

Angefertigt am
Fachbereich 08 - Biologie und Chemie
in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Virologie
am Fachbereich 11 - Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Zoonotisches Potenzial neu entdeckter
Orthohepadnaviren aus Fledermäusen und
die Charakterisierung der Virus-Rezeptor
Interaktionen des Hepatitis B Virus**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs 08 - Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Alexander König
Dipl. biol.

Gießen 2014

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn

Gutachter: Prof. Dr. Michael U. Martin
Institut für Immunologie
Fachbereich 08 – Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

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

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	2
1.1	Entdeckungsgeschichte der Hepatitis B und D Viren	2
1.1.1	Die Geschichte des Hepatitis B Virus.....	2
1.1.2	Das Hepatitis D Virus: Geschichte und Taxonomie	2
1.2	Epidemiologische Relevanz von HBV- und HDV-Infektionen	3
1.3	Die Familie der Hepadnaviridae	3
1.3.1	Taxonomie der Hepadnaviridae	3
1.3.2	Epidemiologische Aspekte der Hepadnaviridae und Evolution des HBV	4
1.3.2.1	Neu entdeckte Hepadnaviren seit 2013.....	6
1.3.3	Strukturelle Aspekte der Hepadnaviridae und des Hepatitis Delta Virus	9
1.3.3.1	Die Morphologie der Hepadnaviridae am Beispiel des Hepatitis B Virus	9
1.3.3.2	Der Genomaufbau der Hepadnaviridae	10
1.3.3.3	Die Oberflächenproteine des Hepatitis B Virus.....	12
1.3.3.4	Das Genom und die Morphologie des Hepatitis Delta Virus.....	15
1.3.4	Klinische Aspekte einer HBV-Infektion.....	16
1.3.4.1	Transmission.....	16
1.3.4.2	Impfprävention der Hepatitis B Infektionen	17
1.3.4.3	Infektionsverlauf und Immunpathogenese	18
1.3.4.4	Diagnostische Marker der HBV-Infektion.....	19
1.4	Molekularvirologische und zellbiologische Aspekte einer HBV- und HDV-Infektion.....	20
1.4.1	Die initialen Schritte des HBV-Replikationszyklus	20
1.4.2	Intermediäre Schritte des HBV-Replikationszyklus	21
1.4.3	Die späten Schritte des HBV-Replikationszyklus	21
1.4.4	Der Replikationszyklus des HDV	23
1.5	<i>In vitro</i> Infektionssysteme für HBV / HDV	24
1.6	Die Funktion des NTCPs und anderer Transporter der Solute Carrier Familie 10 (SLC10)....	25
2.	Zielsetzung.....	27

Inhaltsverzeichnis

3.	Materialien	28
3.1	Zellkultur.....	28
3.1.1	Primäre Hepatozyten und Hepatomzelllinien	28
3.1.1.1	PTH	28
3.1.1.2	PHH.....	28
3.1.1.3	HepG2 Tet-On Advanced.....	28
3.1.1.4	NTCP-HepG2 TO	29
3.1.1.5	HuH7.....	29
3.2	Plasmide, Primer und quantitative realtime PCR.....	30
3.2.1	Plasmide	30
3.2.1.1	ZFN-Vektor, ZFN_NTCP-FLAG	30
3.2.1.2	pcDNA5/FRT/TO	31
3.2.1.3	pCEP-Puro.....	31
3.2.1.4	pCH9-200.....	31
3.2.2	Primer zur Amplifikation und Quantifizierung von HDV RNA oder HBV-DNA mittels RT-PCR	31
3.2.3	Mastermix zur Amplifikation und Quantifizierung von HDV RNA oder HBV-DNA mittels RT-PCR	32
3.3	Hepadnavirale Myr-präS1-Peptide.....	32
3.4	Gereinigtes Hepatitis B Virus aus dem Serum eines chronisch HBV infizierten Patienten ...	33
3.5	Rekombinantes Hepatitis D Virus aus HuH7-Zellkulturüberständen	33
3.6	Antikörper und Nachweisproteine.....	34
3.6.1	Primärantikörper	34
3.6.2	Sekundärantikörper und Nachweisproteine	35
3.7	Chemische Inhibitoren und Gallensalze	35
3.8	Transportpuffer für NBD-TC	36
3.9	Puffer, Medien.....	37
3.10	Chemikalien	38
3.11	Kommerzielle Kits.....	39

Inhaltsverzeichnis

3.12	Verbrauchsmaterialien.....	39
3.13	Geräte.....	40
4.	Methoden.....	41
4.1	Amplifizierung von Plasmid-DNA	41
4.1.1	Transformation, <i>E. coli</i> Flüssigkultur und Plasmidpräparation	41
4.2	Isolierung und Kultivierung primärer Hepatozyten aus <i>Tupaia belangeri</i>	41
4.2.1	Tiertötung.....	41
4.2.2	Entnahme der Leber und Vereinzelung der Hepatozyten.....	42
4.2.3	Zellgewinnung	42
4.3	Transfektion.....	43
4.4	Produktion von HDV und pseudotypisierten HDV	43
4.4.1	Bestimmung der Konzentration sekretierter HDV mittels RT-PCR.....	43
4.5	Immunologische Nachweismethoden.....	45
4.5.1	Immunfluoreszenz-Färbung	45
4.5.1.1	Nachweis der Expression von BATHBV Strukturproteinen in HepG2-Zellen.....	45
4.5.1.2	Nachweis der Bindung von Myr-präS1-Peptiden an PTH.....	45
4.5.1.3	Nachweis der HDAg-Expression in infizierten PTH oder NTCP-HepG2 Zellen.....	46
4.5.1.4	Nachweis der NTCP-Expression in PHH oder in DOX induzierbaren NTCP-HepG2 Zellen	46
4.5.2	Nachweis von HBsAg	46
4.5.3	Nachweis von HBeAg.....	47
4.5.4	Western-Blot	47
4.5.5	Immunfluoreszenz-Assay (IFA) zum Nachweis spezifischer Antikörper im Serum von Fledermäusen.....	48
4.6	Myr-präS1-Peptid Bindungsassay.....	48
4.7	Präparation von HBV aus Patientenserum.....	50
4.7.1	Quantitative PCR zum Nachweis von Hepatitis B Viruspartikeln	51
4.8	<i>In vitro</i> Infektionsexperimente.....	51
4.8.1	Infektionen mit HDV und HBV	51

Inhaltsverzeichnis

4.9	Nachweis der NTCP Transportaktivität	52
5.	Ergebnisse.....	53
5.1	Funktionelle Charakterisierung neu entdeckter Orthohepnaviren aus Fledermäusen	53
5.1.1	Untersuchung der Replikationsfähigkeit von BATHBV-Arten in humaner Hepatomzellkultur.....	53
5.1.1.1	Nachweis der Expression von BATHBV surface und core Proteinen und deren Antigenität gegen spezifische Antikörper des HBV	54
5.1.2	Infektiosität / Virulenz von BATHBV.....	56
5.1.2.1	Serologische Untersuchung von RBHBV oder HBHBV DNA positiven und negativen Hipposideros oder Rhinolophus Fledermäusen	56
5.1.2.2	Bestimmung der Bindungsaffinität verschiedener orthohepnaviraler myristoylierter präS1-Peptide zu primären Hepatozyten aus <i>Tupaia belangeri</i>	59
5.1.2.3	Untersuchung des inhibitorischen Potenzials verschiedener orthohepnaviraler Myr-präS1-Peptide auf die HBV-Infektion primärer Hepatozyten aus <i>Tupaia belangeri</i>	61
5.1.2.4	Produktion von HDV Pseudotypen mit Oberflächenproteinen verschiedener Orthohepnaviren.....	64
5.1.2.5	Infektion HBV-susceptibler Hepatozyten mit HDV, pseudotypisiert mit verschiedenen orthohepnaviralen Oberflächenproteinen	65
5.2	Wechselwirkungen der Funktionen des NTCPs als Rezeptor für HBV und als Gallensalztransporter.....	69
5.2.1	Korrelation der TC-Transportaktivität und der HBV-Suszeptibilität mit der Expression des hNTCP.....	69
5.2.1.1	Kinetik der NTCP-Expression in primären Hepatozyten und der NTCP-HepG2 Zelllinie	69
5.2.1.2	Kinetische Analyse der Myr-präS1-Peptid Bindung an die NTCP-HepG2 Zelllinie in Abhängigkeit von der NTCP-Expression	73
5.2.1.3	Kinetische Analyse der HBV-Infektion von stabil transfizierten NTCP-HepG2 Zellen in Abhängigkeit von der NTCP-Expression	75
5.2.1.4	Vergleichende Analyse der spezifischen Interaktion von HBV mit NTCP und den verwandten organischen Salztransportern ASBT des Intestins und SOAT der Testes.....	76

Inhaltsverzeichnis

5.2.1.5	Endozytotische Aufnahme des HBV Myr-präS1-Peptids in GFP-NTCP exprimierenden HepG2-Zellen.....	78
5.2.1.6	Einfluss von Gallensalzen und Inhibitoren des NTCPs auf die HBV-Infektion von primären Hepatozyten und NTCP-HepG2 Zellen.....	80
5.2.1.7	Einfluss von Gallensalzen und Inhibitoren des NTCPs auf die Bindung des Myr-präS1-Peptids an NTCP-HepG2 Zellen.....	83
5.2.1.8	Einfluss der Myr-präS1-Pepid Bindung an NTCP auf die Taurocholat Transportaktivität.....	85
6.	Diskussion.....	87
6.1	Neu entdeckte Hepadnaviren aus Fledermäusen.....	87
6.1.1	Molekularbiologische Untersuchung des zoonotischen Potenzials von Hepadnaviren aus Fledermäusen.....	87
6.1.1.1	Untersuchung später Interaktionsschritte zwischen BATHBV und humanen Hepatozyten zur Charakterisierung des zoonotische Potenzials von BATHBV.....	88
6.1.1.2	Untersuchung früher Interaktionsschritte zwischen BATHBV und HBV-suszeptibler Hepatozyten zur Charakterisierung des zoonotische Potenzials von BATHBV.....	90
6.1.2	Serologische Untersuchung der epidemiologischen Eigenschaften von Fledermaus Hepadnaviren.....	96
6.1.3	Potenzielle Transmissionswege von Hepadnaviren und die Evolution des HBV.....	98
6.2	Untersuchung der NTCP-Funktionalität als Gallensalz-Transporter und HBV-Rezeptor.....	101
6.2.1	Kinetische Untersuchung der Abhängigkeit des Gallensalztransports, der Myr-präS1-Peptid Bindung und der HBV-Infektion von der Expression des NTCPs.....	101
6.2.2	In vitro Untersuchung der Gewebespezifität des Hepatitis B Virus.....	103
6.2.3	Vergleichende Analyse der funktionellen Eigenschaften des NTCPs als Gallensalztransporter und Rezeptor für das Hepatitis B Virus.....	106
7.	Zusammenfassung.....	111
7.1	Charakterisierung des zoonotischen Potenzials neu entdeckter Orthohepadnaviren aus Fledermäusen.....	111
7.2	Wechselwirkungen zwischen den Funktionen des Natrium-abhängigen Taurocholat Cotransporter Polypeptids (NTCP) als HBV-Rezeptor und als Gallensalz-Transporter.....	112
8.	Ausblick.....	114

Inhaltsverzeichnis

9.	Summary.....	116
9.1	Characterization of the zoonotic potential from newly discovered orthohepadnaviruses of bats	116
9.2	Interactions between the functions of the sodium-dependent taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) as HBV receptor and bile salt transporter.	117
10.	Literaturverzeichnis.....	118
11.	Abkürzungsverzeichnis.....	137
12.	Anhang.....	142
13.	Danksagung.....	144
14.	Eidesstattliche Erklärung.....	146

Abbildungen

Abbildung 1: Phylogenetische Beziehung der Orthohepadnaviren.	8
Abbildung 2: Die Morphologie von Virionen und subviralen Partikeln des Hepatitis B Virus.	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung des HBV Genoms als cccDNA mit vier ORFs und den daraus transkribierten mRNAs.	12
Abbildung 4: Die Oberflächenproteine des Hepatitis B Virus.	14
Abbildung 5: Schematische Morphologie des HDV.	16
Abbildung 6: Der HBV Lebenszyklus.	22
Abbildung 7: Der Replikationszyklus des HDV.	24
Abbildung 8: Antigene Eigenschaften von BATHBV.	55
Abbildung 9: Nachweis spezifischer anti-BATHBV-Antikörpern im Serum von Fledermäusen.	57
Abbildung 10: Bindungsaffinität von orthohepadnaviralen Myr-präS1-Peptiden an primäre <i>Tupaia</i> -Hepatozyten (PTH).	60
Abbildung 11: Inhibitorisches Potenzial orthohepadnaviraler Myr-präS1(2-48)-Peptide auf die HBV-Infektion von PTH und PHH <i>in vitro</i>	62
Abbildung 12: Sekretion von HDV, pseudotypisiert mit verschiedenen orthohepadnaviralen Oberflächenproteinen.	64
Abbildung 13: NBD-Taurocholat Transport und HDV-Suszeptibilität von primären <i>Tupaia</i> Hepatozyten.	66
Abbildung 14: NBD-Taurocholat Transport und HDV-Suszeptibilität von hNTCP-transfizierten HepG2 Zellen.	67
Abbildung 15: Expression von NTCP in primären humanen Hepatozyten (PHH) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zellisolation aus der Leber.	70
Abbildung 16: Expression von NTCP in transfizierten HepG2 Zellen nach Doxycyclin Induktion.	72
Abbildung 17: HBV Myr-PräS1-Peptid Bindung an NTCP-HepG2 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Doxycyclin Induktion.	74
Abbildung 18: HBV-Infektion von NTCP-HepG2 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der vorübergehenden Doxycyclin Induktion.	75
Abbildung 19: Spezifität der HBV Myr-präS1-Peptid Bindung an hNTCP.	77
Abbildung 20: <i>Livecell-Imaging</i> Analyse der HBV Myr-präS1-Peptid Endozytose in NTCP-GFP exprimierende HepG2-Zellen.	79
Abbildung 21: Einfluss von Gallensalzen, Ezetimibe und Natriumionen auf die HBV-Suszeptibilität primärer <i>Tupaia</i> (PTH) und humaner Hepatozyten (PHH).	81
Abbildung 22: Einfluss von Gallensalzen und Ezetimibe auf die HBV-Suszeptibilität der NTCP-HepG2 Zelllinie.	82
Abbildung 23: Inhibitorisches Potenzial von Gallensalzen und Ezetimibe auf die Myr-präS1-Peptid Bindung an NTCP-exprimierende HepG2-Zellen.	84
Abbildung 24: Transport von NBD-TC in NTCP transfizierten HepG2-Zellen in Abhängigkeit der Myr-präS1-Peptid Bindung.	86
Abbildung 25: Sequenzvergleich des N-terminalen Bereichs verschiedener hepadnaviraler präS1-Domänen.	91
Abbildung 26: Aminosäuresequenzvergleich der organischen Salztransporter verschiedener NTCPs, ASBT und SOAT.	103
Abbildung 27: Funktionen des NTCPs als Gallensalz-Transporter und hoch-affiner Rezeptor des HBV.	110
Abbildung 28: Organspezifität der HBV-Infektion.	142
Abbildung 29: HBV-Infektion von NTCP-HepG2 Zellen in Abhängigkeit der Doxycyclin Konzentration.	143

Tabellen

Tabelle 1: Beprobungsgebiete, gefangene Fledermausfamilien und Spezies..... 6

Tabelle 2: Chronologie der Entdeckung der Hepadnaviridae Arten bzw. Genotypen oder Stämme.. ... 8

Tabelle 3: Verwendete Plasmide..... 30

Tabelle 4: Verwendete Primer 31

Tabelle 5: Rezepte für Mastermix 32

Tabelle 6: Verwendetes Virus aus Patientenserum 33

Tabelle 7: Verwendete Viren aus Zellkulturüberständen 33

Tabelle 8: Verwendete Primärantikörper 34

Tabelle 9: Verwendete Sekundärantikörper 35

Tabelle 10: Verwendete Gallensalze 35

Tabelle 11: Rezepte für Taurocholat-Transportpuffer 36

Tabelle 12: Verwendete Puffer und Medien..... 37

Tabelle 13: Verwendete Chemikalien 38

Tabelle 14: Verwendete Kits 39

Tabelle 15: Verwendete Verbrauchsmaterialien 39

Tabelle 16: Verwendete Geräte 40

Tabelle 17: Programm der Light Cycler PCR zur Quantifizierung von HDV 44

Tabelle 18: Programm der Light Cycler PCR zur Quantifizierung von HBV 51

Tabelle 19: Serologische Eigenschaften von Orthohepadnavirus DNA positiven und negativen Fledermäusen..... 58

Tabelle 20: IC₅₀-Werte verschiedener orthohepadnaviraler Myr-präS1-Peptide für die Inhibition einer HBV-Infektion von PTH und PHH..... 63

Tabelle 21: Bestimmung der Zellviabilität von PTH und HepG2-NTCP Zellen mit Hilfe des WST-1 Tests. 83

Tabelle 22: Übersichtstabelle der Ergebnisse zur funktionellen Charakterisierung neu entdeckter Orthohepadnaviren aus Fledermäusen. 100

Aus der Promotion resultierende Publikationen

1. Drexler JF, Geipel A, **König A**, Corman VM, van Riel D, Leijten LM, Bremer CM, Rasche A, Cottontail VM, Maganga GD, Schlegel M, Müller MA, Adam A, Klose SM, Carneiro AJ, Stöcker A, Franke CR, Gloza-Rausch F, Geyer J, Annan A, Adu-Sarkodie Y, Oppong S, Binger T, Vallo P, Tschapka M, Ulrich RG, Gerlich WH, Leroy E, Kuiken T, Glebe D, Drosten C. (Okt. 2013)

Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes.

doi: 10.1073/pnas.1308049110. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS). Vol. 110, No. 40. (Impact Factor 9, 809)

2. **König A**, Döring B, Mohr C, Geipel A, Geyer J, Glebe D. (May 2014)

Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na(+)/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes.

doi: 10.1016/j.jhep.2014.05.018. Journal of Hepatology. Vol. 61, S. 867-875. (Impact Factor 10, 401)

3. Glebe D and **König A**. (July 2014)

Molecular virology of hepatitis B virus and targets for antiviral intervention.

doi: 10.1159/000360946. Intervirology. Vol. 57, No 3-4. (Impact Factor 1, 773)

1. Einleitung

1.1 Entdeckungsgeschichte der Hepatitis B und D Viren

1.1.1 Die Geschichte des Hepatitis B Virus

Das für eine akute Hepatitis charakteristische Symptom des Ikterus wurde schon in der Antike wahrgenommen, allerdings ohne zu wissen, dass es sich dabei um eine Infektionskrankheit handelt. Erst Ende des 19. Jahrhunderts konnte zum ersten Mal eine Korrelation zwischen einer Pockenimpfungsmaßnahme mit menschlicher Lymphe und dem Auftreten der Hepatitis Symptome innerhalb einer Population festgestellt werden. Die Suche nach dem auslösenden Agens blieb über Jahrzehnte erfolglos. Jedoch konnte durch weitere epidemiologische Beobachtungen festgestellt werden, dass diese Krankheit entweder fäkal-oral (Typ A Hepatitis) oder parenteral, bzw. über das Blut (Typ B Hepatitis) übertragen werden kann. 1963 wurde durch Blumberg ein noch unbekanntes Protein im Blut eines indigenen Australiers entdeckt (Australia Antigen) [1]. Nachdem das Australia Antigen in verschiedensten Ethnien und Gesellschaftsschichten vorgefunden und eine Korrelation mit der Krankheit Typ B Hepatitis festgestellt wurde, wurde gezielt nach einem assoziierten Agens gesucht [2]. Durch das dominierende Auftreten von Genom freien subviralen Partikeln, konnte D. S. Dane erst im Jahre 1970 zusätzlich virusartige Partikel angereichert mit dem Australia Antigen im Elektronenmikroskop finden (Dane-Partikel) [3, 4]. 1973-1974 entdeckte W. S. Robinson eine DNA-Polymerase und eine DNA innerhalb der Dane-Partikel [4-6]. Die Dane-Partikel wurden daraufhin als Hepatitis B Virus (HBV) und das Australia Antigen als Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) bezeichnet.

1.1.2 Das Hepatitis D Virus: Geschichte und Taxonomie

Im Jahre 1977 wurde von M. Rizzetto ein noch unbekanntes Protein in den Kernen von Hepatozyten entdeckt, das aus der Leber von HBV positiven Patienten isoliert wurde [7]. Da dieses Antigen nur in HBV-infizierten Hepatozyten detektierbar war, ging man davon aus, dass es sich um ein noch unbekanntes Protein des HBV handelt. Das Protein wurde als Hepatitis Delta Antigen (HDAg) bezeichnet. In Infektionsversuchen mit Schimpansen konnte aber gezeigt werden, dass bei einer hohen Verdünnung des Serums von HBV und HDAg positiven Patienten die Übertragung des HBV möglich war, jedoch konnte dann das HDAg in den neu infizierten Tieren nicht mehr nachgewiesen werden [8, 9]. Außerdem etablierte sich das HDAg in der Leber eines chronisch HBV-infizierten Tieres deutlich schneller als in Leber eines gesunden Tieres. Das HDAg musste also von einem eigenständigen, infektiösen Agens stammen, das ausschließlich in Kombination mit dem HBV auftritt [9]. Im Serum von HBV- und HDAg-positiven Schimpansen wurden HBsAg und HDAg reiche Partikel mit einem Durchmesser von 35-37 nm entdeckt, die durch Ultrazentrifugation klar von den viralen

und subviralen Partikeln des HBV unterschieden werden konnten [10]. Das neu entdeckte Pathogen wurde zunächst als Delta-Agens später als Hepatitis Delta oder auch D Virus bezeichnet [11]. Aufgrund der Einzigartigkeit dieses Virus wurde dem Hepatitis Delta Virus eine eigene Gattung zugeteilt, Deltavirus. Bis jetzt wurden aus unterschiedlichen Gegenden der Welt insgesamt 8 verschiedene HDV-Genotypen beschrieben.

1.2 Epidemiologische Relevanz von HBV- und HDV-Infektionen

Obwohl seit 1982 ein wirksamer Impfstoff gegen HBV existiert, ist die Hepatitis B eine der am weitesten verbreiteten Infektionskrankheiten weltweit. Nach epidemiologischen Studien der World Health Organisation (WHO) haben rund ein Drittel der Weltbevölkerung (ca. 2 Milliarden) mit HBV Kontakt gehabt und 3 % (ca. 240 Millionen) sind chronische Träger des Virus. Man geht davon aus, dass ca. 30 % aller Fälle von Leberzirrhose und 53 % aller auftretenden hepatozellulären Karzinome Folgeerkrankung einer HBV-Infektion sind. Weltweit rechnet man mit mehr als 780.000 Todesfällen, die mit einer HBV-Infektion oder mit einer der Folgeerkrankungen assoziiert sind. Eine Koinfektion mit dem HDV weisen rund 10 Millionen Menschen weltweit auf. In 70-90 % der Fälle bewirkt eine Koinfektion einen schweren chronischen Verlauf der HBV-Infektion. Auffällig ist, dass eine HDV-Infektion von HBsAg-Trägern (Superinfektion) deutlich häufiger zu einem fulminanten Krankheitsverlauf führt als eine simultane Infektion mit dem HBV und dem HDV. Die WHO ordnet Hepatitis Viren als ein „weltweit bedeutendes Gesundheitsproblem“ und eine globale Gesundheitsbedrohung ein [12].

1.3 Die Familie der Hepadnaviridae

1.3.1 Taxonomie der Hepadnaviridae

Der Name Hepadnaviridae setzt sich zusammen aus dem Wort für hepar (griechisch: Leber) und dem Fakt, dass das Genom der Viren aus DNA besteht. Die Familie wird in 2 Gattungen unterteilt: Orthohepadnavirus bei den Säugetieren und Avihepadnaviren bei den Vögeln. Alle Mitglieder der Hepadnaviridae weisen eine hohe Wirtsspezifität und Hepatotropismus auf. Zusätzlich ist die Infektiosität der Orthohepadnaviren eng an einen hohen Differenzierungszustand der Hepatozyten gebunden. *In vitro* Infektionsexperimente mit Hepatomzelllinien, die sich über lange Zeit einfach und effizient kultivieren lassen, sind daher nicht möglich. Eine Ausnahme ist die HepaRG Zelllinie, die jedoch redifferenziert werden muss [13]. Typisch für die Orthohepadnaviren ist außerdem, dass eine Infektion temporär akut oder persistierend, chronisch verlaufen kann. Bis Ende 2012 konnten Hepadnaviridae in Säugetieren der Familien der Primates und Rodentia (Orthohepadnaviridae) sowie in Vögeln (Avihepadnaviridae) gefunden werden. Das bekannteste Mitglied der wachsenden Familie der Hepadnaviridae ist das human pathogene HBV des Menschen.

1.3.2 Epidemiologische Aspekte der Hepadnaviridae und Evolution des HBV

Zusätzlich zu den avihepadnaviralen Hepatitis B Virus Infektionen der Vögel können neben dem Menschen auch weitere Spezies der Säugetierfamilien Primates und Rodentia (Nagetiere) von bestimmten Virusarten der Orthohepadnaviridae infiziert werden. Innerhalb der Hepadnaviridae weisen die Avihepadnaviridae mit 60 % genetischer Distanz (z. B. DHBV) der gesamten Nukleotidsequenz die größte Abweichung zum HBV auf [14]. In der Neuen Welt wurden Orthohepadnaviren in Nagetieren wie z. B. dem nordamerikanischen Waldmurmeltier (*Marmota monax* / WHV, Woodchuck Hepatitis Virus), dem nordamerikanischen/kalifornischen Erdhörnchen/Ziesel (*Spermophilus beecheyi* / GSHV, Ground Squirrel Hepatitis Virus) oder dem arktischen Erdhörnchen/Ziesel (*Spermophilus parryii* / ASHV, Arctic Squirrel Hepatitis Virus) gefunden. Diese zeigen verglichen zu den Avihepadnaviridae eine deutlich größere Homologie gegenüber dem HBV. Die Genome des WHV und GSHV divergieren z. B. nur um 37 % von dem Genom des HBV [15]. Weitere Orthohepadnaviren wurden in Säugetieren der Alten Welt entdeckt. Dazu gehören vor allem Spezies der Familie der Hominoiden (Menschenaffen) wie z. B. ostafrikanische Schimpansen (*Pan troglodytes schweinfurthi*, *Pan troglodytes troglodytes*, *Pan troglodytes vellerosus*, *Pan troglodytes verus* / ChHBV, Chimpanzee Hepatitis B Virus) und ostafrikanische Gorillas (*Gorilla gorilla* / GoHBV Gorilla Hepatitis B Virus) sowie in südostasiatischen Orangutans (*Pongo pygmaeus* / OuHBV, Orangutan Hepatitis B Virus). In südostasiatischen Ländern der Alten Welt wurden aber auch Orthohepadnaviren in Spezies entdeckt, die nicht der Familie der Hominoiden angehören. Dazu zählen neun Spezies der Familie der Gibbons wie z. B. dem Westlichen Schwarzen Schopfgibbon (*Hylobates concolor* / GiHBV, Gibbon Hepatitis B Virus) sowie dem Weisshandgibbon (*Hylobates lar*), dem nördlichen Weisswangen Schopfgibbon (*Hylobates leucogenys*) oder dem Südlichen Gelbwangen-Schopfgibbon (*Nomascus gabriellae*). Innerhalb der Familie der Primaten der Neuen Welt wurde ein Orthohepadnavirus in dem Wollaffen (*Lagothrix lagotricha* / WMHBV, Woolly Monkey HBV) entdeckt, dessen Verbreitungsgebiet sich im mittel- und südamerikanischen Raum befindet. Einen Überblick über die bekannten Hepadnavirus-Arten und deren Wirte gibt Tabelle 2. Eine phylogenetische Stammbaumanalyse konnte zeigen, dass sich die Viren der zwei verschiedenen Säugetierfamilien Primaten und Rodentia anhand deren Nukleotidsequenz deutlich unterscheiden und sich in jeweils zwei den Säugetier-Familien entsprechende eigenständige Stämmen gruppieren (s. Abbildung 1). Innerhalb der Gruppe der Primaten HBV weist das WMHBV als einzige Art eines Neuweltaffen die größte Divergenz zum HBV auf. Das WMHBV wird daher als eigene orthohepadnavirale Spezies gesehen dessen nächster Verwandter die HBV Genotypen F und H sind. Innerhalb der Gruppe der Altwelt Primaten Orthohepadnaviren sind hingegen geringere Divergenzen zwischen HBV, GoHBV, ChHBV, OuHBV und GiHBV festzustellen. Die orthohepadnaviralen Isolate, die in diesen Affen gefunden wurden, divergieren generell nicht mehr vom HBV wie die verschiedenen

Einleitung

HBV Genotypen untereinander und werden daher in phylogenetischen Analysen nicht als eigene Spezies, sondern wie HBV als Genotypen gruppiert. Somit weist der HBV Stammbaum nicht nur die Genotypen A, B, C, D, E, F, G und H des HBV auf, sondern auch OuHBV, GiHBV, ChHBV und GoHBV als vier weitere Genotypen (Übersicht in [16]). Obwohl bei den Hepadnaviridae von einer hohen Wirtsspezifität ausgegangen wird, wurde schon mehrfach eine Übertragung der Viren zwischen verschiedenen nahe verwandten Wirtstieren dokumentiert. So konnte gezeigt werden, dass das Himalaya-Murmeltier (*Marmota himalayana*) mit dem WHV des nordamerikanischen Murmeltiers (*Marmota monax*) und ein Streifenhörnchen (*Eutamias*) mit dem GSHV des Erdhörnchens (*Spermophilus beecheyi*) infiziert werden kann [17, 18]. Auch in wild lebenden Schimpansen und Gorillas wurden hepadnavirale Genome entdeckt, die vergleichbar mit HBV Genotypen des Menschen sind [19, 20]. Dies zeigt, dass HBV Genotypen wegen ihrer relativ geringen Divergenz in der Lage sind, innerhalb der Säugetierfamilie der Primaten die Wirtsspezies zu wechseln. Dafür spricht auch, dass z. B. in Gibbons mehrfach Rekombinationen zwischen Genotypen des GiHBV und des humanen HBV gezeigt werden konnten [21]. Weiterhin konnten in westafrikanischen Schimpansen und Gorillas Rekombinationen zwischen dem ChHBV und dem GoHBV detektiert werden [22]. Interspezifische Infektionen sowie eine gleichzeitige Infektion eines Wirtstiers mit zwei unterschiedlichen Orthohepadnaviren scheinen daher möglich zu sein. Aufgrund der hohen Abweichung zwischen den Avihepadnaviren und den Orthohepadnaviren sowie zwischen den Orthohepadnaviridae der verschiedenen Säugetierfamilien geht man nicht von einer Übertragung der entsprechenden Viren zwischen den Wirten der unterschiedlichen Tierfamilien aus. Vermutlich haben sich diese Viren parallel zur Evolution von Vögeln und Säugetieren zusammen mit den Wirten entwickelt (Cospesiation).

Das HBV kann aufgrund von vergleichenden Sequenzanalysen des gesamten Genoms in acht unterschiedliche Genotypen (A-H) mit einer Genomheterologie von mindestens 7,8 % eingeteilt werden. Die Genome der Genotypen B, C, F und H besitzen typischerweise 3215 Nukleotide, wohingegen aufgrund von Deletionen bei Genotyp D 3182 oder von Insertionen bei Genotyp A 3221 bei G. 3248 Nukleotide vorliegen. Innerhalb der Genotypen wird nochmals zwischen verschiedenen Subgenotypen mit einem Sequenzunterschied von mindestens 3,5 % unterschieden [23]. Die HBV-Genotypen und die meisten Subgenotypen weisen eine unterschiedliche geografische Verbreitung auf. Die Genotypen F und H mit der größten Divergenz der Nukleotidsequenz im Gesamtgenom werden überwiegend in der Bevölkerung Süd- und Mittelamerikas nachgewiesen. Die HBV-Subgenotypen A1 und A3-5 findet man überwiegend in Afrika, südlich der Sahara, wohingegen der Subgenotyp A2 wiederum vorherrschend in der westeuropäischen Bevölkerung vorkommt. In Asien sowie Australien sind die Genotypen C und D dominierend. Der HBV Genotyp D mit den Subgenotypen D1, D2 und D3 wird verbreitet über alle Kulturen und Ethnien nachgewiesen. Die

höchste HBV Prävalenz insgesamt findet man innerhalb der Bevölkerung in Südostasien sowie in Afrika (Übersichtsartikel siehe [14, 23, 24]).

1.3.2.1 Neu entdeckte Hepadnaviren seit 2013

Im Rahmen einer Kooperation von Ökologen (Institut für experimentelle Ökologie / Universität Ulm / AG Tschapka) und Virologen (Instituts für Virologie / Universität Bonn / AG Drexler) wurden in Mittelamerika (Panama), Afrika (Ghana, Gabon), Asien (Papua Neu Guinea), Australien (Queensland) und Europa (Deutschland) im Zeitraum von 2002 bis 2011 Fledermäuse gefangen, Gewebe sowie Blutproben gesammelt und diese mittels nested-PCR auf Virus DNA untersucht. Dabei wurden z. B. Genome von Paramyxoviren, HEV sowie Hepadnaviren entdeckt (s. Tabelle 1) [15, 25, 26].

Tabelle 1: Beprobungsgebiete, gefangene Fledermausfamilien und Spezies. Fledermaus-Individuen verschiedener Spezies und Familien wurden auf 5 Kontinenten gefangen und Gewebe- sowie Blutproben für einen anschließenden Nachweis von viraler DNA gesammelt. Fledermaus-Familien in denen hepadnavirale DNA detektiert wurde, sind grün unterlegt. [Analyse erstellt von J. F. Drexler, Bonn; modifiziert nach Drexler, Geipel, König et. al., 2013 [15]]

Beprobungsgebiet		Familie	Anzahl	
			Spezies	Individuen
Neue Welt	Amerika (Panama)	<i>Emballonuridae</i>	2	17
		<i>Phyllostomidae</i>	24	1347
		<i>Mormoopidae</i>	1	53
		<i>Noctilionidae</i>	1	11
		<i>Thyropteridae</i>	1	3
		<i>Vespertilionidae</i>	2	7
		<i>Molossidae</i>	1	1
		<i>Natalidae</i>	1	1
Alte Welt	Afrika (Ghana/Gabon)	<i>Pteropodidae</i>	6	802
		<i>Rhinolophidae</i>	1	16
		<i>Hipposideridae</i>	2	180
		<i>Emballonuridae</i>	1	14
		<i>Vespertilionidae</i>	1	51
	Asien (Papua Neu Guinea)	<i>Pteropodidae</i>	3	17
	Australien (Queensland)	<i>Pteropodidae</i>	2	27
	Europa (Deutschland)	<i>Vespertilionidae</i>	1	42

Insgesamt umfasste die Beprobung 3080 Fledermaus Individuen von 54 unterschiedlichen Spezies aus 11 von 18 zurzeit unterschiedenen Fledermausfamilien. Dabei wurden in 3 Fledermaus-Familien

Einleitung

in einem oder mehreren Individuen einer Spezies drei verschiedene Hepadnavirus-ähnliche Sequenzen detektiert. Nach einer ausführlichen Stammbaumanalyse wurde deutlich, dass es sich dabei tatsächlich um drei neue Arten der Familie Hepadnavirus handelt (s. Abbildung 1). Zur Abgrenzung von den Orthohepadnaviren der Primaten und Nagetiere, wurde die Gruppe dieser Viren als Fledermaus Hepatitis B Viren (BATHBV) bezeichnet (D. Glebe, persönliche Mitteilung). Die drei neu entdeckten BATHBV-Spezies wurden entsprechend der bisherigen Nomenklatur für diese Virusfamilie nach der Wirtstier-Familie bezeichnet, aus der die Fledermausspezies, in der das Virus entdeckt wurde, stammt. Das Virus, welches in Proben von *Hipposideros cf. Ruber* detektiert wurde, wurde als *roundleaf bat* HBV (RBHBV) bezeichnet. Das Virus aus *Rhinolophus alcyone* wurde als *horseshoe bat* HBV (HBHBV) und das Virus aus *Uruderma bilobatum* als *tent-making bat* HBV (TBHBV) bezeichnet. Durch den phylogenetischen Vergleich der vier Ganzgenomsequenzen aus *H. cf. Ruber*, einer Sequenz aus *R. alcyone* sowie vier Sequenzen aus *U. bilobatum* (GenBank accession nos. KC790373-KC790381) wurde deutlich, dass es sich um 3 unterschiedliche Abstammungslinien handelt, die in zwei monophyletische Gruppen, die Alt- und Neuwelt-Fledermaus Orthohepadnaviren, gruppiert werden konnten (s. Abbildung 1). Unterstützt werden diese Sequenzanalyse-Ergebnisse durch die Entdeckung einer weiteren hepadnaviralen Sequenz in einer anderen Altwelt-Fledermaus-Spezies (*Miniopterus fuliginosus*) aus Myanmar [27]. Diese Sequenz des *Long Fingered Bat* HBV (LBHBV) weist den höchsten Verwandtschaftsgrad zu den anderen Altwelt-BATHBV auf (s. Abbildung 1). Innerhalb der Gruppe der Neuwelt-Fledermäuse, die in Panama gefangen wurden, wurde *Uruderma bilobatum* positiv für HBV-DNA getestet (TBHBV). Innerhalb der Gruppe der Altwelt-Fledermäuse, die in Gabon gesammelt wurden, enthielten *Hipposideros cf. Ruber* Proben und *Rhinolophus alcyone* Proben HBV ähnliche Sequenzen (RBHBV, HBHBV). Einen Überblick über die bekannten Hepadnavirus-Arten gibt Tabelle 2.

Einleitung

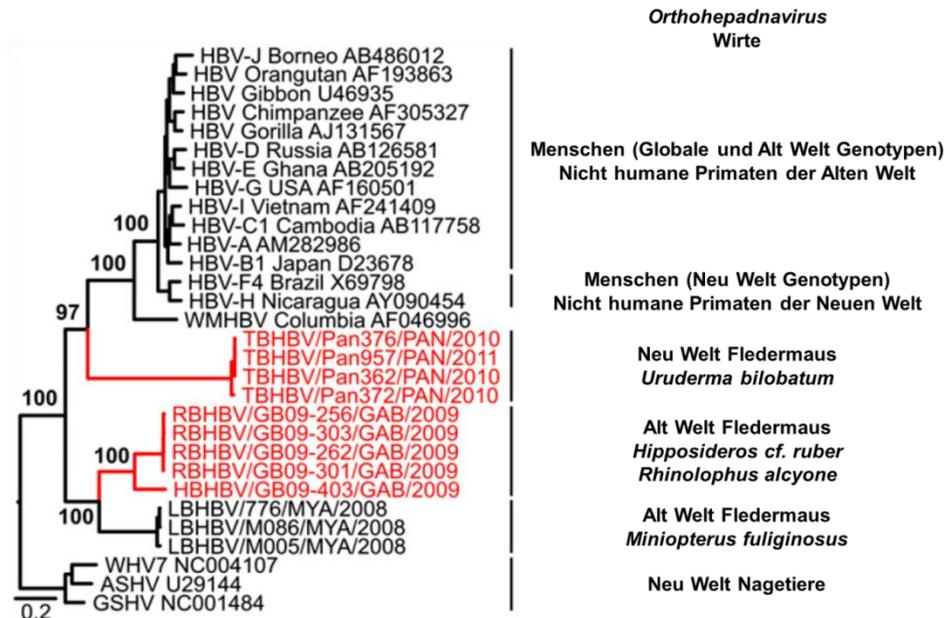


Abbildung 1: Phylogenetische Beziehung der Orthohepadnaviren. Dargestellt sind die Virus- und Wirtsspezies. Unter den Orthohepadnaviren zeigt sich folgende Reihenfolge in der Heterologie der Gesamtgenom Sequenz zum humanen HBV: Nagetier (*Rodent*) HBV (Waldmurmeltier, Erdhörnchen) > Altwelt Fledermaus (*Bat*) HBV (*H. cf. ruber*, *R. alcyone*, *M. fuliginosus*) > Neuwelt Fledermaus (*Bat*) HBV (*U. bilobatum*) > Neuwelt Primaten HBV (Wollaffe) > Altwelt Primaten HBV (Gorilla, Schimpanse, Orangutan, Gibbon, humane Genotypen). Die in dieser Arbeit untersuchten, neu entdeckten Fledermaus HBV Spezies sind in Rot dargestellt. Scale bar, genetischer Abstand / Zahlenwerte, A-posteriori-Wahrscheinlichkeit nach Bayes oder *maximum likelihood bootstrap replicates*. [Analyse erstellt von JF Drexler, Bonn; modifiziert nach Drexler, Geipel, König et. al., 2013 [15]]

Tabelle 2: Chronologie der Entdeckung der Hepadnaviridae Arten bzw. Genotypen oder Stämme. Die in dieser Arbeit untersuchten, neu entdeckten Fledermaus HBV Spezies sind in Rot dargestellt.

Virus	Wirt	Entdeckungsjahr, Referenz
HBV	Mensch	1970, Dane et. al. [3]
WHV	Waldmurmeltier (Woodchuck)	1978, Summers et. al. [28]
DHBV	Pekingente (Duck)	1980, Mason et. al. [29]
GSHV	Erdhörnchen (Ground Squirrel)	1980, Marion et. al. [30]
ChHBV	Schimpanse (Chimpanzee)	1988, Vaudin et. al. [31]
HHBV	Graureiher (Heron)	1988, Sprengel et. al. [32]
RGHBV	Ross-Gans (Ross Goose)	1993, Naumann et. al. [33]
GiHBV	Gibbon	1996, Norder et. al. [34]
ASHV	Arktisches Erdhörnchen (Arctic Squirrel)	1996, Testut et. al. [35]
MDHBV	Mähnente (Maned Duck)	1998, Li et. al. [36]
GTHBV	Weißkehlente (Grey Teal Duck)	1998, Li et. al. [36]
WMHBV	Wollaffe (Woolly Monkey)	1998, Lanford et. al. [37]
SGHBV	Schneegans (Snow Goose)	1999, Chang et. al. [38]
OuHBV	Orangutan	1999, Warren et. al. [39]
GoHBV	Gorilla	2000, Grethe et. al. [40]
STHBV	Weißstorch (Stork)	2001, Pult et. al. [41]
CHBV	Kranich (Crane)	2003, Prassolov et. al. [42]
LBHBV	Langflügelfledermaus (Long Fingered Bat, <i>M. ful.</i>)	2013, Biao He et. al. [27]
TBHBV	Zeltbauende Fledermaus (Tent making Bat, <i>U. bil.</i>)	2013, Drexler, Geipel, König et. al. [15]
HBHBV	Hufeisennasen Fledermaus (Horseshoe Bat, <i>R. alc.</i>)	2013, Drexler, Geipel, König et. al. [15]
RBHBV	Rundblattnasen Fledermaus (Roundleaf Bat, <i>H. cf. rub.</i>)	2013, Drexler, Geipel, König et. al. [15]

1.3.3 Strukturelle Aspekte der Hepadnaviridae und des Hepatitis Delta Virus

1.3.3.1 Die Morphologie der Hepadnaviridae am Beispiel des Hepatitis B Virus

Das Hepatitis B Virus umgibt eine Hülle aus drei unterschiedlichen Oberflächenproteinen (kleines, mittleres und großes Hepatitis B Surface Protein, SHBs, MHBs, LHBs), die in eine Lipidmembran integriert sind. Das LHBs kommt im Virion in zwei unterschiedlichen Topologien zu gleichen Teilen vor. Bei der internen Topologie ist die präS-Domäne nach innen gerichtet und interagiert mit den Core-Proteinen und bei der externen Topologie ist die präS-Domäne nach außen gerichtet, wo es zur Wechselwirkung mit zellulären Rezeptoren exponiert ist [43, 44]. Darin befindet sich das Nukleokapsid aus 120 Core-Protein Dimeren, welche das virale teilweise doppelsträngige DNA-Genom umschließen [45]. Die virale Polymerase ist über ihre Primer-Domäne kovalent mit dem Minusstrang des Genoms verknüpft. In kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen erscheint das HBV als sphärisches Partikel mit einem mittleren Durchmesser von ca. 42-47 nm [3]. Aufgrund einer vergleichweisen Überexpression der HBV-Oberflächenproteine in infizierten Hepatozyten, erscheinen neben den infektiösen Viruspartikeln auch sogenannte subvirale Partikel (SVP), die ausschließlich aus der Lipiddoppelmembran und den Oberflächenproteinen des HBV bestehen. Diese SVP sind nicht infektiös und weisen eine sphärische oder filamentöse Morphologie mit einem Durchmesser von 17-25 nm auf (s. Abbildung 2). Die Konzentration subviraler Partikel im Serum von hoch virämischen HBV-Patienten übersteigt die Konzentration der Viruspartikel um das 1000-10.000 fache.

Einleitung

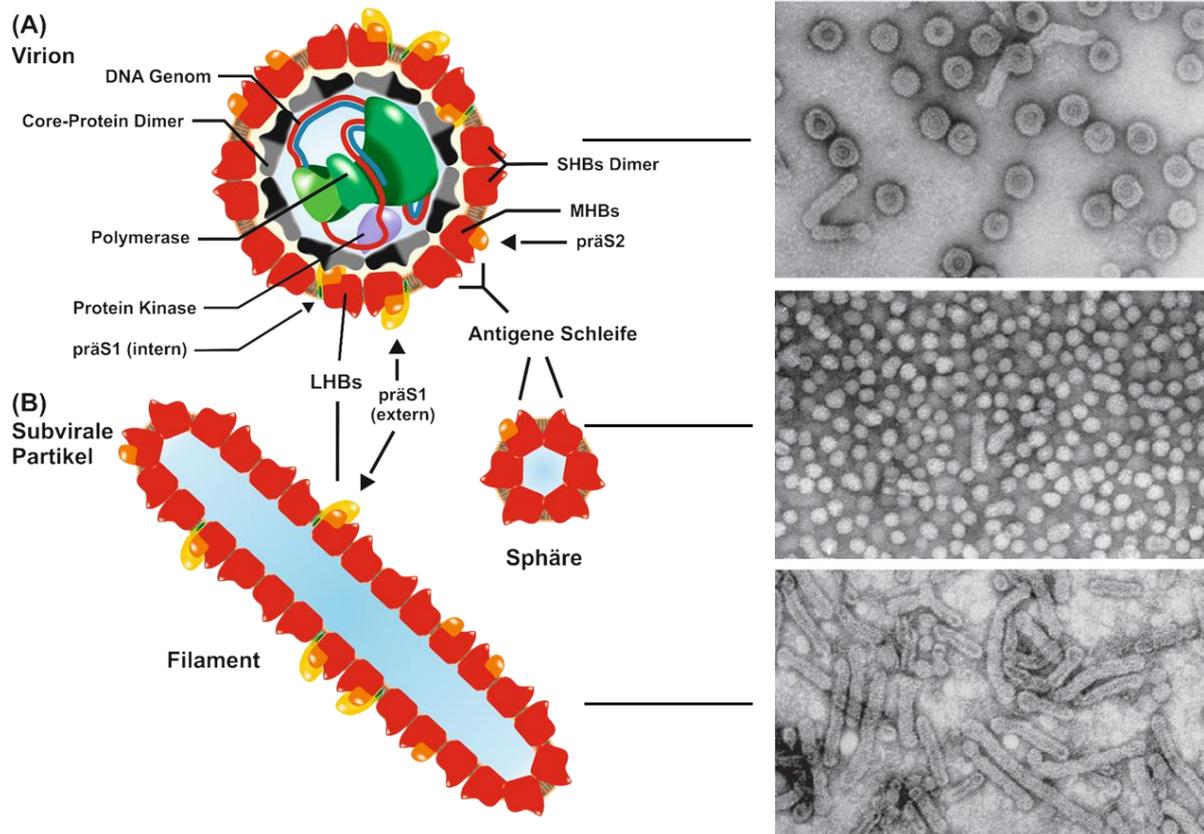


Abbildung 2: Die Morphologie von Virionen und subviralen Partikeln des Hepatitis B Virus. Die Oberflächenprotein Dimere SHBs (S-Domäne = rot), MHBs (S-Domäne + präS2 = orange) und LHBs (S-Domäne + präS2 + präS1 = gelb) liegen integriert in einer Lipiddoppelmembran als (B) subvirales Partikel (Filament, Sphäre) vor oder (A) umhüllen das Nukleokapsid (Virion). Das Nukleokapsid besteht aus Core-Protein Dimeren (grau-schwarz), die das teilweise doppelsträngige DNA Genom (rot-blau), eine Proteinkinase (lila) und die Polymerase (grün), bestehend aus einer reversen Transkriptase, RNase H sowie einer Spacer Domäne, umgeben. Rechts abgebildet sind elektronenmikroskopische Aufnahmen (Negativkontrastierung) der Virionen (oben), sphärischen subviralen Partikeln (Mitte) und filamentösen subviralen Partikeln (unten). [modifiziert nach Glebe und Bremer, 2013 [46] und Gerlich, 2013 [47]]

1.3.3.2 Der Genomaufbau der Hepadnaviridae

Alle Hepadnaviridae besitzen ein Genom mit einem einzigartigen Aufbau. Eine nur teilweise doppelsträngige DNA mit einer Größe von 3,1 bis 3,3 kb befindet sich in einem relaxiert-zirkulären Zustand [48-50]. Die Zirkularität entsteht durch Basenpaarungen der 5'-Enden des Minus- und Plusstrangs [51, 52]. Dieser überlappende Bereich besteht bei Orthohepadnaviren aus 240 und bei Avihepadnaviren aus 50 Basenpaaren (bp). Außerdem ist am 5'-Ende des Minusstrangs die virale Polymerase kovalent verknüpft [53]. Der Minusstrang ist im Viruspartikel komplett und hat eine konstante Länge, während der inkomplette Plusstrang ein konstantes 5'-Ende und ein variables 3'-Ende hat.

Einleitung

Der Minusstrang des HBV-Genoms codiert für vier offene Leserahmen (ORF) (s. Abbildung 3) [54]. Ein ORF codiert für die Oberflächenproteine LHBs, MHBs sowie SHBs (s. unten). Der Polymerase ORF codiert für die virale Polymerase, die sich aus verschiedenen Subdomänen zusammensetzt. Dazu gehören die terminale Protein Priming-Domäne, eine Reverse Transkriptase, die auch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase Funktion besitzt sowie eine RNase H-Domäne.

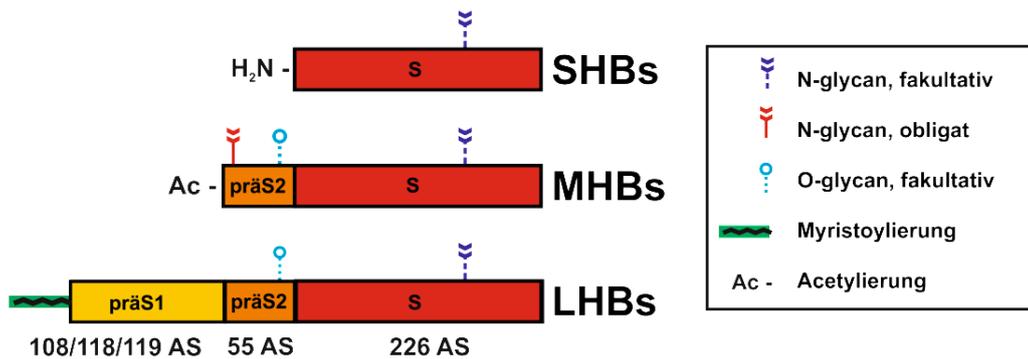
Ein weiterer ORF codiert, beginnend mit dem zweiten Startcodon, das Core-Protein, das sich als Dimer zum Nukleokapsid assemblieren kann. Weiterhin befindet sich innerhalb dieses ORFs, beginnend mit dem ersten Startcodon, eine zusätzliche Prä-Core-Sequenz, die für ein Translokationspeptid codiert. Kommt es zur Synthese der Prä-Core-Sequenz wird das nachfolgende Core-Protein in das Lumen des endoplasmatischen Reticulums (ER) transloziert, wo es nach einer proteolytischen Prozessierung als lösliche Form des Core-Proteins (HBeAg) über die basolaterale Membran der Hepatozyten ins Blut sekretiert wird. Im Replikationszyklus des Virus konnte keine essenzielle Funktion des HBeAg festgestellt werden, jedoch weiß man, dass das HBeAg einen bedeutsamen Einfluss auf die Chronifizierung einer HBV-Infektion hat. Man vermutet, dass es eine immunmodulierende Funktion besitzt. HBeAg scheint die Aktivierung des angeborenen Immunsystems [55] und die Entwicklung einer T-Zellimmunität gegen Core-Protein zu inhibieren [56].

Der X-ORF codiert das X-Protein. Es handelt sich hierbei um ein nicht strukturelles Protein des HBV, dass nicht sekretiert wird. Auch für dieses Protein konnte zunächst kein essenzieller Einfluss auf den viralen Replikationszyklus festgestellt werden. Neuere Studien weisen drauf hin, dass das X-Protein einen epigenetischen Einfluss auf die Transkription des HBV ausübt [57]. Es konnte auch beobachtet werden, dass dieses Protein die Carcinogenese von HBV infizierten Hepatozyten beeinflusst (Übersichtartikel siehe [58]).

Einleitung

CRTCTT/CKTCTT des SHBs (AS 121-126) [59]. Der ebenfalls neutralisierende Antikörper C20/2 bindet ein konformationelles Epitop im Bereich der AS 120-160 der HBs Antigenschleife (AGS) [59]. Weiterhin ist bekannt, dass das HBV über die HBsAg-Schleife an Heparansulfat-Proteoglykane bindet, wodurch weitere essenzielle Schritte der Infektion ermöglicht werden [60-63]. Das MHBs besteht aus der beschriebenen S-Domäne und zusätzlichen N-terminalen 55 AS welche die als PräS2-Domäne bilden. An der Position N-4 beinhaltet die PräS2-Domäne eine obligatorische N-Glykosylierungsstelle und an der Position T-37 eine fakultative O-Glykosylierungsstelle (s. Abbildung 4 A) [64]. Da noch keine essenzielle Beteiligung des MHBs an einem Schritt im HBV-Replikationszyklus beschrieben wurde, ist dessen Funktion bislang noch unbekannt. Das LHBs setzt sich aus dem MHBs (S-Domäne + PräS2-Domäne) und je nach Genotyp zusätzlichen 108, 118 oder 119 N-terminalen AS (präS1-Domäne) zusammen [65]. Das LHBs inhibiert die Sekretion viraler und subviraler Partikel wenn es nicht von einem Überschuss an SHBs begleitet wird. Die präS1-Domäne ist für die Infektion von Hepatozyten erforderlich [66-69]. Der Bereich der präS1-Domäne der einen Einfluss auf die Infektiosität des Virus hat begrenzt sich auf die N-terminalen 77 AS (s. Abbildung 4 B). Die AS 2-9 beinhalten z. B. das Signal für eine N-terminale Myristoylierung ohne die Bindung und Zelleintritt des HBV nicht möglich sind [70, 71]. Die genaue molekulare Funktion der Myristinsäure ist nicht bekannt. Die AS-Sequenz von Position 9 bis 18 ist ebenfalls essenziell für eine HBV-Bindung und Infektion [72-75]. Für diesen Bereich ist bekannt, dass die AS L-11 und P-14 direkt mit dem HBV-Rezeptor (NTCP) interagieren [76]. Die AS der Position 28-48 sind zwar nicht essenziell für eine Virusbindung, jedoch verstärkt dieser Bereich die Bindungsaffinität des HBV [77]. Der Bereich von AS 49-77 spielt keine Rolle in der Virusbindung, ist allerdings unerlässlich für die Infektiosität des HBV [69] (Übersicht in [46, 78]).

A



B

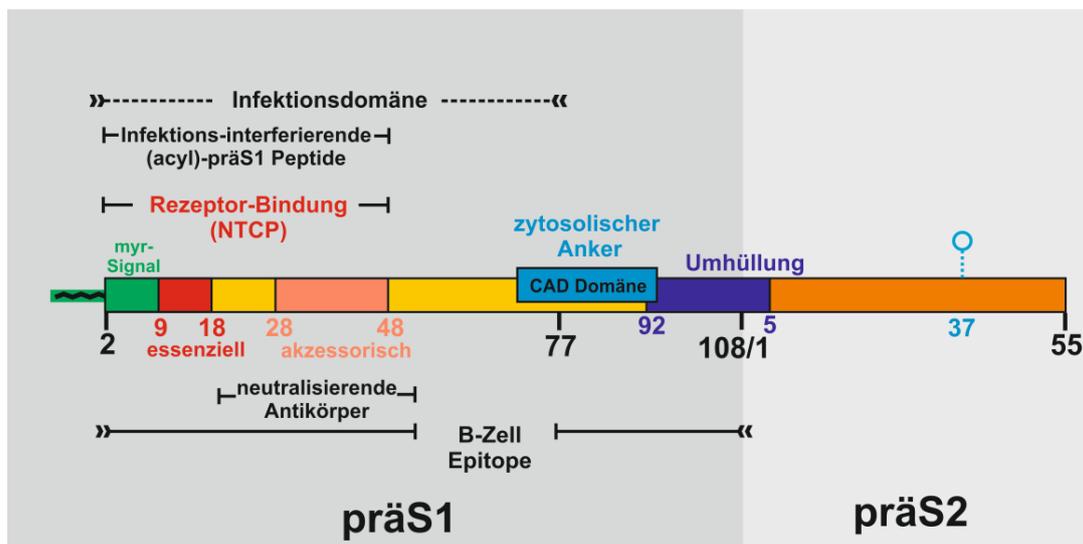


Abbildung 4: Die Oberflächenproteine des Hepatitis B Virus (A) Die drei HBV Oberflächenproteine weisen mit den 226 AS der S-Domäne (rot) einen einheitlichen N-terminalen Bereich auf. Die S-Domäne des MHBs und des LHBs sind am C-Terminus um eine präS2-Domäne (55 AS, orange) bzw. um eine präS2- sowie präS1-Domäne (gelb) erweitert. Die Länge der präS1-Domäne des LHBs kann je nach Genotyp variieren (108, 118, 119 AS). Alle drei Oberflächenproteine können durch posttranslationale Modifikationen verändert werden. Die S-Domäne kann in allen drei Oberflächenproteinen eine N-Glykosylierung aufweisen (fakultativ). Das LHBs kommt ausschließlich mit einer N-terminalen Myristoylierung des Glycin an Position 2 vor (obligat) und kann zusätzlich eine O-glykosidische Modifikation der präS2-Domäne sowie die N-Glykosylierung der S-Domäne besitzen. Im MHBs sind die gleichen fakultativen Modifikationen der S- und präS2-Domäne zu finden sowie immer eine N-terminale Acetylierung sowie N-Glykosylierung im präS2. **(B)** Essenzielle Bereiche für die Infektiosität und Umhüllung der Virionen lassen sich vor allem in der präS1- und der präS2-Domäne finden. Entscheidend für eine spezifische Rezeptor-Bindung sowie für die Infektion sind die Myristoylierungs Signal-Domäne (grün) sowie die darauf folgende essenzielle Domäne der AS-Position 9-18 (rot) im präS1. Im Bereich der AS 18-48 befindet sich eine akzessorische Domäne (AS 28-48, orange), die eine verstärkende Wirkung auf die Virus Bindung und Infektion hat, sowie verschiedene Epitope für neutralisierende Antikörper. Diese 48 AS des LHBs zeigen als N-terminal myristoyliertes Peptid einen starken interferierenden Effekt auf eine HBV-Infektion (myr-präS1-Peptide). Entscheidend für die Umhüllung reifer Core-Partikel sind die AS an Position 92-108 der präS1-Domäne sowie die folgenden AS 1-5 der präS2-Domäne (blau). Innerhalb der C-terminalen 40 AS der präS1-Domäne sind zusätzliche B-Zell Epitope sowie eine *cytosolic anchorage domain* (CAD) zu finden. Die CAD ist verantwortlich für die zytosolische Orientierung der präS-Domänen des LHBs während der Reifung. [aus Glebe und Bremer, 2013 [46]]

1.3.3.4 Das Genom und die Morphologie des Hepatitis Delta Virus

Das HDV (s. Abbildung 5) ist das einzige Tiervirus, das als Genom eine zirkuläre RNA besitzt. Einen solchen Genomaufbau findet man ansonsten nur bei den pflanzenpathogenen Viroiden und Virusoiden. Eine weitere Gemeinsamkeit mit diesen Pflanzenpathogenen ist die Ribozym-Domäne an Position 688-904 des Genoms [79]. Das einzelsträngige RNA-Genom mit ca. 1700 Nukleotiden erscheint durch ca. 70 % intramolekulare Basenpaarung quasi doppelsträngig und stabförmig [80, 81]. Das Genom liegt komplexiert mit dem HDV-Antigen (HDAg) als Ribonukleoproteinkomplex (RNP) und definierter Struktur vor. Man schätzt, dass an einem RNA-Genom ca. 70-220 Moleküle des HDAg gebunden sind [82-84]. Das HDAg ist das bis jetzt einzige bekannte Protein, das vom HDV-Genom im Gegenstrang codiert ist. Es kann in zwei unterschiedlichen Isoformen mit 24 kDa und 27 kDa exprimiert werden [85]. Das große LHDAg hat 214 AS, das kleine SHDAg 195 AS. Durch einen RNA-Editing-Mechanismus wird ein Adenin im Stoppcodon des SHDAg zu einem Tryptophan umgewandelt und so können aus einem gemeinsamen ORF die zwei mRNAs des S- und LHD exprimiert werden. Beide HDAg sind in ihrer Sequenz identisch, bis auf zusätzliche 19 C-terminale AS des LHDAg [86-88]. Aufgrund von Coiled-Coil Strukturen im HDAg (AS 31-52 des N-Terminus) kann das SHDAg mit anderen SHDAg-Molekülen oder auch mit LHDAg Dimere bilden [89]. Diese werden aufgrund einer Nukleären Lokalisations Sequenz (NLS) an der AS-Position 68-88 in den Zellkern transportiert [90-92]. Da das HDAg eine RNA-Bindungsdomäne an der AS-Position 95-146 besitzt, kommt es im Zellkern zu einer Bindung der viralen Proteine mit der viralen genomischen RNA und zur Entstehung von RNPs [91, 93]. Die 19 AS lange Erweiterung des LHDAg besitzt ein Isoprenylierungsmotiv. Die Isoprenylierung verleiht dem LHDAg die Fähigkeit direkt mit den Oberflächenproteinen des HBV zu interagieren, was zu einer Umhüllung des HDV-Nukleokapsids mit HBV-Oberflächenproteinen führt [94-96]. HDV kann auch ohne HBV replizieren sofern das HDV Genom den Zellkern erreicht, zur Ausbreitung von Zelle zu Zelle benötigt es aber die Umhüllung durch die SHBs- und LHBs-Proteine [97]. Das HDV-Partikel besitzt eine sphärische Morphologie mit einem Durchmesser 36 – 45 nm [8].

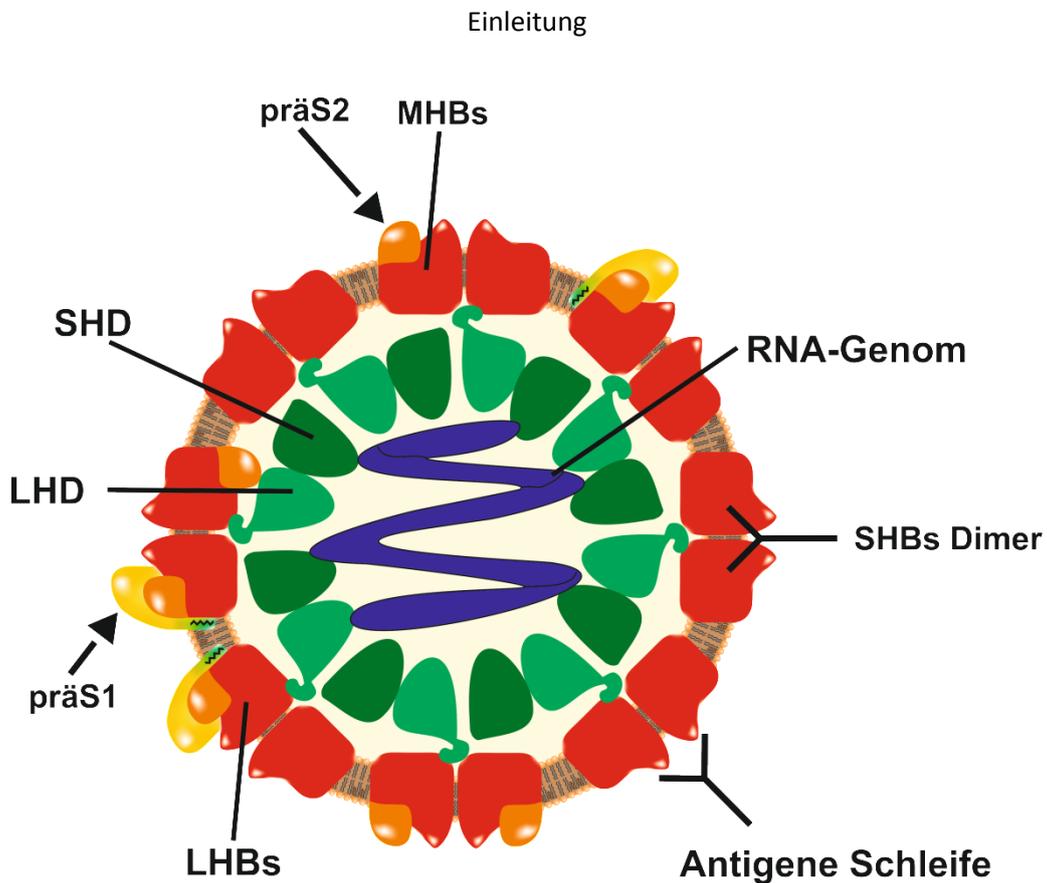


Abbildung 5: Schematische Morphologie des HDV. Das große Hepatitis Delta Protein (LHD) interagiert mit den HBV Oberflächenproteinen (LHBs, MHBs und SHBs) und vermittelt die Umhüllung des Virus. Durch eine RNA-Bindungsdomäne können das kleine Hepatitis Delta Protein (SHD) sowie auch das LHD mit dem zirkulären und selbstkomplementären RNA-Genom einen Ribonukleoproteinkomplex bilden. [modifiziert nach Glebe und Bremer, 2013 [46]].

1.3.4 Klinische Aspekte einer HBV-Infektion

1.3.4.1 Transmission

Hinsichtlich der Übertragung von Infektionskrankheiten können die Erreger in drei Gruppen eingeteilt werden. Bei Saprosozen handelt es sich um Erreger, die ausschließlich von ihrer Umwelt auf den Menschen übertragen werden (z. B. *Clostridium tetani*). Anthropogen übertragbare Erreger wie z. B. Masern, Röteln oder das Hepatitis C Virus werden ausschließlich von Mensch zu Mensch übertragen. Zu den Zoonosen zählt man Erreger, deren Reservoir sich in einer oder mehreren Tierarten befindet, jedoch auch von einem Tier auf den Menschen übertragen werden kann. Dazu gehört z. B. die Tollwut, das Hantavirus oder auch Ebola. Die Häufigkeit von zoonotischen Übertragungen hängt stark von dem Verhältnis zwischen Erreger, Wirt und deren Umwelt (epidemiologische Triade) ab. Veränderungen in diesen komplexen Verhältnissen, wie z. B. das Eindringen des Menschen in fremde Lebensräume kann zu einem vermehrten, neuen oder erneuten Auftreten von Infektionskrankheiten führen [98]. Als natürliches Reservoir für wichtige zoonotische Viren gelten z. B. Fledermäuse (z. B. Ebola Virus, SARS) [99], Nagetiere (z. B. Hantavirus) [100] oder nicht humane Primaten (z. B. HIV) [101]. Das HBV gehört zu den anthropogen übertragbaren Infektionserregern, weil es nach aktuellem

wissenschaftlichen Stand ausschließlich von Mensch zu Mensch übertragen wird. Für die Epidemiologie des HBV sind die chronisch infizierten, (hoch)virämischen Träger als wichtigstes Reservoir zu nennen, da hier die Krankheit häufig aufgrund einer nur unauffälligen Ausprägung der Symptome oft unbemerkt bleibt. Ohne Behandlung und ohne Umstellung der Lebensgewohnheiten kann das Zeitfenster und das Risiko einer potenziellen Übertragung auf gesunde, nicht vakzinierter Personen sehr groß sein [98]. In HBV positiven Trägern befinden sich infektiöse Hepatitis B Viruspartikel vor allem in Hepatozyten und im Serum. Bei hochvirämischen Trägern jedoch kann es auch in anderen Körperflüssigkeiten wie z. B. Speichel, Ejakulat, Vaginalsekret und Muttermilch in geringen Mengen nachgewiesen werden [98]. Die Übertragung des Virus erfolgt daher am wirksamsten über einen Blutkontakt, insbesondere wenn größere Mengen Blut oder Serum direkt intravenös verabreicht werden. Noch effizienter ist die seltene Übertragung durch Transplantation einer infizierten Leber. Durch die Einführung standardisierter diagnostischer Methoden zur Untersuchung von Blut und Blutprodukten konnte das Risiko einer HBV-Transmission durch Bluttransfusionen oder Lebertransplantationen seit Mitte der 70er Jahre stark reduziert werden [102]. Die Anzahl infektiöser Viruspartikel/ml Blut beträgt jedoch bei hochvirämischen HBV-Trägern häufig $>10^8$ /ml. Für eine erfolgreiche HBV-Übertragung über eine intravenöse Verabreichung sind nachweislich ca. 10 infektiöse Viruspartikel ausreichend. So kann schon der Kontakt mit kleinsten Serummengen infektiös sein [98]. Je nach Genotyp und in Abhängigkeit vom Alter kann es somit zu einer meist horizontalen Übertragung (sexuell, Blut oder Schleimhaut, z. B. Genotyp A) oder zu einer meist vertikalen/perinatalen Übertragung (von der Mutter auf das Neugeborene, z. B. Genotyp C) kommen. Der insgesamt häufigste Übertragungsweg ist in Europa und den USA der Geschlechtsverkehr. Daher wird HBV zu den sexuell übertragbaren Krankheitserregern gezählt [98].

1.3.4.2 Impfprävention der Hepatitis B Infektionen

Aufgrund mangelnder therapeutischer Ansätze für HBV-Infektionen, spielen präventive Maßnahmen durch Vakzinierungen neben hohen hygienischen Standards die wichtigste Rolle zur Vermeidung der Hepatitis B. In einer Studie von R. Palmer Beasley in den frühen 1980er Jahren konnte gezeigt werden, dass bei einer intravenösen Verabreichung von hohen Mengen anti-HBs-Immunglobulinen (HBIG) direkt nach der Geburt in 71 % der Fälle eine Übertragung des Virus von HBV-positiven Müttern auf das Neugeborene verhindert werden kann [103]. So stand noch vor der aktiven Impfung die passive Impfung mit HBIG als Postexpositionsprophylaxe zur Verfügung. Die erste groß angelegte Feldstudie zur Wirksamkeit einer aktiven HBV-Impfung wurde 1980 von Szmunes durchgeführt. Als Vakzine wurde HBsAg aus dem Plasma von HBV-positiven Patienten verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass bei 92 % der vakzinierter Probanden eine HBV-Infektion verhindert wurde [104]. Daraufhin wurde zusätzlich zur passiven Impfung eine aktive Impfung in vielen Ländern eingeführt. Im Zuge des ansteigenden Auftretens von AIDS verlor der aus Plasma hergestellte HBV-Impfstoff

zunehmend an Akzeptanz. Die Grundlage für eine Weiterentwicklung der aktiven HBV-Impfung wurde 1979 durch die Klonierung des HBV-Genoms und der Identifizierung des HBs-Gens geschaffen. In zwei Studien konnten 1980 rekombinante Hefe-Zellen (*Saccharomyces cerevisiae*) präsentiert werden, die HBs in großen Mengen synthetisieren [105, 106]. Im Verlauf der 80er Jahre wurde daraufhin ein aktiver HBV-Impfstoff, bestehend aus dem kleinen Oberflächenprotein (SHBs) des HBV Genotyp A2 aus Hefe, eingeführt. Durch eine aktiv/passiv Impfung kurz nach einer Exposition mit HBV kann heutzutage eine Infektion des HBV in 95 % der Fälle verhindert werden [107]. So können vor allem die Neugeborenen, bei denen es während der Geburt zu einem intensiven Kontakt mit infektiösen, maternalen Blut kommt, geschützt werden. Die perinatale Übertragung des HBV konnte durch diese Impfung in vielen Ländern weitgehend unterbunden werden (Übersicht in [47]).

1.3.4.3 Infektionsverlauf und Immunpathogenese

Es treten unterschiedliche Verlaufsformen von HBV-Infektionen auf, die unter anderem vom Alter, Immunstatus und Infektionsdosis des Patienten abhängig sind. Bei dem typischen Verlauf einer symptomatischen akuten Hepatitis B zeigen sich die ersten klinischen Symptome erfahrungsgemäß 45 bis 200 Tagen nach der Inokulation mit dem Virus. Bei Erwachsenen mit einem kompetenten Immunsystem sowie einer niedrigen HBV-Infektionsdosis ($<10^6$ GE/ml) prägen sich in den meisten Fällen die Symptome jedoch so schwach aus, dass man von einem subklinischen Verlauf spricht. Bei einer Inokulation mit dem Blut eines hochtitrigen HBV-Trägers sind die typischen Symptome einer Hepatitis wie z. B. Schmerzen im rechten Oberbauch oder Ikterus meistens sehr viel auffälliger. Diese Verlaufsform wird als akute Hepatitis B bezeichnet. Die auftretenden Symptome resultieren aus der Reaktion des Immunsystems auf die Virusinfektion, bei der die infizierten Hepatozyten zerstört werden und so die Leber unterschiedlich stark geschädigt wird (Immunpathogenese) [108-110]. Wie auch die subklinische Verlaufsform heilt eine akute HBV-Infektion meistens aus, die Leber regeneriert sich und es kommt zur Immunität der Person. Eine Ausheilung einer HBV-Infektion ist daran zu erkennen, dass nach dem Auftreten der Symptome eine rasche Abnahme der HBV-DNA und eine nachfolgende Verringerung des HBsAg im Blut des Patienten beobachtet werden. Bei der so genannten fulminanten Verlaufsform einer HBV-Infektion wird die Leber durch eine extrem heftige Immunreaktion so stark geschädigt, dass es zu einem Leberversagen mit einer hepatischen Enzephalopathie und einer Störung im Gerinnungssystem kommt, woran 70 % der Betroffenen versterben. Diesen Verlauf findet man bei <1 % aller ikterischen Fälle. Viele dieser fulminanten Verläufe können mit einer HDV-Superinfektion oder mit einer HBeAg-negativen HBV-Variante in Verbindung gebracht werden [98]. Von einer chronischen Verlaufsform der HBV-Infektion spricht man, wenn man über einen Zeitraum von sechs Monaten HBsAg im Serum des Patienten nachweisen kann. In diesen Fällen ist es häufig zu einer nur schwachen initialen Immunreaktion mit wenig auffälligen Symptomen gekommen. Eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für diese Verlaufsformen haben

daher Personen mit einem geschwächten oder unreifen Immunsystem. Dazu gehören vor allem Neugeborene und Kinder sowie immunsupprimierte Erwachsene. Bei ca. 80-90 % der infizierten Neugeborenen verläuft die Infektion chronisch [107, 111], wohingegen sich die Infektion bei immunkompetenten Erwachsenen nur zu wenigen Prozent chronifiziert [107]. Allerdings kann die akute HBV-Infektion mitunter in eine chronische Verlaufsformen übergehen. Entscheidend für die Prognose einer chronischen HBV-Infektion ist der Zeitpunkt, wann es durch die Reaktion des Immunsystems zu einer ausreichenden Kontrolle der Virusreplikation kommt. Nur nach einer deutlich ausgeprägten Immunreaktion, die durch einen kräftigen temporären Anstieg der Transaminasen mit darauf folgender Reduktion der Viruslast charakterisiert ist, können Langzeit-Folgeschäden der Leber verhindert werden. Bei einer andauernden hohen Virusreplikation kommt es jedoch zu einem chronischen Entzündungsprozess der Leber, wodurch fibrotische und zirrhotische Veränderungen der Leber ausgelöst werden können. Etwa 15-20 % der chronischen HBV-Träger entwickeln innerhalb von 5-20 Jahren eine Leberzirrhose. Bei frühkindlichen Infektionen können sogar bei ca. 40 % der Patienten im mittleren Lebensalter zirrhotische Leberveränderungen beobachtet werden. Häufig entwickelt sich später bei diesen Patienten ein hepatozelluläres Karzinom (HCC). Das Risiko an den Folgen dieser Lebererkrankung zu sterben ist bei chronischen HBV-Trägern um das 30-100 fache erhöht. Zurzeit weisen weltweit über zwei Milliarden Menschen serologische Merkmale einer HBV-Infektion auf. Von denen kann in ca. 240 Millionen eine aktive chronische Virusreplikation nachgewiesen werden. Eine Zirrhose wird sich bei ca. 50-75 Millionen und ein HCC bei 15-30 Millionen entwickeln. Aufgrund dieser HBV assoziierten Folgeschäden sterben jährlich ca. 780.000 Menschen weltweit [98, 107].

1.3.4.4 Diagnostische Marker der HBV-Infektion

Je nach Infektionsverlauf können im Serum des Patienten verschiedene Faktoren als Marker für eine HBV-Infektion nachgewiesen werden. Dazu gehören einerseits Bestandteile und Genprodukte des HBV, andererseits Antikörper und Immunreaktionen, die vom adaptiven Immunsystem gegen die viralen Antigene gebildet werden. Als ein direkter Marker für die Schädigung der Leber bei allen Hepatitisformen einschließlich der Hepatitis B kann im Blut eine erhöhte Konzentration von Transaminasen bestimmt werden, die unter physiologischen Bedingungen ausschließlich intrahepatozellulär lokalisiert sind. Bei einem subklinischen Verlauf scheint das adaptive Immunsystem fast alle infizierten Hepatozyten zu eliminieren, bevor sich das Virus in der Leber weiter verbreiten konnte. In der Serologie ist daher nur ein vergleichsweise kurzzeitiges Auftreten geringer HBsAg-Konzentrationen zu sehen, die innerhalb weniger Wochen wieder unterhalb der Nachweisgrenze abfällt. Kennzeichnend für die Immunpathogenese der HBV-Infektion ist, dass der temporäre Anstieg der Transaminasen sowie das Auftreten des Anti-HBc-Antikörpers erst erfolgt, wenn die HBV- und HBsAg-Konzentration im Serum wieder abnimmt. Ein Anstieg des Anti-HBs-

Antikörper Titer findet in den meisten Fällen erst statt, nachdem kein HBsAg mehr nachweisbar ist und der Patient als immun gilt. Die Symptome treten parallel zu der temporären Erhöhung der Transaminasen auf. Diese verzögerte Immunreaktion wird durch verschiedene Immunevasionsmechanismen des HBV bewirkt und ermöglicht es dem Virus sich über Wochen und Monate weitgehend ungestört zu vermehren und in der Leber auszubreiten. Bei einem akuten HBV-Infektionsverlauf ist eine sehr ähnliche Kinetik der serologischen Marker wie bei dem subklinischen Verlauf festzustellen. Die gemessenen Konzentrationen des HBsAg und der Transaminasen sind jedoch um ein Vielfaches erhöht. Parallel zum HBsAg können bei akuten Verläufen vor Ausbruch der Symptome auch hohe Konzentrationen viraler DNA und des HBeAg gemessen werden. Mit Beginn der klinischen Symptome fallen HBV-DNA und HBeAg im Verlauf einiger Wochen ab, die HBV DNA bleibt jedoch für lange Zeit knapp über der Nachweisgrenze der PCR. Die HBsAg-Konzentration sinkt in vielen Fällen zunächst langsamer ab, verschwindet dann aber ganz und wird einige Wochen später vom anti-HBs abgelöst [112]. Ein spezifischer Nachweis der gebildeten Anti-HBs- und Anti-HBc-Antikörper ist in den meisten Fällen noch über Jahre und Jahrzehnte möglich und ein eindeutiges Zeichen einer überstandenen HBV-Infektion. Im Unterschied zum akuten Infektionsverlauf sinken bei einem chronischen Verlauf die Titer für virale Marker wie dem HBsAg, HBeAg oder der HBV-DNA über mindestens sechs Monate nicht ab und können in diesem Zeitraum parallel zu hohen Konzentrationen von Anti-HBc-Antikörpern nachgewiesen werden. Bei chronischen Verläufen kann es aus nicht bekannten Gründen zu einem kompletten Verlust des HBeAg kommen, worauf kurze Zeit später die Bildung von Anti-HBe-Antikörpern detektierbar ist. Parallel zum Verlust des HBeAg sinken meist auch die Titer der HBV-DNA sowie des HBsAg stark ab. Dieser Verlauf wird als chronische HBV-Infektion mit HBe-Serokonversion bezeichnet und bedeutet für den Patienten, dass das Risiko für HBV-assoziierte Leberschädigungen deutlich verringert ist [113].

1.4 Molekularvirologische und zellbiologische Aspekte einer HBV- und HDV-Infektion

Auf molekular- und zellbiologischer Ebene ist eine Virusinfektion nicht zu trennen von den zellulären Strukturen und Funktionen, die für den viralen Lebenszyklus essenziell sind. Der Lebenszyklus des HBV kann in drei Teile gegliedert werden:

1.4.1 Die initialen Schritte des HBV-Replikationszyklus

Eine HBV-Infektion wird durch eine wenig spezifische Bindung des Virus an Heparansulfat-Proteoglykane der basolateralen Membran von Hepatozyten initiiert [60-62] (s. Abbildung 6). Durch eine spezifische Bindung an den ebenfalls basolateral lokalisierten Gallensalztransporter Natrium-Taurocholat cotransportierendes Polypeptid (NTCP) gelangen die Viren durch einen bislang noch unbekanntem Aufnahmemechanismus in das Zytoplasma der Zellen [66, 76, 114-119]. Es konnte

beobachtet werden, dass z. B. subvirale Partikel ca. 30-45 Min nach der Bindung an die Zellmembran in Endosom-ähnlichen Kompartimenten von HBV-suszeptiblen Hepatozyten erscheinen [120]. Vermutlich wird daraufhin durch die viralen Oberflächenproteine eine Fusion der Virushülle mit der endosomalen Membran induziert und das HBV-Nukleokapsid gelangt in das Zytoplasma [121, 122]. Aufgrund eines Kernlokalisierungssignals (NLS) im C-terminalen Teil der Coreproteine wird das Nukleokapsid durch eine Interaktionen mit Mikrotubuli-Filamenten der Zelle aktiv zur Kernmembran transportiert [123]. Im Kernporenkomplex kommt es zu einer Disassemblierung des Nukleokapsids, wodurch das virale Genom in das Karyoplasma freigesetzt wird [124-126].

1.4.2 Intermediäre Schritte des HBV-Replikationszyklus

Im Zellkern kommt es durch Wechselwirkungen des HBV-Genoms mit zellulären DNA-Reparaturmechanismen zur Entfernung der kovalent mit dem viralen DNA-Minusstrang verknüpften Polymerase, zur Entfernung des RNA-Primers vom DNA-Plusstrang, zur Komplettierung der nur teilweise doppelsträngigen DNA (*relaxed circular DNA / rcDNA*) und zur Ligation der verbliebenen Nicks zur kovalent geschlossenen zirkulären DNA (*covalently closed circular cccDNA*) [127] (s. Abbildung 6). Diese cccDNA bildet zusammen mit zellulären Histonen und anderen Proteinen ein episomal stabiles Minichromosom und wird von der zellulären RNA-Polymerase II als Matrize für die Expression der viralen prägenomischen RNA (pgRNA) sowie subgenomischer mRNAs verwendet [128, 129]. In differenzierten Hepatozyten muss die HBV-Transkription der Strukturproteine durch das virale HBx-Protein aktiviert werden [130, 131].

1.4.3 Die späten Schritte des HBV-Replikationszyklus

Nach dem Export der mRNAs in das Zytoplasma kommt es durch die Translation von subgenomischen mRNAs am Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zellen zur Synthese der Oberflächenproteine (s. Abbildung 6). Von der pgRNA werden das Core-Protein sowie die virale Polymerase synthetisiert. Die Coreprotein-Moleküle dimerisieren und binden an den Replikationskomplex aus pgRNA und viraler Polymerase was nachfolgend die Assemblierung der Nukleokapside unter Verpackung des Replikationskomplexes auslöst [132-134]. Aufgrund der reversen Transkriptase-Funktion der Polymerase kann im Nukleokapsid die pgRNA als Matrize für die Synthese der rcDNA verwendet werden [135]. Dies führt zur sogenannten „Reifung“ der Nukleokapside. Die reifen Nukleokapside werden dann über Mikrotubuli zu den Kernporen transportiert, wo es erneut zur Translokation der viralen rcDNA in das Kernlumen und zur Bildung neuer cccDNA kommt [136-138]. Außerdem können die reifen Nukleokapside aber auch am ER mit der zytosolisch lokalisierten präS1-Domäne der HBV-Oberflächenproteine wechselwirken, was zur Umhüllung durch alle drei HBs Proteine und zur Bildung infektiöser Viren führt. Diese werden über multivesikuläre Körperchen als infektiöse Viren aus der Zelle sekretiert [139]. Ein sehr großer Anteil der Oberflächenproteine assembliert auch ohne

Interaktion mit den Nukleokapsiden zu HBsAg-Partikeln und wird über den Golgi-Apparat sekretiert. Dadurch kommt es auch zur Anreicherung von subviralen Partikeln im Blut.

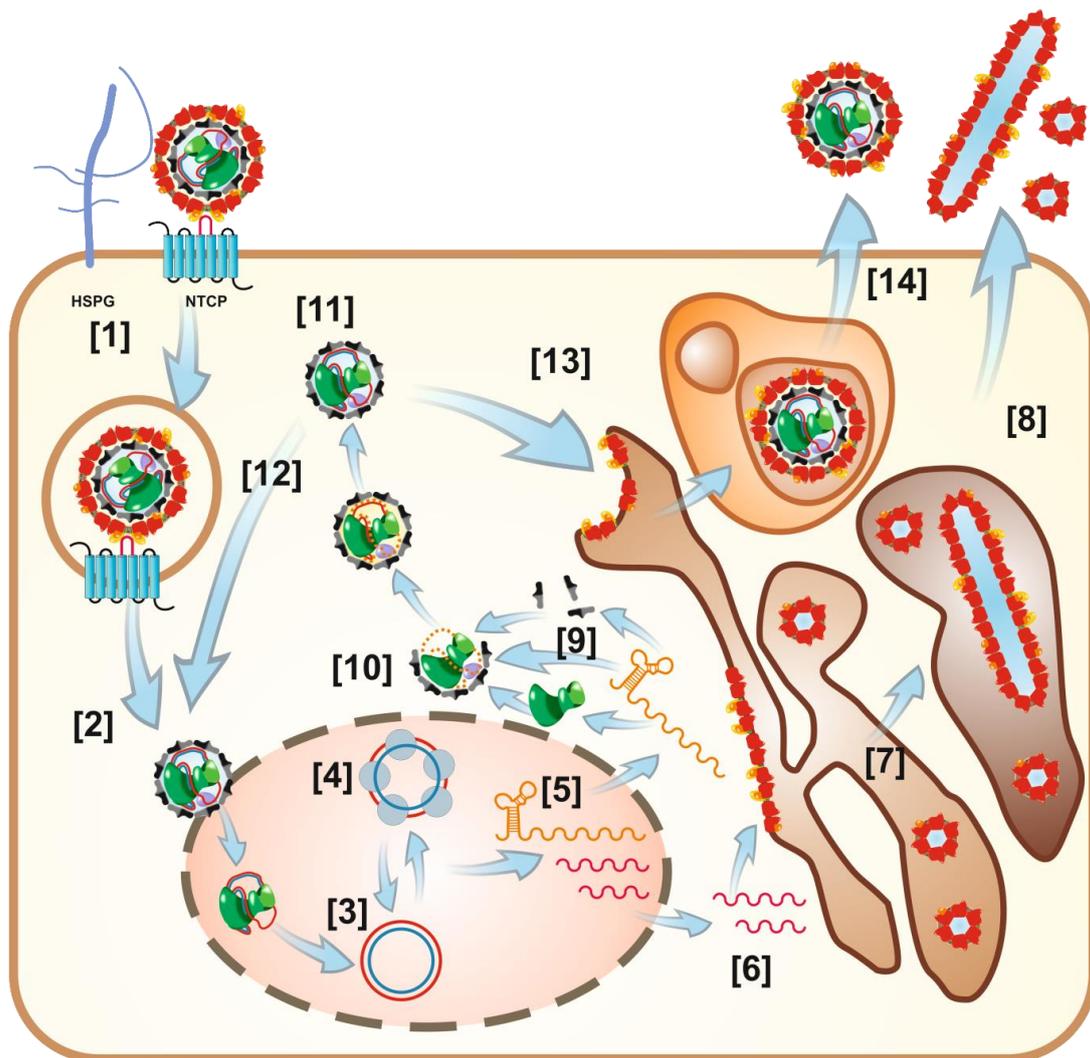


Abbildung 6: Der HBV Lebenszyklus. (1) Mit den Heparansulfat Proteoglykanen sowie dem NTCP sind zwei membranständige zelluläre Bindungspartner des HBV bekannt. Allerdings führt nur die hoch spezifische Bindung an den Hepatozyten spezifischen NTCP zu einer endozytotischen Aufnahme des Virus und zu einer Infektion. (2) Nachdem das Core-Partikel durch noch unbekannte Vorgänge ins Zytoplasma gelangt ist und über Mikrotubuli-Filamente zum Nucleus transportiert wurde, kommt es zu dessen Disassemblierung im *nuclear pore complex*. Dadurch wird ermöglicht, dass das virale Genom zusammen mit der viralen Polymerase in das Kernlumen transloziert wird. (3) Dort wird die teilweise doppelsträngige *relaxed circular DNA* (rcDNA) zu einer *covalently closed circular DNA* (cccDNA) repariert und (4) durch die Bindung von zellulären Histonen sowie nicht Histon-Proteinen zu einem episomal stabilen „Minichromosom“ ergänzt. (5) Durch die Transkription der cccDNA kommt es zur Synthese von prägenomischer und subgenomischen mRNAs (pgRNA und sgRNA). Nach dem Transport der mRNAs in das Zytoplasma werden von der (9) pgRNA die Polymerase sowie die Core-Proteine translatiert und die (6) sgRNAs werden als Matrizen für die viralen Oberflächenproteine verwendet. (10) Nachdem die pgRNA zusammen mit der viralen Polymerase und Core-Proteinen zu unreifen Core-Partikeln assemblieren, (11) kommt es durch die Aktivität der reversen Transkriptase zur Reifung der Core-Partikel. (12) Diese Core-Partikel werden entweder in den Kern transportiert, wodurch es zu einer Anreicherung von cccDNA kommt oder (13) werden ER mit des Oberflächenproteinen umhüllt und (14) als Virionen über Multivesikuläre Körperchen in das sinusoidale Blut sekretiert. (7, 8) Aufgrund einer vergleichsweise Überexpression der Oberflächenprotein, kommt es zur Ausbildung von subviralen Partikeln, die über das Trans-Golgi Netzwerk ebenfalls in das sinusoidale Blut sekretiert werden. [modifiziert nach Glebe und König, 2014 [140]]

1.4.4 Der Replikationszyklus des HDV

Das HDV bindet wie auch das HBV über die externe präS1-Domäne des LHBs an das basolateral lokalisierte Membranprotein NTCP [76, 97] (s. Abbildung 7). Daraufhin gelangt das Virus in die Hepatozyte und das HDV RNP wird in das Zytoplasma der Zelle entlassen. Aufgrund eines Kernlokalisationsignals (NLS) im N-Terminus des HDAG wird das RNP in den Zellkern transportiert [90, 141]. Die zirkuläre genomische RNA (G-RNA) wird dort wie bei Viroiden und Virusoiden über einen sogenannten „Double Rolling-Circle Mechanismus“ vervielfältigt [81, 142]. Dabei wird als Erstes die G-RNA (negative Polarität) von der zellulären DNA-abhängigen RNA-Polymerase II als Matrize für die Synthese einer antigenomischen RNA (AG-RNA mit positiver Polarität) verwendet [143]. Diese intermediäre AG-RNA kann um ein Vielfaches länger sein als die genomische RNA. Durch eine Selbstspaltungsreaktion innerhalb der HDV-eigenen Ribozym-Domäne der RNA entstehen aus der multimeren AG-RNA mehrere monomere, lineare AG-RNA Moleküle, die durch eine Ribozym-induzierte Ligationsreaktion rezirkularisiert werden [79]. Diese antigenomischen, monomeren, zirkulären RNAs dienen wiederum als Matrize für die Synthese und Vervielfältigung der zirkulären G-RNA. Die G-RNA dient auch als Matrize für die Synthese der subgenomischen mRNA (ca. 0,8 kb), die für die Translation des S- und LHDAg benötigt werden [85]. Anfangs wird ausschließlich das SHDAg synthetisiert, das eine essenzielle Funktion im Replikationsmechanismus des Virus hat [144, 145]. Sobald es durch zelluläre RNA-Editing Prozesse zur Expression des LHDAg kommt, stoppt die Vervielfältigung des Genoms, da das LHDAg einen dominant negativen Effekt auf die Replikation ausübt [88, 146, 147]. HDV RNP, bestehend aus G-RNA, S- und LHDAg (s. o.) werden aufgrund eines Nukleären Export Signals (NES) am C-Terminus des LHDAg aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert [148, 149]. Durch eine Prenylierung des CXXX-Motivs am C-Terminus des LHDAg kommt es zu einer Verankerung des RNP am ER der Zelle [150]. Da das Genom von HDV keine Oberflächenproteine codiert, kommt es ausschließlich bei einer gleichzeitigen HBV-Infektion der Zelle zur Umhüllung des HDV mit den Oberflächenproteinen des HBV [151, 152]. Dabei interagiert im ER eine Tryptophan-reiche Domäne (AS: WMMWYW) am C-Terminus (AS: 196-201) des SHBDAg mit dem C-Terminus des LHDAg [152]. Daraufhin erfolgt eine Sekretion von infektiösem HDV zusammen mit subviralen Partikeln über das Trans-Golgi-Netzwerk ins das Blut [151, 153].

Einleitung

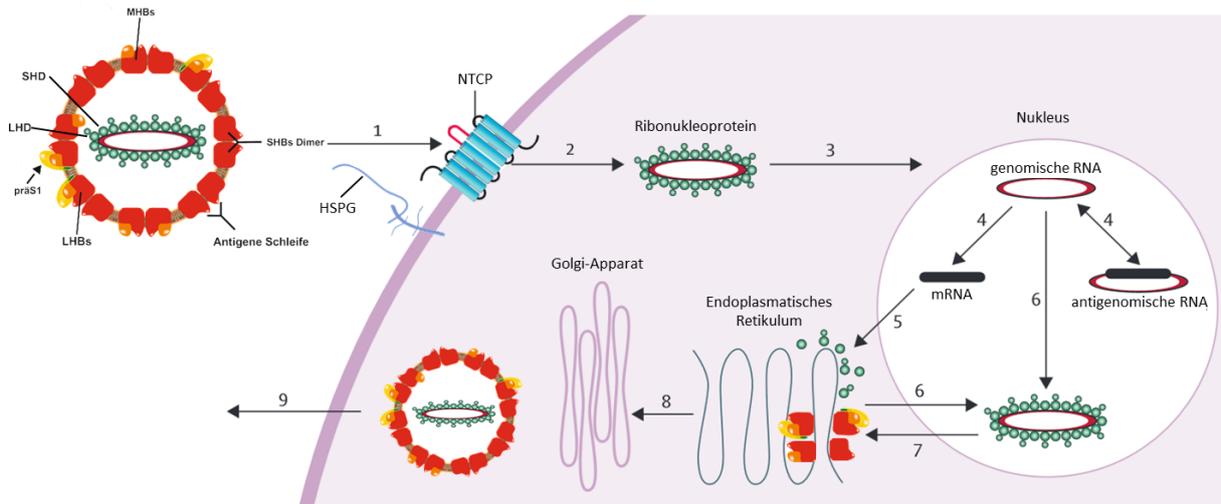


Abbildung 7: Der Replikationszyklus des HDV. (1) Durch eine Interaktion des kleinen Hepatitis B Oberflächenproteins (SHBs) mit Heparansulfat Proteoglykanen (HSPG) sowie des großen Hepatitis B Oberflächenproteins (LHBs) mit dem Leber spezifischen Gallensalztransporter NTCP bindet das Delta Virion an die basolaterale Membran von Hepatozyten. (2) Nach der Aufnahme des Virus in die Zelle, gelangt das HDV-Ribonukleoprotein (RNP) ins Zytoplasma und (3) wird zum Zellkern transportiert. (4) Im Nucleus wird die virale, genomische RNA entweder zu einer mRNA transkribiert, die für die zwei offenen Leserahmen des S-HDAg und L-HDAg codiert oder zu einer antigenomischen RNA transkribiert, die als Matrize für die Synthese und Vervielfältigung der zirkulären genomischen RNA dient. (5) Nachdem mRNA-Export ins Zytoplasma werden am ER neue Moleküle des S-HDAg und L-HDAg translatiert. (6) Die Delta-Antigene werden in den Nucleus transportiert, wo sie mit den Transkripten der genomischen RNA assoziieren und neue RNPs bilden. (7) Im Falle einer aktiven HBV-Infektion des Hepatozyten kommt es nach einem Export der RNPs ins Zytoplasma durch Wechselwirkungen des L-HDAg mit dem LHBs am ER zu einer Umhüllung mit den HBV-Oberflächenproteinen. (8+9) Die neuen Delta Virionen werden anschließend über das Trans-Golgi Netzwerk in das sinusoidale Blut sekretiert. [modifiziert nach Hughes et. al., 2011 [142]]

1.5 *In vitro* Infektionssysteme für HBV / HDV

Der Eintrittsweg von HBV und HDV ist an den hohen Differenzierungsstatus von Hepatozyten angepasst [154, 155]. Daher sind permanente Hepatomzelllinien normalerweise nicht suszeptibel für HBV und HDV. Selbst primäre Hepatozyten verlieren ihre Suszeptibilität innerhalb von ca. fünf Tagen nach deren Isolierung aus der Leber [119]. Allerdings führt eine Transfektion von Hepatomzellen mit Expressionsplasmiden des HBV-Ganzgenoms zu einer Sekretion von infektiösen HBV-Partikeln. Somit wurde schon lange vermutet, dass der Block der HBV-Infektion in den frühen Schritten des HBV-Lebenszyklus, vor der Ausbildung der cccDNA, geschieht [78]. Außerdem ist die Infektion neben Differenzierungs-spezifischen Faktoren auch von Spezies- und Gewebe-spezifischen Faktoren abhängig [156, 157]. Aufgrund dieser Einschränkungen, standen für HBV *in vitro* Infektionssysteme über Jahrzehnte ausschließlich primäre Hepatozyten von Mensch (PHH) und Schimpanse zur Verfügung. Viele wichtige Erkenntnisse über Hepadnaviren konnten auch durch die Verwendung primärer Hepatozyten aus dem nordamerikanischen Waldmurmeltier bzw. der Ente und deren Hepadnaviren erlangt werden. Der Nachteil in der Verwendung von PHH ist, dass je nach Spender die

PHH eine erhebliche Variabilität in der Qualität und Suszeptibilität für HBV aufweisen. Außerdem ist das Zeitfenster für Infektionsexperimente mit PHH auf max. fünf Tage eingeschränkt und die Verfügbarkeit geeigneter Leberproben zur Herstellung von primären Hepatozyten Kulturen ist sehr begrenzt. Eine Suszeptibilität für HBV und HDV von primären Hepatozyten des südostasiatischen Spitzhörnchens (PTH) wurde anhand von *in vitro* sowie *in vivo* Infektionsexperimenten festgestellt [158-161]. Interessanterweise weisen PTH auch eine Suszeptibilität für das WMHBV, jedoch nicht für das WHV auf [162]. In einer Studie aus 2003 von Glebe et. al. konnte gezeigt werden, dass die HBV-Infektion von PTH und PHH vergleichbar sind [163]. In 2002 wurde erstmals eine Hepatomzelllinie (HepaRG) beschrieben, die mit HBV infiziert werden kann [13]. Alle zuvor beschriebenen Zelllinien, die aus einem Lebertumor stammen (z. B. HepG2 oder HuH7) sind weitgehend dedifferenziert und nicht suszeptibel für HBV und HDV. Ein vergleichsweise hoher Differenzierungsstatus sowie eine Infektion der HepaRG-Zellen kann allerdings nur festgestellt werden, wenn die Zellen zuvor über einen Zeitraum von zwei Wochen mit DMSO behandelt wurden [13, 164, 165]. Seit dem Bekanntwerden eines funktionellen Rezeptors (NTCP) des HBV und HDV in 2012 können auch andere hepatische humane Zelllinien wie z. B. HepG2 oder HuH7, die zuvor mit NTCP-Expressionsplasmiden transient oder stabil transfiziert wurden, für *in vitro* Infektionen mit beiden Viren verwendet werden [76]. Interessanterweise weisen exogen hNTCP-exprimierende HeLa-Zellen (Zervixkarzinom, human, nicht hepatisch), Hepa1-6, MMHD3 oder AML-12 (murine Hepatomzellen) sowie nicht humane, nicht hepatische CHO (*Chinese hamster ovary*) und Vero (*african green monkey kidney*) eine Suszeptibilität für das HDV, nicht aber für HBV auf [166, 167].

1.6 Die Funktion des NTCPs und anderer Transporter der Solute Carrier Familie 10 (SLC10)

Zurzeit sind 43 SLC Familien und 319 humane SLC Transporter Gene bekannt. Darunter findet man passive Transporter, Ionen gekoppelte Symporter sowie Antiporter [168]. Die Transporter der Familie SLC10 gehören zu den Ionen gekoppelten Symportern und werden als Familie der Natrium / Gallensäure Kotransporter bezeichnet. Zu den Mitgliedern der SLC10 Familie, die ein Gallensalz molekül zusammen mit einem Natrium Molekül transportieren, zählt das Natrium-Taurocholat cotransportierende Polypeptid NTCP (SLC10A1) und der apikale Natrium-abhängige Gallensalztransporter ASBT (SLC10A2) [169-172]. Beide Transporter sind essenzielle Faktoren für die Aufrechterhaltung der enterohepatischen Zirkulation von Gallensalzen (GS) [172-174]. Die Funktion von Gallensalzen ist das Emulgieren von wasserunlöslichen Substanzen wie z. B. Lipide die über die Nahrung in den Darm gelangen. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für deren Resorption und damit sind Gallensalze unerlässlich für die Fettverdauung. In der Leber werden Gallensalze aus

Einleitung

Cholesterinmolekülen synthetisiert. Die Synthese des Cholesterins ist jedoch sehr energieaufwendig. Der enterohepatische Kreislauf ermöglicht es große Mengen der Gallensalze wiederzugewinnen, indem die Gallensalze an der apikalen Membran von Enterozyten im Ileum durch die Transportaktivität des ASBT aus dem Darmlumen resorbiert werden. Über die basolaterale Membran gelangen die GS in den Blutkreislauf und über die Vena portae zur Leber. Aus dem Portalblut werden die Gallensalze über die basolaterale Membran der Hepatozyten hauptsächlich durch die Aktivität des NTCPs in das Zytoplasma der Zellen transportiert. Ein verhältnismäßig kleiner Anteil der GS werden über den Natrium unabhängigen Transport des OATP (*organic anion transporting polypeptide*) in die Hepatozyten transportiert. An der apikalen, kanalikulären Membran werden die GS wiederum durch ATP-abhängige Gallensalz Export Pumpen wie z. B. dem Multidrug Resistance Protein II (MRP II) in Gallenkanälchen sezerniert. Über den Gallekanal gelangen die GS in die Gallenblase wo sie wieder nach Bedarf in das Intestinum sezerniert werden. Durch diesen Kreislauf werden über 95 % der ins Intestinum sezernierten GS wiedergewonnen (Übersichtsartikel siehe [174]). Seit 2004 ist bekannt, dass nicht alle Transporter der SLC10 Familie Gallensalze transportieren. Stattdessen transportiert der Natrium-abhängige organische Anionen-Transporter SOAT (SLC10A6) unter physiologischen Bedingungen Steroidsulfate wie z. B. Oestron-3-Sulfat und DHEAS. Durch *in vitro* Experimente konnte allerdings auch gezeigt werden, dass der SOAT auch Gallensalze transportieren kann. Die physiologische Funktion des SOAT ist jedoch der Transport von den oben genannten Prohormonen in Zellen der Testes, Plazenta oder der Nebenniere [175, 176]. Wie für den NTCP und ASBT ist der Transport streng Natrium abhängig und man geht auch hier von einem Symport Transportmechanismus aus [171, 172, 177]. Vergleicht man die Nukleotidsequenz der SLC10 Gene ist eine hohe Ähnlichkeit vor allem zwischen dem ASBT und dem SOAT (ca. 41,8 %), aber auch zwischen dem NTCP und dem SOAT (33,4 %) sowie dem NTCP und dem ASBT (34,9 %) auffällig [178]. Der Sequenzbereich mit der höchsten Homologie befindet sich im Inneren der Transporter, wobei die C- und N-terminalen Bereiche komplett heterolog sind. Dieser hoch homologe Kernbereich der Transporter weist sieben bis neun Transmembrandomänen auf. Aus diesem Grund ähneln sich diese drei SLC10 Transporter nicht nur in der Funktionalität und der Nukleotidsequenz sondern auch in ihrer Membrantopologie [178]. Über den molekularen Mechanismus des Symports der SLC10 Transporter sowie die Lokalisation der Ligandenbindungsstellen ist nicht viel bekannt. Durch die SLC10A1-Nomenklatur ist festgelegt, dass der humane SLC10A1 „NTCP“ und nicht humane SLC10A1 „Ntcp“ geschrieben werden (z. B. mNtcp, rNtcp, tNtcp aus mouse, rat, tupaia) [179].

2. Zielsetzung

In Zusammenarbeit der Arbeitsgruppen von M. Tschapka (Institut für experimentelle Ökologie / Universität Ulm) und der Arbeitsgruppe von J. F. Drexler (Instituts für Virologie / Universität Bonn) wurden in Gewebe- und Blutproben von zwei Fledermausspezies in Gabun (Westafrika) und einer Fledermausspezies in Panama (Mittelamerika) virale DNA detektiert, die nach einer ausführlichen Sequenzanalyse eindeutig der Genera Orthohepadnaviridae zugeordnet werden konnten. Aufgrund der hohen Homologie zum HBV des Menschen sollte die Funktionalität dieser neu entdeckten Viren untersucht werden. Wichtigstes Ziel der Untersuchungen war es, herauszufinden ob eine potenzielle zoonotische Gefährdung von diesen Orthohepadnaviren ausgeht. Folgende Fragestellungen waren dabei relevant:

- Können die viralen Hepadnavirusgenome aus Fledermäusen in humanen Hepatozyten replizieren?
- Sind die Oberflächenproteine in der Lage an die Membran HBV-suszeptibler Hepatozyten zu binden?
- Können diese Viren HBV-suszeptible primäre Hepatozyten infizieren?
- Kann der funktionelle hoch-affine HBV-Rezeptor NTCP eine Infektion von humanen Hepatomzelllinien mit diesen neuartigen Viren vermitteln?

Eng verknüpft damit sollte in dieser Arbeit auch die molekularbiologische Interaktion zwischen dem HBV und dessen jüngst entdecktem, hoch-affinen Rezeptor NTCP untersucht werden. Da der NTCP ein Leber-spezifischer Gallensalztransporter der SLC10 Familie ist, war die wichtigste Fragestellung dabei, ob die Gallensalztransportaktivität des NTCPs möglicherweise mit der NTCP-vermittelten HBV-Infektion korreliert. Die Bedeutung von nahe verwandten humanen Transportern der SLC10 Familie als möglicher HBV-Rezeptor war eine weitere Fragestellung.

Um dies zu beantworten, wurden folgende Fragen formuliert:

- Kann das HBV mit den SLC10 Transportern ASBT, SOAT und NTCP interagieren?
- Gibt es eine Korrelation zwischen NTCP-Expression in Hepatozyten, der Gallensalz-Transportaktivität des Rezeptors sowie der HBV-Suszeptibilität?
- Beeinflussen Gallensalze als natürliche Substrate des NTCPs die Suszeptibilität für HBV?
- Beeinflusst die Interaktion des NTCPs mit dem HBV dessen Funktion als Gallensalztransporter?

3. Materialien

3.1 Zellkultur

3.1.1 Primäre Hepatozyten und Hepatomzelllinien

3.1.1.1 PTH

Primäre Hepatozyten aus dem südostasiatischen Spitzhörnchen *Tupaia belangeri* wurden für Myr-präS1-Peptid Bindungsexperimente und HBV-Infektionsversuche immer frisch isoliert. Die Tiere für diese Versuche stammen aus eigener Zucht, die sich im zentralen Tierlabor der JLU-Gießen in der Frankfurter Str. 105 befindet. Zur Kultivierung von PTH wurden die Zellkulturplatten vor dem Aussäen der Zellen mit Matrigel beschichtet. Als Zellkulturmedium wurde für diese Zellen ausschließlich „*Hepatocyte Growth Medium*“ (HGM) verwendet. Alle mit PTH durchgeführten Versuche sind mit der Tierschutzbeauftragten der JLU-Gießen abgesprochen und im Antrag zur Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken unter der Projekt-ID 767 und der JLU-Nr. 410-M offiziell gemeldet.

3.1.1.2 PHH

Primäre humane Hepatozyten wurden von der Firma Primacyt Cell Culture Technology GmbH (Schwerin, Deutschland) aus nicht krankhaft veränderten parenchymalen Bereichen eines Leberresektats isoliert. Die Fa. Primacyt garantiert, dass die Entnahme im Vorfeld von einer lokalen Ethik-Kommission genehmigt wurde, die Patienten umfassend über die mögliche Nutzung der isolierten Zellen aufgeklärt wurden und ihr Einverständnis schriftlich erteilt haben. Die Hepatozyten, die für die Untersuchung des Einflusses verschiedener orthohepadnaviraler Myr-präS1-Peptide auf die HBV-Infektion im ersten Teil der Arbeit verwendet wurden, stammten aus der Leber eines HCC erkrankten, Hepatitis A, B und C sowie HIV1+2 negativen 61 jährigen Mannes. Die PHH, die im zweiten Teil der Arbeit für die Untersuchung des Einflusses von NTCP-Substraten und –Inhibitoren auf die HBV-Infektion verwendet wurden, stammten aus der Leber eines Hepatitis A, B und C sowie HIV1+2 negativen 64 jährigen Mannes der an einer Child A Zirrhose und einem HCC erkrankt ist. Zur Kultivierung von PHH wurden die Zellkulturplatten vor dem Aussäen der Zellen mit Matrigel beschichtet. Als Zellkulturmedium wurde für diese Zellen ausschließlich HGM verwendet.

3.1.1.3 HepG2 Tet-On Advanced

Die immortalisierte HepG2-Hepatomzelllinie entstammt aus Hepatozyten einer Biopsie die 1975 aus der Leber eines an primären Leberkrebs erkrankten 15 jährigen Jungen entnommen wurde [180]. Verglichen zu vielen anderen Hepatomzelllinien gelten HepG2-Zellen als Hepatozyten mit differenzierten Leberzellfunktionen. In den Zellen kann keine HBV-DNA nachgewiesen werden. Die

HepG2 Tet-On (TO) Advanced Zelllinie (Cloneteck Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) exprimiert einen Tetracyclin regulierten Transaktivator. Eine Transfektion dieser Zelllinie mit einem Vektor, bei dem das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle eines Tetracyclin regulierten Promotors steht, ermöglicht die induzierbare Expression des Proteins durch die Zugabe von Doxycyclin ins Zellkulturmedium. Zur Kultivierung von HepG2 TO-Zellen wurden die Zellkulturplatten vor dem Aussäen der Zellen mit Kollagen Typ I beschichtet.

3.1.1.4 NTCP-HepG2 TO

Durch eine Transfektion des Plasmids ZFN-NTCP-FLAG (s. Kapitel 3.2.1.1 ZFN-Vektor, ZFN_NTCP-FLAG) in eine HepG2 Zelllinie, die einen Tetracyclin regulierten Transaktivator exprimiert (s. Kapitel 3.1.1.3 HepG2 Tet-On Advanced) konnte durch eine anschließende Puromycin Selektion eine Zelllinie hergestellt werden, die stabil mit dem Gen für den humanen NTCP transfiziert ist und dessen Expression durch die Zugabe von Doxycyclin ins Zellkulturmedium induzierbar ist.

3.1.1.5 HuH7

Die immortalisierte Hepatomzelllinie HuH7 wurde 1982 aus einem hepatozellulären Karzinom eines 57 jährigen japanischen Mannes generiert [181]. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von U. Protzer und V. Bruss (TU München) zur Verfügung gestellt.

3.2 Plasmide, Primer und quantitative realtime PCR

3.2.1 Plasmide

Tabelle 3: Verwendete Plasmide

Plasmidname	Vektor	Insert	Quelle
pcDNA5/FRT/TO_ASBT/NTCP-emGFP	pcDNA5/FRT/TO	ASBT-emGFP mit integrierten NTCP-Domänen AA91-94 zu RLKN u. AA163-171 zu KGIVISLVL	B. Döring
pcDNA5/FRT/TO_ASBT/NTCP-FLAG	pcDNA5/FRT/TO	ASBT-FLAG mit integrierten NTCP-Domänen AA91-94 zu RLKN u. AA163-171 zu KGIVISLVL	B. Döring
pcDNA5/FRT/TO_ASBT-EmGFP	pcDNA5/FRT/TO	ASBT-EmGFP	B. Döring
pcDNA5/FRT/TO_ASBT-FLAG	pcDNA5/FRT/TO	ASBT-FLAG	B. Döring
pCEP-Puro_HBHBV-1.1	pCEP-Puro	1.1 faches Genom des HBHBV	A. Geipel
pCEP-Puro_HBV-1.1	pCEP-Puro	1.1 faches Genom des HBV	A. Geipel
pcH9-200_LHBsHBHBV	pcH9-200	L, M, S Oberflächenprotein des HBHBV	A. Geipel
pcH9-200_LHBsHBHBV_HB1	pcH9-200	L, M, S Oberflächenprotein des HBHBV mit integriertem HB1 Epitop des HBV	A. Geipel
pcH9-200_LHBsHBV	pcH9-200	L, M, S Oberflächenprotein des HBV	A. Geipel
pcH9-200_LHBsRBHBV	pcH9-200	L, M, S Oberflächenprotein des RBHBV	A. Geipel
pcH9-200_LHBsRBHBV_HB1	pcH9-200	L, M, S Oberflächenprotein des RBHBV mit integriertem HB1 Epitop des HBV	A. Geipel
pcH9-200_LHBsTBHBV	pcH9-200	L, M, S Oberflächenprotein des TBHBV	A. Geipel
pcDNA5/FRT/TO_NTCP-EmGFP	pcDNA5/FRT/TO	NTCP-EmGFP	B. Döring
pcDNA5/FRT/TO_NTCP-FLAG	pcDNA5/FRT/TO	NTCP-FLAG	B. Döring
ZFN_NTCP-FLAG	ZFN	NTCP-FLAG	B. Döring
pSVLD3		3 x HDV Genom	C. Schüttler
pCEP-Puro_RBHBV-1.1	pCEP-Puro	1.1 faches Genom des RBHBV	A. Geipel
pcDNA5/FRT/TO_SOAT/NTCP-emGFP	pcDNA5/FRT/TO	SOAT-emGFP mit integrierten NTCP-Domänen AA91-94 zu RLKN u. AA163-171 zu KGIVISLVL	B. Döring
pcDNA5/FRT/TO_SOAT/NTCP-FLAG	pcDNA5/FRT/TO	SOAT-FLAG mit integrierten NTCP-Domänen AA91-94 zu RLKN u. AA163-171 zu KGIVISLVL	B. Döring
pcDNA5/FRT/TO_SOAT-EmGFP	pcDNA5/FRT/TO	SOAT-EmGFP	B. Döring
pcDNA5/FRT/TO_SOAT-FLAG	pcDNA5/FRT/TO	SOAT-FLAG	B. Döring
pCEP-Puro_TBHBV-1.1	pCEP-Puro	1.1 faches Genom des TBHBV	A. Geipel

B. Döring, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Fachbereich Veterinärmedizin; JLU-Gießen
A. Geipel und Dr. C. Schüttler, Institut für medizinische Virologie: JLU-Gießen

3.2.1.1 ZFN-Vektor, ZFN_NTCP-FLAG

Das ZFN-NTCP-Flag Plasmid besteht aus dem Vektor PZDonor (Sigma-Aldrich) mit einer zusätzlichen Puromycinresistenz (Clonotech) und einem Doxycyclin abhängigen minimalen CMV-Promotor aus pLVXtightPuro (Clonotech). Die Gene für Puromycinresistenz und der CMV-Promotor wurden zwischen die flankierenden AASV1 (adeno-associated virus integration site 1) Bereiche des pZDonor Vektors kloniert (ZFN-Grundgerüst). Die AASV1 Bereiche führen dazu, dass alle Gene die dazwischen codiert sind, stabil in die chromosomale DNA der transfizierten Zellen integriert werden. Durch die entsprechenden Klonierungsarbeiten von A. Geipel konnte ein Plasmid hergestellt werden, bei dem das Gen des humanen NTCPs unter der Expressionskontrolle des Doxycyclin abhängigen minimalen CMV-Promotor steht (ZFN_NTCP-FLAG).

3.2.1.2 pcDNA5/FRT/TO

Der pcDNA5/FRT/TO Vektor (Invitrogen) besitzt eine Hygromycinresistenz und einen CMV-Promotor der durch Tetracyclin reguliert werden kann. Durch das „FLP Recombination Target“ (FRT) können Teile des Plasmids, vermittelt durch die Aktivität einer FLP Rekombinase, in die Zelllinie T-Rex integriert werden.

3.2.1.3 pCEP-Puro

Der Vektor pCEP-Puro wurde am Institut für medizinische Virologie durch A. Geipel hergestellt, indem aus dem Vektor pCEP4 (Invitrogen) das Gen für eine Hygromycinresistenz mit einem Gen für eine Puromycinresistenz ausgetauscht wurde. Neben diesem Selektionsmarker für eukaryontische Zellen besitzt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz, um es in Bakterien selektieren zu können. Durch einen OriP des Epstein-Barr-Virus sowie einen EBNA-1-ORF kann das Plasmid während des Zellzyklus episomal repliziert werden. Zusätzlich enthält es eine SV40 Poly-Adenylierungsstelle sowie einen CMV-Promotor.

3.2.1.4 pCH9-200

Das pCH9-200 ist ein Expressionsplasmid für eukaryontische Zellen, das für die Oberflächenproteine (LHBs) des HBV Genotyp D, Subtyp ayw3 und einem vorgeschalteten CMV-Promotor codiert. Nach Transfektion in Hepatomzelllinien kommt es zu Expression und Sekretion der HBV-Oberflächenproteine. Das Ursprungsplasmid des pCH9-200 wird als pCH9-3091 bezeichnet und wurde von Prof. U. Protzer (TU München) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.2.2 Primer zur Amplifikation und Quantifizierung von HDV RNA oder HBV-DNA mittels RT-PCR

Tabelle 4: Verwendete Primer

PCR-Name	Name Primer/Sonde	Primer Sequenz
HBV X-PCR	Primer: HBV X2 sense HBV X2 antisense	5'- gacgtcctttgty ¹⁾ tacgtcccgtc - 3' 5'- tgcagagttgaagcgaagtgcaca - 3'
	TaqMan Sonde: HBV X2-Sonde	5' - FAM ²⁾ -ctccccgtctgtgccttctcatctgccg-TAMRA ³⁾
HDV-RT-PCR	Primer: HDV2 sense HDV2 antisense	5'-tccagaggacccttca 5'-ccgggataagcctcact
	TaqMan Sonde: HDV2-Sonde	5' - FAM ²⁾ -agaccgaagcgaggaggaaagca-TAMRA ³⁾
¹⁾ Y: C/T; ²⁾ FAM: 6-Carboxy-Fluorescein; ³⁾ TAMRA: Tetramethylrhodamin; Quelle: A. Geipel		

3.2.3 Mastermix zur Amplifikation und Quantifizierung von HDV RNA oder HBV-DNA mittels RT-PCR

Tabelle 5: Rezepte für Mastermix

PCR-Name	Name	Volumen/Konzentration
HBV X-PCR	Primer HBV X2 sense	1 µl (10 pmol/µl)
	Primer HBV X2 antisense	1 µl (10 pmol/µl)
	HBV X2 Sonde	1 µl (10 pmol/µl)
	QPCR Capillary Mix	7 µl
	+ gereinigte DNA	+ 10 µl
HDV-RT-PCR	H2O	3 µl
	Primer HDV2 sense	1 µl (10 pmol/µl)
	Primer HDV2 antisense	1 µl (10 pmol/µl)
	HDV2-Sonde	1 µl (10 pmol/µl)
	RT Enhancer	1,25 µl
	QPCR Mix	12,5 µl
	Enzym Mix	0,25 µl
	+ gereinigte RNA	+ 5 µl

Die Quantifizierung der viralen DNA oder RNA wurde mit einem 96-Well Light Cycler 480 II der Firma Roche durchgeführt.

3.3 Hepadnavirale Myr-präS1-Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten Myr-präS1-Peptide wurden anhand der N-terminalen Aminosäuresequenz der Position 2-49 des großen Oberflächenproteins von HBV, WMHBV, TBHBV, HBHBV, RBHBV und WHV von der Firma Bio Synthesis (Lewisville, Texas) mit einer Reinheit von > 90 % synthetisiert. Alle Peptide wurden am N-Terminus (AS 2) mit einer Myristinsäure (myr) modifiziert und am C-Terminus (AS 49) wurde entweder ein Strep-Tag (WSHPQFEK) oder das Fluorophor Alexa594 konjugiert. Zwischen der AS 49 der präS1-Domäne und der C-terminalen Modifikation wurde entweder ein Cystein (C) oder eine Serin, Alanin (SA) eingefügt.

Sequenzen und Modifikationen der orthohepadnaviralen Myr-präS1-Peptide:

HBV (Fluo): myr-GQNLSTSNPL GFFPDHQLDP AFRANTANPD WDFNPNKDTW PDANKVG C Alexa594

HBV (Strep): myr-GQNLSTSNPL GFFPDHQLDP AFRANTANPD WDFNPNKDTW PDANKVG SA WSHPQFEK

WMHBV (Strep): myr-GLNQSTFNPL GFFPSSHQLDP LFKANAGSAD WDKNPNKDPW PQAHDTA SA WSHPQFEK

TBHBV (Strep): myr-GLNQSVPNPL GFLPEHQLPW PPTSQEDWDM SGGKKDPWPQ AHQVGAG SA WSHPQFEK

HBHBV (Strep): myr-GVNQSVTNPL GFLPGHDMIT WDTTTSKDTL PGWYWDPLA GYGPERK SA WSHPQFEK

RBHBV (Strep): myr-GQNGSIPNPV GFFPGHEVLP DLEKLGTDPA LGPYTYWDRV PFKDPDR SA WSHPQFEK

WHV (Strep): myr-GNNIKVTFNP DKIAAWWPAV GTYYTTTYPQ QNQSVPQPGI YQTSLI SA WSHPQFEK

3.4 Gereinigtes Hepatitis B Virus aus dem Serum eines chronisch HBV infizierten Patienten

Tabelle 6: Verwendetes Virus aus Patientenserum

ID	Genotyp / Subgenotyp	Fraktion des Succrose Gradienten	GE/ml	GE/Inokulat
ID 309 (verschiedene Serumproben)	D / ayw2	4	4×10^{11}	1×10^8

3.5 Rekombinantes Hepatitis D Virus aus HuH7-Zellkulturüberständen

Tabelle 7: Verwendete Viren aus Zellkulturüberständen

Name	Oberflächenproteine	GE/ml	GE/Inokulat
HDV/HBV	HBV GT D / Sub-GT ayw3	8×10^5	1×10^6
HDV/TBHBV	TBHBV	5×10^6	1×10^6
HDV/HBHBV	HBHBV	1×10^7	1×10^6
HDV/RBHBV	RBHBV	5×10^6	1×10^6

3.6 Antikörper und Nachweisproteine

3.6.1 Primärantikörper

Tabelle 8: Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper						
Name	Antigenität	Wirt	Verwendung			Quelle
			ELISA	IF	WB	
Anti-FLAG M2-	FLAG-Sequenz: DYKDDDDK	Maus		5-10 µg/ml		Sigma Aldrich, Taufkirchen, F3165
Anti-HBc-AK	HBcAg	Kaninchen		50 µg/ml		DAKO, Kat.-Nr.: B0586
Anti-HDV-AK	Protein-G gereinigtes Antiserum eines HBV/HDV pos. Patienten	Mensch		1:500		D. Glebe, Institut für Med. Virologie JLU-Gießen
Anti-LHBs-IgG MA18/7	Lineares Epitop AS 20-23: LDPAF der präS1-Domäne	Maus				W. Gerlich, Institut für Med. Virologie JLU-Gießen
Anti-SLC10A1, Prestige Antibodies	NTCP, polyklonal, C-terminale Sequenz: VFSLAMKGDMLNSIVMTTCSTFCAL GMMPLLLYISRGYDGLDKVPY	Kaninchen		1-10 µg/ml		Sigma Aldrich, Taufkirchen, SAB2104761
Anti-SHBs-IgG C20/2	Konformationel AS120-160, α- Determinante, S-Domäne	Maus	1 µg/ml	5 µg/ml		W. Gerlich, Institut für Med. Virologie JLU-Gießen
Anti-SHBs-IgG HB1	Lineares Epitop: CRTCTT/CKTCTT in der S-Domäne	Maus		5 µg/ml	1 µg/ml	Aurelia Zvibliene , Institut für Biotechnologie Vilnius, Litauen
Anti-Strep-Tag II, StrepMAB- Classic	Strep-Sequenz: WSHYPQFEK	Maus		5-10 µg/ml		IBA, Goettingen 2-1507-001
Anti-HBs-AK Biotinkonjugat			1:100			Dade Behring, Enzygnost HBsAg 6.0

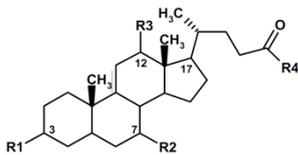
3.6.2 Sekundärantikörper und Nachweisproteine

Tabelle 9: Verwendete Sekundärantikörper

Konjugierte Sekundärantikörper und Nachweisproteine					
Name / Konjugat	Antigenität	Verwendung			Quelle
		ELISA	IF	WB	
Anti- Maus-IgG Alkaline Phosphatase	Leichte u. schwere Kette des IgG aus Maus			0,1 µg/ml	Dianova, Hamburg
Anti-Fledermaus-IgG Alexa594	Leichte u. schwere Kette des IgG aus Fledermaus		5 µg/ml		Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Human-IgG Alexa594	Leichte u. schwere Kette des humanen IgG		5 µg/ml		Invitrogen, Karlsruhe
Fragmente von Anti-Kaninchen-IgG Alexa488	Leichte u. schwere Kette des IgG aus Kaninchen		1 µg/ml		Invitrogen, Karlsruhe
Fragmente von Anti-Kaninchen-IgG Alexa594	Leichte u. schwere Kette des IgG aus Kaninchen		1 µg/ml		Invitrogen, Karlsruhe
Fragmente von Anti-Maus-IgG Alexa488	Leichte u. schwere Kette des IgG aus Maus		1 µg/ml		Invitrogen, Karlsruhe
Fragmente von Anti-Maus-IgG Alexa594	Leichte u. schwere Kette des IgG aus Maus		1 µg/ml		Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin Peroxydase (POD)	Biotin	2 µg/ml			Dianova, Hamburg

3.7 Chemische Inhibitoren und Gallensalze

Die Basis-Struktur eines Gallensalzes:

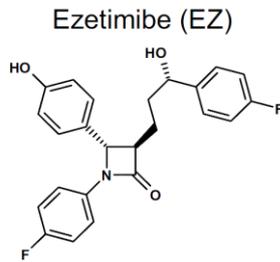


[Aus König et. al., 2014 [119]]

Tabelle 10: Verwendete Gallensalze

Gallensalz		R1	R2	R3	R4	Hersteller	Artikelnummer
TC	Taurocholat	α-OH	α-OH	α-OH	Taurin	Sigma Aldrich	86339
GC	Glykocholat	α-OH	α-OH	α-OH	Glycin	Sigma Aldrich	G7132
UDC	Ursodeoxycholat	α-OH	β-OH	H	OH	Calbiochem	672305
TUDC	Tauroursodeoxycholat	α-OH	β-OH	H	Taurin	Calbiochem	580549
GUDC	Glykoursodeoxycholat	α-OH	β-OH	H	Glycin	Calbiochem	362549
DHC	Dehydrocholat	O	O	O	OH	Sigma Aldrich	D3875

Neben den Gallensalzen wurde in dieser Arbeit auch Ezetimibe (Santa Cruz, Dallas) als chemischer Inhibitor des NTCPs verwendet [182].



[Aus König et. al., 2014 [119]].

3.8 Transportpuffer für NBD-TC

Tabelle 11: Rezepte für Taurocholat-Transportpuffer

Name	Zutaten	Menge / Konzentration
Transportpuffer mit Na ⁺ pH 7,4	NaCl KCl MgSO ₄ x 7 H ₂ O KH ₂ PO ₄ HEPES CaCl ₂ KOH ddH ₂ O	142,9 mM 4,7 mM 1,2 mM 1,2 mM 20 mM 1,8 mM 1 M 10 ml
Transportpuffer ohne Na ⁺ pH 7,4	Cholinchlorid KCl MgSO ₄ x 7 H ₂ O KH ₂ PO ₄ HEPES CaCl ₂ KOH ddH ₂ O	142,9 mM 4,7 mM 1,2 mM 1,2 mM 20 mM 1,8 mM 1 M 10 ml

3.9 Puffer, Medien

Tabelle 12: Verwendete Puffer und Medien

Name	Zutaten	Menge / Konzentration	Firma
1 % Casein Blocklösung		1 oder 0,1 % (in PBS)	Thermo Scientific (Kat. Nr.: 37528)
Blot Waschpuffer	PBS TWEEN 20 BSA	1 % 0,5 %	Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM mit Phenolrot			Invitrogen, Karlsruhe 41966-029
DMEM ohne Phenolrot			Invitrogen, Karlsruhe 21063-029
ELISA- Beschichtungspuffer	NaCl Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O KH ₂ PO ₄ pH 7,4 mit ...	83 mM 8,6 mM 2,2 mM	
ELISA-Substrat	dH ₂ O OPD-Tabletten Perhydrol	12 ml 4 5 µl	DAKO, Glostrup, Dänemark Merck, Darmstadt
ELISA-Waschpuffer	PBS Tween 20	1 L 0,1 %	Merck, Darmstadt
Formaldehyd (37 %)	dH ₂ O Formaldehyd	3,7 %	Merck, Darmstadt
HBSS (∅ MgCl ₂ und CaCl ₂)	dH ₂ O KCl KH ₂ PO ₄ NaHCO ₃ NaCl Na ₂ HPO ₄ D-Glukose (Dextrose)	1 L 5,33 M 0,44 M 4,17 M 137,93 M 0,34 M 5,56 M	
HBSS/EGTA	HBSS (∅ MgCl ₂ und CaCl ₂) EGTA in 1N NaOH gelöst [pH 8]	400 ml 4 ml [0,5 M]	
HGM	DMEM ohne Phenolrot ITS-Mix BSA Fr. V, endotoxinarm Glutamax I Dexamethason Gentamycin Natriumpyruvat Caspofungin Acetat	1 L 10 ml 2 g 10 ml 10 nM 0,1 mg/ml 1 mM 5 µg/ml	Invitrogen, Karlsruhe Invitrogen, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Invitrogen, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Taufkirchen Invitrogen, Karlsruhe PAA, Pasching Sequoia, Pangbourne, UK
Kollagenase Lösung	Kollagenase Typ IV DMEM ohne Phenolrot	250 mg 100 ml	Invitrogen, Karlsruhe
LB-Medium	dH ₂ O Bacto-Trypton Bacto-Hefe-Extrakt NaCl	1 L 10 g 5 g 10 g	BD Biosciences, Heidelberg BD Biosciences, Heidelberg
Matrigel Lösung		Gesamtprotein- Endkonz.: 0,5 mg/ml in dH ₂ O	BD Biosciences, Heidelberg
MgCl ₂ u. CaCl ₂ 100 x Stammlösung	H ₂ O MgCl ₂ CaCl ₂	100 ml 1,32 g 2,133 g	
Mowiol Zellkleber	H ₂ O Mowiol 4-88 Glycerol (87 %) Tris/Cl, pH 8,5	6 ml 2,4 g 6 g 12 ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Merck, Darmstadt
NED-Reagenz	H ₂ O Borsäure Konz. Schwefelsäure	300 ml 2,5 g 111 ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Materialien

	Naphtylethylendiamine (NED) Brij-35 (10 %) Auf 500 ml mit H ₂ O auffüllen	300 mg 1,5 ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Pierce
O-Phtalaldehyd	H ₂ O Konz. Schwefelsäure O-Phtalaldehyd Brij-35 (10 %) Auf 500 ml mit H ₂ O auffüllen	400 ml 37 ml 100 mg 1,5 ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Pierce
PBS	dH ₂ O NaCl, pH 7,4 KCl Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O KH ₂ PO ₄	137 mM 3,4 mM 10 mM 1,8 mM	
PBS++	PBS MgCl ₂ u. CaCl ₂ 100 x Stammlösung	396 ml PBS 4 ml	
Permeabilisierungspuffer	PBS Triton-X-100	0,2 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TNE pH 7,4	Tris-HCl NaCl EDTA	20 mM 140 mM 1 mM	Roth, Karlsruhe PAA, Pasching
Zellkulturmedien (2, 5 od. 10 % FKS)	DMEM mit/ohne Phenolrot FKS Penicillin/Streptomycin	500 ml 10, 25 od 50 ml 5 ml	Invitrogen PAA, Pasching PAA, Pasching
Bacto-Agarplatten	LB-Medium Bacto-Agar Ampicillin	400 ml 7,5 g 50 µg/ml	Difco, Detroid, USA Roth, Karlsruhe
Kollagen Typ I (Rat Tail)		Gesamtprotein- Endkonz.: 0,3 mg/ml in dH ₂ O	Corning, Amsterdam

3.10 Chemikalien

Tabelle 13: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Katalognummer
Ampicillin	Roth, Karlsruhe	2007081
Bacto-Agar	Difco, Detroid, USA	014-01
Bacto-Hefe Extrakt	BD Biosciences, Heidelberg	288620
Bacto-Trypton	BD Biosciences, Heidelberg	211705
BSA	Sigma, Taufkirchen	A-4378
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt	2382.0500
DMSO	Merck, Darmstadt	67-68-5
Ethanol	Roth, Karlsruhe	5054.3
Ethanol 70 % vergällt	Fischer, Saarbrücken	27660
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA, Pasching	A15-101
FuGene HD	Promega, Mannheim	E231A
Isopropanol	Merck, Darmstadt	1070222511
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe	6781.3
Kollagen Typ I	Becton Dickinson, Heidelberg	354236
Magnesiumchloridlösung (1M)	Sigma, Taufkirchen	M1028
Molekularbiologiewasser	Applichem, Darmstadt	A7398.1000
Natriumchlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen	31434
OPD Tabletten	DAKO, Glostrup, Dänemark	S2045
Polyethylenglykol (PEG)	Sigma, Taufkirchen	P1458
Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x)	PAA, Pasching, Österreich	P11-010
Pyruvat (100mM)	PAA, Pasching, Österreich	S11-003
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe	9090.2
Trypsin/EDTA (5x)	PAA, Pasching, Österreich	L11-003
TWEEN 20	Merck, Darmstadt	8170721000

3.11 Kommerzielle Kits

Tabelle 14: Verwendete Kits

Name	Hersteller	Katalog-Nr.
Absolute QPCR Capillary Mix	Thermo Fisher Scientific	AB-1283b
DNase I, RNase free (1 U/ μ l)	Thermo Fisher Scientific	EN0521
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche	11858874001
Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen	12943
Verso 1-Step QRT-PCR Kit + ROX vial	Thermo Fisher Scientific	AB-4100c
wst-1, cell proliferation reagent	Roche	11644807001

3.12 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 15: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Bakterienschalen	BD Biosciences, Heidelberg
Deepwellplatte 2,2 ml 96-Well	Thermo Fisher, Schwerte
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Einwegskalpelle	MAGV, Rabenau-Londorf
Glasbehälter (Messzylinder, Bechergläser etc.)	SCHOTT, Mainz
LightCycler 96-Well Platten	ROCHE Diagnostics, Mannheim
Mikrotiterplatten MaxiSorb	NUNC, Wiesbaden
PCR-Tubes 0,2 ml	nerbe plus, Winsen/Luhe
Pipetten	EPPENDORF, Hamburg
Pipetten	GILSON, Limburg-Offheim
Pipettenspitzen	SARSTEDT, Nümbrecht
Pipettenspitzen, gestopft	nerbe plus, Winsen/Luhe
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	EPPENDORF, Hamburg
Reaktionsgefäße FALCON 15ml, 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Röhrchen 12 ml	Greiner-Bio-One, Frickenhausen
Röhrchen 8 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Zellkulturschalen 24 well, 12 well, 10 cm, Maxi-Well	BD Biosciences, Heidelberg
μ -Slide 8-Well Zellkulturkammern für lebendzell Mikroskopie	ibidi GmbH, München
Glasplättchen für Mikroskopie	R. Langenbrinck, Emmendingen

3.13 Geräte

Tabelle 16: Verwendete Geräte

Name	Hersteller
Bakterienschüttler Innova 44	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank MCO-19AICUV-PE	Panasonic, Hamburg
Centrifuge 5417R Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Durchlichtmikroskop	Zeiss, Wetzlar
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Invitrogen
EIA-Reader BioTek	BioTek, Bad Friedrichshall
EIA-Shaker ZLI 164	Amersham Biosciences, Braunschweig
EIA-Washer COLUMBUS	Tecan Deutschland GmbH
LightCycler 480 II	Roche, Mannheim
pH Meter 26	Radiometer, Kopenhagen, DK
Photometer Picodrop	Biozym Scientific, Oldendorf
PicoFuge™	Stratagene, La Jolla, USA
Pipettierhilfen Integra	Biosciences, Fernwald
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn
Spannungsquelle Modell 200	GIBCO BRL, Life Technologies INC, USA
Sterilbank KS-12	Thermo Scientific, Schwerte
Vortexer	IKA, Staufen

4. Methoden

4.1 Amplifizierung von Plasmid-DNA

4.1.1 Transformation, *E. coli* Flüssigkultur und Plasmidpräparation

Für eine Vermehrung der Plasmid-DNA wurden 45 µl chemisch kompetenter Mach I *E. coli* vorsichtig auf 10 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA gegeben. Daraufhin wurden die Bakterien für 15 Min auf Eis inkubiert und direkt anschließend für 40 Sek bei 42 °C erhitzt. Nach diesem Hitzeschock erfolgte eine erneute 2-minütige Inkubation auf Eis, bevor 250 µl vorgewärmtes LB-Medium dazugegeben wurden und der Transformationsansatz bei 37 °C für 1 h geschüttelt wurde. Der gesamte Ansatz wurde auf LB-Agar Platten mit einem Drigalski-Spatel ausgestrichen. Durch die Anwesenheit von Ampicillin (Amp) in den LB-Agar Platten konnten ausschließlich erfolgreich transformierte Bakterien über Nacht bei 37 °C zu Kolonien herangewachsen. Vereinzelte Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze vorsichtig in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt, der vorher mit 40 ml LB-Amp gefüllt wurde. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler, wurde die Plasmid-DNA aus der *E. coli* Flüssigkultur mit Hilfe des Plasmid Plus Midi Kits der Firma Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

4.2 Isolierung und Kultivierung primärer Hepatozyten aus *Tupaia belangeri*

Für die Experimente mit primären Hepatozyten aus *Tupaia belangeri* wurden die Zellen immer frisch isoliert. Die Isolation der Zellen aus der Leber erfolgte nach einer modifizierten Zwei-Schritt-Kollagenase-Methode, beschrieben in Seglen et. al., 1976 [183].

4.2.1 Tiertötung

Für die Tiertötung vor der Organentnahme wurde zusammen mit der Tierschutzbeauftragten der JLU-Gießen eine möglichst stressfreie Methode erarbeitet. Dafür wurden die Tiere in ihren gewohnten „Schlafkisten“ gefangen, in den ein Schlauch eingeführt wurde. Durch diesen Schlauch wurde mithilfe eines CO₂-Flowmeters kontrolliert Kohlendioxid in die Kiste eingeleitet, so dass sich innerhalb einer Minute die Kohlendioxidkonzentration auf 30 % des Käfigvolumens geräuschlos erhöhte. Nach dem Eintritt der Bewusstlosigkeit wurde die CO₂-Flussrate so erhöht, dass die Kohlendioxidkonzentration für weitere vier Minuten bei 80 % des Käfigvolumens lag. Der Tod des Tiers wurde anhand des fehlenden Liedschlussreflexes und einer Hornhauttrübung festgestellt. Um den Tod des Tieres sicherzustellen, wurde anschließend durch eine Überstreckung des Rückens das Genick gebrochen.

4.2.2 Entnahme der Leber und Vereinzeln der Hepatozyten

Nach einer Desinfektion des Fells mit 70 prozentigen Ethanol wurde das Tier auf dem Rücken liegend an allen vier Extremitäten auf einer Styroporplatte mit Nadeln fixiert. Das Fell wurde am Abdomen und Thorax entfernt, bevor das Abdomen entlang der *linea alba* geöffnet wurde. Um die Leber sowie die Pfortader freizulegen, wurde der Brustkorb sowie die Bauchmuskulatur entfernt, der Darm zur Seite gelegt und die Leberlappen nach oben umgeklappt. Nach der Punktierung der Pfortader wurde die Kunststoffkanüle der Braunüle (22G, Vasocan) mittels Arterienklemmen fixiert und die Bauchvene beidseitig durchtrennt. Unmittelbar danach wurde mittels eines Schlauchpumpensystems durch die Kanüle für ca. 15 Min Magnesium und Calcium freies HBSS / 5 mM EGTA in die Leber eingeleitet. Aufgrund des Calcium Chelators EGTA und des Fehlens zweiwertiger Kationen im HBSS sollen interzelluläre Kontakte wie Tight Junctions destabilisiert und eine Thrombosierung der Leberkapillaren verhindert werden. Anhand der Aufhellung der Leberlappen war sichergestellt, dass die Perfusionsflüssigkeit durch die Kapillaren alle Bereiche des Leberparenchyms erreicht. Anschließend wurde die Leber für weitere 10 Min mit EGTA freiem HBSS perfundiert um das EGTA aus der Leber zu entfernen. Daraufhin erfolgte eine abschließende Perfusion mit einer 37°C erwärmten Kollagenase-Lösung (250 mg Kollagenase IV in 200 ml DMEM) die mittels eines rezirkulierenden Systems solange durch die Leber gepumpt wurde, bis das Leberparenchym weich und rissig wurde (ca. 20-40 Min). Während der gesamten Perfusionsdauer wurde die Leber vorsichtig aus dem Körper rauspräpariert und auf einen Büchnertrichter überführt.

4.2.3 Zellgewinnung

Nachdem die Gallenblase entfernt war, wurden die Leberlappen mit Skalpell in möglichst kleine Stücke zerteilt und zusammen mit der Kollagenase-Lösung in einem Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler bei 37°C und 100 RPM für 20-30 Minuten inkubiert. Mithilfe einer Siebdruckgaze wurden die nicht perfundierten Leberteile von den suspendierten Leberzellen abgetrennt (Porengröße 210 µM, Koenen Siebdrucktechnik, München). Die filtrierte Zellsuspension wurde gleichmäßig auf vorgekühlte 50 ml Falcon-Röhrchen verteilt und für 4 Min bei 40 xg und 4°C in einem Schwingrotor (Eppendorf 5810R, Rotor A4-62) zentrifugiert. Anschließend wurde der trübe Überstand vom Zellpellet vorsichtig abgesaugt, die Zellen in 10 ml eiskaltem DMEM resuspendiert, die Zellsuspension in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt und auf 40 ml mit eiskaltem DMEM aufgefüllt. Das Pelletieren und Resuspendieren wurde so oft wiederholt (ca. 2-3 Mal) bis der Überstand nach der Pelletierung klar war. Durch dieses Waschen der Zellsuspension werden tote Hepatozyten, Blutzellen und andere nicht parenchymatische Leberzellen von den Hepatozyten getrennt. Abschließend wurden die Zellen in HGM / 10% FKS aufgenommen und je nach Zelldichte der Suspension auf Matrigel beschichtete Zellkulturplatten mit einer 50 ml Plastikpipette vorsichtig ausgetropft. Pro 24-

Well Vertiefung wurden so ca. 3×10^5 Zellen ausgesät. Nachdem sich ein Großteil der Zellen nach einer vierstündigen Inkubationszeit im Brutschrank an den Boden angeheftet hatten, wurde das Medium entfernt und mit HGM ohne FKS ersetzt.

4.3 Transfektion

Für die Transfektion der HuH7- oder HepG2-Zelllinien wurden die Zellen in 10 cm Kulturplatten mit einer Konfluenz von 50 % ausgesät und für ca. 24 hr in 10 % haltigen DMEM mit Phenolrot kultiviert, so dass die Zellen eine Dichte von 70-90 % erreichten. Die Plasmid-DNA (9 µg / 10cm Platte) wurde in 350 µl reinem DMEM ohne Phenolrot gevortext, kurz abzentrifugiert und für 5 Minuten inkubiert. Daraufhin wurde als Transfektionsagens 32 µl FuGene HD dazugegeben, gründlich gevortext, abzentrifugiert und für 15 Minuten inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 10 ml PBS ++ gewaschen bevor 10 ml DMEM ohne Phenolrot mit 2 % FKS vorgelegt wurden. Der Transfektionsmastermix wurde tropfenweise über die gesamte 10 cm Platte verteilt und durch Schwenken der Zellkulturplatten vermischt. Nach einer 16-stündigen Inkubation im Zellkultivator wurden die Zellen mit PBS++ gewaschen und für folgende Experimente entsprechend auf die benötigten Zellkulturplatten verteilt. Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit transfizierten Zellen wurde eine Expressionsdauer von 48-72 hr eingehalten.

4.4 Produktion von HDV und pseudotypisierten HDV

Für die Herstellung von HDV und pseudotypisierter HDV wurden HuH7 Zellen mit zwei unterschiedlichen Expressionsplasmiden cotransfiziert (s. 4.3 Transfektion). Ein Plasmid codiert für die Oberflächenproteine des HBV, TBHBV, HBHBV oder RBHBV (4,5 µg DNA) und das zweite Plasmid (pSVLD3) codiert für das gesamte HDV Genom (4,5 µg DNA). Als Negativkontrolle wurde pSVLD3 zusammen mit einem Expressionsplasmid transfiziert, bei dem die drei Startkodons der jeweiligen Oberflächenproteine durch *Site Directed Mutagenesis* entfernt wurden. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen gewaschen und anschließend jeder Ansatz auf 2 Maxi-Platten umgesetzt. Nach 3, 6 und 10 Tagen wurden die Zellkulturüberstände komplett ausgetauscht und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Nach 6 Tagen wurden die Zellen bei Bedarf passagiert und nach 10 Tagen wurden die Zellen verworfen.

4.4.1 Bestimmung der Konzentration sekretierter HDV mittels RT-PCR

Für die Quantifizierung der produzierten HDV muss eine Reverse Transkriptase Real Time PCR durchgeführt werden. Dafür wurde die Virus-RNA aus den Zellkulturüberständen mit dem High-Pure-Viral-Nucleic-Acid-Kit von Roche nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Mittels der hier verwendeten RT-PCR (TaqMan) und spezifischen Primern gegen konservierte Bereiche im HDV-Genom wurde die genomische HDV-RNA amplifiziert und anhand eines mitgeführten Standards

Methoden

quantifiziert. Damit ausschließlich die HDV-RNA amplifiziert wird, wurde vor der RT-PCR zunächst ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurde folgender DNase-Mastermix (pro Ansatz) angesetzt:

- 1,2 µl H₂O
- 0,8 µl DNase Puffer (100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 25 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂)
- 2 µl DNaseI

Je 4 µl einer Probe oder des Standards wurden auf eine 96-Well PCR-Platte zusammen mit je 4 µl des DNase-Mastermix pipettiert. Anschließend wurde die Platte mit einer Light Cycler Folie abgeklebt, bei 700xg für 2Min zentrifugiert und für den DNase-Verdau für 1 h bei 37 °C im Light Cycler inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurden die Proben für eine weitere Minute auf 95 °C erhitzt. Die Folie wurde von der Platte vorsichtig entfernt und zu den 8 µl Probe/Standard wurden jeweils 17 µl eines PCR-Mastermix dazu pipettiert. Ein 1 x PCR-Mastermix setzt sich zusammen aus:

- 0,25 µl Verso 1-Step QRT-PCR Kit plus ROX von Thermo Scientific (Verso Reverse Transkriptase, RNase Inhibitor)
- 1 µl HDV2s (Ausgangskonzentration 10 pmol/µl)
- 1 µl HDV2as (Ausgangskonzentration 10 pmol/µl)
- 1 µl HDV-TaqMan Sonde (Ausgangskonzentration 5 pmol/µl)
- 1,25 µl RT Enhancer
- 12,5 µl 1-Step qPCR Mix

Die Platte wurde anschließend mit einer frischen lightcycler PCR Folie vorsichtig beklebt und wie schon beschrieben zentrifugiert. Die Light Cycler PCR wurde anschließend wie in der Tabelle ... beschrieben durchgeführt.

Tabelle 17: Programm der Light Cycler PCR zur Quantifizierung von HDV

	RT-Schritt	Aktivierung/Denaturierung	Amplifikation			Kühlen
Zyklen	1	1	40			1
Typ	regulär	regulär	Quantifikation			regulär
Temperatur (°C)	50	95	95	60	72	40
Inkubationszeit	15 min	15 min	15 s	30 s	15 s	30 s
Temperaturveränderung (°C/s)	4,4	4,4	4,4	2,2	4,4	2,2
Messung	keine	keine	keine	keine	einmalig	keine

4.5 Immunologische Nachweismethoden

4.5.1 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Methode der Immunfluoreszenz-Färbung wurde in dieser Arbeit für den Nachweis verschiedener Antigene verwendet. Die Durchführung kann jedoch bis auf die Verwendung der Primär- und Sekundärantikörpern vereinheitlicht beschrieben werden. Die Zellen wurden je nach Fragestellung zu bestimmten Zeitpunkten nach der Transfektion, Infektion, Induktion oder Isolation in 3,7 prozentigen, eiskalten Formaldehyd Lösung für 30 Min bei 4°C fixiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Plasmamembran für 30 Min in einer 0,2-prozentigen PBS / Triton X100 Lösung bei RT permeabilisiert, um intrazelluläre Antigene für Antikörper zugänglich zu machen. Wenn ausschließlich extrazellulär zugängliche Proteine der Zellen gefärbt wurden, wurden die Zellen nicht permeabilisiert. Durch eine folgende 45-minütige Inkubation der Zellen in DMEM versetzt mit 10 % FKS sollen unspezifische Protein-Protein Bindungen verhindert werden. Anschließend folgte eine Inkubation mit (einem) primären Antikörper(n) verdünnt in DMEM / 0,1 % BSA für 2 h bei 37 °C. Nach mehreren Waschschriften wurden die Zellen für 1 h mit Alexa488 oder Alexa 594 konjugierten Sekundärantikörpern verdünnt in DMEM / 0,1 % FKS inkubiert und wieder mehrfach gewaschen. Die Zellkerne wurden daraufhin durch eine 10 minütige Inkubation mit 10 µg/ml DAPI in DMEM / 0,1 % BSA angefärbt. Durch die Verwendung des Klebstoffes Mowiol wurden die Coverslips nach abschließenden vier Waschschriften mit der Zellseite auf Objektträger geklebt.

4.5.1.1 Nachweis der Expression von BATHBV Strukturproteinen in HepG2-Zellen

Für den Nachweis der Expression von Oberflächen- und Coreantigenen des HBV, TBHBV, HBHBV und RBHBV in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 wurden die Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden der 1.1 Überlängenkonstrukte transfiziert. Im Falle des HBHBV und RBHBV wurden die Zellen auch mit L, M und SHBHBSAg Expressionsplasmiden kotransfiziert, in denen das HBV HB1-Bindungsepitop integriert ist. Anschließend folgte eine Immunfluoreszenz Färbung (s. Kapitel 4.5.1).

Verwendeter Primärantikörper: HB1 (1:200)

Verwendeter Sekundärantikörper: Anti-Maus-IgG-Alexa594 (1:400)

4.5.1.2 Nachweis der Bindung von Myr-präS1-Peptiden an PTH

Um eine potenzielle Bindung der Myr-präS1-Peptide des HBV, WMHBV, TBHBV, HBHBV, RBHBV und WHV an PTH zu testen, wurden die PTH zu einem Zeitpunkt, zu dem die Zellen nachweislich suszeptibel für HBV sind (Tag 2 oder 3 nach der Isolation) mit unterschiedlichen Konzentrationen der C-terminal Strep-getagten Myr-präS1-Peptide für 30 Min bei 4 °C inkubiert. Um eine Endozytose der

gebundenen Peptide zu verhindern, wurden die Zellen vorher für 15 Minuten auf $< 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgekühlt. Nach der Peptidbindung wurden die Zellen vier Mal mit eiskalten DMEM gewaschen und anschließend wie Kapitel 4.5.1 beschrieben gefärbt.

Verwendeter Primärantikörper: Anti-Strep-Antikörper (1:200)

Verwendeter Sekundärantikörper: Anti-Maus-IgG-Alexa594 (1:400)

4.5.1.3 Nachweis der HDAg-Expression in infizierten PTH oder NTCP-HepG2 Zellen

Als HDV-Infektionsnachweis wurden infizierte PTH oder NTCP-HepG2-Zellen an Tag sechs nach der Virusinokulation, wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben, fixiert und anschließend gefärbt.

Verwendeter Primärantikörper: Anti-HDV-Antiserum (1:200)

Verwendeter Sekundärantikörper: Anti-Human-IgG Alexa594 (1:400)

4.5.1.4 Nachweis der NTCP-Expression in PHH oder in DOX induzierbaren NTCP-HepG2 Zellen

Um die Expression des NTCPs in PHH oder in der DOX induzierbaren NTCP-HepG2 Zelllinie nachzuweisen, wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Isolation aus der Leber oder nach der Inkubation der Zellen mit DOX fixiert und anschließend gefärbt (s. Kapitel 4.5.1).

Verwendeter Primärantikörper: Anti-NTCP-Antikörper (1:200)

Verwendeter Sekundärantikörper: Anti-Kaninchen-IgG Alexa488 (1:400)

4.5.2 Nachweis von HBsAg

Die Methode des Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde in dieser Arbeit für die Detektion und Quantifizierung von sekretiertem HBsAg aus PTH durchgeführt, um einen HBV-Infektionserfolg der Zellen nachzuweisen. Die Variante des hier verwendeten ELISA wird als indirekter Sandwich ELISA bezeichnet. Durch eine 24-stündige Inkubation der Vertiefungen einer 96-Well Mikrotiterplatte (Nunc, Maxisorp) mit 100 μl einer 1 $\mu\text{g/ml}$ Verdünnung des Anti-SHBs-Antikörpers C20/2, wurde die immobile Phase der Vertiefungen mit dem Antikörper beschichtet. Die Vertiefungen wurden anschließend je 2x mit 300 μl 0,1 % Tween in PBS und 300 μl PBS gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen (ELISA Washer Columbus Fa. Tecan). Danach wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine Inkubation der Vertiefungen mit 200 μl TNE / 10 % FKS für 2

h bei RT abgesättigt. Nach dem Waschen der Platte (s. o.) wurden 100 µl der potenziell HBsAg haltigen Zellkulturüberstände in die Vertiefungen der Platte pipettiert. Zur absoluten Quantifizierung des detektierten HBsAg in den Proben wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe eines gereinigten HBsAg-Standards mit bekannter Konzentration in 1 % Casein/PBS angesetzt und auf die Platte aufgetragen (10 ng/ml – 0,167 ng/ml). Die Inkubation der Proben und des Standards fand über Nacht statt. Nach einem erneuten Waschschrift (s. o.) wurden 100 µl einer 1:40 Verdünnung eines biotinylierten polyklonalen Anti-HBs-Antiserums in 0,1 % Casein / PBS (Konjugat 1, Enzygnost, HBsAg 6.0) in die Vertiefungen pipettiert. Nach einer Inkubationsphase von 1 h auf einem Plattenschüttler bei RT, wurden die Vertiefungen erneut gewaschen (s.o.). Daraufhin wurden die Vertiefungen mit einer 1:500 Verdünnung eines Peroxidase (POD) gekoppelten Streptavidins in 0,1 % Casein / PBS für 30 Min auf dem Plattenschüttler bei RT inkubiert. Als POD-Substrat wurden 2 OPD Tabletten (DAKO, Cytomation OPD) in 6 ml Wasser und 2,5 µl Perhydrol gelöst. Nach erneutem Waschen (s. o.) wurde 100 µl dieser Lösung in die Vertiefungen pipettiert und im Dunkeln inkubiert. Die Enzymreaktion wurde nach eigenem Ermessen durch die Zugabe von 50 µl einer 0,5 M Schwefelsäure abgestoppt. Der zur HBsAg-Menge proportionale Farbumschlag konnte dann durch die Messung der Extinktion im Photometer (LP 400, Diagnostic Pasteur) bei 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm bestimmt werden.

4.5.3 Nachweis von HBeAg

Für die Bestimmung der HBeAg-Konzentration in den Zellkulturüberständen von potenziell HBV-infizierten Hepatozyten wurde ein „*Microparticle Enzyme Immuno Assay*“ (MEIA, AxSYM HBe 2.0) der Firma Abbott verwendet. In einem vollautomatisierten System werden durch die Verwendung zweier monoklonaler Anti-HBeAg-Antikörper und einer Positivkontrolle aus aufgereinigtem rekombinanten HBeAg die HBeAg-Konzentration in den Proben als Signal über dem „cutoff“ (S/CO) bestimmt [184].

4.5.4 Western-Blot

Um zu untersuchen, ob die Hüllproteine von verschiedenen Hepadnaviren durch humane Hepatozyten (HuH7) sekretiert werden können, wurden Expressionsplasmide transfiziert, die für die HBV, TBHBV, HBHBV oder RBHBV L, M und S Oberflächenproteine codieren. Im Falle des HBHBV und RBHBV wurden die Zellen auch mit L-, M- und S-HBs Expressionsplasmiden transfiziert, in denen das Bindungsepitop des mAK HB1-anstelle der natürlichen Sequenz von AA 119 bis 124 des SHBs eingesetzt wurde. Die Zellkulturüberstände wurden drei Tage nach der Transfektion gesammelt und ein Aliquot mithilfe eines Molekularsiebes (GE Healthcare; Vivaspin, 10000 MWCO) durch Zentrifugation zehnfach aufkonzentriert. Die konzentrierten und nicht konzentrierten Überstände wurden mit dem NuPage LDS Sample Buffer (Invitrogen) und acht prozentigen (wt/vol) DTT für zehn Minuten bei 70 °C inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Anschließend wurden die Proben in

einem 12 prozentigen (vol/vol) Polyacrylamidgel (Invitrogen) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Übertragen der Proteine von dem Gel auf eine PVDF-Membran, wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch eine Inkubation mit 5 % Magermilchpulver in 1x PBS abgesättigt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit einer 1 µg/ml Lösung des monoklonalen Maus HB1-Antikörpers in 3 % Magermilchpulver/1x PBS inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit 0,05 % Tween/1x PBS, wurde die Membran mit einem Alkaline Phosphatase (AP) konjugierten Anti-Maus-Antikörper (Dianova) 1:10.000 verdünnt in 3 % Magermilchpulver/1x PBS für 1 h bei RT inkubiert. Nach wiederholten Waschschritten (s. o.) konnte durch eine 1-2 minütige Inkubation der Membran mit einem AP-Substrat (Immobilon Western chemiluminescence AP Substrate; Merck, Millipore) ein Chemilumineszenzsignal erzeugt werden, dass eine Schwärzung eines fotografischen Filmes erzeugte. Die Banden konnten anhand deren Position auf der Membran den verschiedenen orthohepadnaviralen Oberflächenproteinen zugeordnet werden.

4.5.5 Immunfluoreszenz-Assay (IFA) zum Nachweis spezifischer Antikörper im Serum von Fledermäusen

Für die Detektion von Antikörpern im Serum von Fledermäusen, die spezifisch gegen Antigene des HBHBV gerichtet sind, wurden HuH7-Zellen mit einem Expressionsplasmid transfiziert, das für ein 1.1 faches Genom des HBHBV codiert. Am Folgetag wurden die Zellen abtrypsiniert, vereinzelt und auf Coverslips ausgesät. Am Tag drei nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und geblockt, wie es in Kapitel 3.6 (Immunfluoreszenz Färbung) beschrieben ist. Daraufhin wurden verschiedene Seren aus HBHBV DNA-positiven oder -negativen Rhinolophus Fledermäusen 1:50 – 1:200 in DMEM / 0,1 % BSA verdünnt und für 2 h bei 37 °C auf die Zellen gegeben. Die weiteren Schritte des IFA entsprechen den Ausführungen des Kapitels ... Immunfluoreszenz Färbung. Zur Detektion von gebundenen Anti-HBHBV-Antikörpern wurde eine 1:200 Verdünnung eines Alexa594 konjugiertes Anti-Fledermaus-IgG-Sekundärantikörpers verwendet (Bethyl, Montgomery, AL, USA).

4.6 Myr-präS1-Peptid Bindungsassay

Die Bindungsfähigkeit von orthohepadnaviralen Myr-präS1-Peptiden an Hepatozyten wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand zweier unterschiedlicher Methoden quantifiziert. Die Myr-präS1-Peptide des WMHBV, TBHBV, HBHBV, RBHBV und WHV lagen am Institut für medizinische Virologie der JLU-Gießen ausschließlich mit einem C-terminalen Strep-Tag vor. Das entsprechende Peptid des HBV stand für diese Arbeit mit einem C-terminalen Strep-Tag oder mit einem C-Terminal konjugierten Fluorophor (Alexa-594) zur Verfügung. Um die Bindungsaffinitäten zwischen dem HBV Myr-präS1-Peptid und den Peptiden des WMHBV, WHV und BATHBV an PTH zu vergleichen, wurden ausschließlich Strep-markierte Varianten verwendet. Für die Detektion der membrangebundenen Peptide wurden die auf Glasplättchen ausgesäten PTH mit PFA fixiert, um diese später per

Methoden

Immunfluoreszenz nachzuweisen. Vorher wurden die PTH an Tag 3 nach deren Isolation auf $< 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen (5, 1, 0,5 und 0,1 μM) der verschiedenen eiskalten Lösungen der Myr-präS1-Peptide in DMEM für 45 Minuten inkubiert. Nachdem die Zellen viermal mit eiskaltem DMEM gewaschen waren, wurden sie mit einer eiskalten, 3,8 prozentigen Formaldehydlösung in H₂O für 30 Minuten inkubiert. Die Immunfärbung erfolgte am folgenden Tag wie in Kapitel 3.6 beschrieben.

Verwendeter Primärantikörper: Anti-Strep-Antikörper (1:200)

Verwendeter Sekundärantikörper: Anti-Maus-IgG Alexa594 (1:400)

Um die spezifische Bindung des HBV Myr-präS1-Peptids an den NTCP detailliert zu untersuchen, wurden die Alexa594 konjugierte Variante des Peptids sowie lebende Zellen, die in Kammerobjektträgern (Ibidi-Slides) für „lebendzell“ Mikroskopie kultiviert wurden, verwendet. Der Einfluss verschiedener NTCP Substrate und Inhibitoren auf die Myr-präS1-Peptid Bindung, wurde anhand der stabil transfizierten und induzierbaren NTCP-HepG2 Zelllinie untersucht. Die NTCP-Expression der Zellen wurde durch eine Inkubation mit 0,3 $\mu\text{g/ml}$ DOX in HGM induziert. Nach einer 24-stündigen Induktion wurden die Zellen für weitere 24 h mit 0,3 $\mu\text{g/ml}$ DOX sowie 2 % DMSO haltigen HGM inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne durch die Inkubation der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 22536 (20 Min, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ in DMEM) gefärbt. Nachdem der überschüssige Farbstoff durch mehrfaches Waschen mit DMEM entfernt wurde, folgte die Durchführung des Myr-präS1-Peptid Bindungsassay. Dafür wurden die Zellen auf $< 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ runtergekühlt und für 30 Min mit einer eiskalten 1 μM konzentrierten Lösung des Alexa594 konjugierten HBV Myr-präS1-Peptids in DMEM bei $< 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ kultiviert. Nach vier Waschschritten mit eiskaltem DMEM wurde das membrangebundene Peptid direkt konfokalmikroskopisch visualisiert. Für die Quantifizierung des gebundenen Peptids wurde die Leica LAS AF Software verwendet. Der Wert für die Quantifizierung (Summe aller Alexa594 Pixel pro Bildausschnitt) wurde anhand der Zellkernanzahl in dem gewählten Bildausschnitt normalisiert und konnte so als Myr-präS1-Peptid Bindung pro Zelle angegeben werden. Außerdem konnte mit dieser „livecell imaging“ Technik und unter der Verwendung von HepG2 Zellen, die ein emGFP gekoppelten NTCP transient überexprimierten, untersucht werden, ob das Peptid als Komplex mit seinem Rezeptor (NTCP) in der Plasmamembran kolokalisiert und aufgenommen wird. Dafür wurde 24 h nach der Transfektion des emGFP-NTCP codierenden Plasmids, die HepG2 Zellen in „Ibidi-Slides“ ausgesät und über Nacht im Zellkulturinkubator kultiviert. Der darauf folgende Myr-präS1-Peptid Bindungsassay wurde wie oben beschrieben durchgeführt und das Emissionslicht des Alexa594 Fluorophors sowie des emGFPs

konfokalmikroskopisch detektiert. Die Zellen hatten zu Beginn der Analyse eine Temperatur von unter 10 °C. Die Bindung des Myr-präS1-Peptids an membranständiges emGFP wurde für 15 Min bei RT analysiert, bevor durch die Aktivierung einer Wärmekammer die Umgebungsluft des Mikroskopen Objektisches innerhalb von 10 Min auf 37 °C erwärmt wurde. Über eine Inkubationsdauer von 60 Min bei 37 °C wurde dann das NTCP- und Peptidsignal pro Minute 12 mal detektiert. Die einzelnen Bilder wurden zu einem Film zusammengefasst. Repräsentative Bilder verschiedener Zeitpunkte dieser kinetischen Untersuchung sind in Abb. 22 exemplarisch dargestellt. Der Film mit dem Namen, „Bindung und Aufnahme des HBV Myr-präS1-Peptids in NTCP exprimierende HepG2 Zellen“, ist auf der angefügten CD hinterlegt.

4.7 Präparation von HBV aus Patientenserum

Für die Gewinnung infektiöser HBV-Partikel wurden verschiedene Serumproben eines HBeAg-positiven, hochtitrigen chronischen HBV-Trägers verwendet. Im Serum des Patienten wurden 120 µg/ml HBsAg und 8×10^9 Virusgenome/ml detektiert. Anhand der Genomsequenzen konnte bestimmt werden, dass es sich bei dem Virus um den Genotyp D mit dem Serotyp ayw2 des HBsAg handelt. Für die Aufreinigung der Viren wurden verschiedene Proben des Serums ID326 gemischt und 30 ml davon auf ein Saccharosekissen, bestehend aus 6 ml einer 15 prozentigen und 2 ml einer 10 prozentigen Saccharoselösung, geschichtet. Durch eine 18 h Ultrazentrifugation bei 25.000 rpm und 10 °C in einem SW 28.38 Schwingbecherrotor (Beckman) wurde ein Großteil der Serumproteine von den pelletierten subviralen und viralen Partikeln abgetrennt. Zur Auftrennung der Viruspartikel von den subviralen Partikeln wurde anschließend das Pellet in eiskaltem TNE resuspendiert und vorsichtig auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten geschichtet. Der Gradient wurde aus verschiedenen konzentrierten Saccharoselösungen wie folgt geschichtet: 2 ml 60 %, 4 ml 45 %, 4 ml 35 %, 5 ml 25 %, 5 ml 15 % und 5 ml 5 %. Durch eine Ultrazentrifugation für 15 hr bei 25.000 rpm und 10 °C in einem SW 28.38 Schwingbecherrotor (Beckman) florierten die verschiedenen Bestandteile abhängig von deren Dichte auf unterschiedlichen Höhen des Gradienten. Nach dem der komplette Gradient in 1 ml Aliquots fraktioniert war, wurde von jeder Fraktion die Saccharosedichte im Refraktometer sowie die Konzentration der HBV-Genomäquivalente mittels quantitativer real-time Light Cycler PCR bestimmt. Anhand einer Auftrennung der fraktionierten Proteine in einem Polyacrylamidgel, konnte durch eine Proteinfärbung mit einer Silbernitratlösung die Fraktionen bestimmt werden in denen sich die subviralen Partikel aufkonzentriert haben.

4.7.1 Quantitative PCR zum Nachweis von Hepatitis B Viruspartikeln

Vor der Quantifizierung mittels PCR wurde die virale DNA aus den fraktionierten Proben mit dem High-Pure-Viral-Nucleic-Acid-Kit von Roche nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Anschließend wurde unter der Verwendung von Primern und einer „TaqMan“-Sonde, die spezifisch einen hoch konservierten Bereich des HBV X-ORFs binden, die virale DNA mittels einer realtime Light Cycler PCR amplifiziert und quantifiziert.

Tabelle 18: Programm der Light Cycler PCR zur Quantifizierung von HBV

	Aktivierung/ Denaturierung	Amplifikation			Kühlen
Zyklen	1	45			1
Temperatur (°C)	95	95	64	72	40
Messung/Quantifizierung			einmalig		
Inkubationszeit	15 min	10 s	20 s	13 s	30 s
Temperaturveränderung (°C/s)	4,4	4,4	2,2	4,4	2,2

4.8 *In vitro* Infektionsexperimente

4.8.1 Infektionen mit HDV und HBV

Da ein HDV-Infektionsnachweis am besten mittels einer Immunfluoreszenz Färbung geschieht, wurden die Zellen auf Glasplättchen in 24-Well Platten ausgesät. Die Zellen für HBV-Infektionen wurden hingegen direkt auf dem Plastik der 24-Well Platten kultiviert. Für einen Infektionsansatz von PTH, PHH oder Transporter transfizierten HepG2 wurden ca. 3×10^5 Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit einem Inokulat inkubiert, das entweder 1×10^8 Genomäquivalenten HBV (333 GE/Zelle) oder 5×10^6 Genomäquivalenten HDV (17 GE/Zelle) beinhaltete. Um den Infektionserfolg in den Transporter transfizierten HepG2-Zellen zu erhöhen, wurden die Zellen 24 h vor der Infektion mit 2 % DMSO in HGM kultiviert. Außerdem wurde das Virusinokulat mit 4 % Polyethylenglykol versetzt. Wenn nicht anders angegeben, wurde die NTCP-Expression der stabilen NTCP-HepG2 Zelllinie durch die Inkubation mit 0,3 µg/ml DOX in HGM 48 hr vor der Infektion induziert. Für die Testung von potenziellen Inhibitoren einer HBV- oder HDV-Infektion (Myr-präS1-Peptide, Gallensalze, Ezetimibe) wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen dieser Substanzen für 30 Min präinkubiert. Nach der Zugabe des Virus wurden die Zellen dann für 16 hr zusammen mit den potenziellen Inhibitoren inokuliert. Nach der Inokulation wurden die Zellen mehrfach mit DMEM gewaschen und über 6 Tage (HDV-Infektion) oder 15 Tage (HBV-Infektion) kultiviert. Für die HBV-Infektionsexperimente wurde das Medium an Tag 1, 4, 7, 11 und 15 gewechselt und die Zellkulturüberstände gesammelt. Das Medium der potenziell HDV-infizierten Zellen wurde alle zwei Tage ausgetauscht und die Überstände verworfen. An Tag 6 nach der Infektion wurden die Zellen der

HDV-Infektionsexperimente für 45 Min mit einer 3,8 % Formaldehydlösung bei 4 °C fixiert und einmal mit PBS gewaschen. Eine HDV-Infektion wurde anschließend durch den Nachweis einer HDAg-Expression in den Zellen durch eine Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen (s. Kapitel 3.6). Mithilfe des in Kapitel 4.5.2 beschriebenen ELISA wurde in den gesammelten Zellkulturüberständen der HBV-Infektionsexperimente die Expression und Sekretion des HBsAg als Infektionsmarker nachgewiesen.

4.9 Nachweis der NTCP Transportaktivität

Zum Nachweis der Transportaktivität von Gallensalzen durch den NTCP, wurden PTH oder NTCP-transfizierte Hepatomzellen in Ibidi-Zellkulturkammern ausgesät. Zwei Tage nach der Transfektion oder dem Aussäen der PTH wurden die Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst 33342, wie in Kapitel 4.6 beschrieben, gefärbt. Nach mehrfachem Waschen mit DMEM wurden die Zellen für 20 Min bei 37 °C mit einer 0,3 µM Verdünnung eines Fluorophor gekoppelten Taurocholat (NBD-TC) in DMEM inkubiert. Die Zellen wurden gründlich gewaschen und anschließend zytoplasmatisch angereichertes NBD-TC konfokalmikroskopisch detektiert.

5. Ergebnisse

5.1 Funktionelle Charakterisierung neu entdeckter Orthohepadnaviren aus Fledermäusen

Als Kooperationspartner dieses Projekts hat die AG Drexler des Instituts für Virologie der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. Drosten) drei Orthohepadnaviren in den Seren und Organen von drei verschiedenen Fledermausspezies und Gattungen entdeckt, die entsprechend der Taxonomie der *Hepadnaviridae* nach deren Wirtstieren benannt wurden (s. Abbildung 1). Das *Tent making Bat* HBV (TBHBV) aus der Neuwelt-Fledermaus *Uruderma bilobatum*, sowie das *Horseshoe Bat* HBV (HBHBV) und das *Roundleaf Bat* HBV (RBHBV) aus den Altwelt Fledermäusen *Rhinolophus alcyone* und *Hipposideros cf. ruber*. Die gesamten Virusgenome wurden in Bonn amplifiziert und sequenziert (GenBank accession nos. KC790373–KC790381) [15]. Im Folgenden wurden in dieser Arbeit die vorliegenden Genome verwendet, um die unterschiedlichen Viren zu exprimieren und funktionell zu charakterisieren. Dafür wurde die Replikationsfähigkeit, Antigenität sowie Virulenz dieser Viren *in vitro* bestimmt. Von besonderer Bedeutung war, ob diese Viren ein zoonotisches Potenzial besitzen, d. h. die Fähigkeit, menschliche Zellen zu infizieren und sich zu vermehren.

5.1.1 Untersuchung der Replikationsfähigkeit von BATHBV-Arten in humaner Hepatomzellkultur

Um die Replikation der BATHBV-Arten zu untersuchen, wurden 1.1 fache Überlängengenome von TBHBV, RBHBV und HBHBV in ein Expressionsvektorsystem durch A. Geipel (Institut für Medizinische Virologie, JLU Gießen) kloniert. Diese Plasmide wurden anschließend in die humanen Hepatomzelllinien HepG2 und HuH7 transfiziert und die virale Replikationsfähigkeit mittels quantitativer *real time* PCR nachgewiesen. Dabei zeigten alle Expressionsplasmide eine Expression und Sekretion der entsprechenden Hepatitis-B-Viren nach Transfektion. Vergleichbar mit dem humanen HBV konnte der Schritt der viralen reversen Transkription bei der Replikation der Viren mit dem hochwirksamen Nucleosidanalogen (Entecavir) inhibiert werden [15].

5.1.1.1 Nachweis der Expression von BATHBV surface und core Proteinen und deren Antigenität gegen spezifische Antikörper des HBV

Um die Gen-Expression der einzelnen BATHBV-Klone genauer untersuchen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit alle am Institut für medizinische Virologie der JLU-Gießen zur Verfügung stehenden anti-HBV-Antikörper (s. Tabelle 8) auf Kreuzreaktivität mit den Antigenen der drei verschiedenen Fledermausviren TBHBV, HBHBV und RBHBV mittels Immunfluoreszenzfärbungen und Western-Blot untersucht. Mithilfe kreuzreaktiver Antikörper könnte die Expression und Sekretion von BATHBV Antigenen in humanen Hepatozyten nachgewiesen werden. Außerdem wäre dies evtl. die Grundlage, um einen Schnelltest zur Detektion von BATHBV in infizierten Fledermäusen, sowie in exponierten Affen und Menschen zu entwickeln.

Ergebnisse

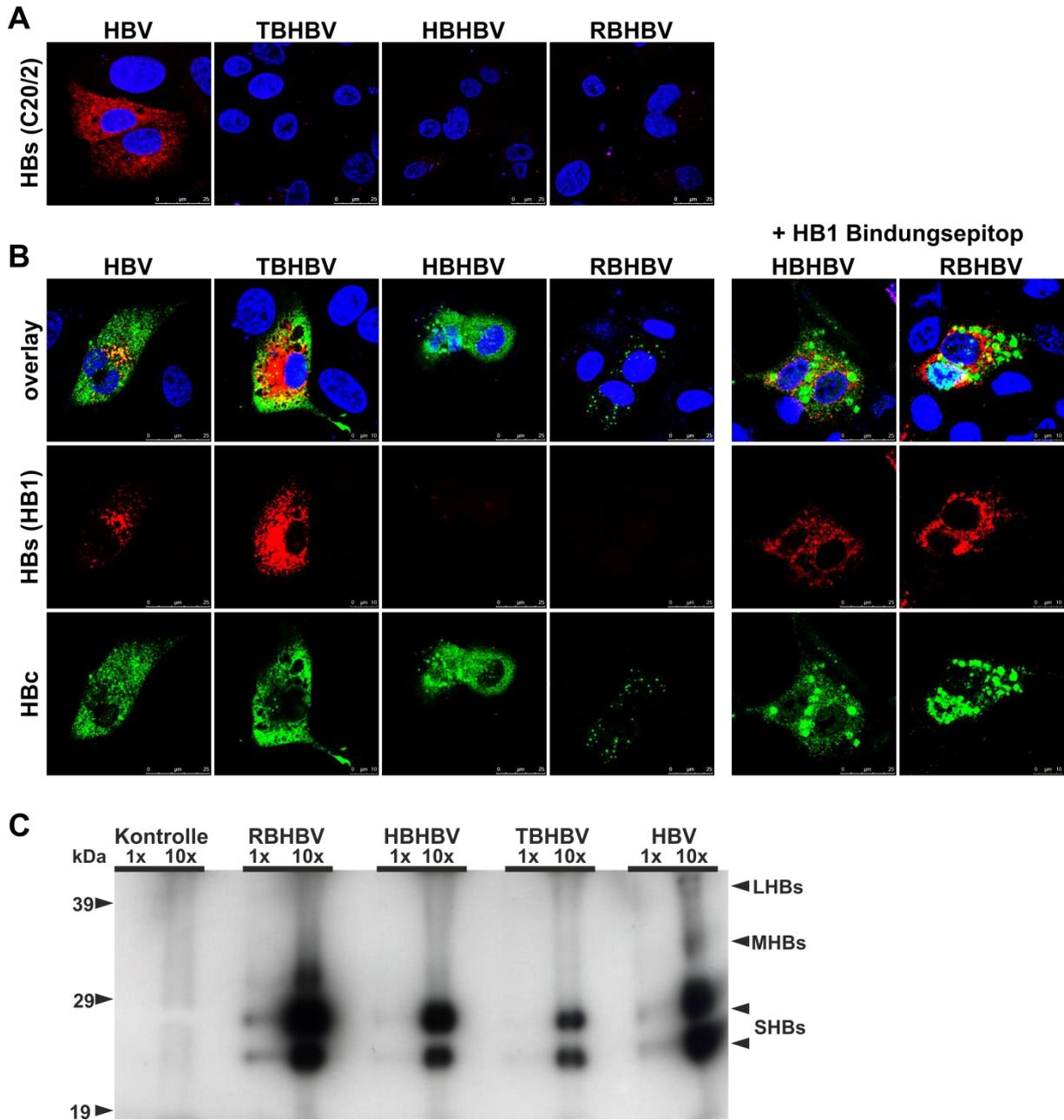


Abbildung 8: Antigene Eigenschaften von BATHBV. HepG2-Zellen wurden transient mit Expressionsplasmiden transfiziert die ein 1.1 faches Genom von HBV, TBHBV, HBHBV oder RBHBV codieren. Für die Erkennung der Oberflächenproteine von HBHBV und RBHBV wurden Expressionsplasmide der Oberflächenproteine von HBHBV und RBHBV, in die das Bindungssepitop (BE) für den monoklonalen anti-SHBs Antikörper HB1 inseriert wurde, zusammen mit den entsprechenden Überlängenkonstrukten cotransfiziert. Nach einem Tag wurden die transfizierten Zellen abtrypsinisiert, auf Deckgläschen ausgesät und 24h im Brutschrank inkubiert. Nach Inkubation der permeabilisierten Zellen mit den monoklonalen anti-SHBs-Antikörpern C20/2 **(A)** (rot), oder **(B)** HB1 (rot) und einem polyklonalen anti-HBc-Antikörper (Hepatitis B core Antigen / grün) wurde die Expression der viralen Oberflächenproteine und des Core-Proteins mit Fluoreszenz markierten sekundären Antikörpern sichtbar gemacht. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). **(C)** Zellkulturüberstände von HuH7-Zellen, transfiziert mit Expressionsplasmiden der Oberflächenproteine von HBHBV/BE, RBHBV/BE, TBHBV und HBV und einem Leervektor (Kontrolle) wurden mittels SDS-Gelelektrophorese in einem 12 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die viralen Oberflächenproteine mit dem monoklonalen anti-SHBs Antikörper HB1 und einem Konjugat aus alkalischer Phosphatase mit anti-Maus-IgG Antikörper durch Chemilumineszenz detektiert. kDa = Kilodalton, LHBs = großes hepadnavirales Oberflächenprotein, MHBs = mittleres hepadnavirales Oberflächenprotein, SHBs = kleines hepadnavirales Oberflächenprotein. 10x: zehnfach konzentrierte Überstände. 1x: einfach konzentrierte Überstände.

Die in Abbildung 8 gezeigten Ergebnisse zeigen, dass die humanen Hepatomzelllinien HepG2 und HuH7 die essenziellen orthohepadnaviralen Strukturproteine, Oberflächen- und Core-Protein exprimieren. Eine Kreuzreaktivität gegen ein polyklonales anti-HBc-Antiserum, das gegen humanes HBV-Core-Protein generiert wurde, konnte für alle drei BATHBV gezeigt werden. Eine Kreuzreaktivität mit Antikörpern gegen HBV-Oberflächenproteine wurde nur bei dem monoklonalen anti-SHBs-Antikörper (HB1) und nur für das Fledermaus TBHBV beobachtet. Eine Expression und Sekretion der HBHBV- und RBHBV-Oberflächenproteine konnte ausschließlich bei den Zellen detektiert werden, die zusätzlich rekombinante HBHBs- oder RBHBs-Proteine mit integrierter HB1-Bindungsstelle exprimierten. Die Sekretion der hepadnaviralen Oberflächenproteine nach Transfektion von HuH7-Zellen in das Zellkulturmedium wurde im Western Blot durch die Verwendung des SHBs-Antikörpers HB1 gezeigt (Abb. 8C). Dieser Antikörper reagiert mit einem sequenziellen Epitop der zentralen antigenen Determinante „a“ der S-Domäne, und kann daher sowohl das große (LHBs), mittlere (MHBs) und kleine (SHBs) Hüllprotein erkennen [59]. Auf der Höhe von ca. 24 und 27 kDa wiesen alle Proben klare Banden auf, die der kleineren, nicht-glykosylierten Variante und der größeren N-glykosylierten Variante des SHBs entsprechen. Die Banden sind viel stärker wenn die Zellkulturüberstände vor der Gelelektrophorese mittels eines Molekularsiebs um das zehnfache konzentriert wurden. Dann werden bei HBV die Bande des MHBs als GP33 und die Banden P39 und GP42 des LHBs schwach sichtbar. Bei den BATHBV zeigt nur RBHBV eine erkennbare GP33 Bande. Die Banden der größeren HBs-Proteine sind im Überstand der transfizierten Zellen nur schwach oder gar nicht erkennbar, da der Anteil des LHBs und MHBs in den vorherrschenden subviralen Partikeln gering ist.

5.1.2 Infektiosität / Virulenz von BATHBV

Nachdem im vorherigen Ergebnisteil dieser Arbeit die Expression der BATHBV in humanen Hepatomzelllinien gezeigt wurde, sollen in diesem Abschnitt die Serologie und die mögliche Infektiosität dieser Viren in HBV suszeptiblen Zellen bestimmt werden.

5.1.2.1 Serologische Untersuchung von RBHBV oder HBHBV DNA positiven und negativen Hipposideros oder Rhinolophus Fledermäusen

Durch die Detektion von hepadnaviraler DNA im Blut und in den Organen der untersuchten Fledermäuse können akute oder chronische Hepatitis-B-Infektionen nachgewiesen werden. Der Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen virale Proteine im Serum der Tiere ist nicht nur eine weitere Möglichkeit eine bestehende Infektion nachzuweisen, sondern dient auch zur Erkennung ausgeheilter Infektionen. Da nur von den zwei afrikanischen Fledermausarten ausreichende Serummengen für diese Untersuchungen verfügbar waren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein

Ergebnisse

Immunfluoreszenz-Assay (IFA) zum Nachweis von spezifischen anti-RBHBV- oder anti-HBHBV-Antikörpern im Serum der Tiere etabliert.

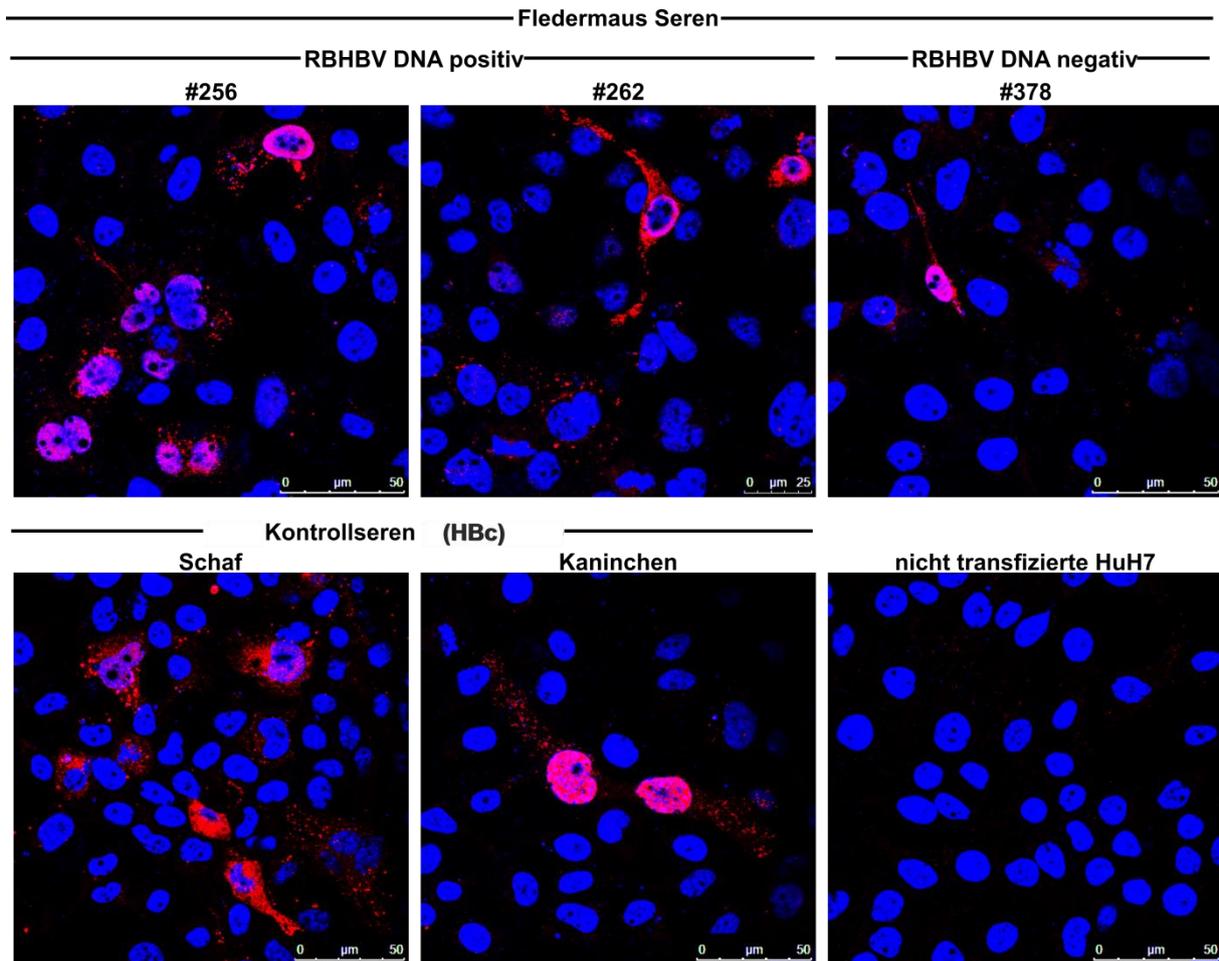


Abbildung 9: Nachweis spezifischer anti-RBHBV-Antikörpern im Serum von Fledermäusen. HuH7-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid transfiziert, das ein 1.1 Überlängengenom von RBHBV codiert. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einer 1:50 Verdünnung verschiedener Seren von *Hipposideros* sp. (obere Reihe, Serum #256, #262, #378) oder als Positivkontrolle mit einer 1:200 Verdünnung spezifischer anti-HBc-Antiseren aus Schaf oder Kaninchen (untere Reihe) inkubiert. Nach mehrfachem Waschen wurden spezifische Alexa 594-gekoppelte anti-Fledermaus, anti-Schaf oder anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper verwendet, um eine Erkennung von RBHBV Antigenen (rot) durch spezifische Antikörper im Serum der Tiere konfokalmikroskopisch sichtbar zu machen.

Die in Abbildung 9 dargestellten Fluoreszenzbilder zeigen, dass mit dem beschriebenen IFA eine Detektion von spezifischen Antikörpern gegen RBHBV-Antigene im Serum der getesteten *Hipposideros* Fledermäuse möglich ist. Dabei ist auffällig, dass sowohl Seren von RBHBV-DNA positiven als auch negativen Fledermäusen spezifische anti-RBHBV-Antikörper aufweisen können. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Virologie der Universität in Bonn wurden von der AG Drexler alle vorliegenden Seren von *Hipposideros* und *Rhinolophus* mit dieser Methode untersucht (s. Tabelle 19).

Ergebnisse

Tabelle 19: Serologische Eigenschaften von Orthohepadnavirus DNA positiven und negativen Fledermäusen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HuH7-Zellen am Institut für Medizinische Virologie, Gießen mit einem 1.1 Überlängengenom oder subgenomischen Konstrukt von RBHBV und HBHBV transfiziert. Die Zellen wurden fixiert, und am Institut für Virologie der Universität in Bonn mit Seren von HBHBV oder RBHBV DNA positiven oder negativen Tieren auf anti-RBHBV- oder anti-HBHBV-Antikörpern getestet (entsprechend Abbildung 9). Durch die Titration der Seren konnte ein relativer Wert für den Antikörper Titer (IFA Endpunkt-Titer) bestimmt werden. Die Überprüfung einer potenziellen Kreuzreaktivität der Antikörper aus Hipposideros-Seren für die Antigene des HBHBV und umgekehrt wurde so auch ermöglicht. [modifiziert nach Drexler, Geipel, König et al., 2013, Tabelle S5 [15]]

Serum Nr.	Hepadnavirale		IFA				
	DNA	GE/ml	IFA	Endpunkt-Titer	IFA Kreuzreaktivität	IFA anti-LHBs Reaktivität	IFA anti-LHBs Kreuzreaktivität
Hipposideros GB/09/ (Roundleaf Bat, RBHBV)					gegen HBHBV		gegen HBHBV
251	Negativ		Positiv	1:400	ja	nein	nein
281	Negativ		Positiv	1:800	ja	nein	nein
293	Negativ		Positiv	1:100	nein	nein	nein
341	Negativ		Positiv	1:200	nein	nein	nein
352	Negativ		Positiv	1:100	nein	nein	nein
359	Negativ		Positiv	1:400	ja	nein	nein
385	Negativ		Positiv	1:800	ja	ja	ja
256	Positiv	1,54x10 ⁵	Positiv	1:400	ja	nein	nein
262	Positiv	5,46x10 ⁵	Positiv	1:1600	ja	nein	nein
301	Positiv	8,24x10 ⁸	Negativ				
303	Positiv	6,45x10 ⁵	Negativ				
Rhinolophus GB/09/ (Horseshoe Bat, HBHBV)					gegen RBHBV		gegen RBHBV
403	Positiv	3,26x10 ³	Positiv	1:1600	ja	nein	nein

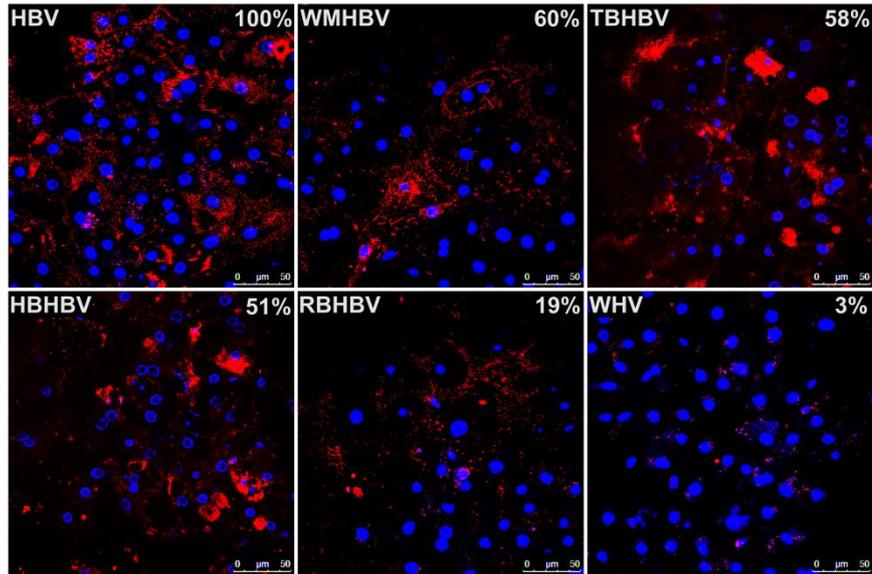
Anhand der in Tabelle 19 präsentierten Ergebnisse ist zu sehen, dass sowohl eine HBHBV DNA positive Rhinolophus (#403) Fledermaus als auch RBHBV DNA positive (#256, 262) und negative (#251, 281, 293, 341, 352, 359, 385) Hipposideros Fledermäuse spezifische Antikörper gegen die entsprechenden viralen Antigene aufzeigen. Außerdem konnten bei zwei RBHBV DNA positiven Tieren (#301, 303) keine Antikörper gegen Proteine des RBHBV detektiert werden. Um eine potenzielle Kreuzreaktivität der Antikörper zu erkennen, wurden die Seren der beiden verschiedenen Fledermausspezies zu transfizierten Zellkulturen mit Antigenen des HBHBV als auch RBHBV gegeben. Dabei wurde deutlich, dass Antikörper aus dem Serum von Hipposideros auch mit Antigenen des HBHBV und umgekehrt reagieren können. Nur für drei Hipposideros Seren konnte keine Kreuzreaktivität nachgewiesen werden. Weiterhin wurde auch getestet, ob die gefundenen Antikörper spezifisch gegen die Oberflächenproteine oder gegen das entsprechende virale Core-Protein gerichtet sind. Von den sieben Fledermäusen, die eine positive IFA-Kreuzreaktivität aufweisen, zeigte eine Hipposideros Fledermaus eine Reaktivität mit den Oberflächenproteinen des RBHBV und HBHBV.

5.1.2.2 Bestimmung der Bindungsaffinität verschiedener orthohepadnaviraler myristoylierter präS1-Peptide zu primären Hepatozyten aus *Tupaia belangeri*

Der für die spezifische Rezeptorbindung relevante Bereich von Primaten-Orthohepadnaviren ist innerhalb der N-terminalen 48 AS der präS1-Domäne des LHBs codiert (s. Abbildung 4 B). Für Bindungsexperimente können daher chemisch synthetisierte N-terminal myristoylierte präS1-Peptide (AS 2-48) der entsprechenden Hepadnaviren (Myr-präS1-Peptid) verwendet werden [72]. Um zu untersuchen, ob die Oberflächenproteine der Fledermausviren in der Lage sind, den initialen Schritt einer Virusinfektion, die spezifische Bindung an die Zielzelle zu vermitteln, wurden Bindungsversuche mit HBV-suszeptiblen PTH und Myr-präS1-Peptiden des HBV, WMHBV, TBHBV, HBHBV, RBHBV und als Negativkontrolle des WHV durchgeführt. Anhand eines C-terminalen „Strep-Tag“ der Myr-präS1-Peptide (AS-Sequenz: WSH PQFEK), konnte eine Bindung an die Zytoplasmamembran der PTH mittels einer Immunfluoreszenz Färbung sichtbar gemacht werden. Ein AS-Sequenzvergleich der hier verwendeten Myr-präS1-Peptide ist in Abbildung 25 der Diskussion (Kapitel 6.1.1.2) dargestellt.

Ergebnisse

A



B

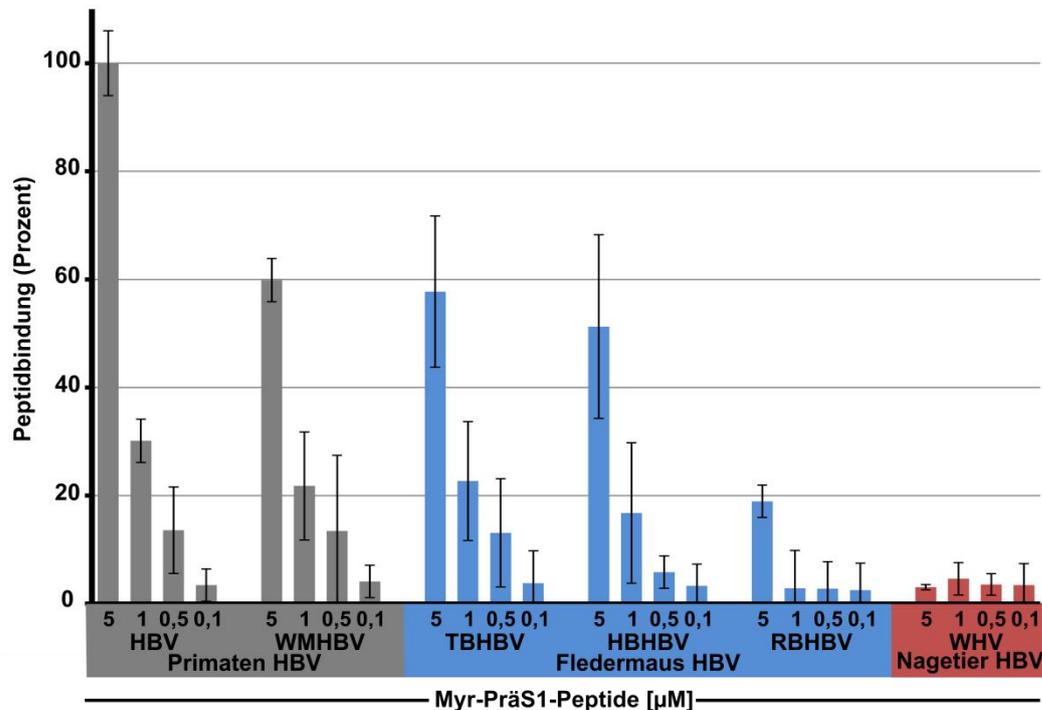


Abbildung 10: Bindungsaffinität von orthohepadnaviralen Myr-präS1-Peptiden an primäre *Tupaia*-Hepatozyten (PTH). Frisch isolierte PTH wurden nach 3 Tagen auf Deckgläschen für 15 Min. auf Eis vorgekühlt und anschließend mit unterschiedlich konzentrierten Lösungen von Myr-präS1-Peptiden der genannten viralen Spezies für 30 Min. auf Eis inkubiert. Nach mehrfachem Waschen wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (3,7 %) fixiert und mittels eines Streptavidin-Alexa594 Konjugats wurde die Bindung der Myr-präS1-Peptide an die Zellen im Konfokalmikroskop sichtbar gemacht. **(A)** Beispielbilder der Membran gebundenen Myr-präS1-Peptide (rot) bei Inkubation mit 5 µM. Die Zellkerne wurden mit Dapi gefärbt (blau). **(B)** Das zur Peptidbindung proportionale Alexa594 Fluoreszenzsignal wurde mittels der Konfokalmikroskop Software quantifiziert (Pixel Sum) und auf die Zellzahl des betreffenden Bildes normalisiert. Für die Bestimmung der Bindung relativ zur HBV-Kontrolle wurden die errechneten Werte der Pixel-Summen von 10 Bildern gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

Ergebnisse

Die in Abbildung 10 gezeigten Ergebnisse zeigen, dass die Myr-präS1-Peptide von Primaten- und auch Fledermaus-HBV konzentrationsabhängig an die Membran von HBV-suszeptiblen Hepatozyten binden. Dabei variiert die Bindungsaffinität deutlich. Die höchste Affinität zeigt das Myr-präS1-Peptid des HBV. Im Vergleich dazu weisen die Myr-präS1-Peptide des WMHBV, TBHBV und HBHBV eine 50-60 % Bindung auf und die Myr-präS1-Peptide des RBHBV und WHV eine um ca. 80 % bzw. 95 % verringerte Bindung. Das Myr-präS1-Peptid des Nagetier-HBVs (WHV) zeigte keine signifikante Bindung an die PTH-Zellkulturen.

5.1.2.3 Untersuchung des inhibitorischen Potenzials verschiedener orthohepadnaviraler Myr-präS1-Peptide auf die HBV-Infektion primärer Hepatozyten aus *Tupaia belangeri*

Inwieweit die im vorhergegangenen Ergebnisteil gezeigte Bindung der Myr-präS1-Peptide (s. Abbildung 10) eine HBV-Infektion der suszeptiblen Hepatozyten inhibieren kann, wurde anhand von *in vitro* Infektionsversuchen mit PTH und PHH und gereinigten HBV-Präparationen aus Patientenserum untersucht.

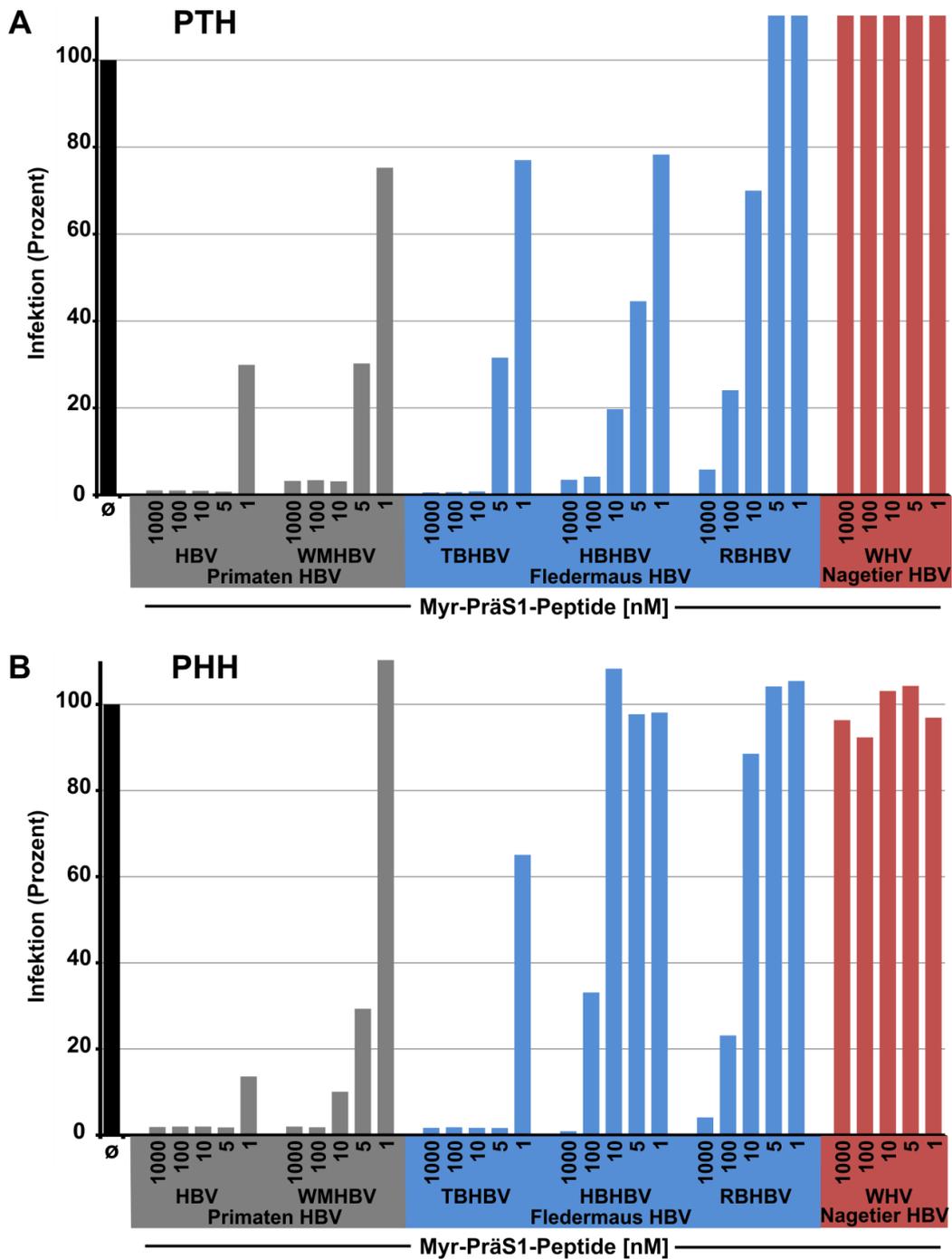


Abbildung 11: Inhibitorisches Potenzial orthohepadnaviraler Myr-präS1(2-48)-Peptide auf die HBV-Infektion von PTH und PHH *in vitro*. PTH wurden nach der Gewinnung aus Leber (A), PHH nach Bereitstellung (B) in 24-well Platten ausgesät und für 3 Tage kultiviert. Dann wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen Myr-präS1-Peptide für 30Min präinkubiert, bevor 50 GE/Zelle gereinigtes HBV dazugegeben wurden. Nach einer 16-stündigen Inkubation wurden die Zellen mehrfach gewaschen und für weitere 14 Tage kultiviert. An den Tagen 1, 4, 7,11 und 15 nach der Infektion wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und mittels ELISA auf neu sekretiertes HBsAg als Infektionsmarker analysiert. Die hier dargestellten relativen Werte entsprechen der HBsAg-Konzentration im Zellkulturüberstand an Tag 11 nach der Infektion. Die Werte sind normalisiert auf die Zahl funktionstüchtiger differenzierter Hepatozyten anhand der Menge des sekretierten Harnstoffs.

Ergebnisse

An Tag 11 nach der Infektion weisen die Zellkulturüberstände je nach dem verwendeten Myr-präS1-Peptid und der eingesetzten Konzentration unterschiedliche Mengen an HBsAg auf (s. Abbildung 11). Die Proben, die mit dem Myr-präS1-Peptid des WHV inkubiert wurden, zeigen in beiden Zellkulturen ausschließlich nicht signifikante Unterschiede in der HBsAg-Konzentration. Um das sehr unterschiedliche inhibitorische Potenzial der verschiedenen Peptide zu quantifizieren, wurde die inhibitorische Konzentration berechnet, bei der noch 50 % der HBsAg-Menge vorliegt im Vergleich zu infizierten Zellkulturen, die nicht mit präS1-Peptiden behandelt wurde (IC_{50}) (s. Tabelle 20).

Tabelle 20: IC_{50} -Werte verschiedener orthohepadnaviraler Myr-präS1-Peptide für die Inhibition einer HBV-Infektion von PTH und PHH. Anhand der in Abb.4 präsentierten Daten wurden IC_{50} -Werte der verschiedenen Myr-präS1-Peptide mittels linearer Regression berechnet. PTH: Primäre Tupaia Hepatozyten, PHH: Primäre Humane Hepatozyten.

Myr-PräS1-Peptide						
~ IC_{50} [nM]	Primaten HBV		Fledermaus HBV			Nagetier HBV
	HBV	WMHBV	TBHBV	HBHBV	RBHBV	WHV
PTH	≤1	2,4	2,4	3,2	48,8	≥1000
PHH	≤1	3,7	1,5	85,7	60,9	≥1000

Die HBV-Infektion von PTH und PHH lässt sich durch eine Inkubation mit Myr-präS1-Peptiden aus Primaten-HBV als auch Fledermaus-HBV konzentrationsabhängig inhibieren, nicht aber durch das Myr-präS1-Peptid des WHV (s. Abbildung 11). Die IC_{50} der verschiedenen Myr-präS1-Peptide variiert zwischen den Peptiden deutlich (s. Tabelle 20). Mit einem IC_{50} Wert von weniger als 1 nM ist das inhibitorische Potenzial für das Myr-präS1-Peptid des HBV in beiden Zellkulturen am höchsten. Die Myr-präS1-Peptide des WMHBV (Neuwelt-Affe) und des TBHBV (Neuwelt-Fledermaus) zeigen in beiden Zellkulturen einen IC_{50} Wert zwischen 1,5 bzw. 3,7 nM. Das Myr-präS1-Peptid des HBHBV zeigt als einziges Peptid deutliche Abweichungen der IC_{50} bei PTH (3,2 nM) im Vergleich zu PHH (85,7 nM), wobei das RBHBV Myr-präS1 Peptid wiederum in beiden Zellkulturen ähnliche IC_{50} Werte von 48,8 nM in PTH und 60,9 nM in PHH aufweist. Für das Myr-präS1 Peptid des WHV wird ein IC_{50} Wert von über 1000 nM angegeben, da es in den hier verwendeten Konzentrationen überhaupt keine inhibitorische Wirkung zeigte. Betrachtet man nur die inhibitorische Wirkung der BATHBV Myr-präS1-Peptide in PHH, fällt besonders auf, dass die Peptide der Viren aus Altwelt-Fledermäusen ein deutlich geringeres inhibitorisches Potenzial im Vergleich zu dem Peptid des Neuwelt-Fledermaus TBHBV aufweisen.

5.1.2.4 Produktion von HDV Pseudotypen mit Oberflächenproteinen verschiedener Orthohepadnaviren

In den vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass durch eine spezifische Bindung der Myr-präS1-Peptide von verschiedenen Hepadnaviren aus Primaten und Fledermäusen die HBV-Infektion von PTH und PHH unterschiedlich stark inhibiert wurde (s. Tabelle 20). Ob diese Interaktion der BATHBV-Oberflächenproteine mit essenziellen zellulären Faktoren einer HBV-Infektion auch bedeutet, dass BATHBV HBV-suszeptible Hepatozyten infizieren können, wurde in den folgenden Abschnitten untersucht. Aus Gründen der biologischen Sicherheit und der Vergleichbarkeit der Experimente wurde als Testsystem für diese Fragestellung pseudotypisierte HDV-Partikel verwendet, die experimentell mit den entsprechenden Oberflächenproteinen der BATHBV umhüllt wurden. Diese HDV-Partikel wurden durch eine Cotransfektion eines Expressionsplasmids, das für das Gesamtgenom des HDV codiert zusammen mit Plasmiden, die ausschließlich für die Oberflächenproteine von BATHBV codieren, in HuH7-Zellen hergestellt. Um eine erfolgreiche Replikation sowie Sekretion von HDV Pseudotypen mit den Oberflächenproteinen von HBV, TBHBV, HBHBV und RBHBV (HDV_{HBV} , HDV_{TBHBV} , HDV_{HBHBV} , HDV_{RBHBV}) nachzuweisen, wurden der Gehalt an HDV-Genomen in den Überständen der transfizierten HuH7-Zellen mittels RT-PCR gemessen und miteinander verglichen.

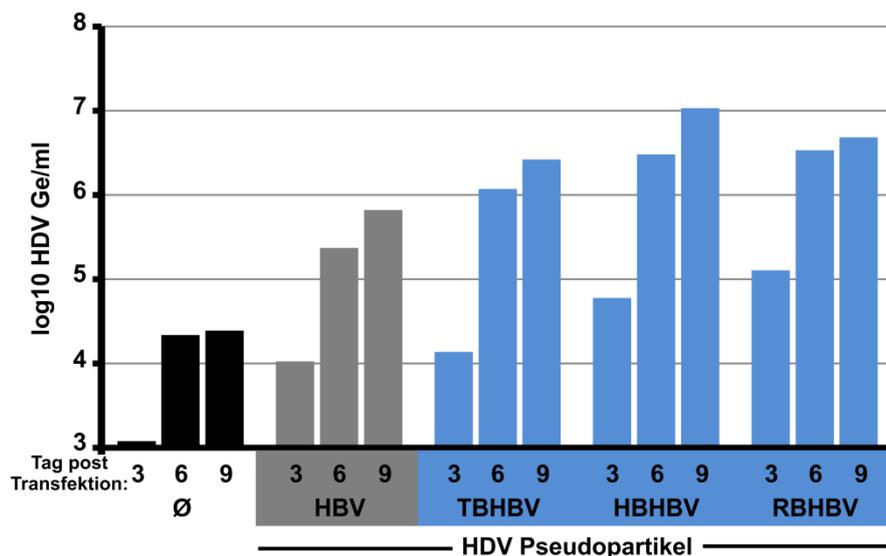


Abbildung 12: Sekretion von HDV, pseudotypisiert mit verschiedenen orthohepadnaviralen Oberflächenproteinen. HuH7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden cotransfiziert die für das Gesamtgenom des HDV bzw. für die Oberflächenproteine von HBV, TBHBV, HBHBV oder RBHBV codieren. Als Kontrolle wurde das HDV-Genom-Plasmid zusammen mit einem Plasmid transfiziert, das keine Expression der HBV-Oberflächenproteine ermöglicht. Die Zellkulturüberstände wurden bei Erreichen der Konfluenz an den Tagen 3, 6, 9 (nach Transfektion) gesammelt und die Zellen 1:2 gesplittet. Nach der Extraktion der RNA wurde die Anzahl der HDV Genomäquivalente pro ml im Zellkulturüberstand durch RT-PCR bestimmt.

Ergebnisse

Die in Abbildung 12 dargestellten Ergebnisse zeigt die Sekretion von HDV in den Zellkulturüberstand. Mit ca. 1×10^7 Ge/ml wurden für HBHBV pseudotypisiertes HDV die meisten Virusgenome im Überstand der Zellen gemessen, was für eine effiziente Umhüllung und Sekretion dieser Viren spricht. Am wenigsten Viren wurden sekretiert (ca. 8×10^5 Ge/ml), wenn sie mit den Oberflächenproteinen des HBV umhüllt wurden. Viren, die mit den Oberflächenproteinen von RBHBV und TBHBV umhüllt waren, zeigten mit ca. 5×10^6 Ge/ml im Zellkulturüberstand eine mittlere Sekretionsrate. Auch ohne die Koexpression der hepadnaviralen Oberflächenproteine sind HDV-Genome im Überstand nachweisbar. Jedoch ist deren Konzentration um mehr als zwei Logstufen niedriger, was auf eine Lyse einer geringen Anzahl an transfizierten Zellen zurückzuführen sein könnte.

5.1.2.5 Infektion HBV-suszeptibler Hepatozyten mit HDV, pseudotypisiert mit verschiedenen orthohepadnaviralen Oberflächenproteinen

Die gemäß Kapitel 5.1.2.4 hergestellten HDV-Pseudopartikel aus HuH7 Zellkulturüberständen wurden verwendet, um die Fähigkeit der orthohepadnaviralen Oberflächenproteine zu überprüfen, eine HDV-Infektion in HBV-suszeptiblen Hepatozyten zu ermöglichen. Der Gallensäure-Transporter „Natrium-Taurocholat cotransportierendes Polyprotein“ (NTCP) wurde kürzlich als funktioneller HBV-Rezeptor identifiziert [76]. Um vorab die Präsenz und Funktionalität des NTCP in den hier verwendeten Zellkulturen zu testen, wurde dessen Transporter-Funktion mit einem Fluorophor-markiertem NTCP-spezifischen Substrat (NBD-Taurocholat) untersucht. Die Transport- sowie Infektionsversuche wurden mit PTH sowie mit HepG2-Zellen durchgeführt, die mit einem Expressionsvektor für das hNTCP transfiziert waren.

Ergebnisse

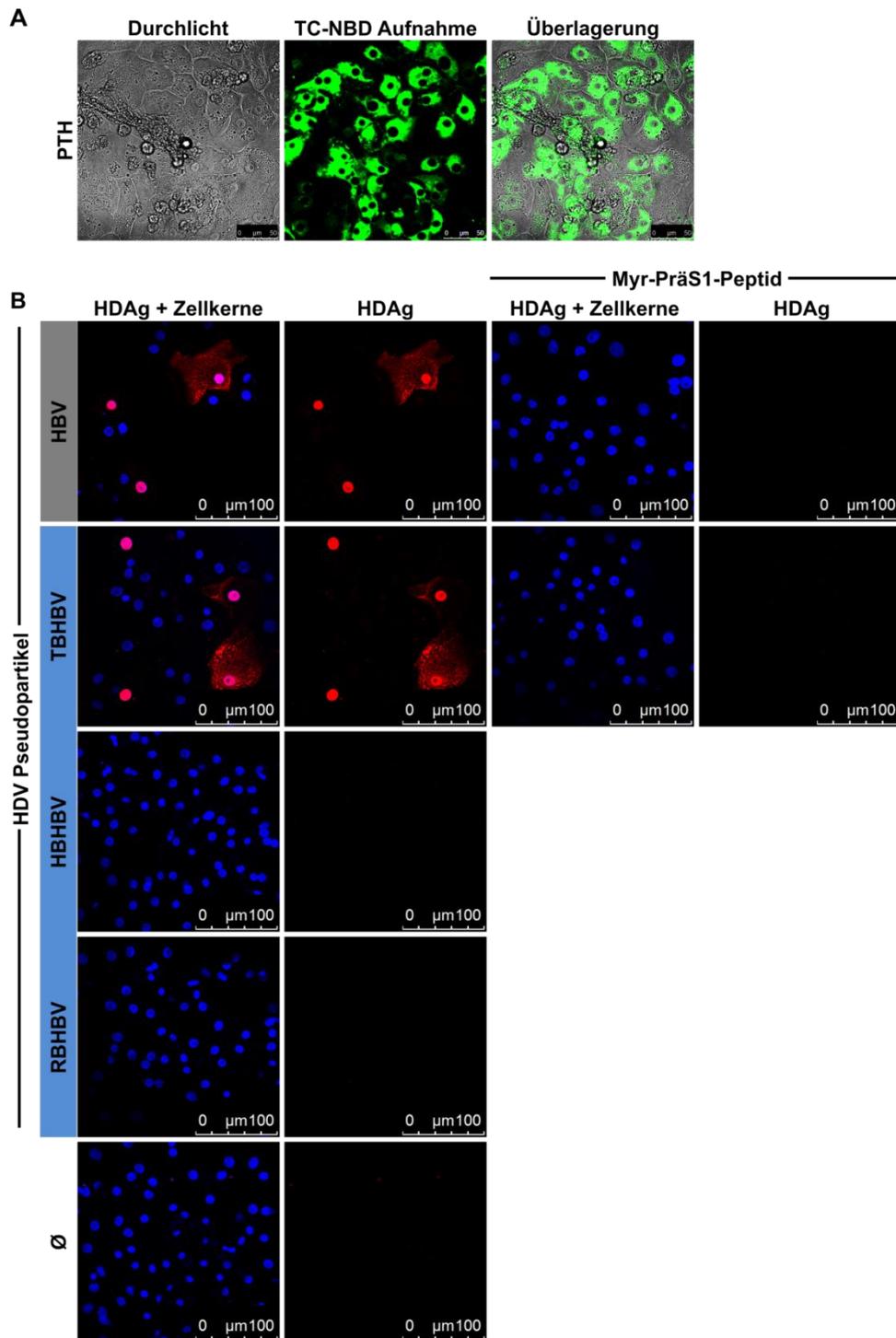


Abbildung 13: NBD-Taurocholat Transport und HDV-Suszeptibilität von primären Tupaia Hepatozyten. PTH wurden nach der Isolation aus der Leber für 48h in (A) Ibidi-slides oder (B) 24-Wellplatten auf Glasplättchen kultiviert. PTH in Ibidi-Slides wurden mit einer 0,3µg/ml Lösung eines Fluorophor markierten NTCP Substrats (NBD-TC) für 10 Min inkubiert, mehrfach gewaschen und mittels „livecell-imaging“ intrazelluläres NBD-TC (grün) detektiert. PTH in 24-Wellplatten wurden mit 1×10^6 Genomäquivalenten von HDV_{HBV}, HDV_{TBHBV}, HDV_{HBHBV}, HDV_{RBHBV} für 16h inkubiert. Kontrolle: HDV ohne HBV-Oberflächenproteine (HDV_∅). Nach einer fünftägigen Kultivierung im Zellkulturinkubator wurden die Zellen mit 3% PFA fixiert, permeabilisiert und mittels eines humanen anti-HDAg-Antiserums und einem Alexa594 markierten anti-human IgG-Sekundärantikörpers gefärbt. Als Marker für eine Infektion wurde neu synthetisiertes HDAg in den Zellen konfokalmikroskopisch detektiert. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Ansätze, die spezifisch infiziert werden konnten, wurden zur Kontrolle auch mit den entsprechenden inhibitorischen Myr-präS1-Peptiden präinkubiert.

Ergebnisse

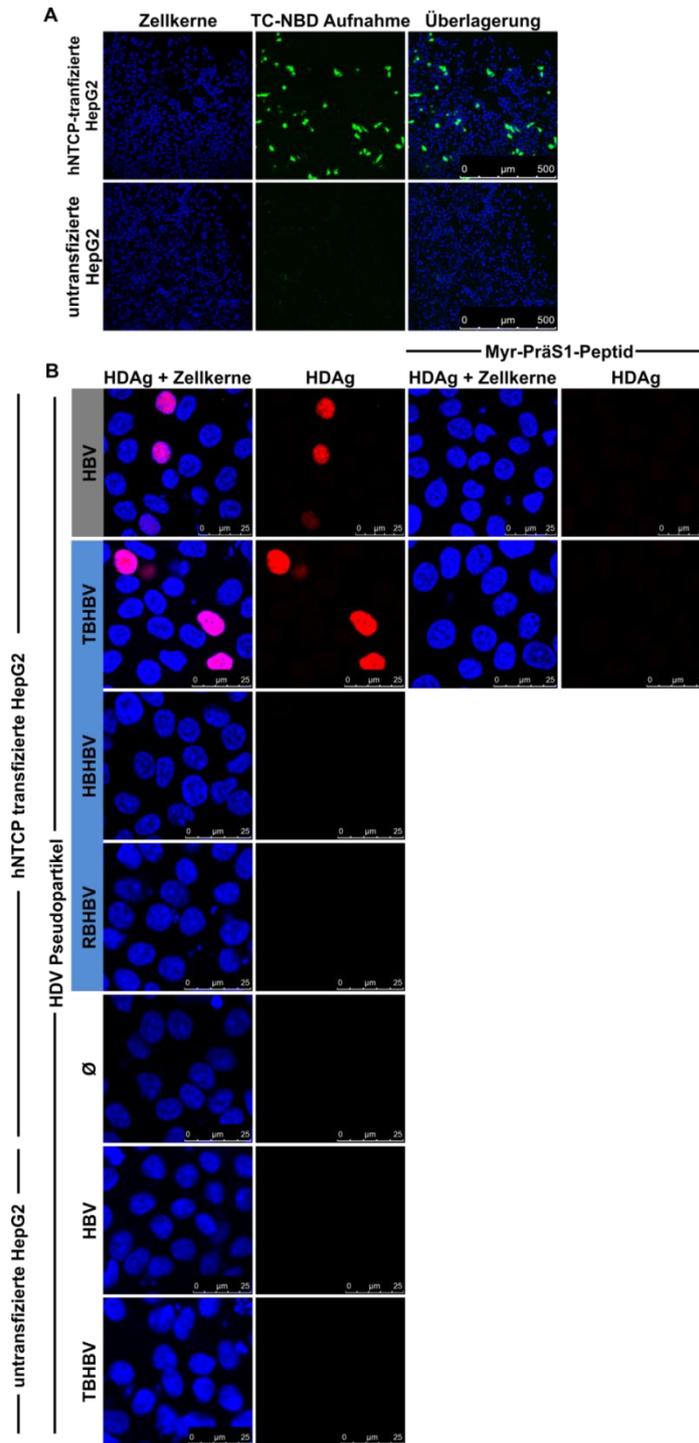


Abbildung 14: NBD-Taurocholat Transport und HDV-Suszeptibilität von hNTCP-transfizierten HepG2 Zellen. HepG2-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid für humanes NTCP transfiziert. (A) Nach 48h Kultivierung in Ibidi-slides wurden die Zellen mit 0,3μg/ml des Fluorophor-markierten NTCP Substrats NBD-TC 10 Min inkubiert, mehrfach gewaschen und mittels live cell-imaging intrazelluläres NBD-TC (grün) detektiert. (B) Zellen desselben Transfektionsansatzes wurden auf Glasplättchen 48h kultiviert, bevor sie mit 1×10^6 Genomäquivalenten HDV_{HBV}, HDV_{TBHBV}, HDV_{HBHBV}, HDV_{RBHBV} oder als Kontrolle mit nicht umhüllten HDV_∅ für 16h inkubiert wurden. Als weitere Kontrollen wurden nicht transfizierte HepG2-Zellen mit HDV_{HBV} oder HDV_{TBHBV} inkubiert. Nach 5 Tagen wurden die Zellen mit 3% PFA fixiert, permeabilisiert und mittels eines humanen anti-HDAg-Antiserums und eines Alexa594 markierten anti-human IgG-Sekundärantikörpers gefärbt. Als Marker für eine Infektion wurde HDAg in den Zellen konfokalmikroskopisch detektiert. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Ansätze, die spezifisch infiziert werden konnten, wurden zur Kontrolle auch mit den entsprechenden inhibitorischen Myr-präS1-Peptiden präinkubiert.

Ergebnisse

Die in Abbildung 13 und Abbildung 14 präsentierten Ergebnisse zeigen, dass PTH sowie hNTCP-exprimierende HepG2-Zellen mit HDV_{HBV} und HDV_{TBHBV} jedoch nicht mit HDV_{HBHBV} oder HDV_{RBHBV} infiziert werden können. Die Infektion konnte in beiden Fällen durch eine Inkubation der Zellen mit den Myr-präS1-Peptiden der entsprechenden Viren komplett inhibiert werden. Die Verwendung von nicht NTCP-exprimierenden HepG2-Zellen oder nicht umhüllten HDV-Partikeln führte nicht zu einer Infektion. Die Detektion des NTCP Substrates, NBD-TC, im Zytoplasma der Zellen zeigt, dass diese Zellen den NTCP funktionell exprimieren.

5.2 Wechselwirkungen der Funktionen des NTCPs als Rezeptor für HBV und als Gallensalztransporter

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Funktion des NTCPs als HBV-Rezeptor sowie als Gallensalztransporter untersucht um zu zeigen, inwieweit sich diese beiden funktionellen Eigenschaften des NTCPs gegenseitig beeinflussen können.

5.2.1 Korrelation der TC-Transportaktivität und der HBV-Suszeptibilität mit der Expression des hNTCP

Um eine Korrelation zwischen der Expression des NTCP mit einer TC-Transportaktivität und der HBV-Suszeptibilität nachzuweisen, wurden kinetische Analysen mit PHH, PTH und einer NTCP-HepG2 Zelllinie gemacht (s. Kapitel 3.1.1).

5.2.1.1 Kinetik der NTCP-Expression in primären Hepatozyten und der NTCP-HepG2 Zelllinie

Um die NTCP-Expression in primären humanen Hepatozyten (PHH) nachzuweisen, wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Isolation fixiert und die NTCP-Proteinexpression mittels Immunfluoreszenz detektiert.

Ergebnisse

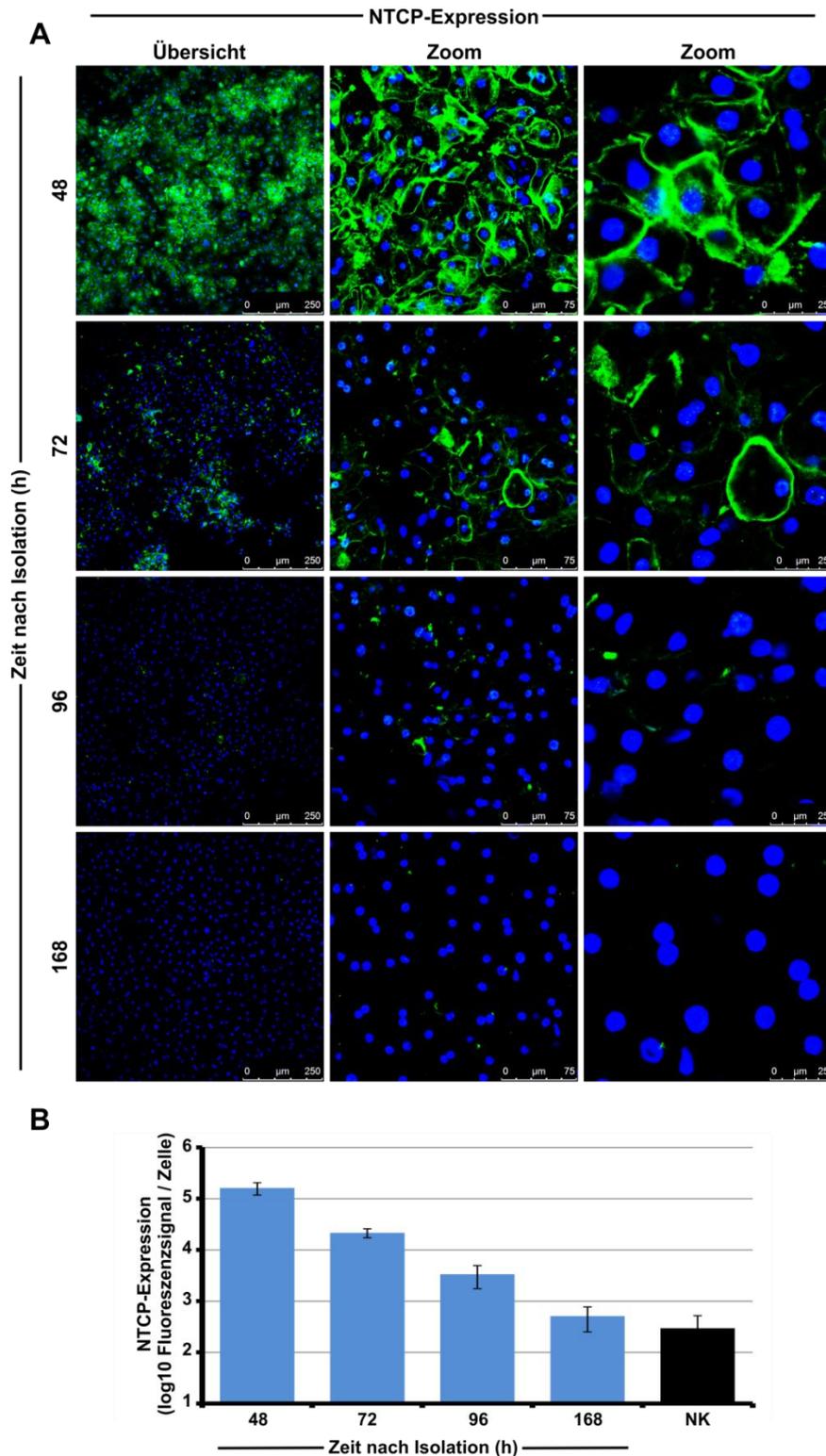


Abbildung 15: Expression von NTCP in primären humanen Hepatozyten (PHH) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zellisolation aus der Leber. Die Zellen wurden 48, 72, 96 und 168 h nach der Isolation in 3 % PFA fixiert und mit einem polyklonalen Anti-NTCP-Antiserum (Kaninchen) und einem Alexa488 (grün) markierten Anti-Kaninchen-Antikörpers gefärbt. (A) NTCP in den Zellen (grün) zeigt eine Färbung nahe der Plasmamembran. Die Zellkerne sind blau dargestellt. Bilder mit unterschiedlichen Vergrößerungen sind abgebildet (Übersicht, Zoom). (B) Aus fünf Übersichtsbildern wurde das zum NTCP proportionale Alexa488 Signal als Pixelsumme quantifiziert und für jeden Zeitpunkt der Messungen ein Mittelwert mit Standardabweichung gebildet. Der Mittelwert der Pixelsumme wurde mit dem mittleren Wert der Zellzahl als Fluoreszenzsignal/Zelle normalisiert.

Ergebnisse

Anhand der Ergebnisse in Abbildung 15 wird deutlich, dass die Expression des NTCPs von Tag 2 bis Tag 7 nach der Isolation aus der Leber stark abnimmt. Ab Tag 7 wird kein NTCP mehr gefunden.

Um mit einem besser verfügbaren und vergleichbareren *in vitro* Zellkultursystem arbeiten zu können, wurde im Rahmen dieses Projekts am Institut für medizinische Virologie der JLU-Gießen von A. Geipel eine HepG2-Zelllinie hergestellt, die stabil mit dem NTCP transfiziert ist. Damit die Expression des NTCPs dieser NTCP-HepG2 Zelllinie möglichst gut an die physiologischen Bedingungen primärer Hepatozyten angepasst werden kann, wurde für die Herstellung der Zelllinie ein induzierbarer Expressionsvektor verwendet. Der Promotor des verwendeten Expressionsvektors ist mit Doxycyclin induzierbar. Die Stärke der NTCP-Genexpression sollte daher durch die Doxycyclinkonzentration regulierbar sein. Um dies zu testen, wurden NTCP-HepG2 Zellen auf Deckgläschen ausgesät und unterschiedlich lange mit verschiedenen Konzentrationen Doxycyclin kultiviert, bevor die Zellen fixiert wurden und eine IF-Färbung der NTCP-Proteinexpression erfolgte.

Ergebnisse

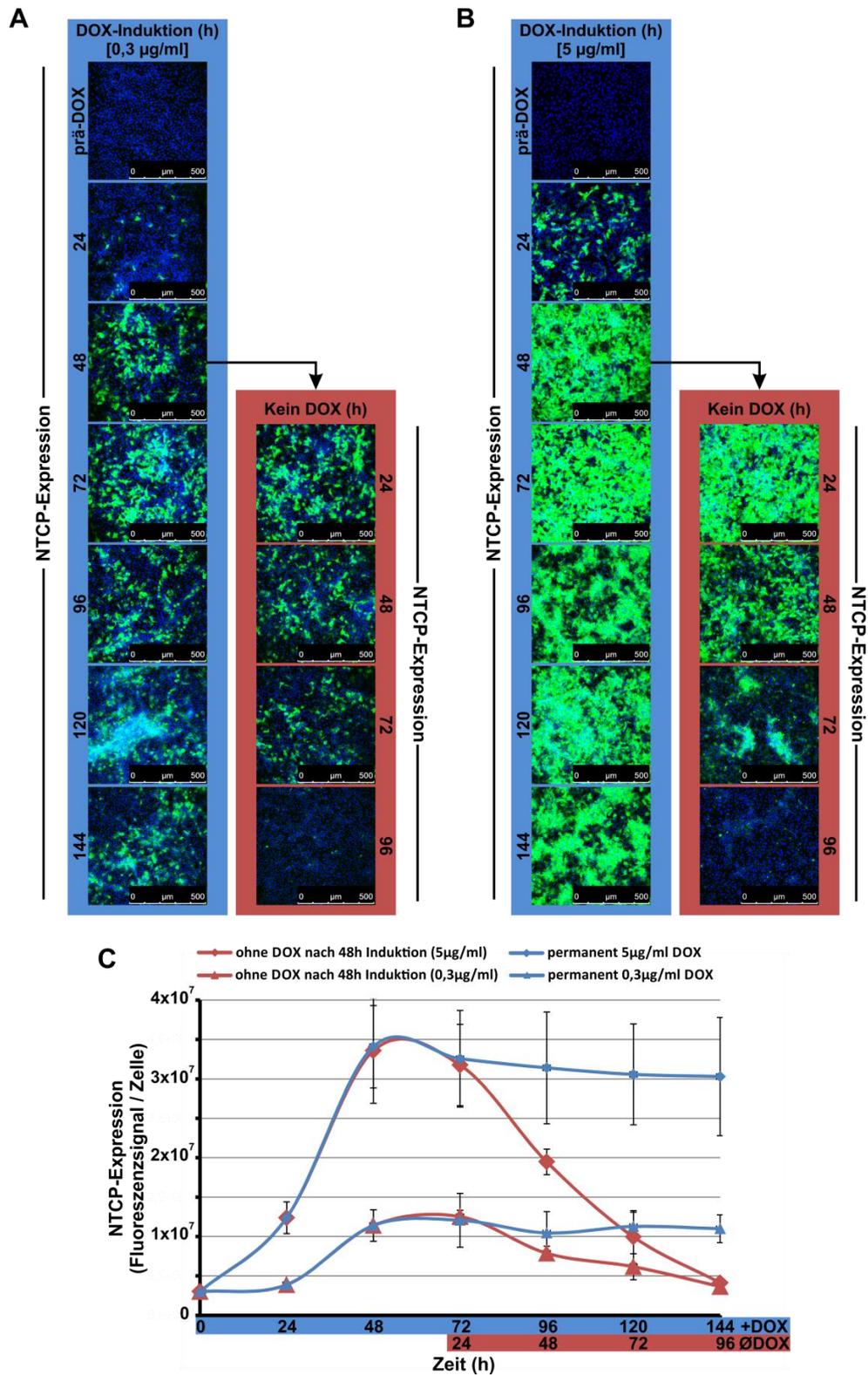


Abbildung 16: Expression von NTCP in transfizierten HepG2 Zellen nach Doxycyclin Induktion. NTCP-HepG2 Zellen auf Deckgläschen ausgesät und mit 0,3 µg/ml oder 5 µg/ml Doxycyclin (DOX) inkubiert. Nach 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 h DOX-Induktion wurden die Zellen fixiert. Parallel dazu wurden NTCP-HepG2 Zellen nach einer 48 h DOX-Induktion ohne DOX weiter inkubiert und nach 24, 48, 72 oder 96 h fixiert. Die Expression des NTCPs mit FLAG-tag wurde mit einem Maus Anti-FLAG-Antikörper sowie einem Alexa488 (grün) markierten Anti-Maus-Sekundärantikörper gefärbt und konfokalmikroskopisch detektiert. Das Fluoreszenzsignal wurde für fünf Übersichtsbilder von jedem Versuchsansatz und Zeitpunkt mittels der Leica SP5 Software quantifiziert und das Fluoreszenzsignal anhand der Nukleuszahl der entsprechenden Bilder normalisiert.

Abbildung 16 zeigt, dass NTCP in der NTCP-HepG2 Zelllinie erst durch Inkubation mit Doxycyclin nachweisbar ist. Die Menge an NTCP in den Zellen steigt bei einer niedrigen DOX-Konzentration von 0,3 µg/ml als auch bei einer hohen Konzentration von 5 µg/ml innerhalb von 48 h auf ein jeweiliges Maximum an, bevor es zu einer mindestens 96 h währenden Plateau-Phase kommt. Eine Inkubation mit 5 µg/ml DOX führt zu einer ca. zehnfach stärkeren Expression des NTCPs, als in Zellen die nur mit 0,3 µg/ml DOX kultiviert wurden. Wenn man nach einer 48-stündigen Induktion die Zellen ohne DOX weiter inkubiert, kommt es in beiden Fällen innerhalb von 96 h zu einem nahezu kompletten Verschwinden des NTCP-Signals in den Zellen.

5.2.1.2 Kinetische Analyse der Myr-präS1-Peptid Bindung an die NTCP-HepG2 Zelllinie in Abhängigkeit von der NTCP-Expression

Im Abschnitt 5.2.1.1 konnte gezeigt werden, dass die Expression des NTCP in der NTCP-HepG2 Zelllinie durch eine Inkubation mit Doxycyclin-haltigem Medium konzentrationsabhängig reguliert werden kann. Parallel dazu wurde nun getestet, inwieweit sich die Suszeptibilität der Zelllinie für HBV in Abhängigkeit zur NTCP-Expression verändert. Dazu wurden Bindungsaffinitätsexperimente mit HBV Myr-präS1-Peptiden durchgeführt.

Ergebnisse

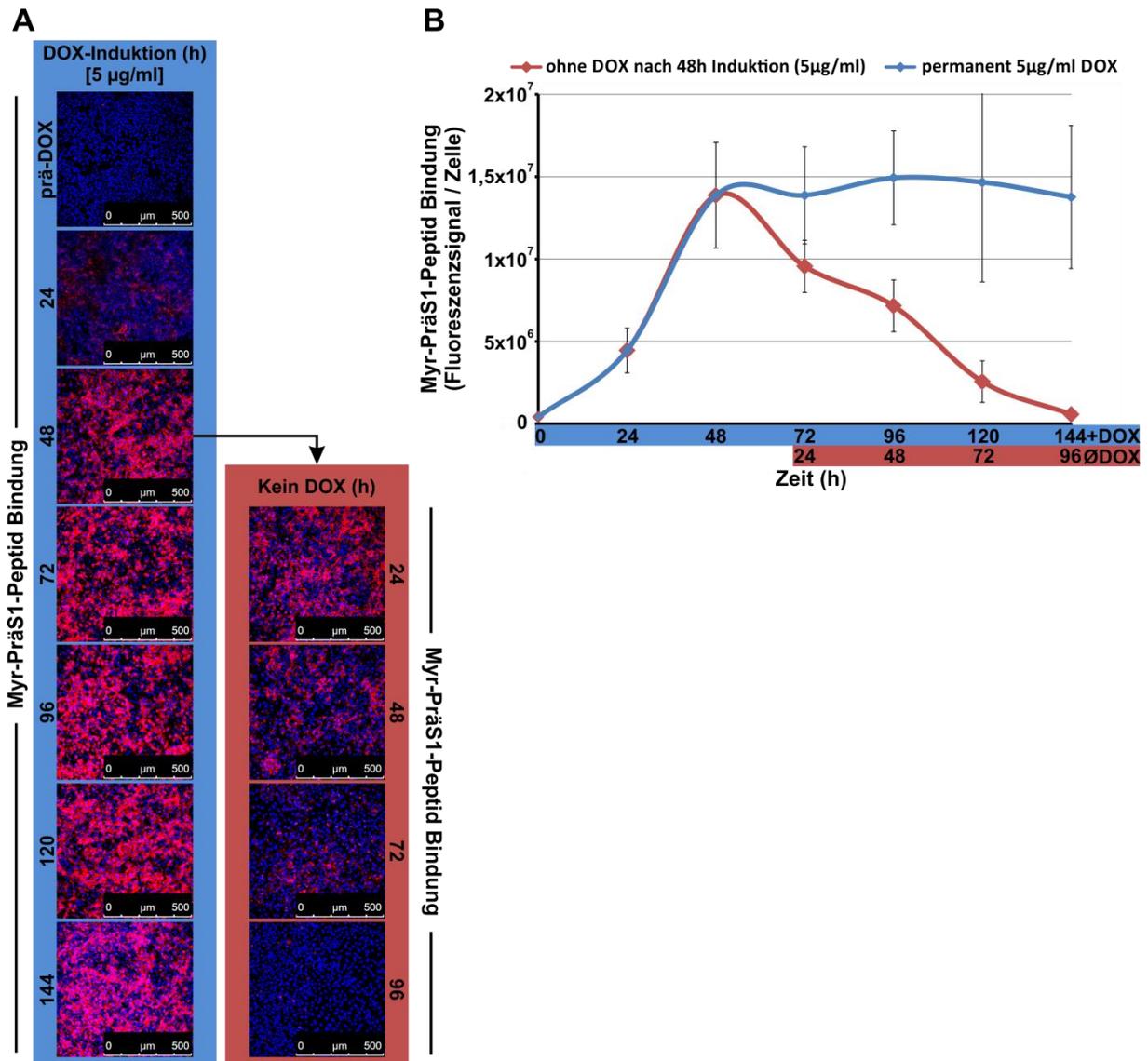


Abbildung 17: HBV Myr-PräS1-Peptid Bindung an NTCP-HepG2 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Doxycyclin Induktion. NTCP-HepG2 Zellen wurden auf IBIDI-Slides ausgesät und mit 5 µg/ml Doxycyclin (DOX) für 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 h inkubiert. Parallel dazu wurden NTCP-HepG2 Zellen nach einer 48 stündigen DOX-Induktion für 24, 48, 72 oder 96h ohne DOX weiter inkubiert. Die Zellen wurden auf 8 °C gekühlt und mit einer eiskalten 1 µM eines AX594 gekoppelten Myr-PräS1-Peptids 30 Min inkubiert. **A.** Nach mehrfachem Waschen wurde das Membran gebundene PräS1-Peptid konfokalmikroskopisch nachgewiesen. **B.** Das Fluoreszenzsignal wurde für 5 Übersichtsbilder von jedem Versuchsansatz mittels der Leica SP5-Software quantifiziert und das Fluoreszenzsignal anhand der Nukleuszahl der entsprechenden Bilder normalisiert.

Die in Abbildung 17 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das Myr-präS1-Peptid erst nach einer Inkubation der NTCP-HepG2 Zelllinie mit Doxycyclin von den Zellen gebunden werden kann. Die Menge an Membran-gebundenem Peptid nimmt innerhalb der ersten 48 h der Induktion zu und bleibt auf ähnlich hohem Niveau für mindestens weitere 96 h. Nach der Wegnahme des Doxycyclins nach 48-stündiger Induktion kann innerhalb von 96 h ein nahezu kompletter Verlust der Bindungsfähigkeit für das Myr-präS1-Peptid festgestellt werden. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Ergebnissen aus Abbildung 16, sieht man, dass die Kinetik der Myr-präS1-Peptid Bindung exakt der Kinetik der NTCP-Expression entspricht.

5.2.1.3 Kinetische Analyse der HBV-Infektion von stabil transfizierten NTCP-HepG2 Zellen in Abhängigkeit von der NTCP-Expression

Ob die in Abschnitt 5.2.1.2 gezeigte spezifische Bindung des AX594-markierten HBV Myr-präS1-Peptids auch bedeutet, dass diese Zelllinie in Abhängigkeit zur NTCP-Expression suszeptibel für eine HBV-Infektion ist, wurde in diesem Abschnitt untersucht. Dafür wurden parallel zum Versuchsablauf von Abbildung 16 und Abbildung 17 die Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten mit HBV infiziert und in den Zellkulturüberständen jeweils an Tag 10 nach der Infektion neu produziertes und sekretiertes HBeAg als Infektionsmarker nachgewiesen. Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchsansätze wurden hier prozentuale Werte der erfolgreichen HBV-Infektion (HBeAg-Expression) dargestellt.

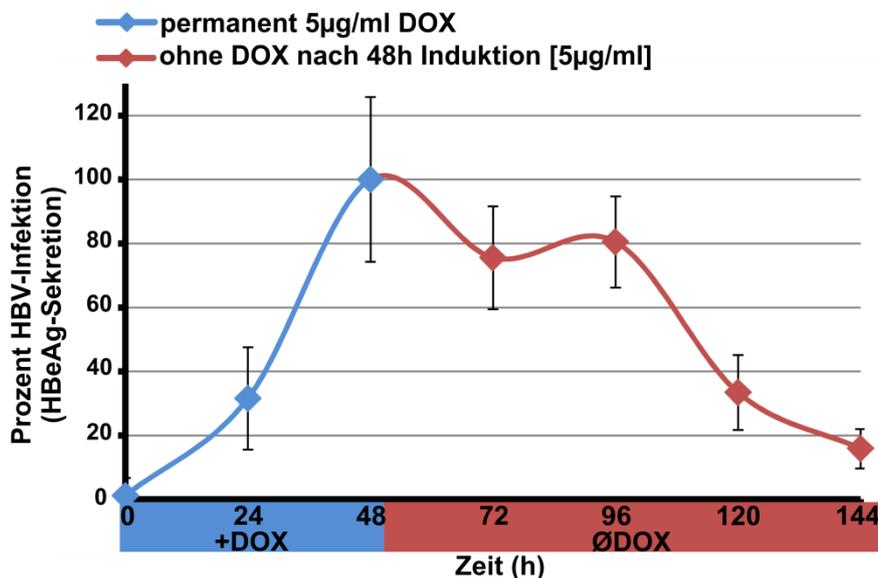


Abbildung 18: HBV-Infektion von NTCP-HepG2 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der vorübergehenden Doxycyclin Induktion. NTCP-HepG2 Zellen wurden auf 24-Well Platten ausgesät und mit 5 µg/ml Doxycyclin (DOX) für 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 h inkubiert. Parallel dazu wurden NTCP-HepG2 Zellen nach einer 48-stündigen DOX-Induktion für 24, 48, 72 oder 96 h ohne DOX weiter inkubiert. Der in rot dargestellte relative Wert für den Infektionserfolg entspricht dem Anteil der HBV-Infektion von Zellen nach der Wegnahme des DOX von dem entsprechendem Infektionswert bei dauerhaft induzierten Zellen. Die Zellen wurden mit 20 GE/Zelle HBV für 16 h inkubiert und 11 Tage im Zellkulturinkubator kultiviert. Die Überstände wurden an Tag 1, 4, 7 und 11 gesammelt und mittels eines Mikropartikel Enzym Immuno Assays (MEIA) auf sekretiertes HBeAg als Marker für eine Infektion analysiert.

Eine Suszeptibilität der NTCP-HepG2 Zelllinie für HBV kann erst nach Induktion der Zellen mit Doxycyclin festgestellt werden (s. Abbildung 18). Dabei ist die Konzentration an HBeAg im Zellkulturüberstand nach einer 48-stündigen Induktion ca. dreifach höher als nach einer 24-stündigen Doxycyclin Inkubation. Durch die Wegnahme des DOX kommt es zu einem schrittweisen und nahezu vollständigen Verlust der HBV-Suszeptibilität innerhalb von 96 h.

5.2.1.4 Vergleichende Analyse der spezifischen Interaktion von HBV mit NTCP und den verwandten organischen Salztransportern ASBT des Intestinums und SOAT der Testes

Die Wirtsspezifität des HBV für humane Hepatozyten wurde von anderen Arbeitsgruppen auch anhand von vergleichenden Bindungs- und Infektionsexperimenten unter der Verwendung des NTCPs aus anderen Säugetierspezies wie z. B. Maus oder Ratte untersucht [76, 116, 167]. Yan et. al. beschrieben zwei Domänen mit der Aminosäure Position 84 bis 87 sowie 157 bis 165 im humanen NTCP, die für die hohe Wirtsspezifität verantwortlich sind. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der Verwendung des NTCPs sowie der nahe verwandten humanen Transporter ASBT (höchste Expression im Ileum) und SOAT (höchste Expression im Testis) der Organotropismus des HBV untersucht werden. Weiterhin sollte gezeigt werden, ob die von Yan et. al. beschriebenen HBV-Bindungs-Domänen auch für den Lebertropismus im Menschen verantwortlich sind. Dafür wurden Plasmide verwendet (s. Tabelle 3) bei denen die homologen Domänen im ASBT und SOAT mit den äquivalenten Domänen des NTCPs ausgetauscht wurden. Einen AS-Sequenzvergleich der entsprechenden Domänen verschiedener organischer Salztransporter ist in Abbildung 26 der Diskussion (Kapitel 6.2.2) dargestellt. Nach der Transfektion von NTCP, SOAT und ASBT sowie ASBT/NTCP- und SOAT/NTCP-Chimären codierenden Expressionsplasmide (s. Tabelle 3) in HepG2-Zellen, konnte die Bindungsaffinität des HBV Myr-präS1-Peptids an die verschiedenen Gallensalztransporter sowie die Suszeptibilität dieser Zellen für HBV untersucht werden.

Ergebnisse

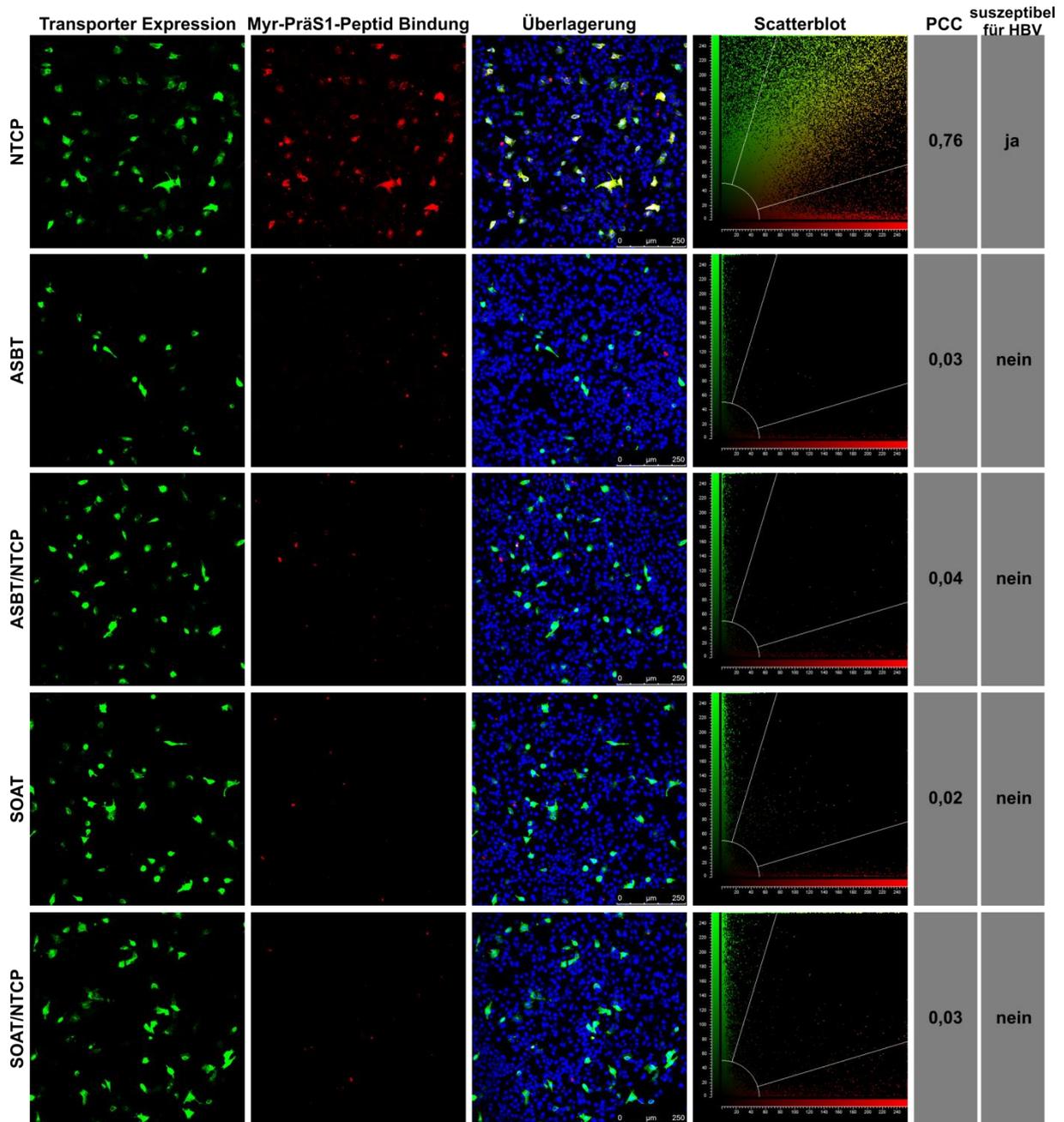


Abbildung 19: Spezifität der HBV Myr-präS1-Peptid Bindung an hNTCP. HepG2-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden transfiziert, welche GFP-markiertes hNTCP, hASBT, hASBT/hNTCP, hSOAT oder hSOAT/hNTCP codieren. Die Zellen wurden für 3 Tage auf IBIDI-Zellkulturkammern kultiviert, auf 8 °C gekühlt, bevor sie mit 1µM Alexa594-markiertem Myr-präS1-Peptid 30Min inkubiert wurden. Nach mehrfachem Waschen wurde das GFP markierte hNTCP (grün) und das Alexa594-markierte Myr-präS1-Peptid (rot) konfokalmikroskopisch detektiert und mithilfe der Mikroskopsoftware die Kolo-kalisation der beiden Farbstoffe bestimmt. Dies wird anhand des Scatterblots sowie des *Pearson's Correlation Coefficient* (PCC) quantitativ dargestellt. Daten zur HBV-Suszeptibilität, siehe Anhang (Abbildung 28)

Anhand Abbildung 19 wird deutlich, dass das Alexa594 markierte HBV Myr-präS1-Peptid ausschließlich an NTCP-exprimierende Zellen bindet. Zellen die ASBT, SOAT, ASBT/NTCP oder SOAT/NTCP exprimieren sind nicht in der Lage das Peptid zu binden. Vereinzelt Bereiche dieser Zellen weisen trotzdem ein Alexa594-Signal auf. Diese Bindung kann allerdings nicht mit der Expression von ASBT, SOAT, ASBT/NTCP oder SOAT/NTCP korreliert werden. Am deutlichsten wird dies anhand des *Pearson's Correlation Coefficient* (PCC), der ein Parameter für die Kollokalisierung von Transporter und Myr-präS1-Peptid ist. Daran wird deutlich, dass 76 % des Fluoreszenzsignals von NTCP und Myr-präS1-Peptid kollokalisiert sind, wogegen nur 2,5, 4,3, 1,9 oder 3,2 % Kollokalisierung des Peptids mit ASBT, ASBT/NTCP SOAT oder SOAT/NTCP vorliegen. Weiterhin konnte durch Infektionsexperimente mit diesen Zellen gezeigt werden, dass ausschließlich eine Expression des NTCPs eine HBV-Suszeptibilität der HepG2-Zellen vermittelt (s. Abbildung 28).

5.2.1.5 Endozytotische Aufnahme des HBV Myr-präS1-Peptids in GFP-NTCP exprimierenden HepG2-Zellen

Nach der gezeigten spezifischen Bindung des Myr-präS1-Peptids an membranständiges NTCP (s. Abbildung 19) würde eine Aufnahme des Peptids ins Zytoplasma der Zelle zeigen, dass auch der nächste Schritt einer effektiven HBV-Infektion anhand dieses Systems untersucht werden könnte. Zum Nachweis einer Myr-präS1-Peptid Aufnahme in NTCP-GFP Zellen, wurden die Zellen nach einer 30-minütigen Bindungsphase mit Alexa594 markiertem Myr-präS1-Peptid bei 8 °C gewaschen und für weitere 15-60 Minuten bei 37 °C kultiviert. Die Fluoreszenz des NTCPs sowie des Peptids wurden direkt an den lebenden Zellkulturen mittels „livecell imaging“, konfokalmikroskopisch detektiert.

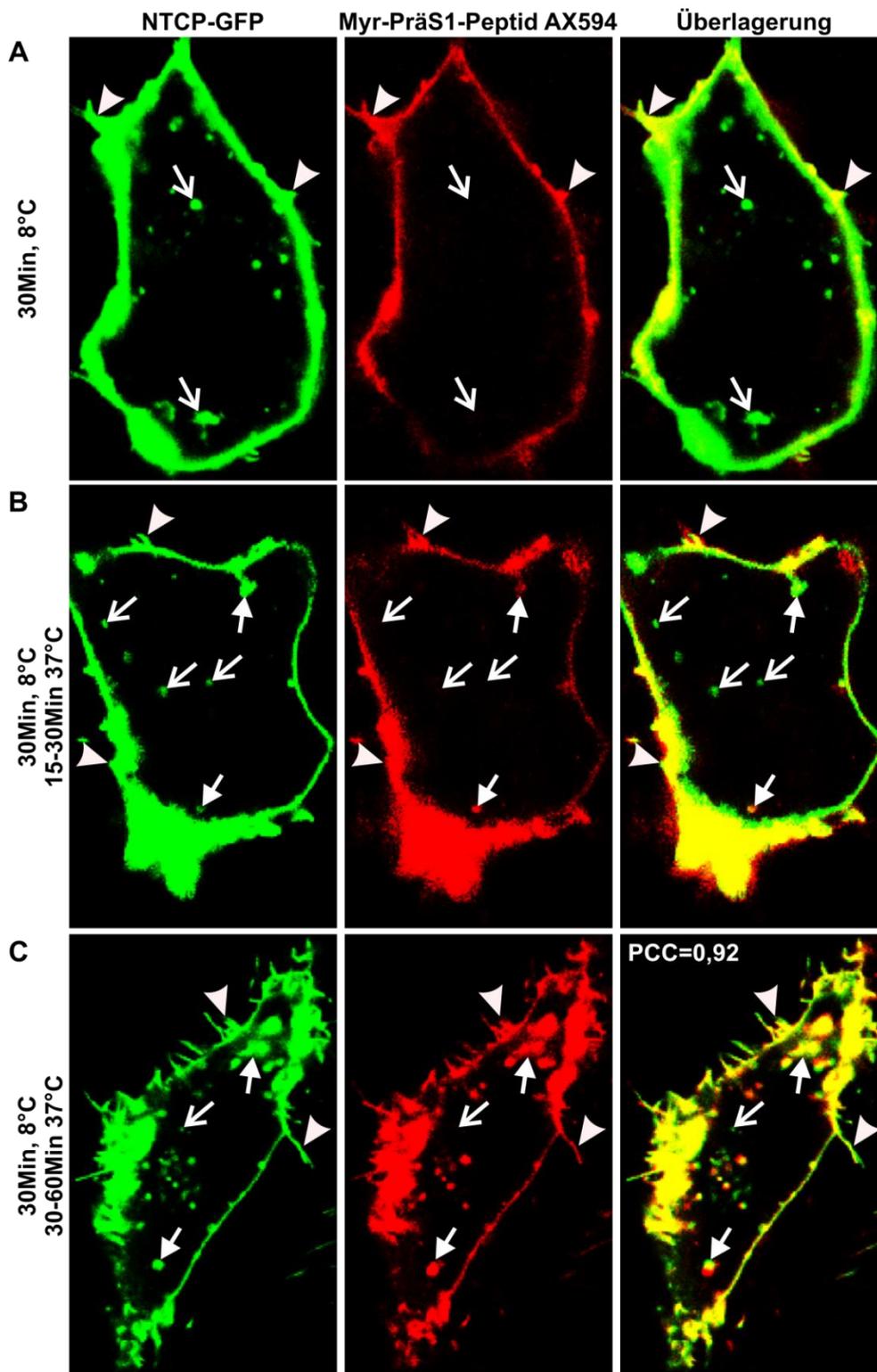


Abbildung 20: Livecell-Imaging Analyse der HBV Myr-praS1-Peptid Endozytose in NTCP-GFP exprimierende HepG2-Zellen. HepG2-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid transient transfiziert, das ein hNTCP-GFP Fusionsprotein codiert (grün). Nach der Aussaat und einer zweitägigen Kultivierung der Zellen in IBIDI-Zellkulturkammern für *livecell-imaging* wurden die Zellen auf ca. 8 °C gekühlt und 30 Min mit eiskaltem 1µM Alexa594-markiertem HBV Myr-praS1-Peptid (rot) inkubiert. Die Zellen wurden mehrfach gewaschen und direkt anschließend über eine Dauer von 60 Min bei 37 °C konfokalmikroskopisch analysiert. Pfeilspitze: membranständiges Myr-praS1-Peptid + NTCP, offener Pfeil: NTCP haltiges Vesikel, geschlossener Pfeil: NTCP haltiges + Myr-praS1-Peptid haltiges Vesikel od. Zellkompartiment. PCC = *Pearson's Correlation Coefficient*.

Die in Abbildung 20 gezeigten Konfokalbilder machen noch einmal deutlich, dass das Myr-präS1-Peptid an die Membranbereiche der HepG2-Zellen bindet, in denen das NTCP lokalisiert ist. In Abbildung 20 A sieht man, dass es neben membranständigem NTCP auch vereinzelte zytoplasmatische Vesikel gibt, in denen NTCP lokalisiert ist. Das Myr-präS1-Peptid kann bei Zellen, die bei 8 °C mit dem Peptid inkubiert wurden, ausschließlich membrangebunden detektiert werden. Inkubiert man die Zellen nach dieser Bindungsphase bei 37 °C können nach 15-30 Min neben den Membran-gebundenen Peptiden die ersten Vesikel und Membraninvaginationen festgestellt werden, in denen sowohl NTCP als auch Myr-präS1-Peptid festgestellt werden kann (s. Abbildung 20 B). Nach einer 30-60-minütigen Aufnahmezeit bei 37 °C wird dieser Effekt noch deutlicher. Hier kommt es zu einer Anhäufung von Myr-präS1-Peptid und NTCP-angereicherten Vesikeln im Zytoplasma der Zellen (s. Abbildung 20 C). Es konnten nur wenige Vesikel detektiert werden, die ausschließlich NTCP enthalten. Vesikel, in denen Myr-präS1-Peptid und kein NTCP lokalisiert ist, wurden nicht gefunden. Deutlich wird dies auch an der hohen Koloalisationsrate von 92 %. Um diesen Aufnahmeprozess weiter zu verdeutlichen, ist unter folgendem Verweis ein Video hinterlegt (<http://www.journal-of-hepatology.eu/cms/attachment/2017196526/2037594040/mmc2.mp4>), das zu einem späteren Zeitpunkt des Aufnahmevorganges erstellt wurde. Dabei fällt auf, dass im Verlauf des Aufnahmevorganges verstärkt Filopodien ausgebildet werden, die mit NTCP und Myr-präS1-Peptid angereichert sind. Nach dem Abschnüren der NTCP und Myr-präS1-Peptid haltigen Vesikeln von der Plasmamembran ist ein Transport dieser Endosomen im Zytoplasma der Zellen zu beobachten. Neben den vielen kleinen, dynamischen Endosomen sind vereinzelt größere statische Zellkompartimente direkt unterhalb der Plasmamembran zu beobachten, die sowohl NTCP als auch Myr-präS1-Peptid enthalten. Häufig ist ein gerichteter Transport der Vesikel von der Plasmamembran zu diesen Zellkompartimenten zu sehen, wo es zu einer Fusion der Vesikel mit den Kompartimenten kommt.

5.2.1.6 Einfluss von Gallensalzen und Inhibitoren des NTCPs auf die HBV-Infektion von primären Hepatozyten und NTCP-HepG2 Zellen

Nachdem in dieser Arbeit die Korrelation zwischen der Expression des NTCPs und der Bindung, Aufnahme sowie Infektion mit HDV und HBV untersucht wurde (s. Abbildung 14 und Kapitel 5.2.1), sollte abschließend geklärt werden, ob die Gallensalz-Transportaktivität des NTCPs die Suszeptibilität der Zellen beeinflussen kann. Dazu wurden verschiedene Gallensalze (s. Tabelle 10) und NTCP-Inhibitoren in HBV-Infektionsversuchen mit PTH, PHH sowie NTCP-HepG2 Zellen eingesetzt.

Ergebnisse

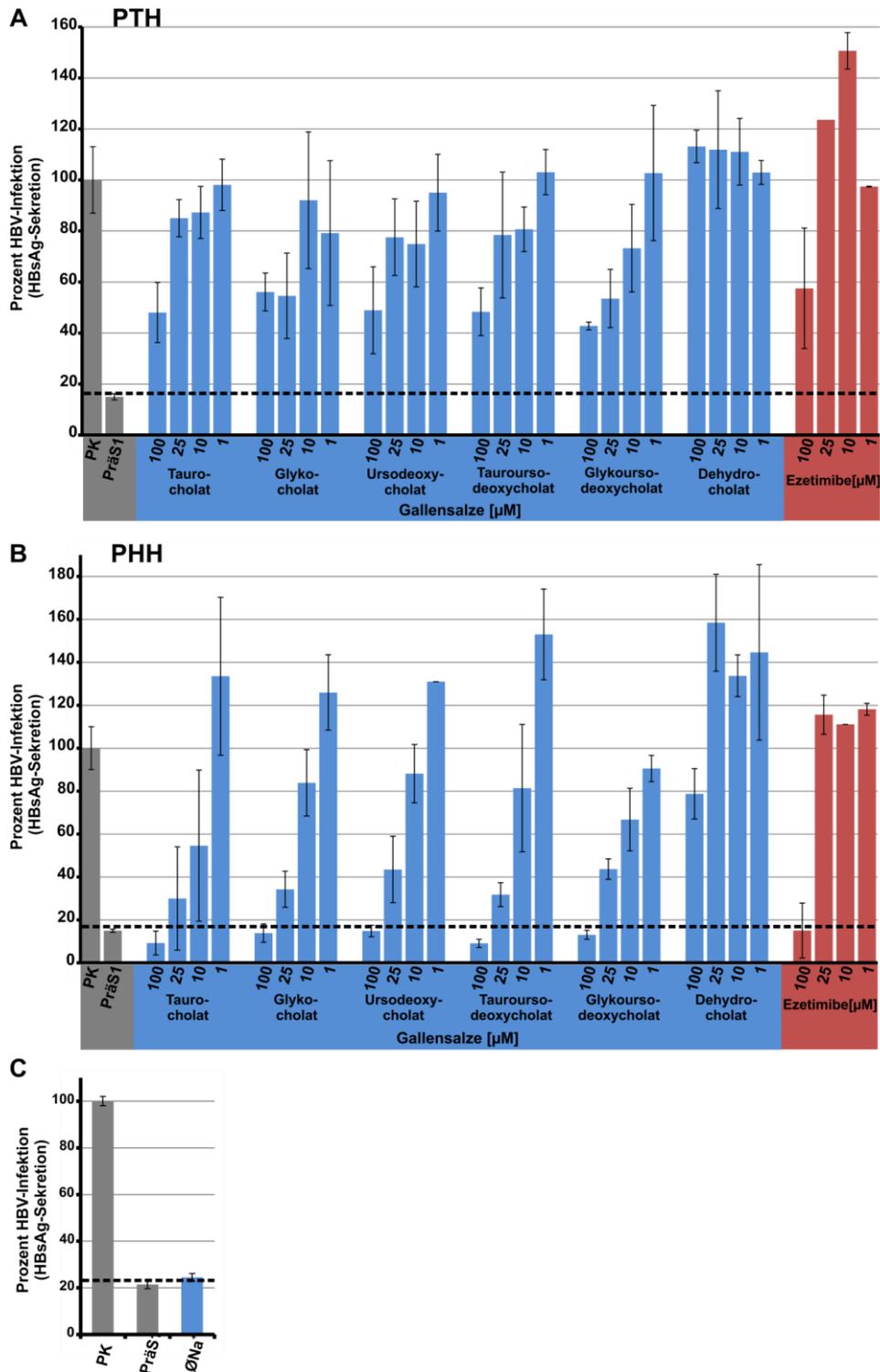


Abbildung 21: Einfluss von Gallensalzen, Ezetimibe und Natriumionen auf die HBV-Suszeptibilität primärer *Tupaia* (PTH) und humaner Hepatozyten (PHH). Primäre Hepatozyten wurden aus der Leber von (A u. C) *Tupaia belangeri* oder aus einem (B) humanen Leberresektat isoliert und für 3 Tage kultiviert. Nach einer 30 minütigen Präinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Gallensalze, Ezetimibe oder (C) einem Natrium-depletierten Puffer, wurden 30 GE/Zelle HBV zugefügt und 16 h im Inkubator kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mehrfach gewaschen und für weitere 14 Tage kultiviert. An den Tagen 1, 4, 7, 11 und 15 nach Infektion wurde der Zellkulturüberstand gesammelt und die Konzentration von neu sekretierten HBsAg als % Wert der nicht inhibierten Positivkontrolle (PK) bestimmt. Gestrichelte Linie: Cut-Off. Der relative Wert für die Definition eines Cut-Offs wurde anhand der ELISA-Werte von Zellkulturüberständen nicht infizierter Hepatozyten errechnet.

Ergebnisse

Aus Abbildung 21 kann zusammengefasst werden, dass verschiedene Substrate des Natrium/Taurocholat Kotransportierende Polypeptids (NTCP) wie z.B. Gallensalze aber auch der Inhibitor Ezetimibe eine HBV-Infektion von primären Hepatozyten konzentrationsabhängig inhibieren können. Dabei wird deutlich, dass das inhibitorische Potenzial aller verwendeter Substanzen mit PHH größer ist als mit PTH. Eine Konzentration von 100 μM zeigte mit allen Gallensalzen sowie Ezetimibe eine vollständige Inhibition der HBV-Infektion in PHH, wogegen die HBV-Infektion von PTH bei dieser Konzentration nur um ca. 60 % verringert wurde. Das synthetische Gallensalz DHC zeigt in beiden Fällen kein inhibitorisches Potenzial. Außerdem wurde gezeigt, dass eine Natrium-Depletion des Zellkulturmediums während der Inkubationsphase bei Verwendung von PTH auch zu einer vollständigen Inhibition der HBV-Infektion führt. Im weiteren wurde auch der Effekt dieser NTCP Substrate und des Inhibitors Ezetimibe auf die HBV-Suszeptibilität von der NTCP-HepG2-Zelllinie untersucht.

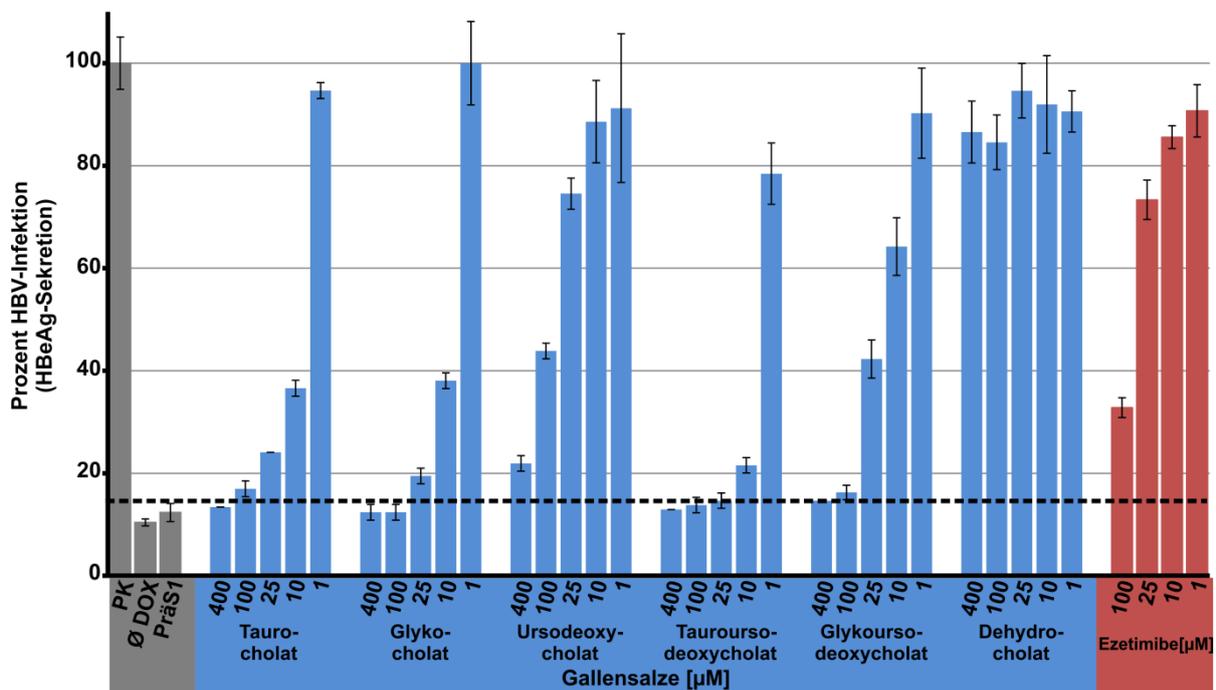


Abbildung 22: Einfluss von Gallensalzen und Ezetimibe auf die HBV-Suszeptibilität der NTCP-HepG2 Zelllinie.

NTCP-HepG2 Zellen wurden in 24-Well Platten mit 50 % Konfluenz ausgesät und mit 0,3 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin für 24 h kultiviert. Nach einer weiteren 24-stündigen Inkubation mit 0,3 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin und 4 % DMSO wurden die Zellen in Gegenwart von 3 % PEG, 0,3 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin und 4 % DMSO für 16 h mit 30 GE/Zelle HBV inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mehrfach gewaschen und für weitere 10 Tage kultiviert. An den Tagen 1, 4, 7 und 10 nach der Infektion wurde der Zellkulturüberstand gesammelt. Mittels eines HBeAg-MEIA wurde die Konzentration von neu sekretiertem HBeAg im Überstand der Zellen als Marker für eine Infektion bestimmt und als relativer Wert zur nicht inhibierten Positivkontrolle (PK) korreliert. Gestrichelte Linie: Cut-off. Der relative Wert für die Definition eines Cut-Offs wurde anhand der MEIA-Werte von Zellkulturüberständen nicht infizierter Hepatozyten errechnet.

Ergebnisse

Wie auch für PTH und PHH oben beschrieben (s. Abbildung 21), wurde die HBV-Infektion der NTCP-HepG2 Zelllinie durch Ezetimibe und durch alle Gallensalze bis auf DHC konzentrationsabhängig gehemmt (s. Abbildung 22). TUDC weist dabei das größte inhibitorische Potenzial auf, während Ezetimibe die Infektion nur um ca. 50 % verringert.

Um eine potenzielle zytotoxische Wirkung der Gallensalze und des chemischen Inhibitors Ezetimibe zu messen, wurde mittels eines WST1-Tests die Zellviabilität von NTCP-HepG2 und PTH nach einer 16-stündigen Inkubationsphase mit den entsprechenden Substanzen bestimmt.

Tabelle 21: Bestimmung der Zellviabilität von PTH und HepG2-NTCP Zellen mit Hilfe des WST-1 Tests. Um einen potenziell zytotoxischen Einfluss der verwendeten Gallensalze und Ezetimibe auf PTH und HepG2-NTCP Zellen zu testen, wurden die Zellen für 12 h mit den angegebenen Konzentrationen der Substanzen inkubiert, mehrfach gewaschen und mithilfe eines kommerziellen WST-1 Tests (G-biosciences, St. Louis, MO, USA) die Zellviabilität nach den Angaben des Herstellers ermittelt. Die Zellviabilität ist als prozentualer Wert zur nicht behandelten Positivkontrolle der entsprechenden Zellkultur angegeben.

Zellviabilität [%]									
Zellen	PTH				HepG2-NTCP				
Substanz	Konzentration [μM]								
	100	25	10	1	400	100	25	10	1
Taurocholat	98 \pm 2	94 \pm 5	101 \pm 5	100 \pm 4	101 \pm 3	111 \pm 2	101 \pm 8	106 \pm 5	119 \pm 3
Glykocholat	113 \pm 12	91 \pm 3	109 \pm 12	114 \pm 4	94 \pm 1	102 \pm 7	101 \pm 3	102 \pm 6	104 \pm 5
Ursodeoxycholat	97 \pm 4	106 \pm 1	105 \pm 2	106 \pm 4	98 \pm 4	113 \pm 7	114 \pm 2	105 \pm 7	116 \pm 2
Tauroursodeoxycholat	107 \pm 5	109 \pm 1	106 \pm 1	117 \pm 6	95 \pm 6	97 \pm 14	102 \pm 4	101 \pm 7	112 \pm 6
Glykoursodeoxycholat	120 \pm 4	120 \pm 4	105 \pm 4	107 \pm 2	103 \pm 5	108 \pm 7	108 \pm 6	107 \pm 10	98 \pm 2
Dehydrocholat	121 \pm 7	118 \pm 5	121 \pm 1	110 \pm 1	97 \pm 8	110 \pm 8	104 \pm 5	96 \pm 2	110 \pm 9
Ezetimibe	92 \pm 7	107 \pm 1	115 \pm 5	111 \pm 8	n.d.	107 \pm 10	121 \pm 14	108 \pm 7	110 \pm 14

Keine der verwendeten Substanzen zeigte einen signifikanten zytotoxischen Effekt auf PTH oder HepG2-NTCP Zellen in den hier verwendeten Konzentrationen und Versuchsbedingungen. Auf einen potenziellen Einfluss der Gallensalze und des chemischen Inhibitors Ezetimibe auf die Oberflächenexpression von NTCP wird im Kapitel 6.2.3 der Diskussion eingegangen.

5.2.1.7 Einfluss von Gallensalzen und Inhibitoren des NTCPs auf die Bindung des Myr-präS1-Peptids an NTCP-HepG2 Zellen

Nachdem im Kapitel 5.2.1.6 die inhibitorische Wirkung von NTCP-Substraten und Ezetimibe auf die HBV-Infektion von Hepatozyten gezeigt wurde, sollte in diesem Abschnitt untersucht werden, ob die Bindung von HBV an seinen Rezeptor NTCP durch diese Substanzen beeinflusst wird. Dafür wurde die Bindung des HBV Myr-präS1-Peptids (Alexa594 markiert) an die Membran von NTCP-HepG2 Zellen unter verschiedenen Bedingungen mittels *livecell-imaging* konfokalmikroskopisch quantifiziert.

Ergebnisse

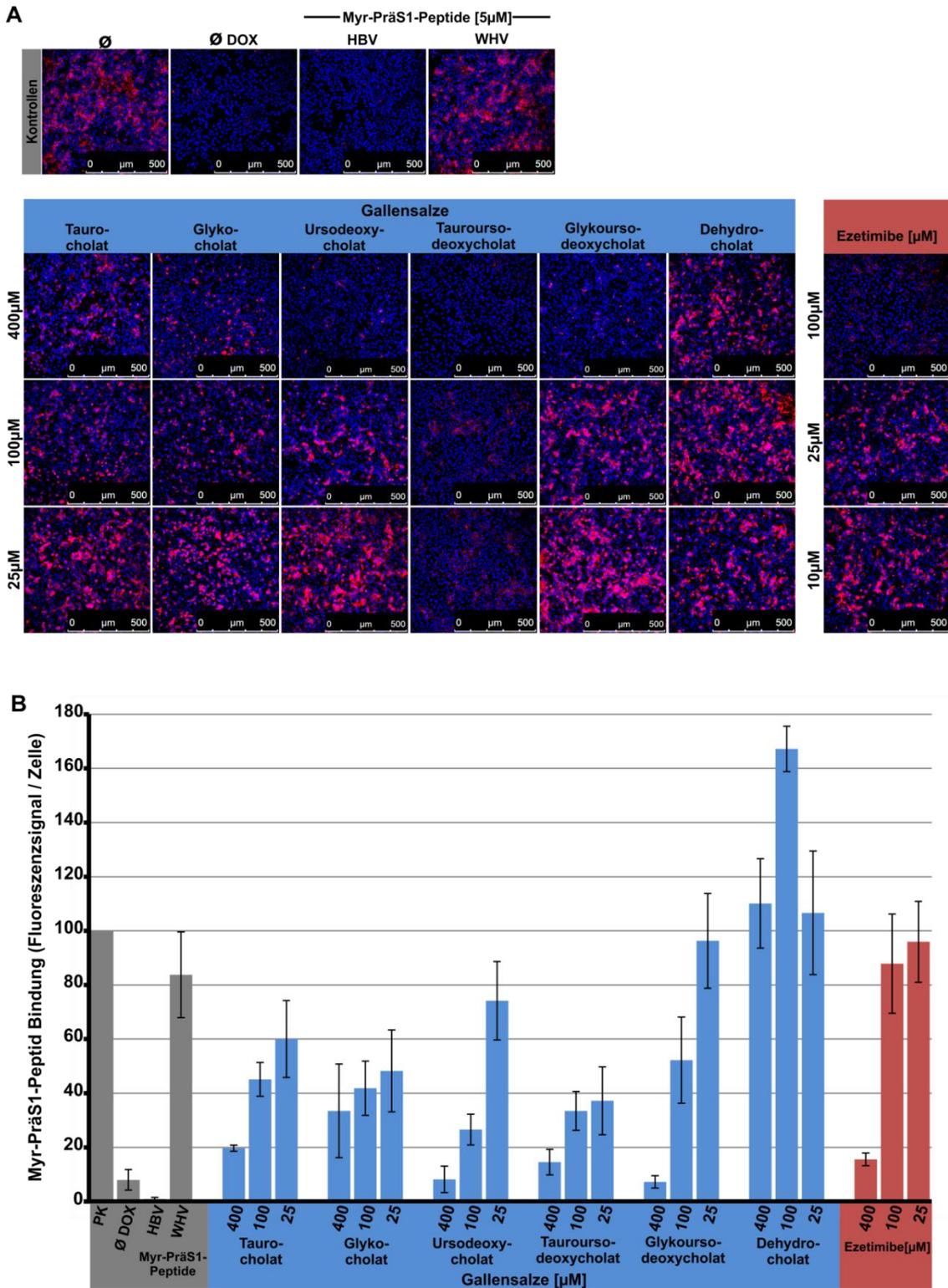


Abbildung 23: Inhibitorisches Potenzial von Gallensalzen und Ezetimibe auf die Myr-präS1-Peptid Bindung an NTCP-exprimierende HepG2-Zellen. Die Zellen wurden in IBIDI-Zellkulturkammern für *livecell-imaging* ausgesät und in Anwesenheit von 5 µg/ml Doxycyclin 2 Tage kultiviert. Nach einer 30-minütigen Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Gallensalzen, Ezetimibe oder 5 µM Myr-präS1-Peptid des HBV oder WHV, wurde Alexa595 markiertes Myr-präS1-Peptid dazugegeben (Endkonzentration 1 µM) und die Zellen 30 Minuten coinkubiert. Unmittelbar nach mehrfachen Waschschritten wurde die Bindung des Alexa594-Myr-präS1-Peptids an die Membran der Zellen konfokalmikroskopisch detektiert (**A**) und quantifiziert (**B**). Die quantifizierte Pixelsumme wurde anhand der Zellzahl normalisiert.

Ergebnisse

Anhand der Abbildung 23 kann gezeigt werden, dass eine Bindung des Myr-präS1-Peptids an seinen Rezeptor NTCP durch eine Prä- und Koinkubation mit allen hier verwendeten natürlichen Gallensalzen oder Ezetimibe konzentrationsabhängig inhibiert wird. Dabei wird deutlich, dass TUDC die Peptidbindung am potentesten hemmt. Als Kontrollen wurden die Zellen vor der Bindung des Alexa594 markierten Myr-präS1-Peptids mit einem nicht Fluorophor gekoppelten Myr-präS1-Peptid des HBV oder WHV vorinkubiert. Die Bindung des Alexa594 markierten HBV Myr-präS1-Peptids wurde durch das nicht-markierte Myr-präS1-Peptid des HBV, nicht jedoch des WHV verhindert.

5.2.1.8 Einfluss der Myr-präS1-Peptid Bindung an NTCP auf die Taurocholat Transportaktivität

Da in den vorherigen Kapiteln gezeigt werden konnte, dass Gallensalze als Substrat des NTCP die HBV-Bindung sowie -Infektion von Hepatozyten inhibieren (s. Kapitel 5.2.1.6 und 5.2.1.7), soll in diesem Kapitel ein möglicher Einfluss von hepadnaviralen Myr-präS1-Peptiden auf die NTCP-Transportaktivität untersucht werden. Dafür wurden NTCP-transfizierte HepG2-Zellen mit den Myr-präS1-Peptiden des HBV, WMHBV, TBHBV, HBHBV, RBHBV oder WHV inkubiert, bevor Fluorophor markiertes Taurocholat (NBD-TC) dazugegeben wurde. Der Transport des Substrats wurde anschließend mittels *livecell imaging* konfokalmikroskopisch detektiert.

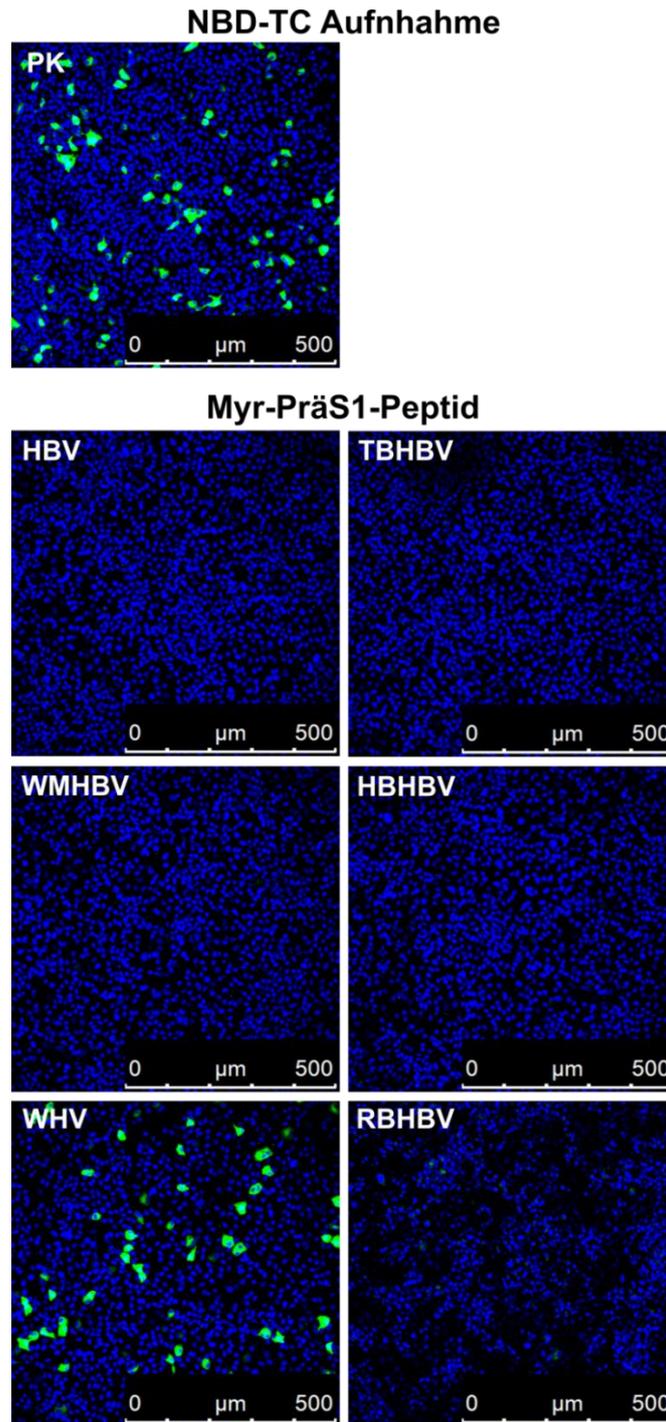


Abbildung 24: Transport von NBD-TC in NTCP transfizierten HepG2-Zellen in Abhängigkeit der Myr-präS1-Peptid Bindung. HepG2-Zellen wurden transient mit einem NTCP codierenden Expressionsplasmid transfiziert, auf IBIDI-Zellkulturkammern ausgesät und für 48 h kultiviert. Nach einer 30-minütigen Inkubation mit einer 1 μM Lösung verschiedener Myr-präS1-Peptide wurde das NTCP-Substrat NBD-TC dazugegeben [0,5 μM]. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mehrfach gewaschen, bevor die Aufnahme des NBD-TC in die Zellen am Konfokalmikroskop detektiert wurde.

Die in Abbildung 24 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die hepadnaviralen Myr-präS1-Peptide des HBV, WMHBV, TBHBV, HBHBV und RBHBV den Transport des NTCP spezifischen Substrats NBD-TC inhibieren. Das entsprechende Peptid des WHVs zeigt keinerlei Einfluss auf die TC-Transportaktivität von NTCP transfizierten Zellen.

6. Diskussion

6.1 Neu entdeckte Hepadnaviren aus Fledermäusen

Neue Viren in wild lebenden Tieren zu entdecken und diese möglichst umfassend zu charakterisieren, erfordert viele unterschiedliche, teilweise sehr spezielle Methoden aus den Forschungsbereichen Ökologie und Virologie. Aus diesem Grund wurde dieses Projekt in einer engen Kooperation zwischen drei Instituten mit jeweils unterschiedlichen Forschungsschwerpunkten durchgeführt. Die Arbeitsgruppe von Marco Tschapka (Institut für experimentelle Ökologie, Universität Ulm) beschäftigt sich mit der Ökologie von neotropischen Fledermäusen und ist innerhalb dieses Projekts für das Fangen und für die Beprobung der Fledermäuse zuständig. Mit der Isolation, Amplifikation und Quantifizierung viraler DNA aus dem Blut und Gewebeproben der Tiere sowie mit den phylogenetischen Stammbaumanalysen hat sich die Arbeitsgruppe von Jan Felix Drexler und Christian Drosten (Institut für Virologie, Universität Bonn) beschäftigt. In der Arbeitsgruppe von Dieter Glebe am Institut für Medizinische Virologie der Universität Gießen wurde die von den Bonner Kollegen überlassene orthohepadnavirale DNA in Expressionsvektoren kloniert sowie im Rahmen dieser Arbeit molekular- und zellbiologische Assays entwickelt, um experimentell die funktionellen Eigenschaften sowie das zoonotische Potenzial dieser Viren zu charakterisieren. Wesentliche Teile dieser Arbeit sind im Oktober 2013 in eine gemeinsame Publikation im Journal Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (PNAS) eingegangen [15].

6.1.1 Molekularbiologische Untersuchung des zoonotischen Potenzials von Hepadnaviren aus Fledermäusen

Zu einem vollständigen Replikationszyklus von Viren gehört eine feste Abfolge von Einzelschritten wie die Anheftung (attachment) des Virus an einen infektionsauslösenden Rezeptor in der Membran der Wirtszelle, der Eintritt (entry) in die Zelle, die Expression der viralen Proteine, die eigentliche Replikation des viralen Genoms, die Morphogenese der Viruspartikel und ihre Freisetzung aus der Zelle (s. Abbildung 6 und Abbildung 7). Damit ein Virus einen kompletten Replikationszyklus durchlaufen kann, sind viele spezifische molekulare Interaktionen von viralen und zellulären Faktoren notwendig. Aus der Spezifität dieser Interaktionen ergeben sich Wirts- und Organtropismus einer Virus-Spezies, welche ihrerseits die natürlichen Spezies- und Gewebebarrieren für dieses Virus bedingen. In den folgenden Kapiteln sollen die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse insbesondere im Hinblick auf die Frage diskutiert werden, welches mögliche Potenzial Hepadnaviren aus Fledermäusen besitzen, die Speziesbarriere zum Menschen zu durchbrechen und ob diese Viren als zoonotische Krankheitserreger eingestuft werden müssen. Der eindeutigste Hinweis für ein zoonotisches Potenzial dieser Viren wäre ein Tierversuch mit Menschenaffen, der sich jedoch aus

Tierschutz- und Kostengründen verbietet. Sehr aussagekräftig ist aber auch der Nachweis einer erfolgreichen Infektion von humanen Zellkulturen *in vitro*. Um jedoch das potenzielle Infektionsrisiko im Umgang mit diesen neu entdeckten Viren möglichst einzugrenzen, wurde das Arbeiten mit infektiösen Hepadnaviren aus Fledermäusen zunächst vermieden. Stattdessen wurden die Einzelschritte des viralen Lebenszyklus dieser Hepadnaviren in verschiedenen Hepatozytenkulturen fluoreszenzmikroskopisch, molekularbiologisch und biochemisch analysiert.

6.1.1.1 Untersuchung später Interaktionsschritte zwischen BATHBV und humanen Hepatozyten zur Charakterisierung des zoonotische Potenzials von BATHBV

Der HBV-Replikationszyklus ist in der Literatur vielfach beschrieben worden (z. B. [140]) (s. Abbildung 6). Zu den seit Langem bekannten intrazellulären Schritten gehören die Bildung der viralen cccDNA im Kern der infizierten Zelle, die Transkription der prägenomischen RNA und der anderen viralen mRNAs, die Translation der strukturellen und nicht strukturellen viralen Proteine, die Verpackung der prägenomischen RNA in den Core-Partikeln, die Reifung des viralen Genoms durch die Aktivität der viralen Reversen Transkriptase, die Umhüllung der reifen Core-Partikel mit den Surface Proteinen und die Exozytose der reifen Viruspartikel sowie die Sekretion der subviralen Surface-Antigen-Partikel in das Kulturmedium der Zellen.

Anhand der Sequenzanalyse der neu isolierten Fledermaus-Hepadnavirusgenome wurde deutlich, dass alle drei BATHBV die für Orthohepadnaviren typische Genomstruktur aufweisen und alle bekannten strukturellen und nicht strukturellen Proteine dieser Viren codieren [15]. Ein Nachweis der Expression und Sekretion dieser Proteine in humanen Hepatozyten ist im Prinzip mit immunologischen Methoden möglich. Es standen für diese neu entdeckten Viren aber zunächst keine spezifischen Antikörper zur Verfügung. Um untersuchen zu können, ob humane Leberzellen in der Lage sind, auch die Proteine der hier beschriebenen Fledermaus Hepadnaviren zu exprimieren, wurden nach Transfektion der entsprechenden Plasmide mittels Immunfluoreszenz alle am Institut für medizinische Virologie der JLU-Gießen zur Verfügung stehenden Anti-HBV-Antikörper auf Kreuzreaktivität mit den Antigenen der BATHBV getestet (s. Tabelle 8 und Kapitel 5.1.1). Aufgrund des hohen Konservierungsgrads der orthohepadnaviralen Core-Proteine (s. Tabelle S4 in [15]), zeigte das polyklonale Anti-HBc-Antiserum gegen humanes HBcAg auch eine klare Reaktivität mit Core-Antigenen von TBHBV, HBHBV und RBHBV (s. Abbildung 8). Im Gegensatz dazu haben die Sequenzanalysen gezeigt, dass der Konservierungsgrad zwischen den Oberflächenproteinen von HBV und BATHBV erheblich geringer ist als für das Core-Protein (s. Tabelle S4 in [15]). Gründe für die vergleichsweise hohe Homologie der verschiedenen orthohepadnaviralen Core-Proteine könnten sein, dass diese Strukturproteine im Inneren der Viren im Vergleich zu den Oberflächenproteinen vermutlich nur geringfügig oder gar nicht durch das Immunsystem beeinflusst werden. Die

Oberflächenproteine verändern sich hingegen vergleichsweise schnell, da die entsprechenden Antikörper einem andauernden starken immunologischen Druck auf die Infektionsfähigkeit der Viren ausüben. Dieser Druck führt dazu, dass zufällige Mutationen in den Oberflächenproteinen, die eine Immunevasion ermöglichen, die Replikation der betreffenden Mutanten begünstigen. Weiterhin findet über die viralen Oberflächenproteine die initiale Interaktion mit Rezeptoren der Wirtszelle statt. Da sich diese Rezeptoren von Spezies zu Spezies unterscheiden können, konnte sich evtl. beim Wirtswechsel nur ein Virus mit zufällig angepassten Oberflächenproteinen durchsetzen. Die monoklonalen Anti-LHBs, Anti-MHBs und Anti-SHBs-Antikörper MA18/7, Q19/10 und C20/2 zeigten dementsprechend keinerlei Reaktivität gegen die Oberflächenproteine der BATHBV (s. Abbildung 8). Der ebenfalls monoklonale Anti-SHBs-Antikörper HB1 zeigte zwar auch keine Reaktivität mit den Proteinen der HBHBV und RBHBV (Altwelt BATHBV), jedoch mit den Oberflächenproteinen des TBHBV. Diese Ergebnisse sind anhand eines Sequenzvergleichs zu erklären. Das lineare Bindungsepitop des Antikörpers HB1 bestehend aus den Aminosäuren CR/KTCTT an Position 121 bis 126 befindet sich in der Antigen-Schleife des SHBs [59]. Diese Sequenz ist für eine HBV-Infektion essenziell und ist auch in der Sequenz des TBHBV, nicht jedoch von HBHBV und RBHBV wiederzufinden [15, 185]. Die Sequenz des linearen Epitops DPAF in präS1(20-23), das durch den MA18/7 Antikörper gebunden wird [186], scheint jedoch in keinem der BATHBV Genome konserviert zu sein [15]. Die spezielle Konformation des kleinen Oberflächenproteins in der S-Domäne der HBV-Oberflächenproteine, die durch den konformationellen Antikörper C20/2 erkannt wird [59], scheint ebenso in keinem der BATHBV Oberflächenproteine ausgebildet zu werden [15]. Um dennoch untersuchen zu können, ob die viralen Oberflächenproteine von HBHBV und RBHBV in humanen Hepatozyten exprimiert werden, wurden Expressionsplasmide der Oberflächenproteine von HBHBV und RBHBV, in die das Bindungsepitop für den monoklonalen Anti-SHBs Antikörper HB1 inseriert wurde, zusammen mit den entsprechenden Überlängenkonstrukten cotransfiziert. So konnte die Expression der Oberflächenproteine von HBHBV und RBHBV mit dem HB1-Antikörper nachgewiesen werden (s. Abbildung 8). Die teilweise deutliche Kolo-kalisation von Core- und Oberflächen-Antigenen in räumlich abgegrenzten vesikulären Kompartimenten der Zelle könnte bedeuten, dass hier tatsächlich gereifte Core-Partikel mit den BATHBV-Oberflächenproteinen umhüllt wurden und die entstehenden Viruspartikel aktiv über einen vesikulären Exozytoseweg aus der Zelle gelangen. Um zu untersuchen, ob tatsächlich virale Proteine von den transfizierten Zellen in das Umgebungsmedium sekretiert wurden, wurde ein Western-Blot unter der Verwendung der oben beschriebenen mutierten BATHBV-Plasmide und dem HB1-Antikörper durchgeführt. Die Zellkulturüberstände der transfizierten Zellen wurden an Tag 4 nach der Transfektion mittels Western-Blot auf die Anwesenheit hepadnaviraler Oberflächenproteine untersucht. In allen Proben wurde das für Hepadnaviren typische Bandenmuster für das kleine Hüllprotein in nicht-glykosilierter und N-

glykosilierter Form sichtbar. Die Menge der mittleren und großen Oberflächenproteine von HBHBV und RBHBV war wie bei TBHBV zu gering, um hier detektiert zu werden (s. Abbildung 8).

Die Expression und Funktionalität der viralen Polymerase wurde anhand eines funktionellen Assays gezeigt, da die Replikation aller Fledermaus Hepadnaviren durch das Nukleosidanalogon Entecavir, einem spezifischen Inhibitor der HBV Reversen Transkriptase (RT), stark gehemmt werden konnte [15]. Die Funktionalität der RT ist abhängig von deren erfolgreicher Verpackung in Corepartikel zusammen mit der prägenomischen mRNA (pg-mRNA) des Hepadnavirus. Somit können anhand der gezeigten RT-Funktionalität auch indirekt die Expression der TBHBV, HBHBV und RBHBV pg-mRNA sowie die erfolgreiche Bildung von Core-Partikeln in humanen Hepatozyten nachgewiesen werden. Alle Strukturproteine von TBHBV, HBHBV und RBHBV werden exprimiert und die virale Reverse Transkriptase zeigt außerdem eine deutliche Aktivität. Weiterhin können im Überstand von BATHBV transfizierten humanen Hepatozyten virale Oberflächenproteine sowie revers transkribierte virale DNA detektiert werden. Vergleichbar mit allen anderen bekannten Hepadnaviren (Wildtyp) konnte ein zytotoxischer Effekt hierbei nicht beobachtet werden. Daraus ist zu schließen, dass alle für HBV typischen Schritte des Replikationszyklus, die nach der Bildung der BATHBV cccDNA stattfinden, in BATHBV-transfizierten humanen Hepatozyten stattfinden konnten. Ob es sich bei den nachgewiesenen viralen Proteinen und der viralen DNA um umhüllte, infektiöse Viruspartikel handelt ist bisher ungeklärt. Mithilfe von z. B. einer Immunpräzipitation sowie *in vitro* Infektions-Experimenten mit primären Hepatozyten aus *Uruderma bilobatum* könnte dieser Fragestellung nachgegangen werden.

6.1.1.2 Untersuchung früher Interaktionsschritte zwischen BATHBV und HBV-suszeptibler Hepatozyten zur Charakterisierung des zoonotische Potenzials von BATHBV

Erst seit Kurzem einer eingehenden Untersuchung zugänglich sind die Schritte der Virusanheftung und des Viruseintritts, die in erster Linie, wenn auch nicht ausschließlich, den Wirts- und Organtropismus bewirken [76, 119, 167]. Die ersten 48 Aminosäuren der N-terminal myristoylierte präS1-Domäne des großen Hüllproteins bestimmen die spezifische Bindung und Infektion von HBV (s. Kapitel 1.3.3.3, Übersicht in [140]). Durch die Verwendung solcher Myr-präS1-Peptide konnte z. B. herausgefunden werden, dass auch Hepatozyten von Tieren die nicht für HBV suszeptibel sind, z. B. Mäusen, Ratten oder auch Hunde nicht aber Makaken, das Myr-präS1-Peptid des humanen HBV spezifisch binden [156]. Interessanterweise weisen primäre Hepatozyten des südostasiatischen Spitzhörnchen *Tupaia belangeri* eine spezifische Bindung von HBV sowie WMHBV Myr-präS1-Peptiden, als auch eine Suszeptibilität für das HBV und WMHBV auf [72, 161, 162]. Um die Bindungsfähigkeit der neu entdeckten Fledermaus-Hepadnaviren an Membranen von HBV-

suszeptiblen Zellen zu analysieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit die am meisten konservierten 48 N-terminalen Aminosäuren der präS1-Domänen von HBV, WMHBV, WHV, TBHBV, HBHBV und RBHBV als N-terminal myristoylierte und C-terminal „Strep-Tag“-markierte Peptide verwendet.

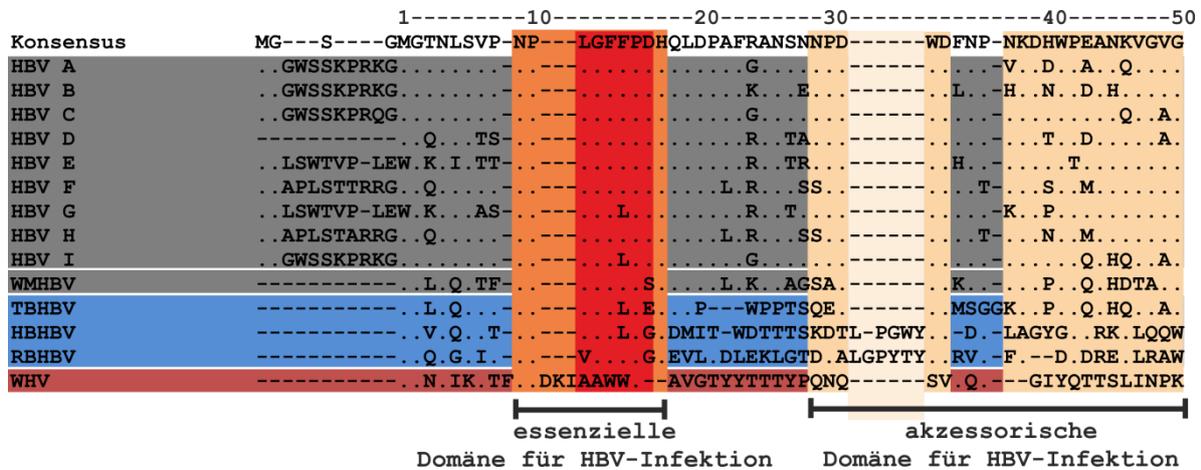


Abbildung 25: Sequenzvergleich des N-terminalen Bereichs verschiedener hepadnaviraler präS1-Domänen. Die Aminosäuresequenzen verschiedener hepadnaviraler Genotypen (GT) des Menschen (HBV A-I) sowie des Wollaffens (WMHBV, Neuweltaffen) sind grau unterlegt (Primaten). Im Vergleich dazu sind die Sequenzen der Hepadnaviren aus Fledermäusen (TBHBV, HBHBV, RBHBV) blau und das Woodchuck HBV (WHV, Nagetier) rot unterlegt. Der Bereich innerhalb der präS1-Domäne des humanen HBV, der für eine HBV-Bindung und -Infektion essenziell ist, ist rot unterlegt (essenzielle Domäne). Bereiche die eine Bindung/Infektion von humanen HBV verstärken können, haben einen gelben Hintergrund (akzessorische Domäne). Für eine bessere Vergleichbarkeit der verschiedenen AS-Sequenzen, wurden die Sequenzbereiche in BATHBV und WHV die den Positionen der essenziellen und akzessorischen Domäne des humanen HBV entsprechen auf gleiche Weise farblich unterlegt. Die in dieser Arbeit verwendeten Myr-präS1-Peptide wurden anhand dieser Sequenzen der Aminosäure Position 2 bis 49 des HBV D, WMHBV, TBHBV, HBHBV, RBHBV und WHV synthetisiert. (-) Aminosäure nicht vorhanden, (.) Aminosäure homolog zur Konsensus-Sequenz. [modifiziert nach Drexler, Geipel, König et al., 2013, Tabelle S4B [15]]

Vergleicht man die AS-Sequenzen (s. Abbildung 25) der humanen HBV GT mit den Viren von nicht humanen Wirten, fällt auf, dass bis auf den HBV GT D alle HBV GT einen um 11 AS längeren N-Terminus besitzen. Diese zusätzlichen AS der anderen GT haben demnach keine entscheidende Funktion für eine HBV-Infektion. Bei den verschiedenen Orthohepadnaviren zeigen sich unterschiedlich große Abweichungen zu der Konsensus-Sequenz 1-50 gemäß Abb. 10. Die Sequenz des WHV weist eine nahezu vollständige Heterologie innerhalb dieses Bereichs auf. Das WHV Myr-präS1-Peptid wird im Rahmen dieser Arbeit daher als „Negativkontrolle“ verwendet. Während der HBV GT D nur eine Distanz von 18 % gegenüber der Konsensus-Sequenz aufweist, weichen das WMHBV, TBHBV, HBHBV und RBHBV um 32, 44, 70 und 68 % ab. Im Bereich der essenziellen Rezeptor-Bindungsdomäne (AS 9-18) zeigen jedoch alle hier aufgeführten Sequenzen eine hohe Homologie zur Konsensussequenz. Während der HBV GT D eine vollständige Homologie aufweist, sind bei allen Fledermaus Hepadnaviren zwei abweichende AS und bei dem WMHBV eine abweichende AS innerhalb der essenziellen Domäne zu finden. Für das TBHBV sowie HBHBV betrifft dies die AS der Position 15 und 17. In beiden Fällen ist ein Phenylalanin der Position 15 zu einem

Diskussion

Leucin und ein Aspartat der Position 17 zu Glutamat (TBHBV) oder Glycin (HBHBV) ausgetauscht. Ein Aspartat an der Position 15 findet man auch z. B. in den HBV GT I und G. Bei RBHBV ist an Position 17 ebenfalls ein Glycin zu finden, jedoch findet man zusätzlich an Position 11 ein Valin anstatt eines Leucins. Innerhalb der akzessorischen Domäne (AS 28-48) ist besonders auffällig, dass HBHBV und RBHBV eine Insertion von fünf bzw. sechs AS an Position 31-36 aufweisen. Ansonsten sind aber auch unterschiedliche Abweichungen in einzelnen AS der akzessorischen Domäne zu beobachten. Während bei dem HBV GT D 19 von 21 AS homolog sind, entsprechen nur 13, 11, 6, oder 7 AS des WMHBV, TBHBV, HBHBV und RBHBV der Konsensussequenz. Erwartungsgemäß war die Bindungsaffinität zwischen Peptid und Zelle für HBV am höchsten, während für das WHV-Peptid keine spezifische Bindung detektiert werden konnte (s. Abbildung 10). Verglichen zu der Bindung des HBV-Peptids haben die Peptide des WMHBV und TBHBV eine um ca. 40 % reduzierte Bindungsstärke, die Peptide des HBHBV und RBHBV eine ca. 50 und 80 % geringere Bindung. Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Interaktion zwischen PHH oder PTH sowie auch NTCP-transfizierten Hepatomzellen und dem HBV Myr-präS1-Peptid eine HBV- und HDV-Infektion verhindern kann [15, 72, 116, 154]. Interessanterweise zeigten die Peptide des WMHBV, TBHBV, HBHBV sowie RBHBV auch ein inhibitorisches Potenzial für eine HBV-Infektion (s. Abbildung 11). Die errechneten IC_{50} -Werte für diesen Effekt spiegeln am besten die Unterschiede der inhibitorischen Wirkung der verschiedenen Peptide wider (s. Tabelle 20). Vergleicht man die in Tabelle 22 zusammengestellten Daten, wird deutlich, dass sich die Unterschiede der Bindungsfähigkeit der verschiedenen Peptide in den Unterschieden des inhibitorischen Potenzials für eine HBV-Infektion in PTH widerspiegeln. Während z. B. das Peptid des HBV mit der höchsten Bindungsaffinität auch die niedrigste IC_{50} (< 1 nM) aufweist, zeigen die Peptide des WMHBV, TBHBV und HBHBV bei einer vergleichweisen Bindungsaffinität von 51-60 % auch höhere IC_{50} -Werte zwischen 2,4 und 3,2 nM. Unter den BATHBV weist das RBHBV-Peptid neben der vergleichsweise schwächsten Bindungsaffinität (19 %) auch das geringste Potenzial für die Inhibition einer HBV-Infektion von PTH auf (48,8 nM). Daran ist klar zu erkennen, dass das inhibitorische Potenzial des Myr-präS1-Peptids direkt von dessen Bindungsaffinität zur Plasmamembran der PTH abhängig ist. Die beiden verwendeten primären Hepatozyten Kulturen aus dem Menschen und *Tupaia belangeri* wiesen eine vergleichbare Suszeptibilität für HBV auf. Obwohl sich die NTCPs aus *Tupaia belangeri* und dem Menschen der Aminosäuresequenz nach sehr ähneln und beide eine Suszeptibilität für HBV vermitteln [76], zeigt das Peptid aus HBHBV eine signifikant erhöhte IC_{50} bei PTH im Vergleich zu PHH (s. Tabelle 20). Dies deutet darauf hin, dass die Infektionssysteme mit PHH oder PTH noch gewisse nicht näher bekannte Unterschiede aufweisen. Um zukünftig das zoonotische Potenzial von Orthohepadnaviren zu untersuchen, sollte man daher ein Infektionssystem mit hNTCP exprimierenden Zellen verwenden. Vergleicht man die AS-Distanz innerhalb der N-terminalen 50 AS der großen orthohepadnaviralen

Diskussion

Oberflächenproteine mit dem inhibitorischen Potenzial (IC_{50}) der entsprechenden Myr-präS1-Peptide auf die HBV-Infektion von PHH (s. Tabelle 22), wird eine klare Korrelation deutlich. Je geringer die Homologie der N-terminalen präS1-Domäne zur HBV-Konsensussequenz ist, desto schlechter inhibiert das entsprechende Peptid eine HBV-Infektion in PHH. Zum Beispiel ist diese Sequenz bei den hier verwendeten Myr-präS1-Peptiden des HBV GT D und des Nagetier Hepadnavirus WHV völlig unterschiedlich. Das Peptid des HBV zeigt dabei eine sehr niedrige IC_{50} für die HBV-Infektion in PHH und das WHV keinerlei inhibitorische Wirkung. Besonders interessant ist, dass anhand dieser Ergebnisse und der Sequenzähnlichkeit das Verwandtschaftsverhältnis des TBHBV zu den Primaten-HBV-Arten, bzw. Genotypen verdeutlicht wird. Das Neuwelt TBHBV weist im Vergleich zu den Altwelt BATHBV (HBHBV, RBHBV) insgesamt und insbesondere innerhalb der für eine HBV-Infektion essenziellen sowie akzessorischen Domäne innerhalb der präS1-Domäne eine höhere Homologie zu dem WMHBV (Neuwelt Affe) und auch HBV auf. Gleichzeitig zeigt das entsprechende Peptid eine um den Faktor 57 bzw. 41 fach niedrigere IC_{50} für die Inhibition einer HBV-Infektion von PHH als die Peptide der beiden Altwelt BATHBV. Somit befindet sich das inhibitorische Potenzial der Peptide von TBHBV und WMHBV auf einem vergleichbar hohen Niveau.

Da neben den in Kapitel 6.1.1.1 diskutierten Hinweisen auf ein zoonotisches Potenzial auch gezeigt werden konnte, dass die Oberflächenproteine der BATHBV spezifisch mit HBV Rezeptormolekülen in PTH und PHH interagieren und dadurch sogar eine HBV-Infektion inhibieren können (s. Abbildung 10 und Abbildung 11), scheint ein zoonotisches Potenzial der BATHBV für sehr wahrscheinlich. Um diese Hypothese weiter zu testen, wurden wie in Kapitel 5.1.2.4 beschrieben Hepatitis Delta Viren hergestellt, die mit den Oberflächenproteinen von TBHBV, HBHBV, RBHBV oder HBV umhüllt sind. Ein entscheidender Faktor für die Umhüllung des HDV mit HBs-Proteinen ist eine Tryptophan-reiche Domäne am C-Terminus des SHBs ($AS_{196}WMMWYW_{201}$) [152]. Da diese Sequenz ebenso in den Oberflächenproteinen der drei BATHBV zu finden ist, war zu erwarten, dass eine Umhüllung von HDV mit den entsprechenden BATHBs-Proteinen auch möglich ist. Diese pseudotypisierten HDV können als Surrogatmodell für ein HBV-Infektionssystem verwendet werden, um die Bindung und Aufnahme des Virus zu untersuchen [97]. Dies bringt vielfache Vorteile für die Untersuchung dieser Fragestellung. Die Viren lassen sich sehr viel einfacher, schneller und in besserer Qualität produzieren. Der Erfolg einer HDV-Infektion kann schon nach 5 Tagen nach der Infektion ausgewertet werden. HBV-Infektionsversuche dauern dagegen mindestens 11 bis 15 Tage. Bei den Arbeiten mit BATHBV muss man außerdem von der Gefahr ausgehen, dass diese Viren im Menschen eine fulminante, akute oder chronische Hepatitis auslösen könnten. Mit einem bestehenden Impfschutz gegen BATHBV durch die HBV-Impfung konnte man zu diesem Zeitpunkt nicht rechnen. Für BATHBV pseudotypisierte HDV war dies zwar auch nicht bekannt, jedoch geht von Hepatitis Delta Viren nicht die Gefahr einer ernsthaften Leberinfektion aus, solange man nicht außerdem mit HBV infiziert ist. So

konnte durch dieses Surrogatmodell die Gefahr beim Arbeiten mit diesen infektiösen Viren stark reduziert werden. Die Ergebnisse aus Kapitel 5.1.2.5 zeigen, dass von den verschiedenen pseudotypisierten Fledermaus-HDV ausschließlich die Oberflächenproteine des TBHBV eine HDV-Infektion von PTH sowie von NTCP transfizierten HepG2 Zellen vermitteln können (s. Abbildung 13 und Abbildung 14). Dies lässt die Hypothese zu, dass die frühen hepadnaviralen Replikationszyklusschritte Bindung, Endozytose und Fusion durch Wechselwirkungen zwischen den TBHBV-Oberflächenproteinen und humanen NTCP sowie evtl. anderen unbekanntem zellulären Faktoren in humanen Hepatozyten und PTH stattfinden. Daher sollte man davon ausgehen, dass es sich bei dem TBHBV möglicherweise um ein zoonotisches Virus handeln könnte. HDV pseudotypisiert mit den Oberflächenproteinen der beiden Altwelt Fledermaus Hepadnaviren HBHBV oder RBHBV infizieren hingegen keine der beiden Zellkulturen (s. Abbildung 13 und Abbildung 14). Zwar konnten die entsprechenden Myr-präS1-Peptide an PTH binden und eine HBV-Infektion von PTH und PHH inhibieren, jedoch war die Bindungsstärke viel geringer als bei TBHBV (s. Tabelle 22). Obwohl im Rahmen dieser Arbeit keine Interaktion des WHV Myr-präS1-Peptids mit HBV-suszeptiblen PTH festgestellt werden konnte, wurde interessanterweise in einer Studie von Gudima et. al. gezeigt, dass HDV-Pseudotypen des WHV neben den primären Hepatozyten des *Woodchucks* auch PHH infizieren können [187]. Allerdings wird diese Infektion nicht durch das Myr-präS1-Peptid des HBV inhibiert. Daraus lässt sich schließen, dass das WHV nicht über hNTCP bzw. *woodchuck* Ntcp infiziert, sondern einen noch unbekanntem funktionellen Rezeptor benutzt, der sowohl in *woodchuck*- als auch in humanen Hepatozyten vorkommt.

Um herauszufinden, ob der auch in Deutschland eingesetzte von der WHO empfohlene Impfstoff gegen Hepatitis B auch gegen eine Infektion mit TBHBV schützt, wurde im Rahmen dieses Projekts von A. Geipel am Institut für medizinische Virologie der JLU-Gießen ein Neutralisationsassay durchgeführt. Dafür wurden die Seren zweier erfolgreich HBV-vakzinierter Personen mit einem hohen Anti-HBs-Titer von über 1.000 IU/L Anti-HBs verwendet, die Antikörper über eine Protein-G Säule gereinigt und mit den entsprechenden HDV-Partikeln im *in vitro* Infektionsversuch eingesetzt. Nur bei HDV-Partikeln, die mit Oberflächenproteinen des HBV pseudotypisiert waren (HDV_{HBV}), gelang eine Neutralisierung mit den beiden gereinigten Anti-HBs-Antiseren, nicht aber bei Pseudotypisierung mit TBHBV Oberflächenproteinen (HDV_{TBHBV}) [15]. Aus diesen Ergebnissen wird klar, dass TBHBV ein zoonotisches Potenzial besitzt und der Standard HBV-Impfstoff vor dieser Infektion nicht schützt. In einer Studie von Tacke et. al. konnte z. B. gezeigt werden, dass diese auf HBV GT A und D (nur SHBs) basierende Impfstoffe (wie z. B. Twinrix combination HAV/HBV vaccine, Glaxo SmithKline) auch keinen ausreichenden Immunsschutz gegen den HBV GT F bewirken [188]. Um das Ziel einer weltweiten Ausrottung des HBV durch flächendeckende Vakzinierung zu erreichen, sollte man daher über eine Weiterentwicklung der gängigen Impfstoffe nachdenken. Z. B. könnte

eine Ergänzung des Impfstoffes mit dem LHBs oder den wichtigsten Aminosäurebereichen der präS1-Domäne von HBV und anderen eng verwandten Viren einschließlich TBHBV das Risiko vor HBV- sowie zoonotischen Infektionen reduzieren. Es ist zu vermuten, dass es neben dem WMHBV und TBHBV noch weitere Orthohepadnaviren mit zoonotischen Potenzial gibt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die späten Schritte in der Replikation der drei neu entdeckten BATHBV-Arten auch in humanen Hepatozyten stattfinden, während die frühen Schritte nur für TBHBV nachgewiesen wurden. Man sollte daher davon ausgehen, dass es sich zumindest bei dem TBHBV um ein zoonotisches Virus handeln könnte. Ein direkter Nachweis einer Übertragbarkeit von TBHBV von einer Fledermaus auf den Menschen fehlt jedoch. Es ist zu bedenken, dass die Spezies-Barriere bei HDV mutmaßlich geringer ist als bei HBV. So konnte HDV vom Menschen auf WHV-infizierte Woodchucks übertragen werden [189]. Um die Frage endgültig beantworten zu können, müsste man Infektionsversuche mit diesen Viren in geeigneten (immunkompetenten) Tiermodellen durchführen. Hier kommt eigentlich nur der Schimpanse in Frage, da dieses Tier auch als natürlicher Wirt für HBV dient und Schimpansen bei der Einführung und Validierung der Hepatitis-B-Impfung in den 1980er Jahren eine große Rolle spielten (Übersicht in [47]). Die Verwendung von Schimpansen für Zoonose-Experimente ist jedoch aufgrund berechtigter ethischer Bedenken nicht machbar.

Auch wenn viele hier aufgeführten Fakten für eine mögliche Übertragung des TBHBV von einer Fledermaus auf den Menschen sprechen, konnten im Rahmen dieser Arbeit einige der essenziellen früheren orthohepadnaviralen Replikationszyklusschritte aus Zeitgründen nicht überprüft werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass das Corepartikel von Hepadnaviren nach der Endozytose des Virus und der Fusion der viralen Hülle mit einer zytoplasmatischen Kompartimentenmembran über Mikrotubuli zum Zellkern transportiert wird [123]. Dort wird es im nukleären Kernporen-Komplex disassembliert und die partiell doppelsträngige virale DNA in den Zellkern transportiert [124]. Im Zellkern wird die virale DNA durch zelluläre Polymerasen und Reparaturfaktoren zur cccDNA umgewandelt [127], bevor von dieser Matrize die virale pgRNA und mRNA für die Antigenexpression synthetisiert werden. Jeder dieser Schritte, zwischen der Fusion und der Bildung der cccDNA, ist abhängig von spezifischen Interaktionen zwischen vielen verschiedenen Faktoren des Virus und der Wirtszelle. Ob diese Interaktionen auch z. B. zwischen dem TBHBV und humanen Hepatozyten stattfinden, ist noch unbekannt. Somit ist die Frage nach einer möglichen Infektion von humanen Hepatozyten durch das TBHBV noch nicht endgültig geklärt.

6.1.2 Serologische Untersuchung der epidemiologischen Eigenschaften von Fledermaus Hepadnaviren

Innerhalb der Gruppe der Neuwelt-Fledermäuse, die in Panama gefangen wurden, wurden 5 von 54 Proben (9,3 %) von *Uruderma bilobatum* positiv für HBV-DNA getestet. Innerhalb der Gruppe der Altwelt-Fledermäuse, die in Gabon gesammelt wurden, enthielten 4 von 54 *Hipposideros cf. Ruber* Proben (7,9 %) und 1 von 16 *Rhinolophus alcyone* Proben (6,3 %) HBV ähnliche Sequenzen. Dies entspricht einer Prävalenz für TBHBV, HBHBV und RBHBV von 9,3, 7,9 bzw. 6,3 % (Analyse J.F. Drexler, s. [15]). Die beschriebene Prävalenz von TBHBV (9,3 %), HBHBV (6,3 %) und RBHBV (7,9 %) basiert auf der Detektion von hepadnaviraler DNA im Serum der Tiere. Mit dieser Methode wurden ausschließlich die Tiere erfasst, die zum Zeitpunkt der Beprobung eine aktive Virusreplikation aufgrund einer akuten oder chronischen HBV-Infektion aufwiesen. Zusätzliche Informationen über die Verbreitung und den Infektionsverlauf dieser Viren in den entsprechenden Fledermaus-Populationen erhält man durch die Seroprävalenz. Der Nachweis von Anti-BATHBV-Antikörper, insbesondere gegen das virale Core-Protein (Anti-BATHBc) im Serum eines Tiers zeigt, dass das Immunsystem des Tiers im Verlauf einer stattgefundenen BATHBV-Infektion mit einer Bildung von spezifischen Antikörpern reagiert hat. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Immunfluoreszenz-Assay etabliert mit dessen Hilfe eindeutig gezeigt wurde, dass es Fledermäuse gibt, die positiv für hepadnavirale DNA sowie Antikörper sind (Fledermaus Serum #256, #262, s. Abbildung 9). Dies und die Höhe des DNA-Titers könnten bedeuten, dass es sich dabei um eine chronische BATHBV-Infektion handelt. Ebenso wurden in dieser Arbeit Hinweise für einen akuten Verlauf mit anschließender Serokonversion sowie Ausheilung der Infektion gefunden. Dafür spricht die Probe #378, in der spezifische Antikörper gegen BATHBV gefunden wurde, jedoch keine virale DNA detektiert werden konnte (s. Abbildung 9). Für die Bestimmung der Seroprävalenz wurde die in Abbildung 9 beschriebene Methode genutzt um weitere Fledermaus-Seren dahingehend zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 zusammengestellt (Analyse A. König und AG Drexler). Zwei DNA-positive Tiere (#256, #262), zeigten mit einer generell positiven Seroprävalenz, aber fehlenden spezifischen Antikörpern gegen die viralen Oberflächenproteine (Anti-HBs) das klassische Bild einer chronischen HBV-Infektion. Vergleichbar mit dem Menschen liegt hier eventuell vorhandenes Anti-HBs gebunden an subvirale Partikel im Serum der Tiere vor, daher zeigt sich keine Reaktivität in der IF. Eine Quantifizierung der subviralen Partikel (HBsAg, Antigenämie) konnte leider in Ermangelung eines spezifischen Tests nicht durchgeführt werden. Allerdings sind bei Infektionen des Menschen auch Antikörper gegen das Core-Protein schon während der akuten Phase zusammen mit HBV-DNA und HBsAg nachweisbar. Zwei Tiere wurden positiv für virale DNA getestet, aber spezifische Anti-BATHBV Antikörper konnten nicht detektiert werden (#301, #303). Dabei könnte es sich um infizierte Fledermäuse in der Frühphase der Infektion handeln, bei denen noch keine entsprechenden

Antikörper gebildet worden waren. Neun Tiere zeigten keine Viruslast, aber Antikörper gegen virale Proteine, wovon nur bei einem dieser Tiere auch eine Reaktivität gegen die viralen Oberflächenproteine (Anti-HBs/LHBs) zugeordnet werden konnte (#385). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass diese Tiere eine akute Hepatitis B Infektion überlebt haben und ausgeheilt sind. Dies wird auch deutlich, vergleicht man in den Individuen von *Hipposideros cf. ruber* die Seroprävalenz von 18,4 % mit der DNA-Prävalenz von 7,9 %. Interessanterweise zeigt die Serumprobe (#385) auch eine Kreuzreaktivität mit viralen Antigenen des HBHBV, insbesondere mit den Oberflächenproteinen. Auffällig ist, dass bei allen drei Tieren bei denen keine Kreuzreaktivität nachgewiesen werden konnte, die Antikörper-Reaktivität generell nur bei verhältnismäßig geringen Verdünnungsstufen von 1:100 bis 1:200 nachweisbar war (IFA Endpunkt-Titer). Dies spricht dafür, dass die Konzentration der Anti-RBHBV-Antikörper im Serum dieser Tiere vergleichsweise niedrig waren, da die Seren, die eine Kreuzreaktivität aufwiesen in Verdünnungsstufen zwischen 1:400 bis zu 1:1600 noch erfolgreich eingesetzt werden konnten. Aus diesen Gründen ist es sehr wahrscheinlich, dass die Anti-RBHBV-Antikörper grundsätzlich eine Kreuzreaktivität mit den Antigenen des HBHBV und umgekehrt aufweisen. Die Kreuzreaktivität ist nicht unerwartet, da das Core-Antigen in der gesamten Gattung der Orthohepadnaviren hoch konserviert ist und somit eine Kreuzreaktivität der Anti-Core Antikörper wahrscheinlich ist. Außerdem ist die Aminosäuresequenz der Oberflächenproteine der beiden Alt-Welt Fledermaus-Hepadnaviren sehr ähnlich (s. Analyse J.F. Drexler, Tabelle S4 in [15]), was auch für eine Kreuzreaktivität dieser Antikörper spricht.

Die in dieser Studie präsentierten Daten erlauben keine gesicherten Aussagen zur Immunpathogenese, zum Krankheitsverlauf sowie zur tatsächlichen Prävalenz chronisch und akut infizierter Fledermäuse. Dafür müssten über einen langen Zeitraum Proben aus BATHBV positiven Populationen gesammelt werden und die Titer der viralen DNA, der Antigene sowie der spezifischen Antikörper im Blut der Tiere quantifiziert werden. Eine wichtige Fragestellung wäre, ob diese Hepadnaviren z. B. horizontal, sexuell oder andere Blut-Kontakte oder/und vertikal vom Muttertier auf das Neugeborene übertragen werden können. Es ist aber bei den momentan durchgeführten Wildfängen aus einer Höhle in Gabon mit ca. 100.000 Tieren logistisch fast unmöglich, zweimal hintereinander das gleiche Tier wieder zu fangen, selbst wenn man es entsprechend markiert. Bekannt ist aus der Literatur, dass für Avihepadnaviren eine vertikale, transovariale Übertragung des Virus typisch ist, wohingegen die Hepadnaviren von Nagetieren vertikal, perinatal und von Primaten vertikal, perinatal sowie horizontal, sexuell übertragen werden (Übersicht in [98]). Bei einer möglichen horizontalen Übertragung würde sich die ökologische Fragestellung anschließen, ob Individuen unterschiedlicher Population in irgendeiner Form interagieren und ob das Virus evtl. über größere Entfernungen an andere Populationen weitergegeben werden kann.

6.1.3 Potenzielle Transmissionswege von Hepadnaviren und die Evolution des HBV

Generell ist die Evolution von Viren z. B. durch deren vertikalen Transmission und Cospeziation mit dem Wirt sowie durch interspezifische horizontale Transmissionen, Adaptationen an neue Wirte und Rekombinationen geprägt. Die Entdeckung von hepadnaviralen Genomsequenzen in verschiedenen Vogelarten [190] sowie in der gefleckten Klapperschlange (*Crotalus mitchellii*) lässt einen Ursprung der Hepadnaviridae vermuten, der viele Millionen Jahre zurückliegt (Übersicht in [191]). Wie sich im Laufe der Evolution die Orthohepadnaviridae der Primaten, Rodentia und Chiroptera entwickelt haben ist noch ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die späten Schritte in der Replikation wie z. B. die Expression und Sekretion hepadnaviraler Proteine der drei neu entdeckten BATHBV-Arten auch in humanen Hepatozyten stattfinden (s. Abbildung 8 u. Abbildung 12), während die frühen Schritte nur für TBHBV nachgewiesen wurden (s. Abbildung 13 u. Abbildung 14). Man sollte daher davon ausgehen, dass zumindest für das TBHBV eine zoonotische Transmission möglich ist. Ein direkter Nachweis einer Übertragbarkeit von TBHBV von einer Fledermaus auf den Menschen fehlt jedoch. Durch die hier beschriebenen Neuentdeckungen von Hepadnaviren in Fledermäusen und deren zoonotischen Potenzials müssen die bestehenden Theorien zur Transmission sowie zur Evolution und Abstammung des HBV überdacht und neu diskutiert werden. In der Literatur sind mehrfach Anhaltspunkte zu finden, die für einen Ursprung des humanen HBV von Orthohepadnaviren der Altwelt Primaten sprechen. Z. B. ist der Anteil von 8-13 % differierender Nukleotiden zwischen den Genomen humaner HBV GT und den GT von Gibbons, Schimpansen oder Orangutans teilweise geringer als die durchschnittliche Differenz von 11 % innerhalb der humanen HBV GT untereinander (Übersicht [14]). Außerdem wurde in der Literatur auch schon mehrfach von HBV GT berichtet, die sowohl Menschen als auch Spezies der Hominoiden Superfamilie wie z. B. westafrikanische Schimpansen [192] oder Gibbons sowie Orangutans aus Südost Asien infizieren können [21, 22, 39, 40]. In diesem Zusammenhang wurde auch von Rekombinationen zwischen z. B. GoHBV und ChHBV berichtet [22]. Diese Befunde sowie die hohe Prävalenz von Altwelt Primaten HBV sprechen für einen Ursprung des humanen HBV von HBV der Altwelt Primaten [23, 193]. Eine weltweite Verbreitung des HBV könnte im Zuge der prähistorischen Wanderung des „modernen“ *Homo sapiens* aus Afrika vor rund 100.000 Jahren stattgefunden haben (Übersicht in [14]). Als einziges nicht humanes Primaten-Hepadnavirus der Neuen Welt ist das WMHBV bekannt, das eine, verglichen zu Altwelt Primaten HBV, deutlich größere genetische Abweichungen zu humanen HBV GT aufweist. In *in vitro* Experimenten wurde allerdings gezeigt, dass PHH mit WMHBV oder WMHBV pseudotypisierten HDV infiziert werden können [157]. Daher wäre es auch denkbar, dass das WMHBV zoonotisch übertragen werden kann. Interessanterweise weist die Nukleotidsequenz des TBHBV eine höhere Homologie zum WMHBV auf als zu den beiden anderen BATHBV [15]. Dieser

Primat ist ebenso wie *U. bilobatum* in den Regenwäldern der Neuen Welt beheimatet. Betrachtet man die relativ geringe Differenz der Nukleotidsequenz zwischen WMHBV und den humanen HBV Genotypen F und H, die ursprünglich nur in der indigenen Bevölkerung Mittel- und Südamerikas vorkamen [194, 195], liegt die Vermutung nahe, dass das humane HBV aus einer Stammlinie von Neuwelt Fledermaus HBV über Neuwelt Primaten HBV (WMHBV) entstanden sein könnte. Eine interspezifische Transmission von BATHBV auf den Wollaffen oder andere Affen ist allerdings nicht bekannt. Die möglichen artübergreifenden Übertragungswege der hier beschriebenen Hepadnaviren von der Fledermaus auf den Affen, von der Fledermaus auf Menschen oder von einem Affen auf den Menschen sind gegeben, da bekannt ist, dass Fledermäuse (z. B. *Uruderma bilobatum*) von Affen gefangen und verspeist werden [196-198] und dass im gesamten afrikanischen Raum sowie in den tropischen Zonen der Neuen Welt Fledermäuse und Affen als so genanntes „Buschfleisch“ von Menschen konsumiert werden [199-201]. Z. B. ist es dokumentiert, dass Wollaffen (*Lagothrix*) im mittelamerikanischen Raum von der einheimischen Bevölkerung als Haustiere gehalten, sowie als „Buschfleisch“ verspeist werden [202]. Ein gesicherter Nachweis einer zoonotischen Übertragung von Hepadnaviren existiert zurzeit jedoch nicht. Allerdings wurden in einer Publikation von Tatematsu et. al. Ergebnisse veröffentlicht, nach denen aus einem an HCC erkrankten japanischen Patienten ein neuer HBV Genotyp (GT J) isoliert wurde, der sowohl Homologien zum humanen HBV GT C als auch zu GiHBV und OuHBV aufweist (s. Abbildung 1) [203]. Aus der Historie des Patienten ging hervor, dass er sich zu Zeiten des zweiten Weltkriegs über einen längeren Zeitraum (1939-1945) auf der südostasiatischen Insel Borneo versteckt hat. In wie weit er zu dieser Zeit in Kontakt zu den dort heimischen Affen gekommen ist, ist nicht dokumentiert. Gut dokumentiert ist allerdings, dass in Südostasien gefangenen Orangutans und Gibbons das OuHBV bzw. GiHBV mit hoher Prävalenz nachgewiesen werden (20 bzw. 26 %) [39, 204, 205], dass Orangutans und Gibbons von Menschen intensiv bejagt und gefangen wurden/werden [206] und dass innerhalb der lokalen Bevölkerung Infektionen mit dem HBV GT B und C stark verbreitet sind (2-8 % endemische Prävalenz [203]). Außerdem konnte mithilfe von uPA/SCID-Mäusen gezeigt werden, dass GiHBV und OuHBV humane Hepatozyten infizieren können [207]. Eine wahrscheinliche Hypothese wäre, dass der neu entdeckte HBV GT J durch eine zoonotische Transmission von GiHBV/OuHBV sowie einer Rekombination mit dem HBV GT C entstanden ist. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zum zoonotischen Potenzial von BATHBV, das „Alter“ der Hepadnaviridae und die in dieser Arbeit ausgeführten verschiedenen Möglichkeiten der Transmission und viralen Adaptation an neue Wirte, lassen vermuten, dass der Ursprung und die Evolution des HBV durch Einflüsse wie Cospeziation sowie multiple interspezifische und zoonotische Transmissionen in der Alten sowie Neuen Welt mit nachfolgenden Rekombinationen geprägt wurde.

Tabelle 22: Übersichtstabelle der Ergebnisse zur funktionellen Charakterisierung neu entdeckter Orthohepadnaviren aus Fledermäusen. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse sowie weitere publizierte Ergebnisse zum zoonotischen Potenzial des Woolly Monkey (WM), Tent making Bat (TB), Horseshoe Bat (HB), Roundleaf Bat (RB) und Woodchuck Hepatitis B Virus (HBV), wurden in einer Übersichtstabelle zusammengefasst. Die Ergebnisse zur phylogenetischen Untersuchung (AG Drexler, Universität Bonn) für die gesamten Aminosäuren (AS) des großen Oberflächenproteins (LHBs) sowie der Bindungs- und Infektionsrelevanten N-terminalen 50 AS der präS1-Domäne des LHBs (präS1), sind als Prozent (%) Distanz zur Konsensussequenz angegeben. Eine Bindung des Antikörpers HB1 an das WMHBV SHBs ist aufgrund einer Abweichung im entsprechenden AS-Bereich (gelb unterlegt) fragwürdig. Eigenleistung im Rahmen dieser Dissertation: Berechnung der % AS Distanz der präS1-Domäne (AS 2-48) anhand Sequenzvergleich der Abbildung 25; Expression von viralen Proteinen in hum. Leberzellen (HBV, TBHBV, HBHBV, RBHBV) (s. Abbildung 8), Bindungs und Inhibitionsexperimente mit Myr-präS1-Peptiden (PTH, PHH) (s. Abbildung 10, Abbildung 11 u. Tabelle 20), HDV-Pseudopartikel (pp) Infektionen (PTH, NTCP-HepG2 mit HDV-HBV, -TBHBV, -HBHBV, -RBHBV) (s. Abbildung 13 u. Abbildung 14), Bestimmung HB1-Antigenität (AK-Bindung) (s. Abbildung 8).

Virus	% AS Distanz ¹		Expression in hum. Leberzellen	Myr-präS1-Pepid ¹			HDVpp-Infektion		HB1-Epitop (Bindung)	Neutralisierung durch hum. Impfsereen*
	LHBs [#]	präS1		% PTH Bindung	IC ₅₀ Inhibition HBV-Infektion		PHH* PTH	NTCP-HepG2		
					PTH (nM)	PHH (nM)				
HBV	4,2	18	Ja ¹	100	≤ 1	≤ 1	Ja ¹	Ja ¹	Ja ^{1H}	Ja ¹
WMHBV	27,2	32	Ja ²	60	2,4	3,7	Ja ⁴	n. u.	(Ja) ^{5W}	n. u.
TBHBV	44,4	44	Ja ¹	58	2,4	1,5	Ja ¹	Ja ¹	Ja ^{1T}	Nein ¹
HBHBV	44,5	70	Ja ¹	51	3,2	85,7	Nein ¹	Nein ¹	Nein ¹	Nein ¹
RBHBV	45	68	Ja ¹	19	48,8	60,9	Nein ¹	Nein ¹	Nein ¹	Nein ¹
WHV	50,9	82	Ja ³	3	≥ 1000	≥ 1000	n. u.	n. u.	Nein	n. u.

¹ Drexler, Geipel, König et. al., 2013, GenBank: KC790373-KC790381 [15]; ² Chouteau et. al., 2001 [67]; ³ Ziermann, Ganem et. al., 1996 [208]; ⁴ Barrera et. al., 2004 [157]; ⁵ GenBank: AAO74857.1; * Experimente von A. Geipel, # Ergebnisse von AG Drexler; HB1-Epitope: ^H CRTCTT; ^W CRTCTP; ^T CRTCTT

6.2 Untersuchung der NTCP-Funktionalität als Gallensalz-Transporter und HBV-Rezeptor

Die physiologische Funktion des NTCPs ist der Transport von Gallensalzen aus dem Portalblut über die basolaterale Membran in das Zytoplasma von Hepatozyten. Somit ist das NTCP ein dominierender Faktor für die Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs von Gallensalzen [178]. Ende 2012 wurde von Yan et. al. das NTCP als funktioneller HBV-Rezeptor zum ersten Mal beschrieben [76].

6.2.1 Kinetische Untersuchung der Abhängigkeit des Gallensalztransports, der Myr-präS1-Peptid Bindung und der HBV-Infektion von der Expression des NTCPs

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten bestätigen die von Yan et. al. veröffentlichten Ergebnisse, dass eine HBV-Suszeptibilität von Hepatozyten von der Expression des NTCPs abhängig ist. [76, 119] Anhand der in Kapitel 5.2.1.1 dargestellten Ergebnisse wird deutlich, dass die Expression des NTCPs in frisch ausplattierten PHH innerhalb von sieben Tagen in der Zellkultur bis unterhalb der Nachweisgrenze der hier verwendeten Methode der Immunfluoreszenzfärbung abnimmt, wobei an Tag drei und vier nur noch eine vergleichsweise schwache Proteinexpression des NTCP detektierbar war. Parallel dazu konnte von B. Döring am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der JLU gezeigt werden, dass der Na^+ -abhängige Transport von Gallensalzen, der auf den NTCP zurückzuführen ist, in Hepatozyten aus derselben Leber parallel dazu bis unter die Nachweisgrenze abnimmt [119]. Bei PTH konnte ebenfalls eine Abnahme des TC-Transports mit einer nahezu identischen Kinetik beobachtet werden. Diesem Verlust der Transport-Funktion ging nachweislich eine Reduktion der tNtcp mRNA voraus. An Tag 3 und 4 ist noch ein vergleichsweise geringer tNtcp spezifischer Transport von Taurocholat (TC) detektierbar, während zu diesem Zeitpunkt die tNtcp mRNA nahe der Nachweisgrenze war [119]. Auch in primären Hepatozyten der Ratte konnte schon nachgewiesen werden, dass die TC-Transportaktivität simultan mit der Expression der rNtcp mRNA stattfindet [209]. Da die HBV-Suszeptibilität dieser Zellkultur mit gleicher Kinetik abnahm (s. Kapitel 5.2.1), konnte vermutet werden, dass die Abschaltung der NTCP/tNtcp-Transkription in Folge der Dedifferenzierung der Hepatozyten nach der Isolation aus der Leber direkt mit dem Verlust der Suszeptibilität für das HBV korreliert. Allerdings ist es bekannt, dass neben dem NTCP auch viele weitere hepatozelluläre Faktoren nach der Isolation aus der Leber in primären Hepatozyten herunterreguliert werden (Übersicht in [210]). Um die Abhängigkeit der initialen Schritte einer HBV-Infektion sowie des TC-Transports von der NTCP Expression detaillierter untersuchen zu können, wurde eine HepG2 Zelllinie mit induzierbarer und quantitativ regulierbarer NTCP Expression hergestellt. In dieser Arbeit konnte erwartungsgemäß gezeigt werden, dass die NTCP-Expression

durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Doxycyclin (DOX)-reguliert werden konnte (s. Abbildung 16). Kinetische Analysen zeigen, dass parallel zur NTCP-Expression die Bindungsaffinität zum Myr-präS1-Peptid sowie die Suszeptibilität für HBV ansteigt. Durch die Wegnahme des Induktors DOX, kann außerdem eine simultane Reduktion der Bindungsaffinität sowie der HBV-Infektion gezeigt werden (s. Abbildung 17 u. Abbildung 18). Parallel dazu wurde von Barbara Döring gezeigt, dass der NTCP spezifische TC-Transport dieser Zelllinie mit der DOX induzierten NTCP-Expression mit der gleichen Kinetik konzentrationsabhängig korreliert [119]. Die maximale NTCP-Expression, Myr-präS1-Peptid Bindung, HBV-Suszeptibilität sowie die maximale TC-Transportaktivität wurde nach einer 48 stündigen DOX-Inkubation gemessen. Ein kompletter Verlust der NTCP-Expression, Myr-präS1-Peptid Bindung, HBV-Suszeptibilität sowie der TC-Transportaktivität konnte erst am Ende einer anschließenden vier tägigen DOX-freien Inkubation der Zellen beobachtet werden. Dies entspricht dem hier präsentierten kinetischen Verlauf der Reduktion der NTCP-Expression, TC-Transportaktivität und der HBV-Suszeptibilität in primären Hepatozyten (s. Kapitel 5.2.1). Bei den Analysen der verschiedenen Zellkulturen wurde deutlich, dass im Vergleich zu PHH und PTH die Transportaktivität der maximal induzierten (5 µg/ml DOX) NTCP-HepG2 Zellen mindestens um das 5-10 fache erhöht ist (B. Döring, persönliche Mitteilung). Die Menge an membranständigen NTCP könnte von entscheidender Bedeutung sein, wenn man z. B. die inhibitorische Wirkung NTCP-interagierender Substanzen auf die HBV-Infektion testen will. Die induzierbare NTCP-HepG2 Zelllinie erlaubte es den physiologischen Verhältnissen der NTCP-Expression in primären Zellen möglichst gerecht zu werden, in dem für weitere Infektions-Experimente eine DOX-Konzentration verwendet wurde (0,3 µg/ml) (s. Abbildung 22), die der Situation in primären Hepatozyten entspricht. Auf die Suszeptibilität der Zelllinie für HBV hatte die verringerte DOX-Konzentration keinen Einfluss (s. Abbildung 29). Da allerdings bei einer Induktion mit 0,3 µg/ml DOX das Myr-präS1-Peptid nur schwach nachweisbar an die Zellen bindet, wurden die Zellen für die kinetischen Bindungs-Experimente (s. Abbildung 17) maximal induziert. Die hier beschriebene regulierbare NTCP-HepG2 Zelllinie bietet aufgrund der flexiblen Nutzbarkeit im Vergleich zu den bisher publizierten konstitutiv NTCP überexprimierenden Zelllinien optimierte Bedingungen [76, 114, 116-118]. Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass die stetige Verringerung der HBV-Suszeptibilität und des TC-Transports in primären Hepatozyten nach der Isolation aus der Leber mit einem Verlust der NTCP-Expression zu erklären ist. Sowohl für NTCP als auch für viele weitere Faktoren des Hepatozyten-spezifischen Stoffwechsels konnte ein Verlust der Expression nach der Isolation der Zellen aus der Leber festgestellt werden, was zu einer schrittweisen Dedifferenzierung der Zellen führt (Übersicht in [210]).

6.2.2 In vitro Untersuchung der Gewebespezifität des Hepatitis B Virus

Neben dem NTCP gibt es noch weitere Mitglieder der SLC10 Carrier Familie. Dazu gehören z.B. der hauptsächlich in Testis exprimierte SOAT und der Darm spezifische ASBT. Beide weisen auf Sequenz- und Strukturebene eine hohe Homologie zum NTCP auf [178]. Auch auf funktioneller Ebene weisen diese drei Mitglieder der SLC10 Familie Gemeinsamkeiten auf. Der SOAT transportiert als Substrat ausschließlich sulfatierte Steroide und der ASBT ausschließlich Gallensalze, wohingegen der NTCP eine Transportaktivität für beide Substratgruppen sowie einige Arzneistoffe wie Bromsulfatphtalein und Statine aufweist [211-213]. Aufgrund der Ähnlichkeiten dieser Transporter wurde in dieser Arbeit untersucht, inwieweit HBV theoretisch auch mit dem ASBT und SOAT interagieren kann. Es konnte klar gezeigt werden, dass das HBV Myr-präS1-Peptid nicht an den SOAT oder ASBT bindet und dass die Expression dieser beiden Transporter in Hepatomzellen nicht zu einer HBV-Suszeptibilität von Hepatozyten führt (s. Abbildung 19 u. Anhang Abbildung 28). In einer Studie zur Wirtsspezifität des HBV wurden zwei Domänen im NTCP an Position 84-87 und 157-165 postuliert, die für die Bindung des Myr-präS1-Peptids an den NTCP essenziell sind [76, 118, 167]. Auch wenn diese zwei Domänen des NTCPs in die entsprechenden Positionen des ASBT und SOAT genetisch eingebaut wurden (s. Kapitel 3.2.1 u. Abbildung 26), konnte weder eine Myr-präS1-Peptid Bindung noch eine HBV-Infektion detektiert werden (s. Abbildung 19 u. Abbildung 28).

NTCP	84	RLKN ⁸⁷	157	KGIVISLVL ¹⁶⁵
tNtcp	84	PLNN ⁸⁷	157	VGIVISLIL ¹⁶⁵
mNtcp	84	HLTS ⁸⁷	157	KGIMLSLVM ¹⁶⁵
ASBT	91	DILP ⁹⁴	163	DNIGTSLVA ¹⁷¹
SOAT	91	SLKP ⁹⁴	163	QNIGITLVC ¹⁷¹
ASBT/NTCP	91	RLKN ⁹⁴	163	KGIVISLVL ¹⁷¹
SOAT/NTCP	91	RLKN ⁹⁴	163	KGIVISLVL ¹⁷¹

Abbildung 26: Aminosäuresequenzvergleich der organischen Salztransporter verschiedener NTCPs, ASBT und SOAT. Je nachdem ob es sich um das tNtcp des *Tupaia*s oder das mNtcp der Maus handelt, unterscheiden sich die Aminosäuresequenzen in den hier dargestellten Domänen von Position 84-87 und 157-165 zu den homologen Domänen im humanen NTCP. Auch die Aminosäuren der homologen Domänen des ASBT und SOAT unterscheiden sich deutlich vom NTCP. Durch den Austausch dieser Domänen im humanen ASBT und SOAT mit den homologen Domänen des NTCP sind rekombinante Chimären namens ASBT/NTCP und SOAT/NTCP entstanden. (aus [119])

Um diese Ergebnisse zu verdeutlichen, wurde die Kolokalisation des Alexa594 markierten Myr-präS1-Peptids mit dem membranständigen GFP-gekoppelten NTCP bestimmt. Anhand der Überlagerung der Pixel kann ein *Pearson's Correlation Coefficient* berechnet werden, der einen direkten Wert für den Anteil kolokalisierender Pixel darstellt (Übersicht in [214, 215]). Dieser Wert beträgt bei NTCP exprimierenden Zellen 0,76, was einer Kolokalisation von 76% aller Pixel bedeutet. Dem gegenüber beträgt die Kolokalisation mit SOAT, SOAT/NTCP, ASBT und ASBT/NTCP nur zwischen 2 und 4 % (s.

Abbildung 19). Eine 100 prozentige Kolkalisation des Myr-präS1-Peptids mit dem NTCP kann nicht erreicht werden, weil durch die zytoplasmatische Translation des GFP gekoppelten NTCPs auch intrazelluläres GFP detektiert wird, was nicht von dem Peptid gebunden werden kann. *In vivo* Studien zur HBV Gewebespezifität hatten bereits gezeigt, dass Myr-präS1-Peptide innerhalb kurzer Zeit aus der Körperperipherie zur Leber wandern und dort akkumulieren [156]. In diesen Studien konnten weder eine Myr-präS1-Bindung an Zellen des Testis oder des Darms noch eine Infektion dieser Organe detektiert werden. Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen auf zellulärer Ebene warum das HBV einen hohen Lebertropismus aufweist und verdeutlichen somit, dass der NTCP nicht nur ein essenzieller Faktor für die Wirtsspezifität sondern auch für die Gewebespezifität ist.

Die Bindung von viralen Oberflächenproteinen an die Membran der Wirtszelle ist aber nur der initiale Schritt des viralen Replikationszyklus, dem dann die Aufnahme des Virus ins Zytoplasma der Zelle folgen muss, um diese erfolgreich zu infizieren. Wie im Ergebnisteil beschrieben, wurde bei den Bindungsexperimenten mit einem direkt Fluorophor-gekoppelten Rezeptor (GFP-NTCP) sowie einem direkt Fluorophor-gekoppelten Liganden (Alexa594-Myr-präS1-Peptid) gearbeitet. Die Ergebnisse aus Abbildung 20 A zeigen deutlich, dass das Myr-präS1-Peptid nach einer 30 minütigen Bindungsphase bei 8°C ausschließlich an der NTCP-reichen Plasmamembran der Zellen gebunden vorliegt, wobei die zytoplasmatischen Vesikel in denen NTCP angereichert ist kein Myr-präS1-Peptid aufweisen. Nach einem Temperaturwechsel von 8°C zu 37°C sind erste Membran-Invaginationen sowie vereinzelte abgeschnürte Membran-nahe Vesikel zu beobachten, die sowohl NTCP als auch Myr-präS1-Peptid enthalten (s. Abbildung 20 B). Im Verlauf einer weiteren 30 minütigen Inkubation der Zellen bei 37°C kann man immer mehr NTCP- und Myr-präS1-Peptid haltige Vesikel beobachten (s. Abbildung 20 C), die sich von der Membran abschnüren, durch das Zytoplasma transportiert werden und teilweise in größeren Kompartimenten akkumulieren (s. Video auf: <http://www.journal-of-hepatology.eu/cms/attachment/2017196526/2037594040/mmc2.mp4>). Da dieser Rezeptor-Liganden Komplex (NTCP–HBV Myr-präS1-Peptid) gemeinsam von der Plasmamembran eingestülpt wird und darauf folgend zusammen in zytoplasmatischen Vesikeln erscheint, spricht dies dafür, dass auch das HBV nach einer Bindung der präS1-Domäne an den NTCP als Komplex endozytiert wird. Es könnte demnach sein, dass das HBV, NTCP-gebunden über zelluläre Aufnahmemechanismen zur Regulation des NTCPs in die Zellen gelangt. Über endozytische Mechanismen, die an der Aufnahme und Regulation des NTCP beteiligt sind, ist allerdings nicht viel bekannt. Anhand von Studien zum intrazellulären Transport von endozytotischen Vesikeln in primären Ratten-Hepatozyten weiß man, dass der rNtcp endosomal mit anderen Membranproteinen wie dem Transferrin Rezeptor (TfR) oder Asialo-Orosomuroid (ASOR), den Liganden des Asialoglykoprotein Rezeptors, kolkalisiert. Diese Vesikel werden abhängig von der Protein Kinase C zeta Aktivität, entlang von Mikrotubuli mittels Kinesin 1 und Dynein transportiert, wo es durch Vesikel Abschnürungen zur Abtrennung des ASOR

von rNtcp und TfR kommt. Im Gegensatz zu rNtcp und TfR gelangt der ASOR in Rab7 haltige späte Endosomen, was zur Degradierung des ASOR führt. Das rNtcp erscheint demnach in pH-neutralen Rab4 haltigen frühen und in Rab11 haltigen Recycling-Endosomen, jedoch nicht in späten Endosomen [216]. Späte Endosomen und Lysosomen, in denen die Degradierung von Proteinen stattfindet, sind durch einen sauren pH charakterisiert. Für manche Viren, wie z. B. für das Semliki Forest Virus (SFV), ist ein saurer pH in späten Endosomen und Lysosomen essenziell, damit die Virushülle mit der zellulären Kompartimentenmembran fusionieren kann und es zu einer Infektion kommt [217]. Für HBV konnte bereits gezeigt werden, dass die Infektion in PTH und HepaRG keine pH-Verringerung erfordert [120, 165]. Somit konnte in unabhängigen Studien gezeigt werden, dass sowohl das HBV als auch dessen Rezeptor (in Ratten Hepatozyten) nicht in späte Endosomen gelangen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Ntcp-Endozytose von einem Dileucinmotiv (in Ratten Hepatozyten) abhängig ist [218] und durch Phosphorylierungen der AS Threonin an der Position 225 oder des Serin an der Position 226 reguliert werden kann. Eine Dephosphorylierung des S226, führt z. B. zur Retention des Ntcp in der Plasmamembran [219], wobei eine Aktivierung von Protein Kinase C (PKC) eine Endozytose des Ntcp induziert [220]. Neben der PKC zeta konnte so auch eine Abhängigkeit der NTCP-Endozytose von der Phosphatidylinositol 3-Kinase, der Ca^{2+} abhängigen PKC alpha sowie der Protein Phosphatase 2B gezeigt werden [221, 222]. Anhand der Ergebnisse aus Abbildung 20 konnte festgestellt werden, dass in dem Zeitraum der verstärkten Endozytose des Myr-präS1-Peptids zusammen mit dem NTCP, eine deutlich verstärkte Ausbildung von Filopodien an der Plasmamembran der Zellen zu beobachten ist. Diese Filopodien weisen sowohl NTCP, als auch gebundenes Myr-präS1-Peptid auf. Eine Ausbildung von Filopodien wird durch eine massive Umstrukturierung von monomeren Aktinmolekülen zu Aktinfilamenten gesteuert und findet z.B. bei makropinozytischen Endozytosemechanismen statt (Übersicht in [223]). Hinweise auf eine Beteiligung des Aktinzytoskelletts sowie der Filopodienbildung bei der Bindung und Aufnahme des Myr-präS1-Peptids oder von HBV subviralen Partikeln wurden schon in verschiedenen Doktorarbeiten von N. Kott sowie A. Meier mitgeteilt [224]. Z. B. konnte gezeigt werden, dass eine Zerstörung des Aktinzytoskelletts durch den Inhibitor Cytochalasin D zu einem Verlust der HBV-Suszeptibilität der Hepatozyten führen kann. Obwohl andere Inhibitoren der Makropinozytose wie z.B. EIPA die HBV-Infektion nicht inhibieren, sollte in zukünftigen Untersuchungen zum Aufnahme des HBV Aktin-abhängige Mechanismen wie die Makropinozytose besonders thematisiert werden. Für viele andere Viren wie z. B. das Vaccinia Virus [225] oder HIV1 [226] ist bekannt, dass sie über eine Makropinozytose internalisiert werden. Allerdings muss dabei bedacht werden, dass die NTCP-vermittelte Bindung und Endozytose von monomeren Myr-präS1-Peptiden nicht zwangsläufig die Situation für das HBV widerspiegelt, da die Virushülle mehrere Myr-präS1-Domänen sowie zusätzlich das kleine und mittlere HBsAg und eine Lipiddoppelschicht beinhaltet. Jedes zusätzliche

Lipid oder Protein der Virushülle könnte einen Einfluss auf die Endozytose des HBV haben und damit würde der Aufnahmemechanismus des Virus nicht dem hier gezeigten Endozytosemechanismus des Myr-präS1-Peptids entsprechen. Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Leber spezifische Gallensalztransporter NTCP nicht nur für die Bindung des HBV an die Membran von Hepatozyten, sondern vermutlich auch für die Endozytose des Virus verantwortlich ist.

6.2.3 Vergleichende Analyse der funktionellen Eigenschaften des NTCPs als Gallensalztransporter und Rezeptor für das Hepatitis B Virus

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der NTCP sowohl eine Bindung des Myr-präS1-Peptids (s. Abbildung 19) und eine HBV-Infektion vermittelt (s. Anhang Abbildung 28), als auch einen Transport des Fluorophor-gekoppelten Gallensalz Taurocholat ermöglicht (s. Abbildung 14). In den Kapiteln 5.2.1.6 bis 5.2.1.8 wurden daher mögliche Interaktionen dieser beiden funktionellen Eigenschaften des NTCPs untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine HBV-Infektion durch eine Prä- und Coinkubation von PTH, PHH sowie NTCP-HepG2-Zellen mit Gallensalzen konzentrationsabhängig inhibiert wird (s. Abbildung 21 u. Abbildung 22). Da auch die Bindung des Myr-präS1-Peptids an den NTCP durch diese Gallensalze unterbunden wird (s. Abbildung 23) und der Transport von NBD-Taurocholat durch die Inkubation der Zellen mit dem Myr-präS1-Peptid blockiert wird (s. Abbildung 24) könnte man vermuten, dass sich diese beiden Funktionen des NTCPs durch eine gegenseitige kompetitive Hemmung inhibieren. Im Rahmen dieses Projektes wurden durch B. Döring detailliertere Experimente zur Inhibition des Gallensalztransports durch das Myr-präS1-Peptid des HBV, WMHBV und WHV in PTH, PHH, NTCP-HepG2 sowie NTCP-HEK-Zellen durchgeführt [119]. So konnte gezeigt werden, dass der Gallensalztransport in den primären Hepatozyten und NTCP exprimierenden Zelllinien durch die Myr-präS1-Peptide des HBV und WMHBV konzentrationsabhängig inhibiert wird. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch die Myr-präS1-Peptide der in Kapitel 5.1.2.2 und 0 untersuchten Fledermaus Hepadnaviren TBHBV, HBHBV und RBHBV den Gallensalztransport in NTCP-HepG2 Zellen verringern (s. Abbildung 24). Anhand dieser Ergebnisse lassen sich verschiedene Hypothesen ableiten, die die gezeigten Effekte erklären könnten. Denkbar wäre, dass (1) sich die Substrate des NTCPs und das Myr-präS1-Peptid eine gemeinsame Bindungsstelle im NTCP teilen und es so zu einer direkten gegenseitigen kompetitiven Inhibition kommt. Dies würde auch bedeuten, dass die Myr-präS1-Peptide aller hier getesteten Primaten und Fledermaus Hepadnaviren den humanen NTCP im selben Bereich binden. Es wäre aber auch denkbar, dass (2) das Myr-präS1-Peptid und Gallensalze nicht den selben Bereich im NTCP binden. Der beobachtete Effekt könnte dadurch zustande kommen, dass durch die Bindung von Gallensalzmolekülen eine Konformationsänderung im NTCP ausgelöst wird, die das Bindungssepitop des Myr-präS1-Peptids so beeinflusst, dass dessen Bindung nicht mehr möglich ist. Ebenso könnte

auch (3) die Bindung des Myr-präS1-Peptids die Konformation des NTCPs verändern und einen Gallensalztransport so verhindern. Da jedoch noch kein geeignetes 3D-Model des NTCPs bekannt ist, ist es bis heute unklar wo sich diese(s) Bindungsstelle(n) für GS und Natrium-Ionen in dem Protein befinden könnte(n) und wie die Bindung und der Transport von Gallensalzen molekularbiologisch abläuft. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass die Mutation T262M im ASBT des Menschen als Polymorphismus vorkommt, die zu einem Verlust der Reabsorption von GS aus dem Ileum und dadurch zur Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufs der GS führt. Das Krankheitsbild wird als Primäre GS Malabsorption (PBAM) bezeichnet [227]. Außerdem wurde gezeigt, dass der Polymorphismus S267F des NTCPs in bestimmten ethnischen Populationen auftritt. Diese Mutation führt zu keinem bisher bekannten Krankheitsbild, obwohl der GS-Transport über NTCP nicht funktioniert [228]. Es konnte gezeigt werden dass die Mutationen S267F als auch eine Mutation der AS 262 (N262A) des NTCPs in *in vitro* Experimenten zu einem Verlust der Gallensalztransport Funktion sowie der HBV-Suszeptibilität und der Myr-präS1 Peptid Bindung in HepG2-Zellen führen [118]. Dies weist darauf hin, dass die AS 262 (S) und 267 (N) im NTCP essenziell für den Transport von GS sowie für die Bindung und Infektion des HBV sind. Über die genaue Funktion von Natrium für den GS-Transport des NTCPs ist ebenso wenig bekannt. Denkbar wäre, dass sich durch die Bindung eines Natrium Moleküls die Konformation des NTCPs verändert und der gemeinsame Transport mit dem Gallensalmolekül initiiert wird. Interessanterweise führt eine Natrium Depletion der Zellen nicht nur zur Inhibition des Gallensalztransports, sondern verhindert auch eine HBV-Infektion (s. Abbildung 21 C). In einer Studie von Nien-Jen Hu et. al. konnte anhand von Kristall-Strukturen eines bakteriellen Homologs des ASBTs Natrium Bindungsstellen abgeleitet werden [118, 229]. Die daraufhin eingefügten Mutationen Q68A, S105A/N106A, E257A und Q261A im NTCP führten zu einem nahezu vollständigem Verlust des GS-Transports sowie der HDV-/HBV-Suszeptibilität in HepG2-Zellen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bis auf die Mutation S105A/N106A alle Mutationen eine starke bis vollständige Reduktion der NTCP Bindung des Myr-präS1 Peptids bewirken [118]. Die beschriebenen AS scheinen somit eine wichtige Funktion für die Bindung von Natriummolekülen im NTCP und somit für den GS-Transport, für die HBV-Infektion und teilweise für die HBV-Bindung zu haben. Für zukünftige Studien wäre es interessant, weitere Informationen über die Struktur und Konformationen des NTCPs zu erhalten.

Eine weitere Erklärung wäre, dass (4) durch die Inkubation der Zellen mit Gallensalzen oder Myr-präS1-Peptiden z.B. ein endozytotischer Prozess initiiert wird, durch den der NTCP internalisiert wird und nicht mehr für den Gallensalztransport, die Myr-präS1-Peptid Bindung sowie für eine HBV-Infektion zur Verfügung steht. Tatsächlich konnte dieser Effekt (4) in verschiedenen Publikationen für die natürlichen Gallensalze Taurolithocholat und Taurochenodeoxychololat beschrieben werden [118, 230]. Im Gegenteil zu allen anderen hier getesteten Substanzen konnte B. Döring für hohe

Konzentrationen von 400 und 100 μM GUDC sowie 100 μM Ezetimibe zeigen, dass auch nach einem anschließenden zehnmütigen Waschen der Zellen, der Gallensalztransport inhibiert bleibt [119]. Daher kann man davon ausgehen, dass diese beiden Substanzen eine Verringerung des NTCPs in der Plasmamembran der Zellen bewirken. Denkbar wäre, dass es sich dabei um einen zellulären „Feedback“-Regulationsmechanismus handelt, durch den die Zelle sich mit einer Endozytose des NTCPs vor zu hohen zytoplasmatischen Konzentrationen dieser Substanzen geschützt wird. Bei allen weiteren hier getesteten Gallensalzen war jedoch keine Verringerung des membranständigen NTCPs zu beobachten [119]. Daher kann zusammenfassend gefolgert werden, dass die Bindung von Gallensalzen als NTCP-Substrate mit der Myr-präS1-Peptid Bindung interferiert und somit eine HBV-Infektion verhindern kann. Diese Beobachtungen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen gemacht (Ni. Y. et. al., 2013; Yan et. al., 2014). Wie auch in diesen Arbeiten dargestellt, weisen die NTCP-Substrate TUDC und UDC mit 20-50 μM das größte inhibitorische Potenzial für eine HBV-Infektion und der Myr-präS1-Peptid Bindung von NTCP-exprimierenden Hepatomzellen auf (s. Kapitel 5.2.1.6 u. 5.2.1.7). Obwohl in dieser Studie für PTH eine inhibitorische Konzentrationen von mindestens 100 μM TUDC festgestellt wurde, konnte abweichend dazu in der Studie von Yan et. al. (Yan et. al., 2014) ein stärkerer inhibitorischer Effekt (20 μM) auf die HBV-Infektion gezeigt werden. Das UDC wird bereits als geprüftes Medikament für die Behandlung verschiedener Lebererkrankungen wie z.B. einer primären biliären Zirrhose (PBC) oder von Cholesterin-Gallensteinen eingesetzt. In den Studien zu diesem Medikament konnte kein zytotoxischer Effekt bis zu 500 μM nachgewiesen werden [231]. Dies entspricht ungefähr dem mikromolaren Bereich der im Rahmen dieser Arbeit auf Zytotoxizität getestet wurde. Anhand der Tabelle 21 im Anhang ist zu erkennen, dass bei den meisten getesteten Gallensalzen sowie Ezetimibe erste leichte zytotoxische Effekte bei einer Konzentration von 400 μM in PTH zu erkennen sind. Für die NTCP-HepG2 Zelllinie hingegen ist bei der hier verwendeten maximalen Konzentration von 400 μM noch keine Zytotoxizität festzustellen. Da anhand der bisher veröffentlichten *in vitro* Daten eine vollständige Inhibition der HBV-Infektion bei einer Konzentration von 25-100 μM denkbar wäre, sollte dieses Medikament bei einer Entwicklung neuer Behandlungsstrategien von HBV infizierten Patienten oder zur Postexpositionsprophylaxe beachtet werden. Allerdings beträgt die bisher angewandte Standarddosierung 12-15 mg UDC pro Kilogramm Körpergewicht, wodurch UDC mit einer Plasmakonzentration von 17 μM zum prädominanten Gallensalz der enterohepatischen Gallensalzzirkulation wird (24). Ob unter diesen Bedingungen eine HBV-Infektion verhindert werden könnte ist noch unklar.

Das Wissen über die Strukturen der bisher bekannten Substanzen, die die NTCP-Transportfunktion beeinflussen, könnte in zukünftigen Studien verwendet werden, um Moleküle zu finden, welche optimalerweise eine HBV-Infektion in niedrigen Konzentrationen verhindern und gleichzeitig die enterohepatische Zirkulation von Gallensalzen nur minimal beeinflussen. Zu den potenziellen

Substanzen zählen eine Vielzahl von Gallensalzen sowie z.B. die chemischenn Inhibitoren Ezetimibe, Cyclosporin A (CsA), Propanolol, Bumetanide, Simvastatine, Irbesartan, Doxazosin und viele Andere [232]. Für die Lipid senkende Substanz und spezifischen Inhibitor des intestinalen Niemann- Pick C1 ähnlichen Cholesterol Transporters Ezetimibe, konnte auch eine signifikante Inhibition des NTCP Transports mit einem K_i 25 μ M gezeigt werden [182]. Anhand von Ezetimibe wurde in dieser Arbeit beispielhaft gezeigt, wie ein potenzieller Einfluss auf die HBV-Infektion *in vitro* mit PTH, PHH und NTCP-HepG2 Zellen getestet werden kann. Sowohl für den TC-Transport als auch für die präS1-Peptidbindung und HBV Infektion konnte in allen Zellkulturen eine signifikante Inhibition durch Ezetimibe (100 μ M) festgestellt werden (s. Abbildung 21 bis Abbildung 23). Wie schon diskutiert, werden diese Effekte zumindest teilweise durch eine Ezetimibe induzierte unspezifische Internalisierung des NTCPs ins Zytoplasma der Zellen hervorgerufen. Jedoch steigt die Ezetimibe-Plasmakonzentration bei Standardbehandlungen nur bis auf maximal 15 nM [233]. Dieser Wert liegt weit unterhalb der Konzentration für den hier gezeigten inhibitorischen Effekt auf HBV. Aus diesen Gründen scheint Ezetimibe nicht das richtige Medikament zu sein, um eine HBV-Infektion zu behandeln bzw. um vor einer HBV-Infektion zu schützen. In anderen kürzlich erschienenen Studien konnten bereits gezeigt werden, dass auch das Immunsuppressivum CsA die Peptidbindung an NTCP und eine HBV Infektion erfolgreich inhibieren kann [114, 117]. In beiden Studien wurde eine inhibitorische CsA Konzentration von 4-8 μ M festgestellt um eine HBV-Infektion *in vitro* effektiv hemmen zu können. Da therapeutisch nur eine Konzentration von ca. 0,8 μ M CsA in der Leber erreicht wird [234] und höhere Konzentrationen hepatotoxische Effekte bewirken können [235], scheint CsA ebenfalls kein geeigneter Wirkstoff für die HBV-Therapie bzw. HBV-Postexpositionsprophylaxe zu sein. Anders als mit Gallensalzen wurde ein auf Myr-präS1-Peptiden basierendes Medikament namens Myrcludex B auch schon anhand von *in vivo* Experimenten auf das inhibitorische Potenzial einer HBV-Infektion getestet. Hier konnte in niedrigen nanomolaren Konzentrationen eine HBV-Infektion und eine Ausbreitung des Virus in der Leber von uPa-SCID-Mäusen verhindert werden und somit ist dies ein vielversprechende Präparat für die Postexpositionsprophylaxe oder die Therapie von HBV positiven Patienten [156, 236]. Allerdings kann nach den hier sowie in weiteren Publikationen veröffentlichten Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden, dass eine therapeutische Behandlung mit Myrcludex B die NTCP-Transportaktivität blockiert und so einen bedeutsamen Einfluss auf den enterohepatischen Kreislauf von Gallensalzen im Patienten hat. Zusammenfassend kann anhand der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass eine erfolgreiche Behandlung von HBV-Patienten mit niedrigmolekularen Substanzklassen wie Gallensalzen denkbar wäre und somit eine Alternative zu therapeutischen Behandlung mit Myr-präS1-Peptid Derivaten darstellen könnte. Dies ermöglicht komplett neue Ansätze zur Entwicklung neuartiger Behandlungsstrategien von HBV-Infektionen.

Diskussion

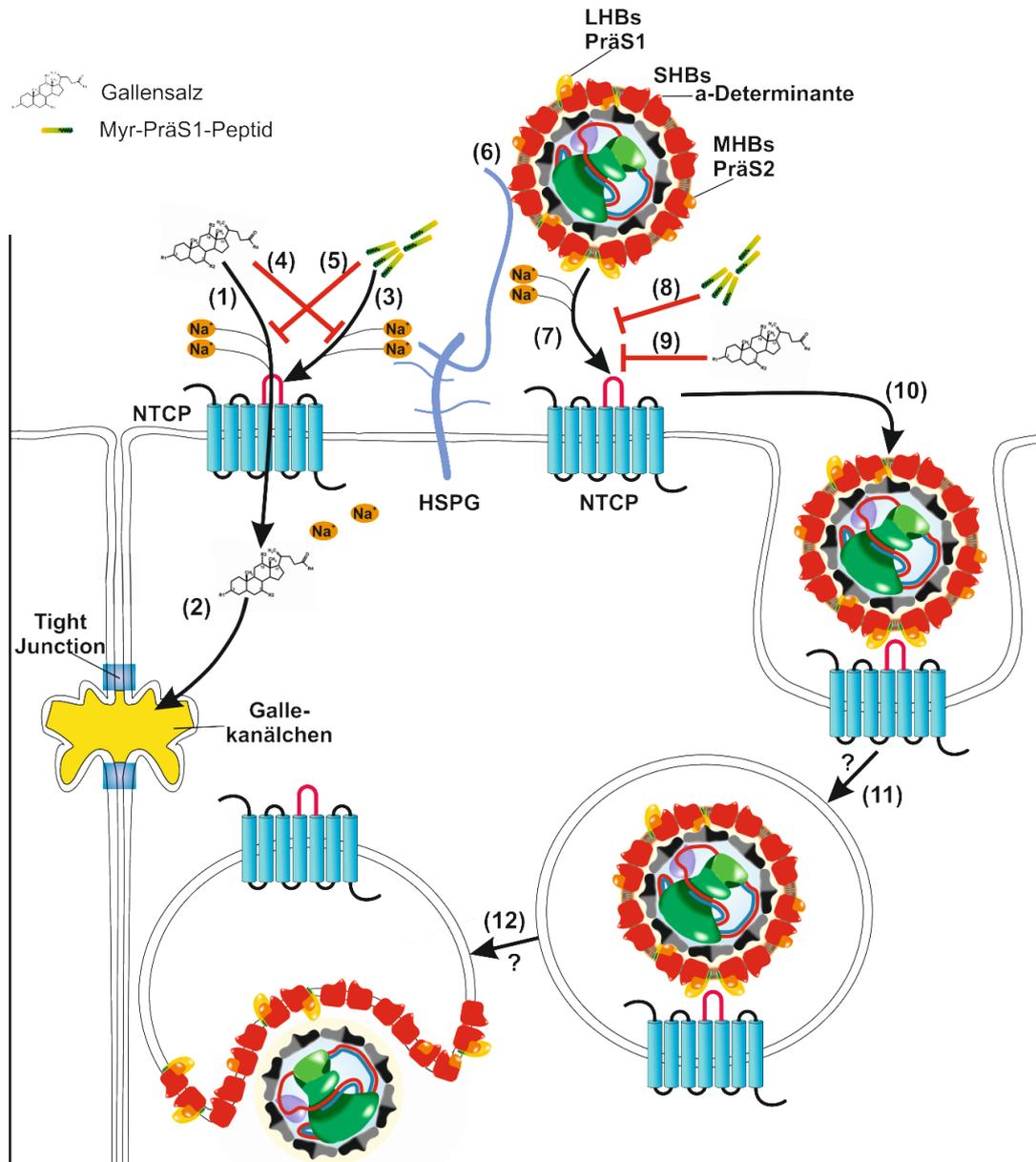


Abbildung 27: Funktionen des NTCPs als Gallensalz-Transporter und hoch-affiner Rezeptor des HBV. (1) Durch die Transportaktivität des NTCPs wird ein Gallensalmolekül zusammen mit zwei Natriumionen aus dem sinusoidalen Blut über die basolaterale Membran in das Zytoplasma von Hepatozyten transportiert. (2) Die Gallensalze gelangen zur apikalen Membran des Hepatozyten, wo sie durch spezielle Transporter wie der Bile Salt Export Pump (BSEP) oder dem Multidrug resistance-associated Protein 2 (MRP2) in das Lumen eines Gallekanälchens transportiert werden. Von dort gelangen sie mit der Galle in den Darm, wo sie aktiv wieder in das Blut aufgenommen werden. Damit schließt sich der enterohepatische Kreislauf der Gallensalze. (3) Durch die Bindung von artifiziellen HBV Myr-präS1-Peptiden an den NTCP kann dessen (5) Transportaktivität blockiert sowie eine (8) Infektion des Hepatozyten mit HBV verhindert werden. (1) Ein Überschuss an Gallensalzen inhibiert eine (4) Bindung des Myr-präS1-Peptids an den NTCP, bzw. eine (9) HBV-Infektion von Hepatozyten. Nach Infektion mit HBV gelangt das Virus über die Blutbahn in die Sinusoide der Leber. (6) Im Disse-Raum zwischen der basolateralen Membran der Hepatozyten und dem fenestrierten Endothel des Sinusoids bindet das Virus mit der HBsAg-Schleife reversibel an Heparansulfatproteoglykane (HSPG) der Leberzellen. (7) Dies ermöglicht die nachfolgende hochaffine Bindung der viralen PräS1-Domäne an den NTCP. (10 -11) Die Aufnahme des Virus erfolgt mutmaßlich über eine gemeinsame Endozytose des HBV-NTCP-Komplexes in zyttoplasmatische Vesikel. (12) Aus diesem Vesikel oder einem anderen zellulären Kompartiment wird das Corepartikel vermutlich durch eine Fusion der viralen Lipidhülle mit der zellulären Lipidmembran in das Zytoplasma des Hepatozyten entlassen. (1, 3 u. 7). Sowohl der NTCP-spezifische Gallensalztransport als auch die NTCP-spezifische HBV Myr-präS1-Peptid Bindung und HBV-Infektion sind abhängig von Natriumionen

7. Zusammenfassung

Die Dissertation gliedert sich in zwei klar unterscheidbare Teile, die jedoch in einem engen methodischen und thematischen Zusammenhang stehen.

7.1 Charakterisierung des zoonotischen Potenzials neu entdeckter Orthohepadnaviren aus Fledermäusen

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) des Menschen ist der Erreger der Hepatitis B und ein Vertreter der viralen Familie der Hepadnaviridae, die sich durch einen engen Wirts- und Organotropismus auszeichnet. Die Avihepadnaviren infizieren jeweils einzelne Vogelarten, während die Orthohepadnaviren ihre Wirte innerhalb der Säugetiere haben. Erst 2013 wurden weitere Orthohepadnavirusarten entdeckt, nun überraschenderweise in verschiedenen Spezies der Säugetierordnung Chiroptera (Fledertiere). Dazu gehören die drei hier beschriebenen Fledermaus (engl. Bat)-Orthohepadnaviren (BATHBV), der Wirtstierarten *tent making bats* TBHBV, *horseshoe bats* HBHBV, *roundleaf bats* RBHBV und das LBHBV der *long-fingered bat*. Phylogenetisch gruppieren die BATHBVs zwischen den Viren der Nagetiere (Rodentia) und der Primaten und Menschen. Insbesondere die Gesamtgenom-Sequenz des BATHBV der als *tent-making bat* bezeichneten Neuwelt-Fledermaus, *Uroderma bilobatum*, (TBHBV) ist am engsten mit dem WMHBV des Neuwelt Wollaffen und den humanen HBV Genotypen (F und H) aus Mittel- und Südamerika verwandt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich diese phylogenetischen Verhältnisse auch im zoonotischen Potenzial der Viren widerspiegeln. Während intermediäre und späte Schritte (Proteinexpression, Genom-Replikation, Sekretion) im hepadnaviralen Replikationszyklus von allen BATHBV in humanen Hepatozytenkulturen mit ähnlicher Effizienz stattfinden, konnten wesentliche Unterschiede innerhalb der frühen Infektionsschritte festgestellt werden. Eine HBV-Infektion von primären Hepatozyten konnte durch Vorbehandlung mit viralen myristoylierten präS1-analogen Peptiden (Myr-präS1-Peptiden) mit der AS-Sequenz der entsprechenden Virusarten aus verschiedenen Wirtsorganismen inhibiert werden. Während die Myr-präS1-Peptide der Primaten-HBVs (HBV und WMHBV) sowie des TBHBV bei einer ähnlich niedrigen Konzentration (IC₅₀: < 4 nM) eine HBV-Infektion von primären humanen Hepatozyten inhibieren, war die IC₅₀ der Myr-präS1-Peptide des HBHBV und RBHBV um das 57- bzw. 41-fache höher. In Infektionsexperimenten mit Hepatitis-Delta-Viruskonstrukten, die mit den Oberflächenproteinen von HBV, TBHBV, HBHBV und RBHBV pseudotypisiert (d. h. umhüllt) waren, ermöglichten nur die Oberflächenproteine des TBHBV, nicht aber die von HBHBV und RBHBV, eine Infektion von HBV-suszeptiblen Zellen. Die Unterschiede zwischen den HBV- und TBHBV-Oberflächenproteine waren jedoch noch so groß, dass HBV-neutralisierende Antikörper von erfolgreich gegen Hepatitis-B geimpften Personen keine

neutralisierende Wirkung auf die Oberflächenproteine des TBHBV in pseudotypisierten HDV hatten. Daher geht von TBHBV mutmaßlich eine zoonotische Gefährdung aus, gegen die auch die aktuell angewendete Hepatitis-B-Impfung nicht schützt. Die Myr-präS1-Peptide des HBHBV und RBHBV zeigten zwar eine schwache Bindung an humane Hepatozyten und bewirkten bei hohen Konzentrationen eine Inhibition der HBV-Infektion; anhand der hier verwendeten in vitro Infektionssysteme konnte aber kein zoonotisches Potenzial dieser Viren festgestellt werden.

7.2 Wechselwirkungen zwischen den Funktionen des Natrium-abhängigen Taurocholat Cotransporter Polypeptids (NTCP) als HBV-Rezeptor und als Gallensalz-Transporter

Der Leber-spezifische Gallensalztransporter NTCP (SLC10A1) wurde in 2012 als ein funktioneller Rezeptor für HBV und HDV identifiziert. Die Expression des NTCP verschwindet wenige Tage nach Explantation der primären Hepatozyten und fehlt bei Hepatomzellen (z.B. HepG2) ganz. Jedoch können Hepatomzellen mit einem Expressionsvektor für NTCP transfiziert werden und sind dann infizierbar. Im humanen NTCP sind die AS 157-165 sowie 84-87 essenziell für eine HBV- und HDV-Infektion. Auf der viralen Seite sind die 48 N-terminalen AS der präS1-Domäne des großen HBV-Oberflächenproteins sowie deren N-terminale Myristoylierung und besonders die AS 9-15 der präS1-Domäne für die HBV-Bindung und für eine erfolgreichen Infektion von Hepatozyten essenziell. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die dem NTCP auf Sequenz-, Struktur- und Funktionsebene sehr ähnlichen Transporter der SLC10 Familie (der Ileum spezifische ASBT bzw. SLC10A2, und der Gonaden-spezifischen SOAT bzw. SLC10A6) keine HBV-Suszeptibilität in Hepatomzellen vermitteln. Auch eine Integration der oben beschriebenenen HBV-infektionsrelevanten NTCP-AS-Sequenzen 157-165 sowie 84-87 in die entsprechende Position des ASBT und SOAT bewirkten keine Myr-präS1-Peptidbindung oder HBV-Suszeptibilität. So scheint neben der Speziespezifität auch die Gewebespezifität des HBV durch den NTCP mitbestimmt zu werden. Interessanterweise konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die natürliche Funktion des NTCP als Gallensalztransporter mit der Fähigkeit korreliert, das Myr-präS1-Peptid des HBV zu binden. Dies zeigte sich darin, dass ein Überschuss an Gallensalzen konzentrationsabhängig die Bindung des Myr-präS1-Peptids an den NTCP inhibierte. Umgekehrt behindert die Myr-präS1-Peptid-Bindung den NTCP-spezifischen Gallensalztransport von Hepatozyten. Außerdem wurde gezeigt, dass Natriumionen, die für den Gallensalztransport des NTCP benötigt werden, auch für die Bindung und die Infektion des HBV notwendig sind. Die genauen molekularen Interaktionen, die während der Bindung zwischen der HBV Myr-präS1-Domäne und dem NTCP stattfinden und zu einer Aufnahme des Virus in die Zelle führen, sind noch unbekannt. In dieser Studie konnte jedoch durch konfokale Laser Scanning Mikroskopie erstmals gezeigt werden, dass ein Fluorophor-konjugiertes Myr-präS1-

Ausblick

Peptid (2-48) des HBV bei $<10^{\circ}\text{C}$ spezifisch an NTCP-haltige Membranbereiche von lebenden HepG2-Zellen bindet und dass bei 37°C das Myr-präS1-Peptid zusammen mit dem NTCP langsam innerhalb von 30-60 Min in die Zelle aufgenommen wird. Diese Ergebnisse deuten an, dass das Virus komplexiert mit einem oder mehreren NTCP-Molekülen endozytiert wird.

8. Ausblick

Anhand der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse ergeben sich viele interessante Fragestellungen für eine zukünftige detailliertere Charakterisierung der Speziespezifität und des zoonotischen Potenzials von Hepadnaviren aus Fledermäusen. Wichtig wäre es zu untersuchen, welche Faktoren sowohl auf viraler als auch auf zellulärer Ebene das Wirtsspektrum einzelner Orthohepadnaviren determinieren. Nachdem gezeigt ist, dass der NTCP ein funktioneller Rezeptor der Infektion für HBV, TBHBV und WMHBV ist, wäre zu prüfen ob auch die Ntcp der entsprechenden Wirtsspezies *Rhinolophus alcyone* und *Hipposideros cf. ruber* als funktionelle Rezeptoren von HBHBV und RBHBV dienen. Falls diese Vermutung bestätigt wird, könnten anhand der Expression verschiedener Ntcp aus unterschiedlichen Fledermaus-, Nagetier-, Primaten und anderer Säugetierordnungen ein genaues Wirtsspektrum der verschiedenen Orthohepadnaviren erstellt werden. Durch Klonierung könnten definierte Anteile der verschiedenen NTCPs ausgetauscht werden, die zeigen könnten, welche Domänen des NTCPs für die Speziespezifität verantwortlich sind. Auf ähnliche Weise könnte man auch auf der viralen Seite vorgehen. Hier gibt es für HBV, nicht aber für die anderen Orthohepadnavirusarten, ein detailliertes Wissen über größere Bereiche bis hin zu essenziellen und akzessorischen Domänen bestehend aus wenigen AS, die für die Interaktion mit dem Rezeptor verantwortlich sind. Infektionsversuche mit Orthohepadnaviren oder pseudotypisierten HDV-Konstrukten bei denen diese Bereiche und Domänen zwischen den verschiedenen Viren schrittweise ausgetauscht werden, könnten wichtige Hinweise über die Speziespezifität der Viren liefern. Noch gibt es keine gesicherten Informationen über weitere zelluläre Faktoren, die an den frühen Schritten der orthohepadnaviralen Infektionen bis zur Erzeugung der viralen cccDNA beteiligt sind. Wenn bestimmte hepatische Zelllinien, die die verschiedenen Wirts-spezifischen Ntcp exprimieren nicht für die entsprechenden Viren suszeptibel sind, müssten weitere Spezies-spezifische Faktoren dafür verantwortlich sein. Um dies herauszufinden wäre es hilfreich, Infektionsexperimente mit Ntcp-transfizierten (hepatischen) Fledermaus-Zelllinien durchzuführen. Für eingehendere Untersuchungen müsste ein System etabliert werden mit dem große Mengen vollständig umhüllter viraler Partikel der verschiedenen Orthohepadnavirusarten produziert werden können. Im Rahmen eines bereits laufenden DFG-geförderten Projektes "Ecology and species barriers of emerging bat hepatitis B viruses" (GL595/4-1) des DFG-Schwerpunktprogramms (SPP) 1596 „Ecology and species barriers in emerging viral diseases“ wird weiterhin nach unbekanntem Orthohepadnaviren gesucht, vorrangig in Fledermäusen und Primaten. Neu entdeckte Hepadnaviren könnten dann zukünftig effizient und schnell mit den hier beschriebenen Methoden charakterisiert werden.

Aus den im zweiten Teil dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen resultieren ebenso viele interessante Ansätze für die HBV-Forschung. Bisher werden für die Behandlung von HBV-infizierten Patienten

Ausblick

ausschließlich Nukleosid/Nukleotid Analoga sowie Interferon- α zur Unterdrückung der viralen Replikation eingesetzt. Eine genauere Charakterisierung der molekularen Interaktionen zwischen dem NTCP und den HBV-Oberflächenproteinen sowie mit Gallensalzen und Natriumionen wäre ein wichtiger Schritt für die Entwicklung zukünftiger antiviraler Medikamente. Größte Priorität hat dabei das Erarbeiten von detaillierten Informationen über die Bereiche des NTCPs, die an der Bindung des Virus sowie der Bindung von Gallensalzen und der Natriumatome beteiligt sind. Durch einen Austausch bestimmter Bereiche im NTCP und das gezielte Einführen von Mutationen sowie einer anschließenden funktionellen Analyse dieser rekombinanten NTCPs könnte diese Wissenslücke geschlossen werden.

9. Summary

This PhD thesis consists of two well distinguishable parts which are, however, closely connected by their methods and topics.

9.1 Characterization of the zoonotic potential from newly discovered orthohepadnaviruses of bats

The human hepatitis B virus (HBV) is the infectious agent of hepatitis B and represents the prototype of the viral family of *Hepadnaviridae* that is characterized by a narrow host- and organ specificity. Within this family, the Avihepadnaviruses infect specific species of birds, while mammals are the host reservoir for the Orthohepadnaviruses. In 2013, four new members of Orthohepadnaviruses have been discovered in four different species of the mammalian order of Chiroptera (bats). The BATHBVs belong to their hosts “Tent making Bat” TBHBV, “Horseshoe Bat” HBHBV, “Roundleaf Bat” RBHBV and “Long-fingered Bat” LBHBV. Phylogenetic analyses have shown that the BATHBVs cluster between the Orthohepadnaviruses of the rodents and the human and non-human primates. The highest genomic homology was found between TBHBV of the New World “tent-making bat” *Uroderma bilibatum* and the WMHBV of the New World non-human primate “Woolly Monkey” (*Lagothrix lagotricha*) and human HBV genotypes (F and H) prevailing in Central and South America. In this thesis, a correlation of these phylogenetic characteristics and the zoonotic potential of BHBV was found. While intermediate as well as late replication steps of all BatHBV and HBV take place with similar efficiency in human hepatocytes, clear differences in preS1-domain-dependent early steps of infection could be observed. First, the inhibitory potential of myristoylated (myr-)preS1-peptides derived from the N-terminal domain of the surface proteins of the respective hepadnaviruses on HBV infection was tested. While peptides of the primate HBV and WMHBV and the new world bat TBHBV inhibited HBV-infection of PHH in similar low nanomolar concentrations (IC_{50} : < 4 nM), the IC_{50} of myr-preS1-peptides the old world bats (HBHBV and RBHBV) showed a 57 and 41 fold increase. In infection experiments with HDV, pseudotyped (i. e. enveloped) with surface proteins of HBV, TBHBV, HBHBV or RBHBV, only pseudotyping with surface proteins of HBV as well as TBHBV but not of the HBHBV or RBHBV could mediate HDV-infection of HBV-susceptible cells. However the differences in the surface proteins of HBV and TBHBV were still high enough, that preincubation of the HDV_{TBHBV} inoculum with HBV and HDV neutralizing antibodies from the sera of persons, successfully vaccinated against hepatitis B had no effect on infection of the pseudotyped HDV_{TBHBV}. Thus, the TBHBV should be considered as a zoonotic animal hepadnavirus against which vaccination against HBV does not protect. Although the myr-preS1-peptides of HBHBV and RBHBV weakly bound to membranes of susceptible hepatocytes and cause inhibition of HBV-infection at high concentrations, a zoonotic hazard by these viruses could not be shown by direct infectivity of HBV-susceptible cell cultures.

9.2 Interactions between the functions of the sodium-dependent taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) as HBV receptor and bile salt transporter.

The liver specific bile salt transporter NTCP (SLC10A1) was characterized as a functional receptor for infection of HBV and HDV in 2012. Expression of NTCP declines during several days after plating of primary hepatocytes, while hepatoma cells (i. e. HepG2) show no NTCP-expression at all. A Plasmid-driven expression of NTCP in HepG2 rendered susceptibility for HBV and HDV. The AA positions 157-165 as well as 84-87 of human NTCP have been proven to be essential for HBV- and HDV-infection by. Mandatory for receptor binding and productive infection of hepatocytes are the HBV N-terminal 48 AA of the preS1-domain and especially AA 9-15 as well as the N-terminal myristoylation. The results of this thesis show that also the closest NTCP-relatives of the SLC10 transporter family (ASBT, SLC10A2, located at the apical membrane of enterocytes in the ileum and SOAT, SLC10A6, mainly expressed in pancreas and reproductive organs) with high similarities in sequence, structure and function are not able to mediate HBV-infection after artificial expression in hepatocytes. Even integration of the HBV-infection relevant NTCP-domains (AA 157-165 and 84-87) into appropriate positions of ASBT and SOAT showed no effect on myr-preS1-peptide binding or HBV-susceptibility. This led to the conclusion that in addition to the species specificity, the tissue specificity of HBV might also be mainly determined by NTCP. Interestingly, this study demonstrate that the bile salt transport function of the NTCP correlates with the ability to bind myr-preS1-peptides of HBV. An incubation of the cells with bile salts in excess inhibits myr-preS1-peptide binding to the NTCP in a concentration dependent manner. Vice versa, the binding of HBV myr-preS1-peptide blocks the NTCP-specific bile salt transport into hepatocytes. Furthermore, sodium ions, which are essential for bile salt transport by NTCP, are also essential for HBV binding and infection. Until now, detailed informations about molecular interactions between NTCP and myr-preS1-domain of HBV leading to high affinity binding and subsequent productive uptake of viral particles into the cell are unknown. However, using confocal laser scanning microscopy a specific binding of a fluorophore-coupled myr-preS1-peptide to NTCP enriched membrane domains of living HepG2-cells (< 10°C) followed by a slow uptake of myr-preS1-peptide with NTCP colocalized in cytoplasmatic vesicles (30-60 min 37 °C) could be observed for the first time in this thesis. These results might indicate that endocytosis of HBV requires complexation of the virus with one ore more NTCP-molecules.

10. Literaturverzeichnis

1. Blumberg, B.S., et al., A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med*, 1967. 66(5): p. 924-31.
2. Bayer, M.E., B.S. Blumberg, and B. Werner, Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndrome and hepatitis. *Nature*, 1968. 218(5146): p. 1057-9.
3. Dane, D.S., C.H. Cameron, and M. Briggs, Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, 1970. 1(7649): p. 695-8.
4. Kaplan, P.M., et al., DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol*, 1973. 12(5): p. 995-1005.
5. Robinson, W.S., D.A. Clayton, and R.L. Greenman, DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol*, 1974. 14(2): p. 384-91.
6. Robinson, W.S. and R.L. Greenman, DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J Virol*, 1974. 13(6): p. 1231-6.
7. Rizzetto, M., et al., Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut*, 1977. 18(12): p. 997-1003.
8. Rizzetto, M., et al., Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. *J Infect Dis*, 1980. 141(5): p. 590-602.
9. Rizzetto, M., et al., delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. 77(10): p. 6124-8.
10. Bonino, F., et al., The delta agent: HBsAg particles with delta antigen and RNA in the serum of an HBV carrier. *Hepatology*, 1981. 1(2): p. 127-31.
11. Andrew M.Q. King, M.J.A., Elliot J. Lefkowitz, Eric B. Carstens, *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses : Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, 2012.
12. Robert-Koch-Institut, *Epidemiologisches Bulletin zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland: Virushepatitis B und D im Jahr 2013*. 2013 28. Juli 2014 / Nr. 30.

13. Gripon, P., et al., Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(24): p. 15655-60.
14. Locarnini, S., et al., Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). *Semin Cancer Biol*, 2013. 23(6 Pt B): p. 561-75.
15. Drexler, J.F., et al., Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(40): p. 16151-6.
16. Bonvicino, C.R., M.A. Moreira, and M.A. Soares, Hepatitis B virus lineages in mammalian hosts: potential for bidirectional cross-species transmission. *World J Gastroenterol*, 2014. 20(24): p. 7665-74.
17. Wang, B.J., et al., Establishing a new animal model for hepadnaviral infection: susceptibility of Chinese Marmota-species to woodchuck hepatitis virus infection. *J Gen Virol*, 2011. 92(Pt 3): p. 681-91.
18. Trueba, D., et al., Transmission of ground squirrel hepatitis virus to homologous and heterologous hosts. *Hepatology*, 1985. 5(3): p. 435-9.
19. Vartanian, J.P., et al., Identification of a hepatitis B virus genome in wild chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthi*) from East Africa indicates a wide geographical dispersion among equatorial African primates. *J Virol*, 2002. 76(21): p. 11155-8.
20. Njouom, R., et al., Detection and characterization of hepatitis B virus strains from wild-caught gorillas and chimpanzees in Cameroon, Central Africa. *Infect Genet Evol*, 2010. 10(6): p. 790-6.
21. Sall, A.A., et al., Frequent infection of *Hylobates pileatus* (pileated gibbon) with species-associated variants of hepatitis B virus in Cambodia. *J Gen Virol*, 2005. 86(Pt 2): p. 333-7.
22. Lyons, S., et al., Species association of hepatitis B virus (HBV) in non-human apes; evidence for recombination between gorilla and chimpanzee variants. *PLoS One*, 2012. 7(3): p. e33430.
23. Kramvis, A., Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology*, 2014. 57(3-4): p. 141-50.
24. Schaefer, S., Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol*, 2007. 13(1): p. 14-21.

Literaturverzeichnis

25. Drexler, J.F., et al., Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J Virol*, 2012. 86(17): p. 9134-47.
26. Drexler, J.F., et al., Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat Commun*, 2012. 3: p. 796.
27. He, B., et al., Hepatitis virus in long-fingered bats, Myanmar. *Emerg Infect Dis*, 2013. 19(4): p. 638-40.
28. Summers, J., J.M. Smolec, and R. Snyder, A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978. 75(9): p. 4533-7.
29. Mason, W.S., G. Seal, and J. Summers, Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol*, 1980. 36(3): p. 829-36.
30. Marion, P.L., et al., A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. 77(5): p. 2941-5.
31. Vaudin, M., et al., The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *J Gen Virol*, 1988. 69 (Pt 6): p. 1383-9.
32. Sprengel, R., E.F. Kaleta, and H. Will, Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol*, 1988. 62(10): p. 3832-9.
33. Naumann, H., et al., Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. *J Gen Virol*, 1993. 74 (Pt 8): p. 1627-32.
34. Norder, H., et al., Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus. *Virology*, 1996. 218(1): p. 214-23.
35. Testut, P., et al., A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J Virol*, 1996. 70(7): p. 4210-9.
36. Li L, D.R., Gu X, Newbold JE, Comparison of the sequences of the Grey Teal, Maned Duck and Duck Hepatitis B Viruses. . *The molecular biology of the Hepatitis B Virus*, 1998. 13.
37. Lanford, R.E., et al., Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(10): p. 5757-61.
38. Chang, S.F., et al., A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA. *Virology*, 1999. 262(1): p. 39-54.

Literaturverzeichnis

39. Warren, K.S., et al., A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J Virol*, 1999. 73(9): p. 7860-5.
40. Grethe, S., et al., Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *J Virol*, 2000. 74(11): p. 5377-81.
41. Pult, I., et al., Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology*, 2001. 289(1): p. 114-28.
42. Prassolov, A., et al., New hepatitis B virus of cranes that has an unexpected broad host range. *J Virol*, 2003. 77(3): p. 1964-76.
43. Bruss, V. and R. Thomssen, Mapping a region of the large envelope protein required for hepatitis B virion maturation. *J Virol*, 1994. 68(3): p. 1643-50.
44. Lambert, C. and R. Prange, Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation. *J Biol Chem*, 2001. 276(25): p. 22265-72.
45. Zlotnick, A., et al., Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein. *Biochemistry*, 1996. 35(23): p. 7412-21.
46. Glebe, D. and C.M. Bremer, The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis*, 2013. 33(2): p. 103-12.
47. Gerlich, W.H., Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology*, 2013. 453(1): p. 239.
48. Hruska, J.F., et al., Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction. *J Virol*, 1977. 21(2): p. 666-72.
49. Landers, T.A., H.B. Greenberg, and W.S. Robinson, Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *J Virol*, 1977. 23(2): p. 368-76.
50. Summers, J., A. O'Connell, and I. Millman, Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. 72(11): p. 4597-601.
51. Sattler, F. and W.S. Robinson, Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *J Virol*, 1979. 32(1): p. 226-33.
52. Will, H., et al., Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol*, 1987. 61(3): p. 904-11.

Literaturverzeichnis

53. Bartenschlager, R. and H. Schaller, The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *EMBO J*, 1988. 7(13): p. 4185-92.
54. Tiollais, P., C. Pourcel, and A. Dejean, The hepatitis B virus. *Nature*, 1985. 317(6037): p. 489-95.
55. Locarnini, S., et al., Cellular response to conditional expression of the hepatitis B virus precore and core proteins in cultured hepatoma (Huh-7) cells. *J Clin Virol*, 2005. 32(2): p. 113-21.
56. Milich, D.R., Do T cells "see" the hepatitis B core and e antigens differently? *Gastroenterology*, 1999. 116(3): p. 765-8.
57. Xie, Q., et al., Epigenetic silencing of SFRP1 and SFRP5 by hepatitis B virus X protein enhances hepatoma cell tumorigenicity through Wnt signaling pathway. *Int J Cancer*, 2014. 135(3): p. 635-46.
58. Xu, C., et al., Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, 2014. 345(2): p. 216-22.
59. Nasr, A.A.E.W.A.A.E., Use of peptide microarrays for mapping viral B cell epitopes. *Dissertation*, 2011.
60. Schulze, A., P. Gripon, and S. Urban, Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology*, 2007. 46(6): p. 1759-68.
61. Sureau, C. and J. Salisse, A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatology*, 2013. 57(3): p. 985-94.
62. Leistner, C.M., S. Gruen-Bernhard, and D. Glebe, Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol*, 2008. 10(1): p. 122-33.
63. Le Duff, Y., M. Blanchet, and C. Sureau, The pre-S1 and antigenic loop infectivity determinants of the hepatitis B virus envelope proteins are functionally independent. *J Virol*, 2009. 83(23): p. 12443-51.
64. Schmitt, S., et al., Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus. *J Gen Virol*, 2004. 85(Pt 7): p. 2045-53.
65. Heermann, K.H., et al., Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol*, 1984. 52(2): p. 396-402.

66. Le Seyec, J., et al., Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J Virol*, 1999. 73(3): p. 2052-7.
67. Chouteau, P., et al., A short N-proximal region in the large envelope protein harbors a determinant that contributes to the species specificity of human hepatitis B virus. *J Virol*, 2001. 75(23): p. 11565-72.
68. Barrera, A., et al., Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain involved in receptor recognition. *J Virol*, 2005. 79(15): p. 9786-98.
69. Blanchet, M. and C. Sureau, Infectivity determinants of the hepatitis B virus pre-S domain are confined to the N-terminal 75 amino acid residues. *J Virol*, 2007. 81(11): p. 5841-9.
70. Bruss, V., et al., Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity. *Virology*, 1996. 218(2): p. 396-9.
71. Gripon, P., et al., Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology*, 1995. 213(2): p. 292-9.
72. Glebe, D., et al., Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology*, 2005. 129(1): p. 234-45.
73. Urban, S. and P. Gripon, Inhibition of duck hepatitis B virus infection by a myristoylated pre-S peptide of the large viral surface protein. *J Virol*, 2002. 76(4): p. 1986-90.
74. Schulze, A., et al., Fine mapping of pre-S sequence requirements for hepatitis B virus large envelope protein-mediated receptor interaction. *J Virol*, 2010. 84(4): p. 1989-2000.
75. Engelke, M., et al., Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site. *Hepatology*, 2006. 43(4): p. 750-60.
76. Yan, H., et al., Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife*, 2012. 1: p. e00049.
77. Gripon, P., I. Cannie, and S. Urban, Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol*, 2005. 79(3): p. 1613-22.
78. Glebe, D. and S. Urban, Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol*, 2007. 13(1): p. 22-38.
79. Wu, H.N., et al., Human hepatitis delta virus RNA subfragments contain an autocleavage activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(6): p. 1831-5.

Literaturverzeichnis

80. Wang, K.S., et al., Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. *Nature*, 1986. 323(6088): p. 508-14.
81. Branch, A.D., et al., An ultraviolet-sensitive RNA structural element in a viroid-like domain of the hepatitis delta virus. *Science*, 1989. 243(4891): p. 649-52.
82. Ryu, W.S., et al., Ribonucleoprotein complexes of hepatitis delta virus. *J Virol*, 1993. 67(6): p. 3281-7.
83. Gudima, S., et al., Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA. *J Virol*, 2002. 76(8): p. 3709-19.
84. Dingle, K., et al., Electrophoretic analysis of the ribonucleoproteins of hepatitis delta virus. *J Virol Methods*, 1998. 75(2): p. 199-204.
85. Weiner, A.J., et al., 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. *J Virol*, 1988. 62(2): p. 594-9.
86. Taylor, J.M., The structure and replication of hepatitis delta virus. *Annu Rev Microbiol*, 1992. 46: p. 253-76.
87. Zheng, H., et al., Editing on the genomic RNA of human hepatitis delta virus. *J Virol*, 1992. 66(8): p. 4693-7.
88. Casey, J.L. and J.L. Gerin, Hepatitis D virus RNA editing: specific modification of adenosine in the antigenomic RNA. *J Virol*, 1995. 69(12): p. 7593-600.
89. Lazinski, D.W. and J.M. Taylor, Relating structure to function in the hepatitis delta virus antigen. *J Virol*, 1993. 67(5): p. 2672-80.
90. Xia, Y.P., et al., Characterization of nuclear targeting signal of hepatitis delta antigen: nuclear transport as a protein complex. *J Virol*, 1992. 66(2): p. 914-21.
91. Chou, H.C., et al., Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA. *J Virol*, 1998. 72(5): p. 3684-90.
92. Alves, C., N. Freitas, and C. Cunha, Characterization of the nuclear localization signal of the hepatitis delta virus antigen. *Virology*, 2008. 370(1): p. 12-21.

Literaturverzeichnis

93. Lin, J.H., et al., Characterization of hepatitis delta antigen: specific binding to hepatitis delta virus RNA. *J Virol*, 1990. 64(9): p. 4051-8.
94. Chang, F.L., et al., The large form of hepatitis delta antigen is crucial for assembly of hepatitis delta virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(19): p. 8490-4.
95. Ryu, W.S., M. Bayer, and J. Taylor, Assembly of hepatitis delta virus particles. *J Virol*, 1992. 66(4): p. 2310-5.
96. Lee, C.Z., P.J. Chen, and D.S. Chen, Large hepatitis delta antigen in packaging and replication inhibition: role of the carboxyl-terminal 19 amino acids and amino-terminal sequences. *J Virol*, 1995. 69(9): p. 5332-6.
97. Sureau, C., B. Guerra, and R.E. Lanford, Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. *J Virol*, 1993. 67(1): p. 366-72.
98. Schaefer S., Glebe D., Gerlich W.H. (2010) Hepatitis-B-Virus (Hepadnaviridae). In: Doerr, H.W. Gerlich, W. H. (Hsgb.) *Medizinische Virologie* 2. Aufl. Thieme Verlag Stuttgart, S. 345-372
99. Wynne, J.W. and L.F. Wang, Bats and viruses: friend or foe? *PLoS Pathog*, 2013. 9(10): p. e1003651.
100. Watson, D.C., et al., Epidemiology of Hantavirus infections in humans: a comprehensive, global overview. *Crit Rev Microbiol*, 2014. 40(3): p. 261-72.
101. Sharp, P.M. and B.H. Hahn, Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2011. 1(1): p. a006841.
102. Hourfar, M.K., et al., Experience of German Red Cross blood donor services with nucleic acid testing: results of screening more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus. *Transfusion*, 2008. 48(8): p. 1558-66.
103. Beasley, R.P., et al., Hepatitis B immune globulin (HBIG) efficacy in the interruption of perinatal transmission of hepatitis B virus carrier state. Initial report of a randomised double-blind placebo-controlled trial. *Lancet*, 1981. 2(8243): p. 388-93.
104. Szmunes, W., et al., Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States. *N Engl J Med*, 1980. 303(15): p. 833-41.
105. Harford, N., et al., Expression of hepatitis B surface antigen in yeast. *Dev Biol Stand*, 1983. 54: p. 125-30.

106. Valenzuela, P., et al., Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*, 1982. 298(5872): p. 347-50.
107. WHO, Hepatitis B Fact sheet N°204. July 2014.
108. Baumert, T.F., R. Thimme, and F. von Weizsacker, Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, 2007. 13(1): p. 82-90.
109. Chisari, F.V., Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest*, 1997. 99(7): p. 1472-7.
110. Chisari, F.V. and C. Ferrari, Hepatitis B virus immunopathology. *Springer Semin Immunopathol*, 1995. 17(2-3): p. 261-81.
111. Ganem, D. and A.M. Prince, Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*, 2004. 350(11): p. 1118-29.
112. Chulanov, V.P., et al., Kinetics of HBV DNA and HBsAg in acute hepatitis B patients with and without coinfection by other hepatitis viruses. *J Med Virol*, 2003. 69(3): p. 313-23.
113. Niederau, C., et al., Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 1996. 334(22): p. 1422-7.
114. Nkongolo, S., et al., Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor. *J Hepatol*, 2014. 60(4): p. 723-31.
115. Iwamoto, M., et al., Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. 443(3): p. 808-13.
116. Ni, Y., et al., Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology*, 2014. 146(4): p. 1070-83.
117. Watashi, K., et al., Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Hepatology*, 2014. 59(5): p. 1726-37.
118. Yan, H., et al., Viral entry of hepatitis B and D viruses and bile salts transportation share common molecular determinants on sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J Virol*, 2014. 88(6): p. 3273-84.

119. König, A., et al., Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes. *J Hepatol*, 2014 Oct;61(4):867-75.
120. Kott, N., Uptake mechanism of Hepatitis B Virus into susceptible primary hepatocyte cultures. Dissertation 2010; Fachbereich Biologie und Chemie, Justus Liebig Universität Gießen.
121. Rodriguez-Crespo, I., et al., Phospholipid interactions of the putative fusion peptide of hepatitis B virus surface antigen S protein. *J Gen Virol*, 1995. 76 (Pt 2): p. 301-8.
122. Rodriguez-Crespo, I., et al., Structural properties of the putative fusion peptide of hepatitis B virus upon interaction with phospholipids. Circular dichroism and Fourier-transform infrared spectroscopy studies. *Eur J Biochem*, 1996. 242(2): p. 243-8.
123. Rabe, B., D. Glebe, and M. Kann, Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events. *J Virol*, 2006. 80(11): p. 5465-73.
124. Rabe, B., et al., Nuclear entry of hepatitis B virus capsids involves disintegration to protein dimers followed by nuclear reassociation to capsids. *PLoS Pathog*, 2009. 5(8): p. e1000563.
125. Schmitz, A., et al., Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket. *PLoS Pathog*, 2010. 6(1): p. e1000741.
126. Kann, M., et al., Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, 1999. 145(1): p. 45-55.
127. Köck, J. and H.J. Schlicht, Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J Virol*, 1993. 67(8): p. 4867-74.
128. Bock, C.T., et al., Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes*, 1994. 8(3): p. 215-29.
129. Rall, L.B., et al., Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, 1983. 3(10): p. 1766-73.
130. Qiao, L., et al., SREBP-1a activation by HBx and the effect on hepatitis B virus enhancer II/core promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. 432(4): p. 643-9.

131. Choi, B.H., G.T. Park, and H.M. Rho, Interaction of hepatitis B viral X protein and CCAAT/enhancer-binding protein alpha synergistically activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter. *J Biol Chem*, 1999. 274(5): p. 2858-65.
132. Junker-Niepmann, M., R. Bartenschlager, and H. Schaller, A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J*, 1990. 9(10): p. 3389-96.
133. Bartenschlager, R. and H. Schaller, Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J*, 1992. 11(9): p. 3413-20.
134. Seifer, M., S. Zhou, and D.N. Strandberg, A micromolar pool of antigenically distinct precursors is required to initiate cooperative assembly of hepatitis B virus capsids in *Xenopus* oocytes. *J Virol*, 1993. 67(1): p. 249-57.
135. Summers, J. and W.S. Mason, Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*, 1982. 29(2): p. 403-15.
136. Tuttleman, J.S., C. Pourcel, and J. Summers, Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell*, 1986. 47(3): p. 451-60.
137. Sells, M.A., et al., Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. *J Virol*, 1988. 62(8): p. 2836-44.
138. Wu, T.T., et al., In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway. *Virology*, 1990. 175(1): p. 255-61.
139. Lambert, C., T. Doring, and R. Prange, Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J Virol*, 2007. 81(17): p. 9050-60.
140. Glebe, D. and A. König, Molecular virology of hepatitis B virus and targets for antiviral intervention. *Intervirology*, 2014. 57(3-4): p. 134-40.
141. Tavanez, J.P., et al., Hepatitis delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *RNA*, 2002. 8(5): p. 637-46.
142. Hughes, S.A., H. Wedemeyer, and P.M. Harrison, Hepatitis delta virus. *Lancet*, 2011. 378(9785): p. 73-85.
143. Li, Y.J., et al., RNA-templated replication of hepatitis delta virus: genomic and antigenomic RNAs associate with different nuclear bodies. *J Virol*, 2006. 80(13): p. 6478-86.

Literaturverzeichnis

144. Yamaguchi, Y., et al., Stimulation of RNA polymerase II elongation by hepatitis delta antigen. *Science*, 2001. 293(5527): p. 124-7.
145. Taylor, J.M., Structure and replication of hepatitis delta virus RNA. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006. 307: p. 1-23.
146. Chang, M.F., C.J. Chen, and S.C. Chang, Mutational analysis of delta antigen: effect on assembly and replication of hepatitis delta virus. *J Virol*, 1994. 68(2): p. 646-53.
147. Polson, A.G., B.L. Bass, and J.L. Casey, RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase. *Nature*, 1996. 380(6573): p. 454-6.
148. Lee, C.H., et al., 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. *J Biol Chem*, 2001. 276(11): p. 8142-8.
149. Wang, Y.H., et al., Novel nuclear export signal-interacting protein, NESI, critical for the assembly of hepatitis delta virus. *J Virol*, 2005. 79(13): p. 8113-20.
150. Glenn, J.S., et al., Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. *Science*, 1992. 256(5061): p. 1331-3.
151. Wang, C.J., et al., Small-form hepatitis B surface antigen is sufficient to help in the assembly of hepatitis delta virus-like particles. *J Virol*, 1991. 65(12): p. 6630-6.
152. Komla-Soukha, I. and C. Sureau, 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. *J Virol*, 2006. 80(10): p. 4648-55.
153. Bruss, V. and D. Ganem, The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(3): p. 1059-63.
154. Meier, A., et al., Myristoylated PreS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes. *Hepatology*, 2013. 58(1): p. 31-42.
155. Schulze, A., et al., Hepatocyte polarization is essential for the productive entry of the hepatitis B virus. *Hepatology*, 2012. 55(2): p. 373-83.
156. Schieck, A., et al., Hepatitis B virus hepatotropism is mediated by specific receptor recognition in the liver and not restricted to susceptible hosts. *Hepatology*, 2013. 58(1): p. 43-53.

157. Barrera, A., et al., Analysis of host range phenotypes of primate hepadnaviruses by in vitro infections of hepatitis D virus pseudotypes. *J Virol*, 2004. 78(10): p. 5233-43.
158. Walter, E., et al., Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology*, 1996. 24(1): p. 1-5.
159. Su, J.J., [Experimental infection of human hepatitis B virus (HBV) in adult tree shrews]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 1987. 16(2): p. 103-6, 22.
160. Li, Q., M. Ding, and H. Wang, [The infection of hepatitis D virus in adult tupaia]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 1995. 75(10): p. 611-3, 639-40.
161. Yan, R.Q., et al., Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. I. Experimental infection of tree shrews with hepatitis B virus. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1996. 122(5): p. 283-8.
162. Kock, J., et al., Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. *J Virol*, 2001. 75(11): p. 5084-9.
163. Glebe, D., et al., Pre-s1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus. *J Virol*, 2003. 77(17): p. 9511-21.
164. Hantz, O., et al., Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. *J Gen Virol*, 2009. 90(Pt 1): p. 127-35.
165. König, A., Infektionssysteme und Methoden zur Untersuchung der frühen Infektionsschritte des Hepatitis B Virus. Diplomarbeit, 2010. Fachbereich Biologie und Chemie, Justus Liebig Universität Gießen.
166. Li, H., et al., HBV life cycle is restricted in mouse hepatocytes expressing human NTCP. *Cell Mol Immunol*, 2014. 11(2): p. 175-83.
167. Yan, H., et al., Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J Virol*, 2013. 87(14): p. 7977-91.
168. Hediger, M.A., et al., The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pflügers Arch*, 2004. 447(5): p. 465-8.
169. Hagenbuch, B., et al., Expression of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem*, 1990. 265(10): p. 5357-60.

Literaturverzeichnis

170. Hagenbuch, B., et al., Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(23): p. 10629-33.
171. Wong, M.H., et al., Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol Chem*, 1994. 269(2): p. 1340-7.
172. Wong, M.H., P. Oelkers, and P.A. Dawson, Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity. *J Biol Chem*, 1995. 270(45): p. 27228-34.
173. Oelkers, P., et al., Primary bile acid malabsorption caused by mutations in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene (SLC10A2). *J Clin Invest*, 1997. 99(8): p. 1880-7.
174. Meier, P.J. and B. Stieger, Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol*, 2002. 64: p. 635-61.
175. Geyer, J., J.R. Godoy, and E. Petzinger, Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 316(2): p. 300-6.
176. Hagenbuch, B. and P. Dawson, The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch*, 2004. 447(5): p. 566-70.
177. Craddock, A.L., et al., Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol*, 1998. 274(1 Pt 1): p. G157-69.
178. Geyer, J., T. Wilke, and E. Petzinger, The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2006. 372(6): p. 413-31.
179. Stieger, P.J.M.a.B., BILE SALT TRANSPORTERS. *Annu. Rev. Physiol.*, 2002. 64: p. 635-661.
180. Aden, D.P., et al., Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 1979. 282(5739): p. 615-6.
181. Nakabayashi, H., et al., Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res*, 1982. 42(9): p. 3858-63.
182. Dong, Z., S. Ekins, and J.E. Polli, Structure-activity relationship for FDA approved drugs as inhibitors of the human sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Mol Pharm*, 2013. 10(3): p. 1008-19.
183. Seglen, P.O., Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*, 1976. 13: p. 29-83.

Literaturverzeichnis

184. Heijtkink, R.A., et al., Serum HBeAg quantitation during antiviral therapy for chronic hepatitis B. *J Med Virol*, 1997. 53(3): p. 282-7.
185. Salisse, J. and C. Sureau, A function essential to viral entry underlies the hepatitis B virus "a" determinant. *J Virol*, 2009. 83(18): p. 9321-8.
186. Sominskaya, I., et al., Determination of the minimal length of preS1 epitope recognized by a monoclonal antibody which inhibits attachment of hepatitis B virus to hepatocytes. *Med Microbiol Immunol*, 1992. 181(4): p. 215-26.
187. Gudima, S., et al., Primary human hepatocytes are susceptible to infection by hepatitis delta virus assembled with envelope proteins of woodchuck hepatitis virus. *J Virol*, 2008. 82(15): p. 7276-83.
188. Tacke, F., et al., Acute hepatitis B virus infection by genotype F despite successful vaccination in an immune-competent German patient. *J Clin Virol*, 2007. 38(4): p. 353-7.
189. Ponzetto, A., et al., Transmission of the hepatitis B virus-associated delta agent to the eastern woodchuck. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(7): p. 2208-12.
190. Cui, J. and E.C. Holmes, Endogenous hepadnaviruses in the genome of the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) and the evolution of avian hepadnaviruses. *J Virol*, 2012. 86(14): p. 7688-91.
191. Gilbert, C., et al., Endogenous hepadnaviruses, bornaviruses and circoviruses in snakes. *Proc Biol Sci*, 2014. 281(1791): p. 20141122.
192. Hu, X., et al., Identification of hepatitis B virus indigenous to chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(4): p. 1661-4.
193. Starkman, S.E., et al., Geographic and species association of hepatitis B virus genotypes in non-human primates. *Virology*, 2003. 314(1): p. 381-93.
194. Devesa, M., et al., Subgenotype diversity of hepatitis B virus American genotype F in Amerindians from Venezuela and the general population of Colombia. *J Med Virol*, 2008. 80(1): p. 20-6.
195. Arauz-Ruiz, P., et al., Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol*, 2002. 83(Pt 8): p. 2059-73.

Literaturverzeichnis

196. Timm, S.B.a.R.M., Predation by Squirrel Monkeys and Double-toothed Kites on Tent-making bats. *American Journal of Primatology*, 1985. V9: p. P121-127.
197. Wainwright, M., *The Natural History of Costa Rican Mammals*. 2002: p. pp. 131–134.
198. Fooden, J., Stomach Contents and Gastro-Intestinal Proportions in Wild-Shot Guianan Monkeys. *Am J Phys Anthropol*, 1964. 22: p. 227-31.
199. Kamins, A.O., et al., Characteristics and Risk Perceptions of Ghanaians Potentially Exposed to Bat-Borne Zoonoses through Bushmeat. *Ecohealth*, 2014.
200. Simon Mickleburgh, K.W.a.P.R., Bats as bushmeat: a global review. *Oryx*, 2009. Volume 43(Issue 02): p. pp 217-234.
201. Walsh, P.D., et al., Catastrophic ape decline in western equatorial Africa. *Nature*, 2003. 422(6932): p. 611-4.
202. Care for the Wild, P.W., *The Neotropical Bushmeat Crisis and its Impact on Primate Populations* 2007.
203. Tatematsu, K., et al., A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol*, 2009. 83(20): p. 10538-47.
204. Sa-nguanmoo, P., et al., Prevalence, whole genome characterization and phylogenetic analysis of hepatitis B virus in captive orangutan and gibbon. *J Med Primatol*, 2008. 37(6): p. 277-89.
205. Noppornpanth, S., et al., Molecular epidemiology of gibbon hepatitis B virus transmission. *J Gen Virol*, 2003. 84(Pt 1): p. 147-55.
206. Nijman, V., *An Assessment of Trade in Gibbons and Orang-Utans in Sumatra, Indonesia*. Published by TRAFFIC Southeast Asia, 2009.
207. Sa-Nguanmoo, P., et al., Cross-species transmission of gibbon and orangutan hepatitis B virus to uPA/SCID mice with human hepatocytes. *Virus Res*, 2011. 158(1-2): p. 209-15.
208. Ziermann, R. and D. Ganem, Homologous and heterologous complementation of HBV and WHV capsid and polymerase functions in RNA encapsidation. *Virology*, 1996. 219(2): p. 350-6.
209. Liang, D., et al., Parallel decrease of Na(+)-taurocholate cotransport and its encoding mRNA in primary cultures of rat hepatocytes. *Hepatology*, 1993. 18(5): p. 1162-6.

210. Fraczek, J., et al., Primary hepatocyte cultures for pharmaco-toxicological studies: at the busy crossroad of various anti-dedifferentiation strategies. *Arch Toxicol*, 2013. 87(4): p. 577-610.
211. Stieger, B., The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation. *Handb Exp Pharmacol*, 2011(201): p. 205-59.
212. Döring, B., et al., The SLC10 carrier family: transport functions and molecular structure. *Curr Top Membr*, 2012. 70: p. 105-68.
213. Geyer, J., et al., Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *J Biol Chem*, 2007. 282(27): p. 19728-41.
214. Zinchuk, V., O. Zinchuk, and T. Okada, Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochem Cytochem*, 2007. 40(4): p. 101-11.
215. McDonald, J.H. and K.W. Dunn, Statistical tests for measures of colocalization in biological microscopy. *J Microsc*, 2013. 252(3): p. 295-302.
216. Sarkar, S., et al., PKCzeta is required for microtubule-based motility of vesicles containing the ntcp transporter. *Traffic*, 2006. 7(8): p. 1078-91.
217. Vonderheit, A. and A. Helenius, Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS Biol*, 2005. 3(7): p. e233.
218. Stross, C., et al., A dileucine motif is involved in plasma membrane expression and endocytosis of rat sodium taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013. 305(10): p. G722-30.
219. Anwer, M.S., et al., Dephosphorylation of Ser-226 facilitates plasma membrane retention of Ntcp. *J Biol Chem*, 2005. 280(39): p. 33687-92.
220. Stross, C., et al., Protein kinase C induces endocytosis of the sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010. 299(2): p. G320-8.
221. Webster, C.R. and M.S. Anwer, Role of the PI3K/PKB signaling pathway in cAMP-mediated translocation of rat liver Ntcp. *Am J Physiol*, 1999. 277(6 Pt 1): p. G1165-72.

222. McConkey, M., et al., Cross-talk between protein kinases Czeta and B in cyclic AMP-mediated sodium taurocholate co-transporting polypeptide translocation in hepatocytes. *J Biol Chem*, 2004. 279(20): p. 20882-8.
223. Mercer, J. and A. Helenius, Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol*, 2009. 11(5): p. 510-20.
224. Meier, A., Visualization and Characterization of HBV Receptor Interactions. Doktorarbeit, Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2010.
225. Mercer, J. and A. Helenius, Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science*, 2008. 320(5875): p. 531-5.
226. Marechal, V., et al., Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J Virol*, 2001. 75(22): p. 11166-77.
227. Peter Oelkers, L.C.K., James E. Heubi and Paul A. Dawson, Primary Bile Acid Malabsorption Caused by Mutations in the Ileal Sodium-dependent Bile Acid Transporter Gene (SLC10A2). *J. Clin. Invest.*, 1997. 99: p. 1880–1887.
228. Richard H. Ho, B.F.L., Richard L. Roberts, Woon Lee, and Richard B. Kim, Ethnicity-dependent Polymorphism in Na-taurocholate Cotransporting Polypeptide (SLC10A1) Reveals a Domain Critical for Bile Acid Substrate Recognition. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2004. 279: p. 7213–7222.
229. Nien-Jen Hu, So Iwata, Alexander D. Cameron and David Drew, Crystal structure of a bacterial homologue of the bile acid sodium symporter ASBT. *Nature*, 2011. 478.
230. Mühlfeld, S., et al., Short-term feedback regulation of bile salt uptake by bile salts in rodent liver. *Hepatology*, 2012. 56(6): p. 2387-97.
231. Poupon, R., Ursodeoxycholic acid and bile-acid mimetics as therapeutic agents for cholestatic liver diseases: an overview of their mechanisms of action. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2012. 36 Suppl 1: p. S3-12.
232. Kim, R.B., et al., Modulation by drugs of human hepatic sodium-dependent bile acid transporter (sodium taurocholate cotransporting polypeptide) activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. 291(3): p. 1204-9.
233. Suchy, D., et al., Ezetimibe--a new approach in hypercholesterolemia management. *Pharmacol Rep*, 2011. 63(6): p. 1335-48.

Literaturverzeichnis

234. Morris, R.G., Cyclosporin Therapeutic Drug Monitoring - an Established Service Revisited. Clin Biochem Rev, 2003. 24: p. pp. 33–46.
235. Rodríguez LC, Araujo CR, Posleman SE, Rey Mdel R. Hepatotoxic effect of cyclosporin A in the mitochondrial respiratory chain. J Appl Toxicol. 2007;27(4):310-7.
236. Volz, T., et al., The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. J Hepatol, 2013. 58(5): p. 861-7.

11. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
Anti-	Antikörper gegen
AS	Aminosäure(n)
ASBT	apical sodium dependent bile salt transporter
ASHV	Arctic ground squirrel Hepatitis Virus
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy
ca.	circa
cccDNA	covalently closed circular Desoxyribonukleinsäure
ChHBV	Chimpanzee HBV
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DHBV	Duck Hepatitis B Virus
DHC	Dehydrocholat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOX	Doxycyclin
DR1 u. 2	Direct Repeat 1 und 2
E. coli	<i>“Escherichia coli”</i>

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et. al.	Und andere
evtl.	eventuell
EZ	Ezetimibe
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GC	Glykocholat
GE	Genomäquivalente
GFP	green fluorescent protein
GiHBV	Gibbon HBV
GoHBV	Gorilla HBV
GRE	Glucocorticoid-Responsive-Element
GSHV	Ground Squirrel-Hepatitis B Virus
GT	Genotyp
GUDC	Glykoursodeoxycholol
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBcAg	Hepatitis B Core Antigen
HBeAg	Hepatitis B Enigma Antigen
HBHBV	Horseshoe Bat Hepatitis B Virus
HBsAg	Hepatitis B Surface Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HDAg	Hepatitis Delta Antigen
HDV	Hepatitis Delta Virus
HSPG	Heparan Sulfat Proteoglykane
IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration bei 50% des Effekts
ID	Identifikationsnummer

Abkürzungsverzeichnis

IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IU	International Unit
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
LHBs	Large Hepatitis B surface protein
LHDAg	large Hepatitis Delta Antigen
m	Meter
m	Milli
M	Molarität (mol/L Lösung)
mAK	monoklonaler Antikörper
MEIA	Microparticle Enzyme Immuno Assay
MHBs	Middle Hepatitis B surface protein
Min	Minuten
mNtcp	Natrium-Taurocholat Cotransportierendes Polypeptide der Maus
Mol	Molar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Myr	myristoyliert
N-	Amino
n...	nano
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NBD	Nitrobenzoxadiazole
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NTCP	humanes Natrium-Taurocholat Cotransportierendes Polypeptid
Ntcp	nicht humanes Natrium-Taurocholat Cotransportierendes Polypeptid
ORF	„open reading frame“ offener Leserahmen
OuHBV	Orangutan HBV

Abkürzungsverzeichnis

p	pico
PBS	phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
pg	prägenomisch
pH	potential Hydrogenii
PHH	primäre humane Hepatozyten
PTH	primäre Tupaia-Hepatozyten
RBHBV	Roundleaf Hepatitis B Virus
rc	relaxed circular
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rNtcp	Natrium-Taurocholat Cotransportierendes Polypeptide der Ratte
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHBs	Small Hepatitis B surface protein
S-HDAg	small Hepatitis Delta Antigen
SLC	Solute carrier
SOAT	sodium-dependent organic anion transporter
Tab.	Tabelle
TBHBV	Tent making Bat Hepatitis B VVirus
TC	Taurocholat
tNtcp	Natrium-Taurocholat Cotransportierendes Polypeptide aus <i>Tupaia belangeri</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TUDC	Tauroursodeoxycholat
UDC	Ursodeoxycholat
WHO	World Health Organization

Abkürzungsverzeichnis

WHV	Woodchuck Hepatitis B Virus
WMHBV	Woolly Monkey Hepatitis B Virus
z. B.	zum Beispiel

12. Anhang

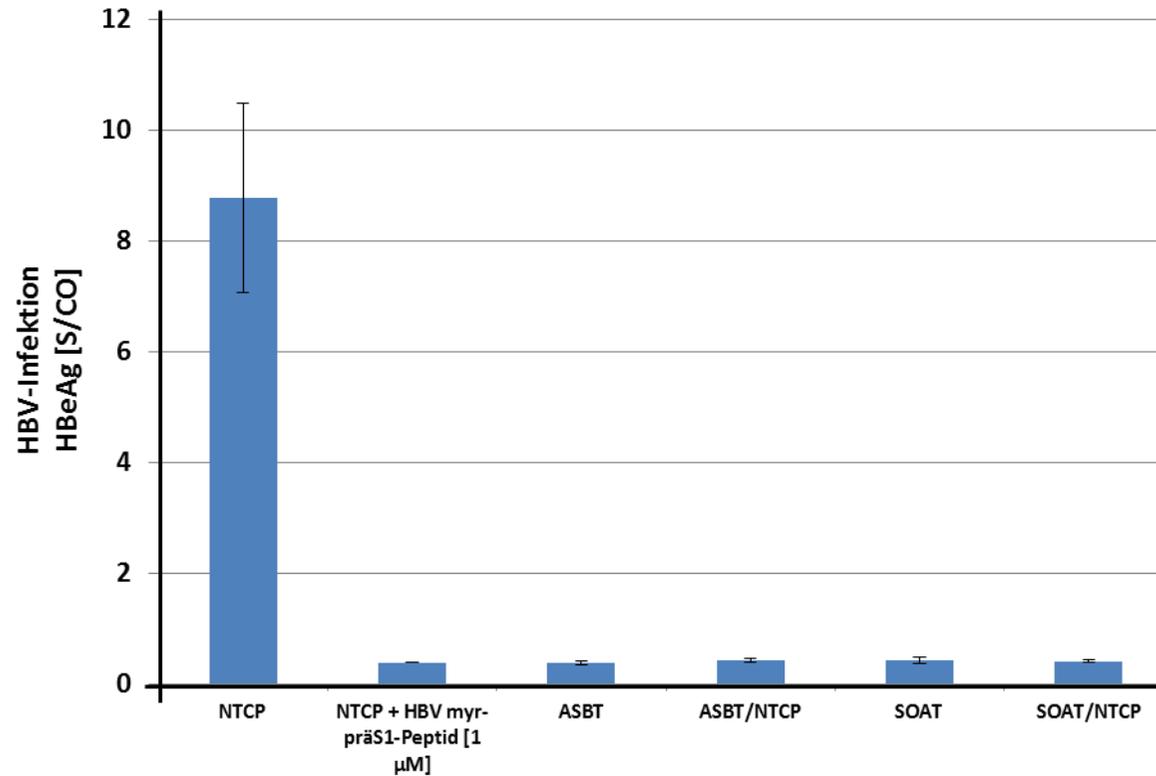


Abbildung 28: Organspezifität der HBV-Infektion. HepG2-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden transfiziert, welche hNTCP, hASBT, hASBT/hNTCP, hSOAT oder hSOAT/hNTCP codieren. Am Folgetag wurden die Zellen in 24-Well Platten mit 50 % Konfluenz ausgesät und für 24 h kultiviert. In Gegenwart von 3 % PEG wurden die Zellen für 16 h mit 50 GE/Zelle HBV inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mehrfach gewaschen und für weitere 10 Tage kultiviert. An den Tagen 1, 4, 7 und 10 nach der Infektion wurde der Zellkulturüberstand gesammelt. Mittels eines HBeAg-MEIA wurde die Konzentration von neu sekretiertem HBeAg im Überstand der Zellen als Marker für eine Infektion bestimmt und als Signal über dem *Cut-off* [S/CO] angegeben (*Cut-off* = 1).

Anhang

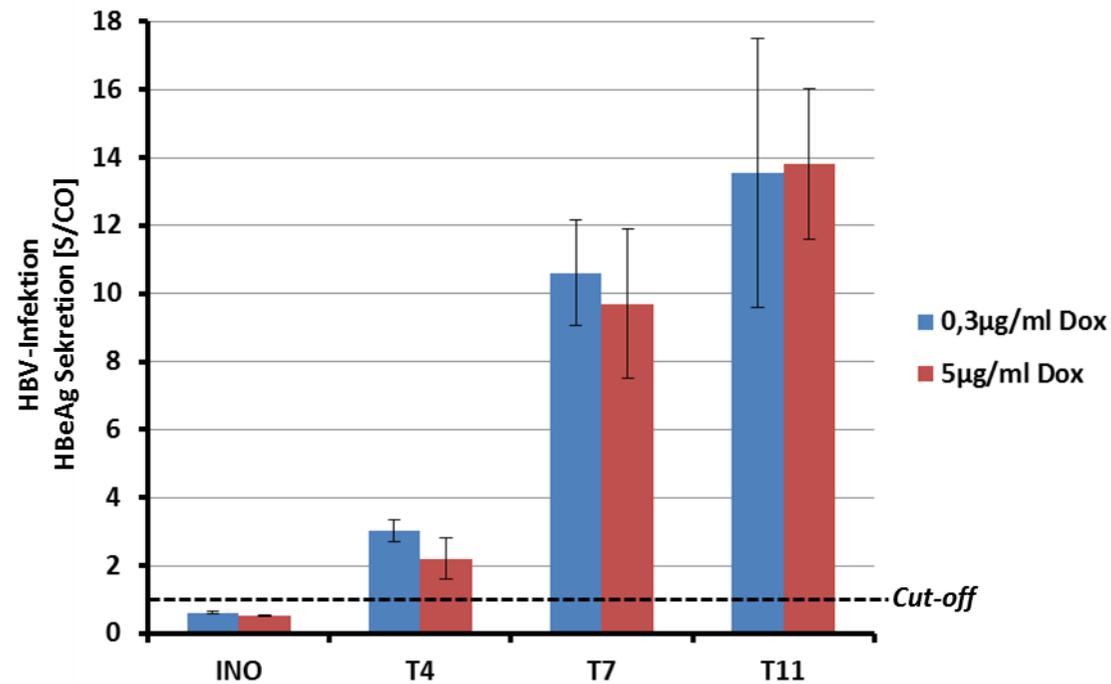


Abbildung 29: HBV-Infektion von NTCP-HepG2 Zellen in Abhängigkeit der Doxycyclin Konzentration. NTCP-HepG2 Zellen wurden in 24-Well Platten ausgesät und mit 0,3 oder 5 µg/ml DOX in DMEM für 48 h kultiviert. In Gegenwart von 3 % PEG wurden die Zellen anschließend für 16 h mit 50 GE/Zelle HBV inkubiert. Die Zellen wurden mehrfach gewaschen und für weitere 10 Tage kultiviert. An den Tagen 1 (INO), 4, 7 und 11 nach der Infektion wurde der Zellkulturüberstand gesammelt. Mittels eines HBeAg-MEIA wurde die Konzentration von neu sekretiertem HBeAg im Überstand der Zellen als Marker für eine Infektion bestimmt und als Signal über dem *Cut-off* [S/CO] angegeben (*Cut-off* = 1). INO, Inokulum; T, Tag.

13. Danksagung

Zunächst danke ich an dieser Stelle allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen für Zustimmung, Förderung, Rat, Tat, vielfältig geleistete Hilfe und ein nettes Arbeitsklima, dass ein kreatives Arbeiten ermöglichte und zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt **Dr. Dieter Glebe** für die gute Betreuung meiner Arbeit, die ein selbstständiges und kreatives wissenschaftliches Arbeiten ermöglichte.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei **Herrn Prof. Dr. M. Martin** für die Begutachtung meiner Arbeit, sowie die kompetente Betreuung und Vertretung vor dem Fachbereich 08, Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Herrn Prof. Dr. W. H. Gerlich und **Herrn Prof. Dr. J. Ziebuhr** danke ich für die Leitung des Instituts für Medizinische Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und die Unterstützung der gesamten Arbeitsgruppe. Weiterhin danke ich **Herrn Prof. Dr. W. H. Gerlich** für die fachkompetente Unterstützung beim Anfertigen der Veröffentlichungen die aus dieser Arbeit resultierten sowie für die Bereitschaft als Prüfer an meiner Disputation teilzunehmen.

Frau Prof. Dr. Trenczeck danke ich für die freundliche Bereitschaft als Prüfer an meiner Disputation teilzunehmen.

Vielen Dank an **Herrn Dr. Andreas Geipel** für die langjährige, gute Zusammenarbeit, die eine große Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit war.

Ein besonderer Dank gilt auch **Herrn Prof. J. Geyer** und **Frau Dr. Barbara Döring** für die konstruktive Kooperation mit lehrreichen und motivierenden Gesprächen und gemeinsamen Versuchsplanungen.

Herrn Prof. Dr. C. Drosten und **Herrn Dr. Felix Drexler** sowie allen weiteren Beteiligten des Instituts für Virologie der Universität Bonn danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Sigrun Broehl danke ich besonders für die Unterstützung in der Zellkultur und für die gute Organisation des Labors.

Jonathan und meiner Freundin **Feven** danke ich von ganzen Herzen, für den seelischen und moralischen Rückhalt während der teilweise schwierigen und sehr arbeitsintensiven finalen Monate dieser Arbeit.

Danksagung

Meiner Familie danke ich für die tatkräftige Unterstützung und Motivation. Ein ganz besonderer Dank gilt dabei meinen **Eltern**, die mir das Studium der Biologie ermöglicht haben.

Diese Arbeit wurde von der **DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft)** im Rahmen der Projektförderung „Ecology and species barriers of emerging bat hepatitis B viruses“ (Fördernummer: GL595/4-1)“ innerhalb des DFG-Schwerpunktprogramms (SPP) 1596 „Ecology and species barriers in emerging viral diseases“ finanziell gefördert.

14. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. 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.

Alexander König