor J (1990) Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. *Journal of virology* 64: 5066–5069.
46. Chemin I, Pujol F H, Scholtès C, Loureiro C L, Amirache F, Levrero M, Zoulim F, Pérez-Vargas J, Cosset F-L (2021) Preliminary Evidence for Hepatitis Delta Virus Exposure in Patients Who Are Apparently Not Infected With Hepatitis B Virus. *Hepatology* 73: 861–864.
47. Chen C-W, Tsay Y-G, Wu H-L, Lee C-H, Chen D-S, Chen P-J (2002) The double-stranded RNA-activated kinase, PKR, can phosphorylate hepatitis D virus small delta antigen at functional serine and threonine residues. *The Journal of biological chemistry* 277: 33058–33067.
48. Chen H-Y, Shen D-T, Ji D-Z, Han P-C, Zhang W-M, Ma J-F, Chen W-S, Goyal H, Pan S, Xu H-G (2019) Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Gut* 68: 512–521.
49. Chen P J, Kalpana G, Goldberg J, Mason W, Werner B, Gerin J, Taylor J (1986) Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 8774–8778.
50. Chen Y-S, Huang W-H, Hong S-Y, Tsay Y-G, Chen P-J (2008) ERK1/2-mediated phosphorylation of small hepatitis delta antigen at serine 177 enhances hepatitis delta virus antigenomic RNA replication. *Journal of virology* 82: 9345–9358.

51. Choi S-H, Jeong S-H, Hwang S B (2007) Large hepatitis delta antigen modulates transforming growth factor-beta signaling cascades: implication of hepatitis delta virus-induced liver fibrosis. *Gastroenterology* 132: 343–357.
52. Chou H C, Hsieh T Y, Sheu G T, Lai M M (1998) Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA. *Journal of virology* 72: 3684–3690.
53. (2013) Collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis D virus RNA for nucleic acid amplification technique (NAT) ...
54. Da B L, Heller T, Koh C (2019) Hepatitis D infection: from initial discovery to current investigational therapies. *Gastroenterology Report* 7: 231–245.
55. Da B L, Rahman F, Lai W C, Kleiner D E, Heller T, Koh C (2021) Risk Factors for Delta Hepatitis in a North American Cohort: Who Should Be Screened? *Am J Gastroenterol* 116: 206–209.
56. Daigh L H, Griffin B L, Soroush A, Mamedov M R, Casey J L (2013) Arginine-rich motifs are not required for hepatitis delta virus RNA binding activity of the hepatitis delta antigen. *Journal of virology* 87: 8665–8674.
57. David E, Rahier J, Pucci A, Camby P, Scevens M, Salizzoni M, Otte J B, Galmarini D, Marinucci G, Ottobrelli A (1993) Recurrence of hepatitis D (delta) in liver transplants: histopathological aspects. *Gastroenterology* 104: 1122–1128.
58. Daw M A, Daw A M, Sifennasr N E M, Draha A M, Daw A M, Daw A M, Ahmed M O, Mokhtar E S, El-Bouzedi A, Daw I M (2018) The Epidemiology of Hepatitis D Virus in North Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis. *TheScientificWorldJournal* 2018: 9312650.
59. Defenbaugh D A, Johnson M, Chen R, Zheng Y Y, Casey J L (2009) Hepatitis delta antigen requires a minimum length of the hepatitis delta virus unbranched rod RNA structure for binding. *Journal of virology* 83: 4548–4556.
60. Duvoux C, Belli L S, Fung J, Angelico M, Buti M, Coilly A, Cortesi P, Durand F, Féray C, Fondevila C, Lebray P, Martini S, Nevens F, Polak W G, Rizzetto M, Volpes R, Zoulim F, Samuel D, Berenguer M (2021) 2020 position statement and recommendations of the European Liver and Intestine Transplantation Association (ELITA): management of hepatitis B virus-related infection before and after liver transplantation. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 54: 583–605.
61. (2017) EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology* 67: 370–398.
62. (2023) EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis delta virus. *Journal of hepatology* 79: 433–460.
63. Elazar M, Glenn J S (2022) Combination of Novel Therapies for HDV. *Viruses* 14.
64. Elena S F, Dopazo J, Flores R, Diener T O, Moya A (1991) Phylogeny of viroids, viroidlike satellite RNAs, and the viroidlike domain of hepatitis delta virus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 5631–5634.
65. Etzion O, Hamid S, Lurie Y, Gane E J, Yardeni D, Duehren S, Bader N, Nevo-Shor A, Channa S M, Cotler S J, Mawani M, Parkash O, Dahari H, Choong I, Glenn J S (2023) Treatment of chronic hepatitis D with peginterferon lambda-the phase 2 LIMT-1 clinical trial. *Hepatology* 77: 2093–2103.

66. Farci P, Niro G A (2012) Clinical features of hepatitis D. *Seminars in liver disease* 32: 228–236.
67. Farci P, Smedile A, Lavarini C, Piantino P, Crivelli O, Caporaso N, Toti M, Bonino F, Rizzetto M (1983) Delta hepatitis in inapparent carriers of hepatitis B surface antigen. *Gastroenterology* 85: 669–673.
68. Farci P, Smedile A, Lavarini C, Piantino P, Crivelli O, Caporaso N, Toti M, Bonino F, Rizzetto M (1983) Delta hepatitis in inapparent carriers of hepatitis B surface antigen. A disease simulating acute hepatitis B progressive to chronicity. *Gastroenterology* 85: 669–673.
69. Fattovich G, Boscaro S, Noventa F, Pornaro E, Stenico D, Alberti A, Ruol A, Realdi G (1987) Influence of hepatitis delta virus infection on progression to cirrhosis in chronic hepatitis type B. *The Journal of infectious diseases* 155: 931–935.
70. Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm S W (2000) Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. *The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep)*. *Gut* 46: 420–426.
71. Ferns R B, Nastouli E, Garson J A (2012) Quantitation of hepatitis delta virus using a single-step internally controlled real-time RT-qPCR and a full-length genomic RNA calibration standard. *Journal of virological methods* 179: 189–194.
72. Filipovska J, Konarska M M (2000) Specific HDV RNA-templated transcription by pol II in vitro. *RNA (New York, N.Y.)* 6: 41–54.
73. Flores R, Grubb D, Elleuch A, Nohales M-Á, Delgado S, Gago S (2011) Rolling-circle replication of viroids, viroid-like satellite RNAs and hepatitis delta virus: variations on a theme. *RNA biology* 8: 200–206.
74. Flores R, Ruiz-Ruiz S, Serra P (2012) Viroids and hepatitis delta virus. *Seminars in liver disease* 32: 201–210.
75. Freitas N, Abe K, Cunha C, Menne S, Gudima S O (2014) Support of the infectivity of hepatitis delta virus particles by the envelope proteins of different genotypes of hepatitis B virus. *Journal of virology* 88: 6255–6267.
76. Fu T B, Taylor J (1993) The RNAs of hepatitis delta virus are copied by RNA polymerase II in nuclear homogenates. *Journal of virology* 67: 6965–6972.
77. Ganem D, Varmus H E (1987) The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annual review of biochemistry* 56: 651–693.
78. Gavilanes F, Gonzalez-Ros J M, Peterson D L (1982) Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. *The Journal of biological chemistry* 257: 7770–7777.
79. Giersch K, Bhadra O D, Volz T, Allweiss L, Riecken K, Fehse B, Lohse A W, Petersen J, Sureau C, Urban S, Dandri M, Lütgehetmann M (2019) Hepatitis delta virus persists during liver regeneration and is amplified through cell division both in vitro and in vivo. *Gut* 68: 150–157.
80. Giersch K, Helbig M, Volz T, Allweiss L, Mancke L V, Lohse A W, Polywka S, Pollok J M, Petersen J, Taylor J, Dandri M, Lütgehetmann M (2014) Persistent hepatitis D virus mono-infection in humanized mice is efficiently converted by hepatitis B virus to a productive co-infection. *Journal of hepatology* 60: 538–544.

81. Glenn J S, Watson J A, Havel C M, White J M (1992) Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. *Science (New York, N.Y.)* 256: 1331–1333.
82. Glenn J S, White J M (1991) trans-dominant inhibition of human hepatitis delta virus genome replication. *Journal of virology* 65: 2357–2361.
83. Goto T, Kato N, Ono-Nita S K, Yoshida H, Otsuka M, Shiratori Y, Omata M (2000) Large isoform of hepatitis delta antigen activates serum response factor-associated transcription. *The Journal of biological chemistry* 275: 37311–37316.
84. Greco-Stewart V, Pelchat M (2010) Interaction of host cellular proteins with components of the hepatitis delta virus. *Viruses* 2: 189–212.
85. Greco-Stewart V S, Schissel E, Pelchat M (2009) The hepatitis delta virus RNA genome interacts with the human RNA polymerases I and III. *Virology* 386: 12–15.
86. Griffin B L, Chasovskikh S, Dritschilo A, Casey J L (2014) Hepatitis delta antigen requires a flexible quasi-double-stranded RNA structure to bind and condense hepatitis delta virus RNA in a ribonucleoprotein complex. *Journal of virology* 88: 7402–7411.
87. Gu X, Chen Z, Dai R, Zhang M, Tang H, Chen L, Dong B (2014) Analysis on the clinical features of 507 HDV-infected patients. *Cell biochemistry and biophysics* 70: 1829–1832.
88. Gudima S, Wu S Y, Chiang C M, Moraleda G, Taylor J (2000) Origin of hepatitis delta virus mRNA. *Journal of virology* 74: 7204–7210.
89. Guzman E M, Cheshenko N, Shende V, Keller M J, Goyette N, Juteau J-M, Boivin G, Vaillant A, Herold B C (2007) Amphipathic DNA polymers are candidate vaginal microbicides and block herpes simplex virus binding, entry and viral gene expression. *Antiviral therapy* 12: 1147–1156.
90. Hall T A (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
91. Harichandran K, Shen Y, Stephenson T, Tsois S, Lee S-C, Casey J L (2019) Hepatitis Delta Antigen Regulates mRNA and Antigenome RNA Levels during Hepatitis Delta Virus Replication. *Journal of virology* 93.
92. Hayashi T, Takeshita Y, Hutin Y J-F, Harmanci H, Easterbrook P, Hess S, van Holten J, Oru E O, Kaneko S, Yurdaydin C, Bulterys M (2021) The global hepatitis delta virus (HDV) epidemic: what gaps to address in order to mount a public health response? *Arch Public Health* 79.
93. Heidrich B, Yurdaydin C, Kabaçam G, Ratsch B A, Zachou K, Bremer B, Dalekos G N, Erhardt A, Tabak F, Yalcin K, Gürel S, Zeuzem S, Cornberg M, Bock C-T, Manns M P, Wedemeyer H (2014) Late HDV RNA relapse after peginterferon alpha-based therapy of chronic hepatitis delta. *Hepatology* 60: 87–97.
94. Hercun J, Koh C, Heller T (2020) Hepatitis Delta: Prevalence, Natural History, and Treatment Options. *Gastroenterology clinics of North America* 49: 239–252.
95. Hetzel U, Szivovics L, Smura T, Prähauser B, Vapalahti O, Kipar A, Hepojoki J (2019) Identification of a Novel Deltavirus in Boa Constrictors. *mBio* 10.
96. Hogema B M, Arents J C, Bader R, Eijkemans K, Yoshida H, Takahashi H, Aiba H, Postma P W (1998) Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates:

the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIAGlc. *Molecular microbiology* 30: 487–498.

97. Hong S-Y, Chen P-J (2010) Phosphorylation of serine 177 of the small hepatitis delta antigen regulates viral antigenomic RNA replication by interacting with the processive RNA polymerase II. *Journal of virology* 84: 1430–1438.
98. Hsieh S Y, Chao M, Coates L, Taylor J (1990) Hepatitis delta virus genome replication: a polyadenylated mRNA for delta antigen. *Journal of virology* 64: 3192–3198.
99. Hsu C-W, Juang H-H, Kuo C-Y, Li H-P, Iang S-B, Lin S-H, Yeh C-T, Chao M (2019) Structural Pattern Differences in Unbranched Rod-like RNA of Hepatitis Delta Virus affect RNA Editing. *Viruses* 11.
100. Hsu S-C, Syu W-J, Sheen I-J, Liu H-T, Jeng K-S, Wu J-C (2002) Varied assembly and RNA editing efficiencies between genotypes I and II hepatitis D virus and their implications. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 35: 665–672.
101. Huang C, Chang S C, Yang H-C, Chien C-L, Chang M-F (2009) Clathrin-mediated post-Golgi membrane trafficking in the morphogenesis of hepatitis delta virus. *Journal of virology* 83: 12314–12324.
102. Huang C, Jiang J-Y, Chang S C, Tsay Y-G, Chen M-R, Chang M-F (2013) Nuclear export signal-interacting protein forms complexes with lamin A/C-Nups to mediate the CRM1-independent nuclear export of large hepatitis delta antigen. *Journal of virology* 87: 1596–1604.
103. Huang H-C, Lee C-P, Liu H-K, Chang M-F, Lai Y-H, Lee Y-C, Huang C (2016) Cellular Nuclear Export Factors TAP and Aly Are Required for HDAg-L-mediated Assembly of Hepatitis Delta Virus. *The Journal of biological chemistry* 291: 26226–26238.
104. Huang W H, Chen C W, Wu H L, Chen P J (2006) Post-translational modification of delta antigen of hepatitis D virus. *Current topics in microbiology and immunology* 307: 91–112.
105. Huang W-H, Mai R-T, Lee Y-H W (2008) Transcription factor YY1 and its associated acetyltransferases CBP and p300 interact with hepatitis delta antigens and modulate hepatitis delta virus RNA replication. *Journal of virology* 82: 7313–7324.
106. Huo T I, Wu J C, Lin R Y, Sheng W Y, Chang F Y, Lee S D (1997) Decreasing hepatitis D virus infection in Taiwan: an analysis of contributory factors. *Journal of gastroenterology and hepatology* 12: 747–751.
107. Hwang S B, Lai M M (1993) Isoprenylation mediates direct protein-protein interactions between hepatitis large delta antigen and hepatitis B virus surface antigen. *Journal of virology* 67: 7659–7662.
108. Ilan Y, Klein A, Taylor J, Tur-Kaspa R (1992) Resistance of hepatitis delta virus replication to interferon-alpha treatment in transfected human cells. *The Journal of infectious diseases* 166: 1164–1166.
109. Imazeki F, Omata M, Ohto M (1991) Complete nucleotide sequence of hepatitis delta virus RNA in Japan. *Nucleic acids research* 19: 5439.

110. Imbert V, Rupec R A, Livolsi A, Pahl H L, Traenckner E B, Mueller-Dieckmann C, Farahifar D, Rossi B, Auberger P, Baeuerle P A, Peyron J F (1996) Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha. *Cell* 86: 787–798.
111. Ivaniushina V, Radjef N, Alexeeva M, Gault E, Semenov S, Salhi M, Kiselev O, Dény P (2001) Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia. *The Journal of general virology* 82: 2709–2718.
112. Iwamoto M, Saso W, Nishioka K, Ohashi H, Sugiyama R, Ryo A, Ohki M, Yun J-H, Park S-Y, Ohshima T, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Matano T, Iwami S, Sureau C, Wakita T, Watashi K (2020) The machinery for endocytosis of epidermal growth factor receptor coordinates the transport of incoming hepatitis B virus to the endosomal network. *The Journal of biological chemistry* 295: 800–807.
113. Iwamoto M, Saso W, Sugiyama R, Ishii K, Ohki M, Nagamori S, Suzuki R, Aizaki H, Ryo A, Yun J-H, Park S-Y, Ohtani N, Muramatsu M, Iwami S, Tanaka Y, Sureau C, Wakita T, Watashi K (2019) Epidermal growth factor receptor is a host-entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116: 8487–8492.
114. Iwamoto M, Shibata Y, Kawasaki J, Kojima S, Li Y-T, Iwami S, Muramatsu M, Wu H-L, Wada K, Tomonaga K, Watashi K, Horie M (2021) Identification of novel avian and mammalian deltaviruses provides new insights into deltavirus evolution. *Virus evolution* 7: veab003.
115. Jeng K S, Daniel A, Lai M M (1996) A pseudoknot ribozyme structure is active in vivo and required for hepatitis delta virus RNA replication. *Journal of virology* 70: 2403–2410.
116. Jeng K S, Su P Y, Lai M M (1996) Hepatitis delta antigens enhance the ribozyme activities of hepatitis delta virus RNA in vivo. *Journal of virology* 70: 4205–4209.
117. Kabaçam G, Onder F O, Yakut M, Seven G, Karatayli S C, Karatayli E, Savas B, Idilman R, Bozdayi A M, Yurdaydin C (2012) Entecavir treatment of chronic hepatitis D. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 55: 645–650.
118. Kamal H, Westman G, Falconer K, Duberg A-S, Weiland O, Haverinen S, Wejstål R, Carlsson T, Kampmann C, Larsson S B, Björkman P, Nystedt A, Cardell K, Svensson S, Stenmark S, Wedemeyer H, Aleman S (2020) Long-Term Study of Hepatitis Delta Virus Infection at Secondary Care Centers: The Impact of Viremia on Liver-Related Outcomes. *Hepatology* 72: 1177–1190.
119. Kang C, Syed Y Y (2020) Bulevirtide: First Approval. *Drugs* 80: 1601–1605.
120. Karataylı E, Altunoğlu Y Ç, Karataylı S C, Alagöz S G K, Cınar K, Yalçın K, Idilman R, Yurdaydın C, Bozdayı A M (2014) A one step real time PCR method for the quantification of hepatitis delta virus RNA using an external armored RNA standard and intrinsic internal control. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 60: 11–15.
121. Kiesslich D, Crispim M A, Santos C, Ferreira F d L, Fraiji N A, Komninakis S V, Diaz R S (2009) Influence of hepatitis B virus (HBV) genotype on the clinical course of disease in patients coinfecting with HBV and hepatitis delta virus. *The Journal of infectious diseases* 199: 1608–1611.

122. Komla-Soukha I, Sureau C (2006) A tryptophan-rich motif in the carboxyl terminus of the small envelope protein of hepatitis B virus is central to the assembly of hepatitis delta virus particles. *Journal of virology* 80: 4648–4655.
123. Kondo Y, Ninomiya M, Kakazu E, Kimura O, Shimosegawa T (2013) Hepatitis B surface antigen could contribute to the immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *ISRN gastroenterology* 2013: 935295.
124. Kuo M Y, Chao M, Taylor J (1989) Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: role of delta antigen. *Journal of virology* 63: 1945–1950.
125. Kuo M Y, Goldberg J, Coates L, Mason W, Gerin J, Taylor J (1988) Molecular cloning of hepatitis delta virus RNA from an infected woodchuck liver: sequence, structure, and applications. *Journal of virology* 62: 1855–1861.
126. Lamas Longarela O, Schmidt T T, Schöneweis K, Romeo R, Wedemeyer H, Urban S, Schulze A (2013) Proteoglycans act as cellular hepatitis delta virus attachment receptors. *PLoS ONE* 8: e58340.
127. Le Gal F, Brichtler S, Drugan T, Alloui C, Roulot D, Pawlotsky J-M, Dény P, Gordien E (2017) Genetic diversity and worldwide distribution of the deltavirus genus: A study of 2,152 clinical strains. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 66: 1826–1841.
128. Le Gal F, Brichtler S, Sahli R, Chevret S, Gordien E (2016) First international external quality assessment for hepatitis delta virus RNA quantification in plasma. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 64: 1483–1494.
129. Le Gal F, Gault E, Ripault M-P, Serpaggi J, Trinchet J-C, Gordien E, Dény P (2006) Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerging infectious diseases* 12: 1447–1450.
130. Lee A M, Rojek J M, Gundersen A, Ströher U, Juteau J-M, Vaillant A, Kunz S (2008) Inhibition of cellular entry of lymphocytic choriomeningitis virus by amphipathic DNA polymers. *Virology* 372: 107–117.
131. Lee C H, Chang S C, Wu C H, Chang M F (2001) A novel chromosome region maintenance 1-independent nuclear export signal of the large form of hepatitis delta antigen that is required for the viral assembly. *The Journal of biological chemistry* 276: 8142–8148.
132. Lee C Z, Chen P J, Lai M M, Chen D S (1994) Isoprenylation of large hepatitis delta antigen is necessary but not sufficient for hepatitis delta virus assembly. *Virology* 199: 169–175.
133. Lee C Z, Lin J H, Chao M, McKnight K, Lai M M (1993) RNA-binding activity of hepatitis delta antigen involves two arginine-rich motifs and is required for hepatitis delta virus RNA replication. *Journal of virology* 67: 2221–2227.
134. Lee C-M, Changchien C-S, Chung J-C, Liaw Y-F (1996) Characterization of a new genotype II hepatitis delta virus from Taiwan. *J. Med. Virol.* 49: 145–154.
135. Leistner C M, Gruen-Bernhard S, Glebe D (2008) Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cellular microbiology* 10: 122–133.

136. Li C, Wen A, Shen B, Lu J, Huang Y, Chang Y (2011) FastCloning: a highly simplified, purification-free, sequence- and ligation-independent PCR cloning method. *BMC biotechnology* 11: 92.
137. Li Y-J, Macnaughton T, Gao L, Lai M M C (2006) RNA-templated replication of hepatitis delta virus: genomic and antigenomic RNAs associate with different nuclear bodies. *Journal of virology* 80: 6478–6486.
138. Li Y-J, Stallcup M R, Lai M M C (2004) Hepatitis delta virus antigen is methylated at arginine residues, and methylation regulates subcellular localization and RNA replication. *Journal of virology* 78: 13325–13334.
139. Lin B C, Defenbaugh D A, Casey J L (2010) Multimerization of hepatitis delta antigen is a critical determinant of RNA binding specificity. *Journal of virology* 84: 1406–1413.
140. Long M, Souza S J de, Gilbert W (1997) Delta-interacting protein A and the origin of hepatitis delta antigen. *Science (New York, N.Y.)* 276: 824–825.
141. Lozano J L, Crespo J, La Cruz F de, Casafont F, Lopez-Arias M J, Martín-Ramos L, Pons-Romero F (1994) Correlation between hepatitis B viremia and the clinical and histological activity of chronic delta hepatitis. *Medical microbiology and immunology* 183: 159–167.
142. Lucey M R, Graham D M, Martin P, Di Bisceglie A, Rosenthal S, Waggoner J G, Merion R M, Campbell D A, Nostrant T T, Appelman H D (1992) Recurrence of hepatitis B and delta hepatitis after orthotopic liver transplantation. *Gut* 33: 1390–1396.
143. Lunemann S, Malone D F G, Grabowski J, Port K, Béziat V, Bremer B, Malmberg K-J, Manns M P, Sandberg J K, Cornberg M, Ljunggren H-G, Wedemeyer H, Björkström N K (2015) Effects of HDV infection and pegylated interferon α treatment on the natural killer cell compartment in chronically infected individuals. *Gut* 64: 469–482.
144. Luo G X, Chao M, Hsieh S Y, Sureau C, Nishikura K, Taylor J (1990) A specific base transition occurs on replicating hepatitis delta virus RNA. *Journal of virology* 64: 1021–1027.
145. Lutterkort G L, Wranke A, Hengst J, Yurdaydin C, Stift J, Bremer B, Hardtke S, Keskin O, Idilman R, Manns M P, Dienes H P, Falk C, Wedemeyer H, Heidrich B (2018) Viral dominance patterns in chronic hepatitis delta determine early response to interferon alpha therapy. *Journal of viral hepatitis* 25: 1384–1394.
146. Macnaughton T B, Lai M M C (2002) Genomic but not antigenomic hepatitis delta virus RNA is preferentially exported from the nucleus immediately after synthesis and processing. *Journal of virology* 76: 3928–3935.
147. Magnius L, Taylor J, Mason W S, Sureau C, Dény P, Norder H, Ictv R C (2018) ICTV Virus Taxonomy Profile: Deltavirus. *Journal of General Virology* 99: 1565–1566.
148. Makino S, Chang M F, Shieh C K, Kamahora T, Vannier D M, Govindarajan S, Lai M M (1987) Molecular cloning and sequencing of a human hepatitis delta (delta) virus RNA. *Nature* 329: 343–346.

149. Miao Z, Zhang S, Ma Z, Hakim M S, Wang W, Peppelenbosch M P, Pan Q (2019) Recombinant identification, molecular classification and proposed reference genomes for hepatitis delta virus. *Journal of viral hepatitis* 26: 183–190.
150. Miao Z, Zhang S, Ou X, Li S, Ma Z, Wang W, Peppelenbosch M P, Liu J, Pan Q (2020) Estimating the Global Prevalence, Disease Progression, and Clinical Outcome of Hepatitis Delta Virus Infection. *The Journal of infectious diseases* 221: 1677–1687.
151. Modahl L E, Macnaughton T B, Zhu N, Johnson D L, Lai M M (2000) RNA-Dependent replication and transcription of hepatitis delta virus RNA involve distinct cellular RNA polymerases. *Molecular and Cellular Biology* 20: 6030–6039.
152. Mu J J, Chen D S, Chen P J (2001) The conserved serine 177 in the delta antigen of hepatitis delta virus is one putative phosphorylation site and is required for efficient viral RNA replication. *Journal of virology* 75: 9087–9095.
153. Mu J-J, Tsay Y-G, Juan L-J, Fu T-F, Huang W-H, Chen D-S, Chen P-J (2004) The small delta antigen of hepatitis delta virus is an acetylated protein and acetylation of lysine 72 may influence its cellular localization and viral RNA synthesis. *Virology* 319: 60–70.
154. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J (1982) Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer research* 42: 3858–3863.
155. Nakano T, Shapiro C N, Hadler S C, Casey J L, Mizokami M, Orito E, Robertson B H (2001) Characterization of hepatitis D virus genotype III among Yucpa Indians in Venezuela. *The Journal of general virology* 82: 2183–2189.
156. Nathani R, Leibowitz R, Giri D, Villarroel C, Salman S, Sehmbhi M, Yoon B H, Dinani A, Weisberg I (2023) The Delta Delta: Gaps in screening and patient assessment for hepatitis D virus infection. *Journal of viral hepatitis* 30: 195–200.
157. Negro F (2014) Hepatitis D virus coinfection and superinfection. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 4: a021550.
158. Negro F, Korba B E, Forzani B, Baroudy B M, Brown T L, Gerin J L, Ponzetto A (1989) Hepatitis delta virus (HDV) and woodchuck hepatitis virus (WHV) nucleic acids in tissues of HDV-infected chronic WHV carrier woodchucks. *Journal of virology* 63: 1612–1618.
159. Netter H J, Barrios M H, Littlejohn M, Yuen L K W (2021) Hepatitis Delta Virus (HDV) and Delta-Like Agents: Insights Into Their Origin. *Frontiers in microbiology* 12: 652962.
160. Ni Y, Lempp F A, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Fälth M, Stindt J, Königer C, Nassal M, Kubitz R, Sülthmann H, Urban S (2014) Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* 146: 1070–1083.
161. Ni Y, Zhang Z, Engelskircher L, Verch G, Tu T, Lempp F A, Urban S (2019) Generation and characterization of a stable cell line persistently replicating and secreting the human hepatitis delta virus. *Scientific Reports* 9: 10021.
162. Niro G A, Ciancio A, Tillman H L, Lagget M, Olivero A, Perri F, Fontana R, Little N, Campbell F, Smedile A, Manns M P, Andriulli A, Rizzetto M (2005) Lamivudine

therapy in chronic delta hepatitis: a multicentre randomized-controlled pilot study. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 22: 227–232.

163. Niro G A, Smedile A, Ippolito A M, Ciancio A, Fontana R, Olivero A, Valvano M R, Abate M L, Gioffreda D, Caviglia G P, Rizzetto M, Andriulli A (2010) Outcome of chronic delta hepatitis in Italy: a long-term cohort study. *Journal of hepatology* 53: 834–840.
164. Olsen K, Mahgoub S, Al-Shakhshir S, Algieder A, Atabani S, Bannaga A, Elsharkawy A M (2023) Recent treatment advances and practical management of hepatitis D virus. *Clinical medicine (London, England)*.
165. O'Malley B, Lazinski D W (2005) Roles of carboxyl-terminal and farnesylated residues in the functions of the large hepatitis delta antigen. *Journal of virology* 79: 1142–1153.
166. Op den Brouw M L, Binda R S, van Roosmalen M H, Protzer U, Janssen H L A, van der Molen R G, Woltman A M (2009) Hepatitis B virus surface antigen impairs myeloid dendritic cell function: a possible immune escape mechanism of hepatitis B virus. *Immunology* 126: 280–289.
167. Ottobrelli A, Marzano A, Smedile A, Recchia S, Salizzoni M, Cornu C, Lamy M E, Otte J B, Hemptinne B de, Geubel A (1991) Patterns of hepatitis delta virus reinfection and disease in liver transplantation. *Gastroenterology* 101: 1649–1655.
168. Palom A, Rando-Segura A, Vico J, Pacín B, Vargas E, Barreira-Díaz A, Rodríguez-Frías F, Riveiro-Barciela M, Esteban R, Buti M (2022) Implementation of anti-HDV reflex testing among HBsAg-positive individuals increases testing for hepatitis D. *JHEP reports : innovation in hepatology* 4: 100547.
169. Palom A, Rodríguez-Tajes S, Navascués C A, García-Samaniego J, Riveiro-Barciela M, Lens S, Rodríguez M, Esteban R, Buti M (2020) Long-term clinical outcomes in patients with chronic hepatitis delta: the role of persistent viraemia. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 51: 158–166.
170. Paraná R, Kay A, Molinet F, Viana S, Silva L K, Salcedo J M, Tavares-Neto J, Lobato C, Rios-Leite M, Matteoni L, D'Oliveira A, Tauil P, Trpo C (2006) HDV genotypes in the Western Brazilian Amazon region: A preliminary report. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 75: 475–479.
171. Paraskevopoulou S, Pirzer F, Goldmann N, Schmid J, Corman V M, Gottula L T, Schroeder S, Rasche A, Muth D, Drexler J F, Heni A C, Eibner G J, Page R A, Jones T C, Mller M A, Sommer S, Glebe D, Drosten C (2020) Mammalian deltavirus without hepadnavirus coinfection in the neotropical rodent *Proechimys semispinosus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117: 17977–17983.
172. Pasetti G, Calzetti C, Degli Antoni A, Ferrari C, Penna A, Fiaccadori F (1988) Clinical features of hepatitis delta virus infection in a northern Italian area. *Infection* 16: 345–348.
173. Patel E U, Thio C L, Boon D, Thomas D L, Tobian A A R (2019) Prevalence of Hepatitis B and Hepatitis D Virus Infections in the United States, 2011-2016. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 69: 709–712.

174. Patient R, Hourieux C, Sizaret P-Y, Trassard S, Sureau C, Roingeard P (2007) Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *Journal of virology* 81: 3842–3851.
175. Perez-Vargas J, Amirache F, Boson B, Mialon C, Freitas N, Sureau C, Fusil F, Cosset F-L (2019) Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo. *Nat Commun* 10: 2098.
176. Pérez-Vargas J, Pereira de Oliveira R, Jacquet S, Pontier D, Cosset F-L, Freitas N (2021) HDV-Like Viruses. *Viruses* 13.
177. Petersen J, Dandri M, Mier W, Lütgehetmann M, Volz T, Weizsäcker F von, Haberkorn U, Fischer L, Pollok J-M, Erbes B, Seitz S, Urban S (2008) Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nature biotechnology* 26: 335–341.
178. Pflüger L S, Nörz D, Volz T, Giersch K, Giese A, Goldmann N, Glebe D, Bockmann J-H, Pfefferle S, Dandri M, zur Schulze Wiesch J, Lütgehetmann M (2021) Clinical establishment of a laboratory developed quantitative HDV PCR assay on the cobas6800 high-throughput system. *JHEP reports : innovation in hepatology* 3: 100356.
179. Pflüger L S, zur Schulze Wiesch J, Polywka S, Lütgehetmann M (2021) Hepatitis delta virus propagation enabled by hepatitis C virus-Scientifically intriguing, but is it relevant to clinical practice? *Journal of viral hepatitis* 28: 213–216.
180. Poisson F, Roingeard P, Baillou A, Dubois F, Bonelli F, Calogero R A, Goudeau A (1993) Characterization of RNA-binding domains of hepatitis delta antigen. *The Journal of general virology* 74 (Pt 11): 2473–2478.
181. Polo J M, Jeng K S, Lim B, Govindarajan S, Hofman F, Sangiorgi F, Lai M M (1995) Transgenic mice support replication of hepatitis delta virus RNA in multiple tissues, particularly in skeletal muscle. *Journal of virology* 69: 4880–4887.
182. Polo J M, Lim B, Govindarajan S, Lai M M (1995) Replication of hepatitis delta virus RNA in mice after intramuscular injection of plasmid DNA. *Journal of virology* 69: 5203–5207.
183. Polson A G, Bass B L, Casey J L (1996) RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase. *Nature* 380: 454–456.
184. Pouri A A, Ghojazadeh M, Baiaz B, Hamzavi F S, Pourasghari B, Somi M H (2020) Prevalence of hepatitis D virus among HBsAg-positive individuals, 2015-2016: Azar cohort study. *Health promotion perspectives* 10: 38–42.
185. Rackwitz H R, Rohde W, Sängler H L (1981) DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies. *Nature* 291: 297–301.
186. Radjef N, Gordien E, Ivaniushina V, Gault E, Anaïs P, Drugan T, Trinchet J-C, Roulot D, Tamby M, Milinkovitch M C, Dény P (2004) Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades. *Journal of virology* 78: 2537–2544.
187. Raimondo G, Longo G, Squadrito G (1983) Exacerbation of chronic liver disease due to hepatitis B surface antigen after delta infection. *British medical journal (Clinical research ed.)* 286: 845.

188. Raimondo G, Smedile A, Gallo L, Balbo A, Ponzetto A, Rizzetto M (1982) Multicentre study of prevalence of HBV-associated delta infection and liver disease in drug-addicts. *Lancet* (London, England) 1: 249–251.
189. Razavi H A, Buti M, Terrault N A, Zeuzem S, Yurdaydin C, Tanaka J, Aghemo A, Akarca U S, Al Masri N M, Alalwan A M, Aleman S, Alghamdi A S, Alghamdi S, Al-Hamoudi W K, Aljumah A A, Altraif I H, Asselah T, Ben-Ari Z, Berg T, Biondi M J, Blach S, Braga W S M, Brandão-Mello C E, Brunetto M R, Cabezas J, Cheinquer H, Chen P-J, Cheon M-E, Chuang W-L, Coffin C S, Coppola N, Craxi A, Crespo J, Ledinghen V de, Duberg A-S, Etzion O, Ferraz M L G, Ferreira P R A, Fornis X, Foster G R, Gaeta G B, Gamkrelidze I, García-Samaniego J, Gheorghe L S, Gholam P M, Gish R G, Glenn J, Hercun J, Hsu Y-C, Hu C-C, Huang J-F, Janjua N, Jia J, Kåberg M, Kaita K D E, Kamal H, Kao J-H, Kondili L A, Lagging M, Lázaro P, Lazarus J V, Lee M-H, Lim Y-S, Marotta P J, Navas M-C, Naveira M C M, Orrego M, Osiowy C, Pan C Q, Pessoa M G, Raimondo G, Ramji A, Razavi-Shearer D M, Razavi-Shearer K, Ríos-Hincapié C Y, Rodríguez M, Rosenberg W M C, Roulot D M, Ryder S D, Safadi R, Sanai F M, Santantonio T A, Sarrazin C, Shouval D, Tacke F, Tergast T L, Villalobos-Salcedo J M, Voeller A S, Yang H-I, Yu M-L, Zuckerman E (2023) Hepatitis D double reflex testing of all hepatitis B carriers in low-HBV- and high-HBV/HDV-prevalence countries. *Journal of hepatology* 79: 576–580.
190. Rizzetto M, Canese M G, Aricò S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, Verme G (1977) Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* 18: 997–1003.
191. Rizzetto M, Canese M G, Gerin J L, London W T, Sly D L, Purcell R H (1980) Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. *The Journal of infectious diseases* 141: 590–602.
192. Rizzetto M, Durazzo M (1991) Hepatitis delta virus (HDV) infections. Epidemiological and clinical heterogeneity. *Journal of hepatology* 13 Suppl 4: S116-8.
193. Rizzetto M, Hamid S, Negro F (2021) The changing context of hepatitis D. *Journal of hepatology* 74: 1200–1211.
194. Rizzetto M, Hoyer B, Canese M G, Shih J W, Purcell R H, Gerin J L (1980) delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77: 6124–6128.
195. Rizzetto M, Purcell R H, Gerin J L (1980) Epidemiology of HBV-associated delta agent: geographical distribution of anti-delta and prevalence in polytransfused HBsAg carriers. *Lancet* (London, England) 1: 1215–1218.
196. Rizzetto M, Shih J W, Gocke D J, Purcell R H, Verme G, Gerin J L (1979) Incidence and significance of antibodies to delta antigen in hepatitis B virus infection. *Lancet* (London, England) 2: 986–990.
197. Rizzetto M, Verme G, Recchia S, Bonino F, Farci P, Aricò S, Calzia R, Picciotto A, Colombo M, Popper H (1983) Chronic hepatitis in carriers of hepatitis B surface antigen, with intrahepatic expression of the delta antigen. An active and progressive disease unresponsive to immunosuppressive treatment. *Annals of internal medicine* 98: 437–441.

198. Roggendorf M (2012) Perspectives for a vaccine against hepatitis delta virus. *Seminars in liver disease* 32: 256–261.
199. Romeo R, Del Ninno E, Rumi M, Russo A, Sangiovanni A, Franchis R de, Ronchi G, Colombo M (2009) A 28-year study of the course of hepatitis Delta infection: a risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 136: 1629–1638.
200. Romeo R, Foglieni B, Casazza G, Spreafico M, Colombo M, Prati D (2014) High Serum Levels of HDV RNA Are Predictors of Cirrhosis and Liver Cancer in Patients with Chronic Hepatitis Delta. *PLoS ONE* 9.
201. Rosina F, Conoscitore P, Cuppone R, Rocca G, Giuliani A, Cozzolongo R, Niro G, Smedile A, Saracco G, Andriulli A, Manghisi O G, Rizzetto M (1999) Changing pattern of chronic hepatitis D in Southern Europe. *Gastroenterology* 117: 161–166.
202. Roulot D, Brichtler S, Layese R, BenAbdesselam Z, Zoulim F, Thibault V, Scholtes C, Roche B, Castelnau C, Poynard T, Chazouillères O, Ganne N, Fontaine H, Gournay J, Guyader D, Le Gal F, Nahon P, Roudot-Thoraval F, Gordien E (2020) Origin, HDV genotype and persistent viremia determine outcome and treatment response in patients with chronic hepatitis delta. *Journal of hepatology* 73: 1046–1062.
203. Safaie P, Razeghi S, Rouster S D, Privitera I, Sherman K E (2018) Hepatitis D diagnostics: Utilization and testing in the United States. *Virus research* 250: 114–117.
204. (2021) Safety and efficacy of bulevirtide monotherapy and in combination with peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis delta: 24 weeks interim data ...
205. Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Kawakami Y, Miyazato S, Kinjo F, Saito A, Ma S P, Hotta H, Kinoshita M (1999) Hepatitis delta virus genotype IIb predominates in an endemic area, Okinawa, Japan. *J. Med. Virol.* 58: 366–372.
206. Salehi-Ashtiani K, Lupták A, Litovchick A, Szostak J W (2006) A genomewide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene. *Science (New York, N.Y.)* 313: 1788–1792.
207. Samuel D (1995) Long-term clinical and virological outcome after liver transplantation for cirrhosis caused by chronic delta hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 21: 333–339.
208. Sandmann L, Cornberg M (2021) Experimental Drugs for the Treatment of Hepatitis D. *Journal of experimental pharmacology* 13: 461–468.
209. Saracco G, Macagno S, Rosina F, Rizzetto M (1988) Serologic markers with fulminant hepatitis in persons positive for hepatitis B surface antigen. A worldwide epidemiologic and clinical survey. *Annals of internal medicine* 108: 380–383.
210. Saracco G, Rosina F, Brunetto M R, Amoroso P, Caredda F, Farci P, Piantino P, Bonino F, Rizzetto M (1987) Rapidly progressive HBsAg-positive hepatitis in Italy. The role of hepatitis delta virus infection. *Journal of hepatology* 5: 274–281.
211. Sato S, Cornillez-Ty C, Lazinski D W (2004) By inhibiting replication, the large hepatitis delta antigen can indirectly regulate amber/W editing and its own expression. *Journal of virology* 78: 8120–8134.

212. Sato S, Wong S K, Lazinski D W (2001) Hepatitis delta virus minimal substrates competent for editing by ADAR1 and ADAR2. *Journal of virology* 75: 8547–8555.
213. Sayad B, Naderi Y, Alavian S M, Najafi F, Janbakhsh A, Mansouri F, Vaziri S, Afsharian M, Norooznehad F (2018) Hepatitis D virus infection in Kermanshah, west of Iran: seroprevalence and viremic infections. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench* 11: 145–152.
214. Schulze A, Gripon P, Urban S (2007) Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* 46: 1759–1768.
215. Sellier P O, Maylin S, Brichtler S, Berçot B, Lopes A, Chopin D, Pogliaghi M, Munier A-L, Delcey V, Simoneau G, Evans J, Gordien E, Simon F, Bergmann J-F (2018) Hepatitis B Virus-Hepatitis D Virus mother-to-child co-transmission: A retrospective study in a developed country. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 38: 611–618.
216. Shakil A O, Hadziyannis S, Hoofnagle J H, Di Bisceglie A M, Gerin J L, Casey J L (1997) Geographic distribution and genetic variability of hepatitis delta virus genotype I. *Virology* 234: 160–167.
217. Shih H H, Jeng K-S, Syu W-J, Huang Y-H, Su C-W, Peng W-L, Sheen I-J, Wu J-C (2008) Hepatitis B surface antigen levels and sequences of natural hepatitis B virus variants influence the assembly and secretion of hepatitis d virus. *Journal of virology* 82: 2250–2264.
218. Smedile A, Rizzetto M, Denniston K, Bonino F, Wells F, Verme G, Consolo F, Hoyer B, Purcell R H, Gerin J L (1986) Type D hepatitis: the clinical significance of hepatitis D virus RNA in serum as detected by a hybridization-based assay. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 6: 1297–1302.
219. Smedile A, Rosina F, Saracco G, Chiaberge E, Lattore V, Fabiano A, Brunetto M R, Verme G, Rizzetto M, Bonino F (1991) Hepatitis B virus replication modulates pathogenesis of hepatitis D virus in chronic hepatitis D. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 13: 413–416.
220. Smedile A, Verme G, Cargnel A, Dentico P, Opolon P, Vergani D, Farci P, Caredda F, Caporaso N, Trepo C, Gimson A, Williams R, Rizzetto M (1982) INFLUENCE OF DELTA INFECTION ON SEVERITY OF HEPATITIS B. *Lancet (London, England)* 320: 945–947.
221. Sommereyns C, Paul S, Staeheli P, Michiels T (2008) IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS pathogens* 4: e1000017.
222. Steiner B, Mandelkow E M, Biernat J, Gustke N, Meyer H E, Schmidt B, Mieskes G, Söling H D, Drechsel D, Kirschner M W, Goedert M, Mandelkow E (1990) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca²⁺(+)-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. *The EMBO Journal* 9: 3539–3544.
223. Stieger B (2011) The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation. *Handbook of experimental pharmacology*: 205–259.

224. Stieger B, Hagenbuch B, Landmann L, Höchli M, Schroeder A, Meier P J (1994) In situ localization of the hepatocytic Na⁺/Taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology* 107: 1781–1787.
225. Stockdale A J, Chaponda M, Beloukas A, Phillips R O, Matthews P C, Papadimitropoulos A, King S, Bonnett L, Geretti A M (2017) Prevalence of hepatitis D virus infection in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Global health* 5: e992-e1003.
226. Stockdale A J, Kreuels B, Henrion M Y R, Giorgi E, Kyomuhangi I, Martel C de, Hutin Y, Geretti A M (2020) The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis. *Journal of hepatology* 73: 523–532.
227. Stroffolini T, Morisco F, Ferrigno L, Pontillo G, Iantosca G, Cossiga V, Crateri S, Tosti M E (2022) Acute Delta Hepatitis in Italy spanning three decades (1991-2019): Evidence for the effectiveness of the hepatitis B vaccination campaign. *Journal of viral hepatitis* 29: 78–86.
228. Stroffolini T, Sagnelli E, Sagnelli C, Russello M, Luca M de, Rosina F, Cacopardo B, Brancaccio G, Furlan C, Gaeta G B, Licata A, Almasio P L (2017) Hepatitis delta infection in Italian patients: towards the end of the story? *Infection* 45: 277–281.
229. Su C-W, Huang Y-H, Huo T-I, Shih H H, Sheen I-J, Chen S-W, Lee P-C, Lee S-D, Wu J-C (2006) Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. *Gastroenterology* 130: 1625–1635.
230. Sureau C (2006) The role of the HBV envelope proteins in the HDV replication cycle. *Current topics in microbiology and immunology* 307: 113–131.
231. Sureau C, Guerra B, Lanford R E (1993) Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. *Journal of virology* 67: 366–372.
232. Sureau C, Negro F (2016) The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *Journal of hepatology* 64: S102-S116.
233. Tavanez J P, Cunha C, Silva M C A, David E, Monjardino J, Carmo-Fonseca M (2002) Hepatitis delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *RNA (New York, N.Y.)* 8: 637–646.
234. Taylor J M (1990) Hepatitis delta virus: Cis and Trans functions required for replication. *Cell* 61: 371–373.
235. Taylor J M (2014) Host RNA circles and the origin of hepatitis delta virus. *World journal of gastroenterology* 20: 2971–2978.
236. Taylor J M (2020) Infection by Hepatitis Delta Virus. *Viruses* 12.
237. Terrault N A, Lok A S F, McMahon B J, Chang K-M, Hwang J P, Jonas M M, Brown R S, Bzowej N H, Wong J B (2018) Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology* 67: 1560–1599.
238. Tozun N, Ozdogan O, Cakaloglu Y, Idilman R, Karasu Z, Akarca U, Kaymakoglu S, Ergonul O (2015) Seroprevalence of hepatitis B and C virus infections and risk factors in Turkey: a fieldwork TURHEP study. *Clinical microbiology and infection* :

the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 21: 1020–1026.

239. Tseng C-H, Cheng T-S, Shu C-Y, Jeng K-S, Lai M M C (2010) Modification of small hepatitis delta virus antigen by SUMO protein. *Journal of virology* 84: 918–927.
240. Tseng C-H, Jeng K-S, Lai M M C (2008) Transcription of subgenomic mRNA of hepatitis delta virus requires a modified hepatitis delta antigen that is distinct from antigenomic RNA synthesis. *Journal of virology* 82: 9409–9416.
241. Tseng C-H, Lai M M C (2009) Hepatitis delta virus RNA replication. *Viruses* 1: 818–831.
242. Vaillant A (2016) Nucleic acid polymers: Broad spectrum antiviral activity, antiviral mechanisms and optimization for the treatment of hepatitis B and hepatitis D infection. *Antiviral research* 133: 32–40.
243. Vanlandschoot P, van Houtte F, Roobrouck A, Farhoudi A, Leroux-Roels G (2002) Hepatitis B virus surface antigen suppresses the activation of monocytes through interaction with a serum protein and a monocyte-specific receptor. *The Journal of general virology* 83: 1281–1289.
244. Volz T, Allweiss L, Ben MBarek M, Warlich M, Lohse A W, Pollok J M, Alexandrov A, Urban S, Petersen J, Lütgehetmann M, Dandri M (2013) The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. *Journal of hepatology* 58: 861–867.
245. Wang C J, Chen P J, Wu J C, Patel D, Chen D S (1991) Small-form hepatitis B surface antigen is sufficient to help in the assembly of hepatitis delta virus-like particles. *Journal of virology* 65: 6630–6636.
246. Wang C-C, Chang T-C, Lin C-W, Tsui H-L, Chu P B C, Chen B-S, Huang Z-S, Wu H-N (2003) Nucleic acid binding properties of the nucleic acid chaperone domain of hepatitis delta antigen. *Nucleic acids research* 31: 6481–6492.
247. Wang K S, Choo Q L, Weiner A J, Ou J H, Najarian R C, Thayer R M, Mullenbach G T, Denniston K J, Gerin J L, Houghton M (1986) Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. *Nature* 323: 508–514.
248. Wang W, Lempp F A, Schlund F, Walter L, Decker C C, Zhang Z, Ni Y, Urban S (2021) Assembly and infection efficacy of hepatitis B virus surface protein exchanges in 8 hepatitis D virus genotype isolates. *Journal of hepatology* 75: 311–323.
249. Wang Y-H, Chang S C, Huang C, Li Y-P, Lee C-H, Chang M-F (2005) Novel nuclear export signal-interacting protein, NESI, critical for the assembly of hepatitis delta virus. *Journal of virology* 79: 8113–8120.
250. Watanabe T, Sorensen E M, Naito A, Schott M, Kim S, Ahlquist P (2007) Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 10205–10210.
251. Webb C-H T, Riccitelli N J, Ruminiski D J, Lupták A (2009) Widespread occurrence of self-cleaving ribozymes. *Science (New York, N.Y.)* 326: 953.

252. Wedemeyer H, Aleman S, Brunetto M R, Blank A, Andreone P, Bogomolov P, Chulanov V, Mamonova N, Geyvandova N, Morozov V, Sagalova O, Stepanova T, Berger A, Manuilov D, Suri V, An Q, Da B, Flaherty J, Osinusi A, Liu Y, Merle U, zur Schulze Wiesch J, Zeuzem S, Ciesek S, Cornberg M, Lampertico P (2023) A Phase 3, Randomized Trial of Bulevirtide in Chronic Hepatitis D. *The New England journal of medicine* 389: 22–32.
253. Wedemeyer H, Negro F (2019) Devil hepatitis D: an orphan disease or largely underdiagnosed? *Gut* 68: 381–382.
254. Wedemeyer H, Schöneweis K, Bogomolov P, Blank A, Voronkova N, Stepanova T, Sagalova O, Chulanov V, Osipenko M, Morozov V, Geyvandova N, Sleptsova S, Bakulin I G, Khaertynova I, Rusanova M, Pathil A, Merle U, Bremer B, Allweiss L, Lempp F A, Port K, Haag M, Schwab M, zur Wiesch J S, Cornberg M, Haefeli W E, Dandri M, Alexandrov A, Urban S (2023) Safety and efficacy of bulevirtide in combination with tenofovir disoproxil fumarate in patients with hepatitis B virus and hepatitis D virus coinfection (MYR202): a multicentre, randomised, parallel-group, open-label, phase 2 trial. *The Lancet. Infectious diseases* 23: 117–129.
255. Wedemeyer H, Schöneweis K, Bogomolov P O, Voronkova N, Chulanov V, Stepanova T, Bremer B, Allweiss L, Dandri M, Burhenne J, Haefeli W-E, Ciesek S, Dittmer U, Alexandrov A, Urban S (2019) GS-13-Final results of a multicenter, open-label phase 2 clinical trial (MYR203) to assess safety and efficacy of myrcludex B in cwith PEG-interferon Alpha 2a in patients with chronic HBV/HDV co-infection. *Journal of hepatology* 70: e81.
256. Wedemeyer H, Yurdaydin C, Dalekos G N, Erhardt A, Çakaloğlu Y, Değertekin H, Gürel S, Zeuzem S, Zachou K, Bozkaya H, Koch A, Bock T, Dienes H P, Manns M P (2011) Peginterferon plus adefovir versus either drug alone for hepatitis delta. *The New England journal of medicine* 364: 322–331.
257. (2023) Week 48 results of the phase 3 D-LIVR study, a randomized double-blind, placebo-controlled trial evaluating the safety and efficacy of Lonafarnib-boosted ...
258. Weiner A J, Choo Q L, Wang K S, Govindarajan S, Redeker A G, Gerin J L, Houghton M (1988) A single antigenomic open reading frame of the hepatitis delta virus encodes the epitope(s) of both hepatitis delta antigen polypeptides p24 delta and p27 delta. *Journal of virology* 62: 594–599.
259. Wille M, Netter H J, Littlejohn M, Yuen L, Shi M, Eden J-S, Klaassen M, Holmes E C, Hurt A C (2018) A Divergent Hepatitis D-Like Agent in Birds. *Viruses* 10.
260. Williams V, Brichler S, Khan E, Chami M, Dény P, Kremsdorf D, Gordien E (2012) Large hepatitis delta antigen activates STAT-3 and NF-κB via oxidative stress. *Journal of viral hepatitis* 19: 744–753.
261. Wranke A, Hardtke S, Heidrich B, Dalekos G, Yalçın K, Tabak F, Gürel S, Çakaloğlu Y, Akarca U S, Lammert F, Häussinger D, Müller T, Wöbse M, Manns M P, Idilman R, Cornberg M, Wedemeyer H, Yurdaydin C (2020) Ten-year follow-up of a randomized controlled clinical trial in chronic hepatitis delta. *Journal of viral hepatitis* 27: 1359–1368.
262. Wu H N, Lin Y J, Lin F P, Makino S, Chang M F, Lai M M (1989) Human hepatitis delta virus RNA subfragments contain an autocleavage activity.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: 1831–1835.

263. Wu J C (2006) Functional and clinical significance of hepatitis D virus genotype II infection. *Current topics in microbiology and immunology* 307: 173–186.
264. Wu J C, Chen P J, Kuo M Y, Lee S D, Chen D S, Ting L P (1991) Production of hepatitis delta virus and suppression of helper hepatitis B virus in a human hepatoma cell line. *Journal of virology* 65: 1099–1104.
265. Wu J C, Chiang T Y, Sheen I J (1998) Characterization and phylogenetic analysis of a novel hepatitis D virus strain discovered by restriction fragment length polymorphism analysis. *The Journal of general virology* 79 (Pt 5): 1105–1113.
266. Wu J C, Choo K B, Chen C M, Chen T Z, Huo T I, Lee S D (1995) Genotyping of hepatitis D virus by restriction-fragment length polymorphism and relation to outcome of hepatitis D. *Lancet (London, England)* 346: 939–941.
267. Yamaguchi Y, Filipovska J, Yano K, Furuya A, Inukai N, Narita T, Wada T, Sugimoto S, Konarska M M, Handa H (2001) Stimulation of RNA polymerase II elongation by hepatitis delta antigen. *Science (New York, N.Y.)* 293: 124–127.
268. Yamaguchi Y, Mura T, Chanarat S, Okamoto S, Handa H (2007) Hepatitis delta antigen binds to the clamp of RNA polymerase II and affects transcriptional fidelity. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 12: 863–875.
269. 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.
270. Yan Y, Allweiss L, Yang D, Kang J, Wang J, Qian X, Zhang T, Liu H, Wang L, Liu S, Sui J, Chen X, Dandri M, Zhao J, Lu F (2019) Down-regulation of cell membrane localized NTCP expression in proliferating hepatocytes prevents hepatitis B virus infection. *Emerging microbes & infections* 8: 879–894.
271. Yeh T S, Lo S J, Chen P J, Lee Y H (1996) Casein kinase II and protein kinase C modulate hepatitis delta virus RNA replication but not empty viral particle assembly. *Journal of virology* 70: 6190–6198.
272. Yurdaydin C, Bozkaya H, Gürel S, Tillmann H L, Aslan N, Okçu-Heper A, Erden E, Yalçın K, Iliman N, Uzunalimoglu O, Manns M P, Bozdayi A M (2002) Famciclovir treatment of chronic delta hepatitis. *Journal of hepatology* 37: 266–271.
273. Yurdaydin C, Keskin O, Kalkan Ç, Karakaya F, Çalışkan A, Karatayli E, Karatayli S, Bozdayi A M, Koh C, Heller T, Idilman R, Glenn J S (2018) Optimizing lonafarnib treatment for the management of chronic delta hepatitis: The LOWR HDV-1 study. *Hepatology* 67: 1224–1236.
274. Yurdaydin C, Keskin O, Yurdcu E, Çalışkan A, Önem S, Karakaya F, Kalkan Ç, Karatayli E, Karatayli S, Choong I, Apelian D, Koh C, Heller T, Idilman R, Bozdayi A M, Glenn J S (2022) A phase 2 dose-finding study of lonafarnib and ritonavir with or without interferon alpha for chronic delta hepatitis. *Hepatology* 75: 1551–1565.
275. Zachou K, Yurdaydin C, Drebber U, Dalekos G N, Erhardt A, Cakaloglu Y, Degertekin H, Gurel S, Zeuzem S, Bozkaya H, Schlaphoff V, Dienes H P, Bock T C, Manns M P, Wedemeyer H (2010) Quantitative HBsAg and HDV-RNA levels in

chronic delta hepatitis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 30: 430–437.

276. Zhang Z, Filzmayer C, Ni Y, Sülmann H, Mutz P, Hiet M-S, Vondran F W R, Bartenschlager R, Urban S (2018) Hepatitis D virus replication is sensed by MDA5 and induces IFN- β/λ responses in hepatocytes. *Journal of hepatology* 69: 25–35.
277. Zhang Z, Ni Y, Lempp F A, Walter L, Mutz P, Bartenschlager R, Urban S (2022) Hepatitis D virus-induced interferon response and administered interferons control cell division-mediated virus spread. *Journal of hepatology* 77: 957–966.
278. Zignego A L, Samuel D, Gentilini P, Bismuth H (1993) Patterns and mechanisms of hepatitis B/hepatitis D reinfection after liver transplantation. *Archives of virology. Supplementum* 8: 281–289.
279. Zuccola H J, Rozzelle J E, Lemon S M, Erickson B W, Hogle J M (1998) Structural basis of the oligomerization of hepatitis delta antigen. *Structure (London, England : 1993)* 6: 821–830.

11 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

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

Ort / Datum

Unterschrift

12 DANKSAGUNG

Zuvorderst möchte ich mich bei **Prof. Dr. Dieter Glebe** bedanken für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Medizinische Virologie der JLU Gießen anzufertigen. Vielen Dank für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für die engagierte Unterstützung und für dieses interessante Thema.

Ein besonders großes Dankeschön gebührt auch **Dr. Nora Goldmann** für die nie enden wollende Geduld mit mir. Danke, dass du immer erreichbar warst und immer eine Antwort auf alle meine (klugen und nicht so klugen) Fragen hattest. Danke auch für die vielen lobenden Worte, die mich stets motiviert haben weiterzumachen.

Danke an **Nora, Felix, Lena, Sigg, Zakia** für das angenehme Arbeitsklima in der Arbeitsgruppe und die schöne gemeinsame Zeit. Ich habe mich bei euch immer sehr wohl gefühlt und hatte immer viel Freude im Labor.

Danke an meinen Partner **Max** für die mentale Unterstützung, die zahlreichen aufbauenden Worte und die Ablenkungen zum richtigen Zeitpunkt.

Ich danke meiner ganzen **Familie** für die tatkräftige Unterstützung während des gesamten Studiums und speziell meinen **Eltern**, die mir dieses Studium überhaupt erst ermöglicht haben. Danke, dass ihr mich nie unter Druck gesetzt habt und immer stolz auf mich seid.