

**Interaktion des Hepatitis-Delta-Virus
(HDV) mit seinem Helfervirus (HBV)
und seinem Rezeptor NTCP in einem
in vitro Infektionsmodell**

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

Nora Tabea Goldmann

(M. Sc.)

Gießen, Oktober 2021

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

1. Gutachterin: Prof. Dr. Katja Sträßer

Institut für Biochemie

Fachbereich 08 – Biologie und Chemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Apl. Prof. Dr. Dieter Glebe

Institut für Medizinische Virologie

Fachbereich 11 – Medizin

Justus-Liebig-Universität Gießen

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
AUS DER PROMOTION HERVORGEGANGENE PUBLIKATIONEN	XI
Peer reviewed Journals.....	XI
Übersichtsartikel.....	XII
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Das Hepatitis-D-Virus	2
1.1.1 Epidemiologie des HDV.....	3
1.1.2 Die virale Replikation des HDV	4
1.1.3 HDV-ähnliche Viren.....	8
1.2 Das Hepatitis-B-Virus.....	9
1.2.1 Taxonomie der <i>Hepadnaviridae</i>	10
1.2.2 Epidemiologie der <i>Orthohepadnaviridae</i>	11
1.2.3 Morphologie des HBV	13
1.2.4 Genomaufbau des HBV.....	14
1.2.4.1 Die Oberflächenproteine des HBV.....	15
1.2.5 Replikation des HBV.....	17
1.3 NTCP als Rezeptor für HBV und HDV.....	20
2. FRAGESTELLUNG	21
3. VERWENDETE MATERIALIEN.....	22
3.1 Plasmide	22
3.2 Hepadnavirale Myr-PräS1-Peptide.....	25
3.3 Restriktionsendonukleasen und weitere Enzyme.....	26
3.4 Verwendete Größen- und Molekulargewichtsmarker	27
3.5 Kommerzielle Kits und Reagenzien	27
3.6 <i>Escherichia coli</i>	28
3.7 Zelllinien	29
3.8 Geräte.....	29
3.9 Puffer, Standardlösungen und Medien.....	31
3.10 Antibiotika	33

3.11	Antikörper und weitere Marker	34
3.12	Verwendete Oligonukleotide	35
3.13	Chemikalien, Reagenzien, Medien	37
3.14	Verbrauchsmaterialien.....	39
4.	METHODEN	39
4.1	Eukaryotische Zellkultur	39
4.1.1	Transiente Transfektion	39
4.1.2	Erzeugung pseudotypisierter HDV	40
4.1.3	<i>In vitro</i> Infektion mit pseudotypisierten HDV	41
4.1.4	NBD-Taurocholat-Aufnahme	41
4.1.5	Myr-PräS1-Peptidbindung	42
4.2	Prokaryoten	42
4.2.1	Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	42
4.2.2	<i>E. coli</i> Flüssigkultur und Plasmidpräparation	42
4.3	Immunologische Nachweismethoden.....	43
4.3.1	Immunfluoreszenz	43
4.3.2	Semi-dry Western Blot.....	43
4.3.3	Quantitative Bestimmung der HBsAg-Konzentration	45
4.3.4	Quantitative Bestimmung der HDV-Infektion mittels eines diagnostischen ELISA.....	45
4.4	Molekularbiologische Methoden	45
4.4.1	Extraktion totaler RNA aus Zellen mittels TRIzol	45
4.4.2	Extraktion von Gesamtprotein aus Zellen mittels TRIzol	46
4.4.3	Quantifizierung pseudotypisierter HDV mittels qRT-PCT	46
4.4.4	Bestimmung der Transfektionseffizienz (pSEAP-Assay).....	48
4.4.5	Northern Blot.....	48
4.4.6	Klonierung deltaviraler Expressionskonstrukte	50
4.4.6.1	Klonierung der 1.0mer-Expressionskonstrukte	50
4.4.6.2	Klonierung der 2.0mer-Expressionskonstrukte	50
4.4.6.3	Kolonie-PCR	51
4.4.6.4	Sequenzierung der 1.0mer- / 2.0mer-Expressionskonstrukte	52
5.	ERGEBNISSE.....	53
5.1	Klonierung und Charakterisierung humaner HDV-Gt 1-Isolate	53
5.1.1	Klonierung humaner HDV-Gt 1-Isolate	53
5.1.2	Replikation humaner HDV-Gt 1-Isolate	55
5.1.3	Interaktion humaner HDV-Gt 1-4 mit HBsAg der HBV-Gt B1 und D3	56
5.1.4	Infektion umhüllter HDV-Partikel der HDV-Gt 1-4 mit HBsAg der HBV-Gt B1 und D3	59
5.1.5	<i>Trans</i> -Komplementation der HDV-Replikation durch S-HDAg-Isolate des HDV-Gt 1	61
5.1.6	<i>Trans</i> -Komplementation der HDV-Replikation durch S-HDAg der HDV-Gt 1-8	64
5.1.7	<i>Cis</i> -Komplementation der HDV-Replikation durch S-HDAg verschiedener Isolate des HDV-Gt 1	68
5.1.8	<i>Trans</i> -Komplementation der HDV-Replikation durch Deltaantigene Hepatitis-Delta-Virus ähnlicher Viren.....	70

5.2	Charakterisierung eines neuen tierischen Hepatitis-D-Virus-ähnlichen Virus aus der Stachelratte „ <i>Proechimys semispinosus</i> “	73
5.2.1	Klonierung und Expression eines RDeV-Expressionsklons <i>in vitro</i>	76
5.2.2	Nachweis von RDeV-spezifischen Antikörpern in Serumproben von <i>Proechimys semispinosus</i>	80
5.2.3	Replikation des RDeV in humanen Zellen	81
5.3	Kreuzinfektiosität neu entdeckter Orthohepadnaviren.....	82
5.3.1	Rezeptorinteraktion einer neuen Neuweltaffen Hepatitis-B-Virus Spezies.....	82
5.3.1.1	Analyse der PräS1-Domäne und Ntcp/NTCP-Bindung des CMHBV	83
5.3.1.2	Untersuchung des Infektionsverhaltens von CMHBV und HBV mit Hilfe von pseudotypisiertem HDV.....	87
5.3.2	Rezeptorinteraktion neuartiger Hepatitis-B-Viren aus Spitzmäusen.....	92
5.3.2.1	Analyse der PräS1-Domäne und NTCP/Ntcp-Bindung des LHBs von HBV, CSHBV und MSHBV..	92
5.3.2.2	Untersuchung des Infektionsverhaltens von MSHBV, CSHBV und HBV mit Hilfe von pseudotypisiertem HDV.....	95
5.3.3	Rezeptorinteraktion einer neuartigen Hepatitis-B-Virus Spezies aus der Gattung der Equiden (<i>Equus asinus</i>)	98
5.3.3.1	Analyse der PräS1-Domäne und NTCP/Ntcp-Bindung des LHBs von HBV und EqHBV	99
5.3.3.2	Produktion und Infektion pseudotypisierter Deltaviren mit EqHBV und HBV-Oberflächenproteinen	101
6.	DISKUSSION.....	103
6.1	Klonierung und Charakterisierung humaner HDV-Gt 1-Isolate	103
6.1.1	Einfluss von exogenem S-HDAg unterschiedlicher HDV-Gt auf die Replikation von HDV-Gt 1-Isolaten	107
6.2	Charakterisierung eines neuen tierischen Hepatitis-D-Virus-ähnlichen Virus aus der Stachelratte „ <i>Proechimys semispinosus</i> “	111
6.2.1	Klonierung und Expression eines RDeV-Expressionsklon	113
6.2.2	Replikation des RDeV in humanen Zellen	116
6.3	Kreuzinfektiosität neu entdeckter Orthohepadnaviren.....	118
7.	ZUSAMMENFASSUNG.....	126
8.	SUMMARY.....	128
9.	LITERATURVERZEICHNIS	130
10.	ANHANG	139
11.	DANKSAGUNG.....	140
12.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	142

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des HDV-Virions.....	3
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Replikationszyklus des HDV.	7
Abbildung 3: Schematische Darstellung des HBV-Virions und subviraler Partikel.....	14
Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der Replikation von HBV.....	19
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Klonierung von 2.0mer HDV- Expressionskonstrukten.	54
Abbildung 6: Replikation neu klonierter HDV-Gt 1-Isolate in vitro.....	56
Abbildung 7: Sekretiertes HBsAg und sekretierte HDV-Partikel aus HDV-/ HBsAg- Kotransfektionen.....	58
Abbildung 8: Infektion pseudotypisierter HDV-Partikel der HDV-Gt 1-4 mit Oberflächenproteinen von HBV-Gt D3 und HBV-Gt B1.	60
Abbildung 9: Wiederherstellung der Replikation replikationsinkompetenter HDV-Gt 1- cDNA-Dimere durch Koexpression von S-HDAg verschiedener Isolate des HDV-Gt 1 in trans.	63
Abbildung 10: Wiederherstellung der Replikation des replikationsinkompetenten HDV-Gt 1 cDNA-Klons CHD_WHO durch Zugabe von S-HDAg der HDV-Gt 1-4 in trans.	65
Abbildung 11: Wiederherstellung der Replikation replikationsinkompetenter HDV-Gt 1- cDNA-Dimere durch Zugabe von S-HDAg der HDV-Gt 1-8 in trans.....	67
Abbildung 12: Replikation chimärer HDV-Gt 1-Isolate.	69
Abbildung 13: Deltaantigenexpression von HDV / HDV-ähnlichen Viren in humanen Hepatomzellen.	71
Abbildung 14: Fähigkeit der Wiederherstellung der RNA-Replikation einer replikationsinkompetenten Mutante des HDV-Gt 1 durch Deltaantigene tierischer HDV- ähnlicher Isolate (DAg).....	72
Abbildung 15: Prozentuale Nukleotid- und Aminosäureidentitäten zwischen humanen HDV-Gt 1-8 und HDV-ähnlichen Viren.	74
Abbildung 16: Phylogenetischer Stammbaum humaner HDV-Gt und HDV-ähnlicher Viren bezogen auf das gesamte virale RNA-Genom.....	75
Abbildung 17: Aminosäurealignment des Carboxy-Terminus des Deltaantigens humaner HDV-Gt (HDAg) und HDV-ähnlicher Viren (DAg).....	76
Abbildung 18: Analyse der RNA-Genom-Editierung von HDV und RDeV-Genomen.	79
Abbildung 19: Spezifische Reaktivität RDeV-RNA positiv getesteter Proechimys semispinosus Seren gegen das kleine Antigen des RDeV (S-RDeAg).	80
Abbildung 20: Replikation des RDeV in humanen Zellen.....	82

Abbildung 21: Sequenzvergleich des N-terminalen Bereichs der PräS1-Domänen des HBsAg humaner sowie nicht-humaner Primaten HBVs.	85
Abbildung 22: Transportfunktion unterschiedlicher primaten NTCP/Ntcp in humanen Hepatomzellen.	86
Abbildung 23: Bindung von CMHBV und HBV Myr-PräS1-Peptiden an NTCP/Ntcp.	87
Abbildung 24: Vergleich der für die Sekretion von HDV essenziellen HDV-Interaktions-Domäne im SHBs unterschiedlicher Hepadnaviren und Sekretion pseudotypisierter HDVs.	89
Abbildung 25: Spezies-spezifische Infektion von HDV-Partikeln pseudotypisiert mit CMHBV- oder HBV-Oberflächenproteinen in Abhängigkeit von der Anwesenheit spezies-spezifischer NTCP/Ntcp.	91
Abbildung 26: Sequenzvergleich des N-terminalen Bereichs der PräS1-Domänen des HBsAg humaner HBVs sowie nicht humaner HBV aus Spitzmäusen (MSHBV und CSHBV).	93
Abbildung 27: NBD-Taurocholat (NBD-TC) Transport und Myr-PräS1-Peptidbindung von hNTCP und Sorex Ntcp transfizierten HepG2- und HuH7-Zellen.	94
Abbildung 28: Vergleich der für die Sekretion von HDV essenziellen HDV-Interaktions-Domäne im SHBs unterschiedlicher Hepadnaviren und zeitlicher Verlauf der Sekretion pseudotypisierter HDVs.	96
Abbildung 29: Untersuchung des Infektionsverhalten pseudotypisierter HDV-Partikel mit Oberflächenproteinen von HBV-Gt D3, MSHBV _{CIV} , CSHBV A und CSHBV B.	97
Abbildung 30: Sequenzvergleich des N-terminalen Bereichs der PräS1-Domänen des HBsAg humaner HBVs sowie des Hepatitis-B-Virus aus Equiden (EqHBV).	99
Abbildung 31: NBD-Taurocholat (NBD-TC) Transport und EqHBV/HBV Myr-PräS1-Peptidbindung von hNTCP und Esel Ntcp transfizierten HepG2- und HuH7-Zellen.	100
Abbildung 32: Vergleich der für die Sekretion von HDV essenziellen HDV-Interaktions-Domäne im SHBs unterschiedlicher Hepadnaviren und zeitlicher Verlauf der Sekretion pseudotypisierter HDVs.	102
Abbildung 33: Infektionsverhalten von psHDV-Partikeln, pseudotypisiert mit Oberflächenproteinen von HBV-Gt D3 und EqHBV.....	103
Abbildung 34: Aminosäuresequenzvergleich relevanter Regionen der HBV-NTCP-Interaktion.....	119
Abbildung 35: Vergleich ausgewählter Aminosäuren des humanen NTCP und Equider Ntcps.	123
Abbildung 36: EqHBV Aminosäuresequenz-Vergleich des OLRs der viralen Oberflächenproteine.....	124
Abbildung 37: S-HDAg-Expression in HuH7-Zellen 4 Tage nach Transfektion der Expressionskonstrukte.	139

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chronologische Reihenfolge der Entdeckung von HDV und HDV-ähnlichen Viren.	8
Tabelle 2: Chronologische Reihenfolge der Entdeckung der Orthohepadnaviridae.....	13
Tabelle 3: Übersicht aller verwendeten Plasmide sowie neu erzeugter Expressionsvektoren.	22
Tabelle 4: Übersicht aller verwendeten Enzyme inklusive Restriktionsendonukleasen unter Angabe des Herstellers.....	26
Tabelle 5: Übersicht aller Größen- und Molekulargewichtsmarker sowie deren Hersteller und der Angabe der Verwendung.	27
Tabelle 6: Übersicht aller Reagenzien und Kits unter Angabe der Verwendung sowie der Bezugsquelle.	27
Tabelle 7: Verwendete Escherichia coli.	28
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Zelllinien.	29
Tabelle 9: Verwendete Geräte sowie Hersteller und Verwendung.	29
Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung.....	31
Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Antibiotika unter Angabe der finalen Konzentration mit Bezugsquellen.	33
Tabelle 12: Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper. WB – Western Blot; IF – Immunfluoreszenz. f.c. – Finale Konzentration.....	34
Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide/Primer.	35
Tabelle 14: Übersicht aller verwendeten Medien und Chemikalien sowie deren Bezugsquellen.	37
Tabelle 15: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	39
Tabelle 16: Zusammensetzung eines 14 %-igen SDS-Gels.	44
Tabelle 17: PCR-Bedingungen für die Quantifizierung von HDV-RNA.	47

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AS	Aminosäure(n)
ASHV	Arctic ground squirrel Hepatitis Virus
bp	Basenpaare
C-	Carboxy
ca.	Circa
cccDNA	Covalently closed circular Desoxyribonukleinsäure
CSHBV (Gt A und Gt B)	Crowned shrew Hepatitis-B-Virus
CMHBV	Capuchin monkey Hepatitis-B-Virus
CO ₂	Kohlendioxid
DCHBV	Domestic cat Hepatitis-B-Virus
Da	Dalton
D _{Ag}	Deltaantigen HDV-ähnlicher Viren
DEPC	Diethylcarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DV	Deltavirus
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EqHBV	Equid Hepatitis-B-Virus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	Und andere
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GE	Genomäquivalente
GiHBV	Gibbon HBV
GoHBV	Gorilla HBV
Gt	Genotyp
H ₂ O	Wasser
HBcAg	Hepatitis B Core Antigen
HBHBV	Horseshoe Bat Hepatitis-B-Virus
HBsAg	Hepatitis B Surface Antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HDAg	Hepatitis Delta Antigen (des humanen HDV)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HDV	Hepatitis-Delta-Virus
HSPG	Heparan Sulfat Proteoglykane
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
IU	International Unit
LHBs	Large Hepatitis B surface protein
L-HDAg	Large Hepatitis Delta Antigen
m	Milli
M	Molarität (mol/L Lösung)
MHBs	Middle Hepatitis B surface protein
Mol	Molar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSHBV_{clv}	Musk shrew Hepatitis-B-Virus
Myr	Myristoyliert
N-	Amino
n	Nano
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NBD	Nitrobenzoxadiazole
nm	Nanometer
NTCP	Humanes Natrium-Taurocholat Cotransportierendes Polypeptid
Ntcp	Nicht humanes Natrium-Taurocholat Cotransportierendes Polypeptid
OLR	Offener Leserahmen
OuHBV	Orang-Utan Hepatitis-B-Virus
OvirDV	Odocoileus virginianus Deltavirus
p	Pico
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
PegIFNα	Pegyliertes Interferon-alpha
pg	Prägenomisch
pH	Pondus hydrogenii
PmacDV	Peropteryx macrotis Deltavirus
RBHBV	Roundleaf Bat Hepatitis-B-Virus
rc	Relaxed circular
RDeAg	Rodent Deltavirus Antigen
RDeV	Rodent Deltavirus
rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

qRT-PCR	Quantitative (q) Reverse Transkriptase (RT)-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHBs	Small Hepatitis B surface protein
S-HDAg	Small Hepatitis Delta Antigen
TBHBV	Tent making Bat Hepatitis-B -Virus
TC	Taurocholat
TFoHBV	Tai Forest Hepatitis-B-Virus
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
WHO	World Health Organization
WHV	Woodchuck Hepatitis-B-Virus
WMHBV	Woolly Monkey Hepatitis-B-Virus
x g	Relative Zentrifugalkraft

Aus der Promotion hervorgegangene Publikationen

Peer reviewed Journals

1. Kirstgen M, Müller SF, Lowjaga KAAT, **Goldmann N**, Lehmann F, Alakurtti S, Yli-Kauhaluoma J, Baringhaus KH, Krieg R, Glebe D, Geyer J. (August 2021). **Identification of Novel HBV/HDV Entry Inhibitors by Pharmacophore- and QSAR-Guided Virtual Screening.** doi: 10.3390/v13081489. *Viruses* 13(8):1489 (Impact Factor 5,048).
2. Palatini M, Müller SF, Lowjaga KAAT, Noppes S, Alber J, Lehmann F, **Goldmann N**, Glebe D, Geyer J. (Juni 2021). **Mutational Analysis of the GXXXG/A Motifs in the Human Na⁺/Taurocholate Co-Transporting Polypeptide NTCP on Its Bile Acid Transport Function and Hepatitis B/D Virus Receptor Function.** doi: 10.3389/fmolb.2021.699443. *Frontiers in Molecular Biosciences* 8:699443 (Impact Factor 4,62).
3. Kirstgen M, Lowjaga KAAT, Müller SF, **Goldmann N**, Lehmann F, Glebe D, Baringhaus KH, Geyer J. (April 2021). **Hepatitis D Virus Entry Inhibitors Based on Repurposing Intestinal Bile Acid Reabsorption Inhibitors.** doi: 10.3390/v13040666. *Viruses* 13(4):666 (Impact Factor 5,048).
4. Rasche A*, Lehmann F*, **Goldmann N**, Nagel M, Moreira-Soto A, Nobach D, de Oliveira Carneiro I, Osterrieder N, Greenwood AD, Steinmann E, Lukashev AN, Schuler G, Glebe D, Drexler JF; Equid HBV Consortium. (März 2021). **A hepatitis B virus causes chronic infections in equids worldwide.** doi: 10.1073/pnas.2013982118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 118(13):e2013982118 (Impact Factor 11,205). *geteilte Erstautorenschaft.
5. Kirstgen M, Lowjaga KAAT, Müller SF, **Goldmann N**, Lehmann F, Alakurtti S, Yli-Kauhaluoma J, Glebe D, Geyer J. (Dezember 2020). **Selective hepatitis B and D virus entry inhibitors from the group of pentacyclic lupane-type betulin-derived triterpenoids.** doi: 10.1038/s41598-020-78618-2. *Scientific Reports* 10:21772 (Impact Factor 4,379).

6. Lowjaga KAAT, Kirstgen M, Müller SF, **Goldmann N**, Lehmann F, Glebe D, Geyer J. (Januar 2021). **Long-term *trans*-inhibition of the hepatitis B and D virus receptor NTCP by taurolithocholic acid.** doi: 10.1152/ajpgi.00263.2020. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 320(1):G66-G80 (Impact Factor 3,725).
7. Paraskevopoulou S*, Pirzer F*, **Goldmann N***, Schmid J, Corman VM, Gottula LT, Schroeder S, Rasche A, Muth D, Drexler JF, Heni AC, Eibner GJ, Page RA, Jones TC, Müller MA, Sommer S, Glebe D, Drosten C. (Juli 2020). **Mammalian deltavirus without hepadnavirus coinfection in the neotropical rodent *Proechimys semispinosus*.** doi: 10.1073/pnas.2006750117. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 117(30):17977-17983 (Impact Factor 11,205).
***geteilte Erstautorenschaft.**
8. Rasche A, Lehmann F, König A, **Goldmann N**, Corman VM, Moreira-Soto A, Geipel A, van Riel D, Vakulenko YA, Sander AL, Niekamp H, Kepper R, Schlegel M, Akoua-Koffi C, Souza BFCD, Sahr F, Olayemi A, Schulze V, Petraityte-Burneikiene R, Kazaks A, Lowjaga KAAT, Geyer J, Kuiken T, Drosten C, Lukashev AN, Fichet-Calvet E, Ulrich RG, Glebe D, Drexler JF. (August 2019). **Highly diversified shrew hepatitis B viruses corroborate ancient origins and divergent infection patterns of mammalian hepadnaviruses.** doi: 10.1073/pnas.1908072116. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 116(34):17007-17012 (Impact Factor 11,205).
9. de Carvalho Dominguez Souza BF, König A, Rasche A, de Oliveira Carneiro I, Stephan N, Corman VM, Roppert PL, **Goldmann N**, Kepper R, Müller SF, Völker C, de Souza AJS, Gomes-Gouvêa MS, Moreira-Soto A, Stöcker A, Nassal M, Franke CR, Rebello Pinho JR, Soares MDCP, Geyer J, Lemey P, Drosten C, Netto EM, Glebe D, Drexler JF. (Februar 2018). **A novel hepatitis B virus species discovered in capuchin monkeys sheds new light on the evolution of primate hepadnaviruses.** doi: 10.1016/j.jhep.2018.01.029. *Journal of Hepatology* 68(6):1114-1122 (Impact Factor 25,083).

Übersichtsartikel

1. Glebe D, **Goldmann N**, Lauber C, Seitz S. (Februar 2021). **HBV evolution and genetic variability: Impact on prevention, treatment and development of antivirals.** doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104973. *Antiviral Research* 186:104973 (Impact Factor 4,909).

1. Einleitung

Die Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) ist global eine der am weitesten verbreiteten Infektionskrankheiten. Die hierdurch ausgelöste Erkrankung, die virale Hepatitis B, ist eine der häufigsten Hepatitis-assoziierten Todesursachen. Die Weltgesundheitsorganisation (*engl.: World Health Organization, WHO*) schätzt, dass im Jahre 2019 etwa 820.000 Todesfälle einer HBV-Infektion zu Grunde lagen [1]. Zum selben Zeitpunkt lebten rund 296 Millionen Menschen mit einer chronischen HBV-Infektion, die positiv auf den viralen Marker HBsAg waren [1]. Die Transmission des Virus kann sexuell, über den Kontakt mit HBV-kontaminiertem Blut und Blutprodukten sowie perinatal von einer HBV-positiven Mutter auf ihr Kind während der Geburt erfolgen. Obwohl sowohl verschiedene präventive Impfstoffe (seit 1982) als auch antivirale Therapien (seit den 1990er Jahren) zur Verfügung stehen, schätzt die WHO, dass sich 1,5 Millionen Personen im Jahre 2019 neu mit HBV infiziert haben [1].

Schätzungsweise 4,5-5 % aller chronisch HBV-infizierten Patienten sind mit dem Hepatitis-Delta-Virus (HDV) koinfiziert, wobei weitere Analysen von einer weitaus höheren HDV-Prävalenz ausgehen (13-16,4 %) [1-6]. HDV kann nur in Anwesenheit einer Koinfektion mit dem HBV in derselben Zelle seinen Infektions- und Replikationszyklus abschließen und wird daher auch als Satellitenvirus bezeichnet. Die Krankheitsverläufe von HDV/HBV-koinfizierten Patienten sind dabei vom Zeitpunkt der HDV-Infektion abhängig. Erfolgt die HDV-Infektion bei bereits chronisch HBV-infizierten Patienten (Superinfektion) führt dies in über 90 % zu einer chronischen HDV-Infektion und ist wesentlich häufiger mit einem fulminanten Krankheitsverlauf und einem höheren Risiko zur Entstehung einer Leberzirrhose assoziiert. Die zeitgleiche Koinfektion mit HDV und HBV (auch Simultaninfektion genannt) führt in nur etwa 2 % zur Chronifizierung [7]. Bedingt durch limitierte Therapiemöglichkeiten sind gegenwärtig die Erfolgsraten einer Behandlung der chronischen HDV-Infektion niedrig. Neben Bulevirtid, einem im Jahr 2020 für die Behandlung einer HDV-Infektion in Europa zugelassener HDV-Aufnahme-Inhibitor [8], ist pegyliertes Interferon-alpha (PegIFN α) zurzeit eine der wenigen Behandlungsmöglichkeiten einer HDV-Infektion. Jedoch können nur wenige Patienten mit PegIFN α therapiert werden. Dies kann zum einen daran liegen, dass eine PegIFN α -Therapie zu kostenintensiv ist und zum anderen

daran, dass der Gesundheitszustand der Patienten eine Therapie, aufgrund bereits entwickelter Leberzirrhose, nicht zulässt. Erwähnenswert ist zudem, dass nur in etwa 25-40 % der mit PegIFN α behandelten Patienten die virale Replikation (HDV-RNA) tatsächlich unterdrückt wird [9, 10].

1.1 Das Hepatitis-D-Virus

Das HDV besitzt das kleinste bisher identifizierte RNA-Genom aller bekannten RNA-Viren [11]. Es umfasst etwa 1,7 kb und enthält nur einen einzigen offenen Leserahmen (OLR), der für das Hepatitis-D-Virus-Antigen (HDAg) kodiert. Dieses HDV-assoziierte Antigen wurde 1977 in HBV-positiven Hepatozyten entdeckt, wurde aber zunächst als ein neuartiges Protein des HBV beschrieben, da es ausschließlich in HBV-infizierten Leberzellen zu finden war [12]. Kurze Zeit später konnten M. Rizzetto et al. durch Infektionsversuche an Schimpansen zeigen, dass (a) das HDAg mit einer RNA assoziiert ist, (b) HBV unabhängig vom HDAg auftritt, und (c) das HDAg in der Leber eines chronisch HBV-infizierten Tieres länger und in höherem Maße nachweisbar war als in der Leber eines zuvor HBV-naiven Tieres [11, 13].

Das HDAg (oft auch Deltaantigen genannt) schien somit mit einem eigenständigen Erreger assoziiert zu sein, der inzwischen als Delta-, Hepatitis-Delta- oder Hepatitis-D-Virus (HDV) bezeichnet wird. HDV besitzt keinen OLR für die Expression eigener Oberflächenproteine und ist auf die Anwesenheit von Oberflächenproteinen des HBV in HDV/HBV-koinfizierten Zellen für Umhüllung, Sekretion und Infektiosität angewiesen. Aufgrund dieser HBV-Abhängigkeit wird HDV auch als ein Satellitenvirus bezeichnet [14].

Die Virionen des HDV besitzen eine sphärische Morphologie mit einem Durchmesser von 36-43 nm [15]. Die äußere Hülle der Virionen besteht aus zellulären Lipiden und allen drei Oberflächenproteinen des HBV, wobei neuere Untersuchungen zeigen konnten, dass HDV zumindest experimentell auch die Oberflächenproteine anderer Viren für die Umhüllung *in vitro* und in einem *In-vivo*-Tiermodell verwenden kann [16]. Im Inneren der Virionen (Abbildung 1) befindet sich ein Ribonukleoprotein, was sich aus etwa 30-200 Kopien des HDAg und dem negativen RNA-Genom zusammensetzt [17-19]. Das RNA-Genom besteht aus einer einzelsträngigen, zirkulären RNA mit quasi-

doppelsträngiger Struktur, charakterisiert durch ein hohes Maß (etwa 74 %) an intramolekularer Basenpaarung [20, 21]. Das einzig bekannte Protein des HDV ist das HDAg, welches in zwei Isoformen, dem „großen“ (*Large*) HDAg (L-HDAg, ca. 27 kDa) und dem „kleinen“ (*Small*) HDAg (S-HDAg, ca. 24 kDa) existiert [22] (Abbildung 1). Beide HDAg sind in ihrer Sequenz identisch, wobei das L-HDAg carboxyterminal um 19 Aminosäuren verlängert ist (siehe auch Kapitel 1.1.2). HDV ist bisher als einziger Vertreter der Gattung der Deltaviren klassifiziert [14].

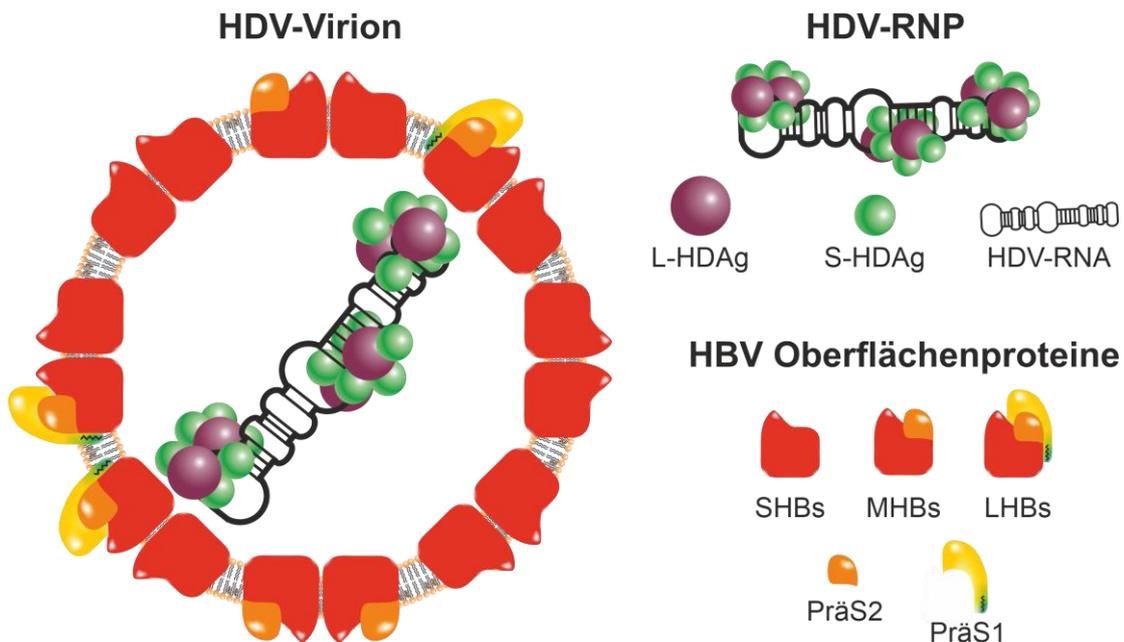


Abbildung 1: Schematische Darstellung des HDV-Virions. Die äußere Hülle bilden die Oberflächenproteine des Hepatitis-B-Virus (HBV). Das HDV-RNP besteht aus der quasi-doppelsträngigen RNA (schwarz) und den beiden HDV-Proteinen, S-HDAg (grün) und L-HDAg (violett), die über eine RNA-Bindedomäne mit der HDV-RNA interagieren. S-HDAg – kleines (engl.: Small) Hepatitis-Delta-Antigen; L-HDAg – großes (engl.: Large) Hepatitis-Delta-Antigen; RNP – Ribonukleoprotein; HBs – HBV-Oberflächenprotein (engl.: HBV surface protein); SHBs – kleines (engl.: Small) HBV-Oberflächenprotein; MHBs – mittleres (engl.: Middle) HBV-Oberflächenprotein; LHBs – großes (engl.: Large) HBV-Oberflächenprotein. [Verändert nach Glebe & Bremer, 2013 [23]].

1.1.1 Epidemiologie des HDV

Bis heute wurden insgesamt acht verschiedene HDV-Genotypen (Gt) und diverse Subgenotypen beschrieben, die in unterschiedlichen Gebieten der Welt verbreitet sind [14, 24-26]. Der Gt 1 ist global verbreitet und spiegelt den Gt mit der höchsten Prävalenz wider. Die Gt 2 und 4 sind in der asiatischen Bevölkerung vorherrschend, dabei ist der Gt 4 eher auf die ostasiatischen Länder beschränkt. Der Gt 3 ist vor allem im Norden von Südamerika verbreitet, die Gt 5-8 sind dagegen in Afrika lokalisiert [25].

Zudem konnten Unterschiede innerhalb der Gt auf den natürlichen HDV-Infektionsverlauf beobachtet werden. Für den Gt 1 wurden milde bis schwere Infektionsverläufe beobachtet, die jedoch häufig mit Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom (*engl.: hepatocellular carcinoma, HCC*) einhergehen [27, 28]. Eine Infektion mit dem Gt 2 scheint eher mild zu verlaufen, während der Gt 3 häufig eine fulminante Hepatitis verursacht [25, 29]. Auch Infektionen mit dem Gt 4 und 5 verlaufen eher mild, eine Ausnahme bildet eine bestimmte Variante des Gt 4 (IIb), die eher mit der Entwicklung einer Leberzirrhose assoziiert ist [30, 31]. Für die afrikanischen Gt 6 bis 8 fehlen solche Studien bislang.

1.1.2 Die virale Replikation des HDV

Da HDV die Oberflächenproteine des HBV zur Umhüllung und Ausschleusung von Virionen verwendet, ist der Zelleintritt beider Viren durch die Eigenschaften der HBV-Oberflächenproteine definiert. Dabei scheint die Bindung an das Apolipoprotein E (ApoE) im Serum von infizierten Patienten die Virionen zu den extrazellulären Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGs) der Hepatozytenmembranen zu lenken [32, 33]. Dabei kommt es zu einer niedrigaffinen Interaktion mit HSPGs, insbesondere des Glypikan 5 (GPC5) (Abbildung 2). Nachfolgend erfolgt die spezifische Interaktion der PräS1-Domäne des LHBs (Abbildung 1) mit dem Gallensäure Transporter NTCP (*engl.: Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP*) [34-38], der als hochaffiner Bindungspartner für HDV/HBV charakterisiert wurde [39]. Über den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (*engl.: epidermal growth factor receptor, EGFR*) wird anschließend eine Clathrin-abhängige Endozytose initiiert [40-42]. Aufgrund einer Kernlokalisationssequenz innerhalb des S-HDAg (Aminosäure(n), AS: 66-75) [43] wird das HDV-RNP in den Zellkern der Hepatozyten transloziert [44, 45] (Abbildung 2). Die Replikation der genomischen RNA findet in einem Viroid-typischen sogenannten „Rolling-Circle“-Mechanismus statt [46, 47]. Dieser Prozess ist noch nicht vollständig verstanden, beinhaltet aber eine unidirektionale Replikation von Nukleinsäuren zur Bildung mehrerer Kopien des zirkulären Genoms unter Verwendung zellulärer RNA-Polymerasen. Dabei werden zunächst mithilfe der eigentlich DNA-abhängigen zellulären RNA-Polymerase II Multimere antigenomischer HDV-RNA synthetisiert [46, 48]. Diese werden anschließend über die HDV-eigenen Ribozyme autokatalytisch in

monomere, lineare RNA-Moleküle gespalten [49, 50]. Bisher ist noch unklar, wie die linearen Monomere zirkularisieren/ligieren. Es scheint jedoch, dass die linearen, antigenomischen RNA-Moleküle sich selbst, durch eine intramolekulare Ligation über die Ribozymaktivität zirkularisieren [51] oder, dass dieser Prozess von zellulären Faktoren abhängt [52, 53]. Die zirkuläre antigenomische RNA dient wiederum als Matrize für die Synthese genomischer RNAs durch einen weiteren „Rolling-Circle“-Mechanismus [46, 54]. Die genomische RNA dient zudem als Matrize für die Synthese einer 0,8 kb großen mRNA mit antigenomischer Polarität, die der Translation des HDAg dient [22]. Dabei ist das Vorhandensein von S-HDAg zwingend erforderlich. Da jedoch nur geringe Mengen nötig sind, scheint das S-HDAg, welches aus den Virionen stammt, auszureichen, um die Transkription der mRNA aus der genomischen RNA zu initiieren [53, 55]. Die beiden Isoformen des HDAg, S-HDAg und L-HDAg, nehmen unterschiedliche regulatorische Rollen während der HDV-Replikation ein. Das S-HDAg *trans*-aktiviert die virale Replikation [56], während das L-HDAg einen inhibitorischen Effekt auf die Replikation, insbesondere auf die genomische RNA-Synthese hat [57-59]. Die Hauptfunktion des L-HDAg ist die Virusassemblierung [60]. Beide Proteine werden von einem einzigen OLR kodiert, wobei vorerst nur das S-HDAg gebildet wird. Im weiteren Verlauf der Replikation wird an der Position des S-HDAg Stopp-Codons die antigenomische RNA durch die zelluläre RNA-abhängige Adenosin-Deaminase 1 (*engl.: cellular adenosine deaminase acting on RNA 1, ADAR1*) editiert [61-63] (Abbildung 2), woraus das L-HDAg resultiert. Innerhalb des S-HDAg Amber-Stopp-Codons wird das Adenin (UAG) zu einem Inosin (UIG) deaminiert, das wiederum von der Polymerase als Guanin (UGG) erkannt wird. Hieraus entsteht ein um 19 bzw. 20 Aminosäuren verlängerter OLR, aus welchem in den nachfolgenden Replikationsschritten das L-HDAg translatiert wird.

S-HDAg und L-HDAg bilden Hetero- und Homodimere, anschließend Oktamere und binden das RNA-Genom [64-66] (Abbildung 2), wodurch es unter anderem auch vor intrazellulären Nukleasen geschützt wird [67]. Die Oligomerisierung basiert auf Grundlage der Coiled-Coil-Domäne innerhalb des HDAg (AS: 31-52) [66, 68-70]. Aufgrund einer konservierten Kern-Lokalisationssequenz innerhalb des S-HDAg (AS: 66-75) [43] werden die HDAg-Multimere in den Zellkern importiert und binden dort aufgrund von RNA-Bindedomänen die genomische HDV-RNA (Abbildung 2), dabei

scheint insbesondere die N-terminale Region des S-HDAg (AS: 2-13) eine dominante Rolle einzunehmen [44, 71-73]. Ein Kern-Exportsignal am carboxyterminalen Ende des L-HDAg (AS: 198-210) [74] führt zu einer Anreicherung der RNP-Komplexe im Zytoplasma, was mit der Beobachtung einer Akkumulation genomischer HDV-RNA im Zytoplasma einhergeht [75]. Über eine Farnesylierung des Cysteins an Position 211 kommt es zu einer Verankerung des RNP an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) [76-78]. In HBV-koinfizierten Hepatozyten kommt es dort zu einer Interaktion des HDV-RNP und einer Tryptophan-reichen Domäne des HBsAg (AS 196-201: WMM(I/W)YW), vermutlich über eine Prolin-reiche Domäne am C-Terminus des L-HDAg [77, 79]. Die Sekretion der mit HBsAg umhüllten HDV-Partikel erfolgt daraufhin Clathrin-vermittelt über das trans-Golgi-Netzwerk, aufgrund der speziellen Architektur der Hepatozyten in der Leber, direkt in das Blut [80-82] (Abbildung 2). Auch wenn HDV für die Assemblierung und Sekretion infektiöser Partikel von einer Koinfektion mit HBV abhängt, kann HDV unabhängig von HBV in verschiedenen Zelltypen replizieren [83-85]. Zudem kann HDV in HBV-uninfizierten Zellen für mindestens sechs Wochen persistieren [86, 87].

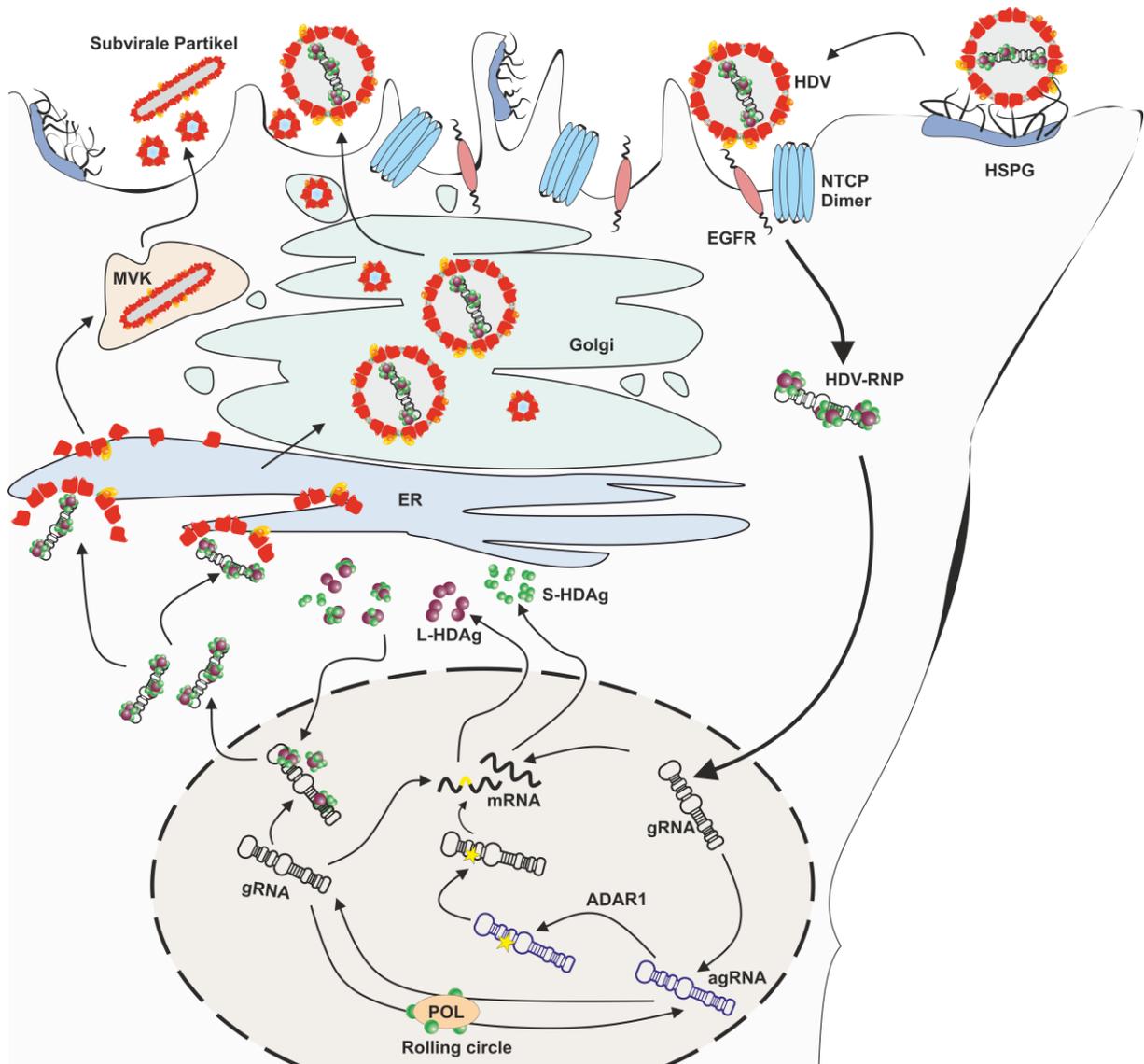


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Replikationszyklus des HDV. Nach der Bindung an HSPGs mit niedriger Affinität und der Bindung mit hoher Affinität an NTCP der basolateralen Hepatozytenmembran tritt das HDV-Virion in das Zytoplasma ein und das Ribonukleoprotein (RNP) wird in den Zellkern transportiert. Im Zellkern beginnt die Transkription von mRNA und antigenomischer HDV-RNA (agRNA) aus der genomischen HDV-RNA (gRNA) des RNP. Über ADAR1 wird das Stopp-Codon innerhalb des S-HDAg OLR einiger Antigenome editiert. Die agRNA dient ihrerseits als Vorlage für die Synthese und Amplifikation der zirkulären gRNA. Im Zytoplasma findet die Translation von S-HDAg und L-HDAg aus mRNA statt, die entweder aus editierter oder uneditierter gRNA resultiert. Die HDAg bilden Multimere und werden in den Zellkern transportiert, wo sie mit gRNA interagieren und neue RNP bilden. Die RNP werden aus dem Kern exportiert, das L-HDAg interagiert mit HBsAg am ER, woraufhin die RNPs mit den Oberflächenproteinen des koinfizierenden HBV umhüllt werden. Die HDV-Virionen werden dann über das trans-Golgi-Netzwerk in das sinusoidale Blut sezerniert. Die Filamente werden über multivesikuläre Körperchen (MVK) sekretiert. [verändert nach Glebe & Bremer, 2013 [23].

1.1.3 HDV-ähnliche Viren

Seit der Entdeckung des HDV 1980 [11, 13] galt HDV aufgrund der einzigartigen Genomstruktur als alleiniger Vertreter der Gattung der Deltaviren.

Im Jahre 2018 wurden erstmals HDV-ähnliche Viren in Transkriptomen aus kombinierten Kloaken- und Oropharyngealproben diverser Enten entdeckt [88]. Ebenso wurden 2019 verschiedene Organe einer Timor-Wasserpython und einer Abgottschlange positiv auf ein HDV-ähnliches Virus getestet [89]. Weitere HDV-ähnliche Viren wurden durch RNA-seq Studien in Darm- und Leberproben eines Feuerbauchmolchs, in Lungenproben der asiatischen Kröte, in Termiten sowie in einem Pool von Kiemenproben verschiedener Fische identifiziert [90]. Im Jahr 2020 wurde erstmals ein Säugetier-HDV-ähnliches Virus in einer Stachelratte identifiziert, welches innerhalb dieser Arbeit charakterisiert wurde (siehe Kapitel 5.2) [91]. Es folgten HDV-ähnliche Viren aus Weißwedelhirschen und Waldmurmeltieren [92, 93]. Zudem wurden kürzlich zwei Genotypen HDV-ähnlicher Viren in Vampirfledermäusen identifiziert sowie in Lebertranskriptomen einer Hundskopffledermaus [93]. Weitere HDV-ähnliche Viren wurden in Zebrafinken und Bronzemännchen gefunden [92]. Tabelle 1 stellt eine Übersicht der bisher identifizierten HDV-ähnlichen Viren dar. Die Tatsache, dass HDV-ähnliche Viren in mehreren Taxa existieren, weist darauf hin, dass HDV weitaus älter sein könnte als bisher angenommen.

Tabelle 1: Chronologische Reihenfolge der Entdeckung von HDV und HDV-ähnlichen Viren. Das in dieser Arbeit untersuchte HDV-ähnliche Virus aus Stachelratten, RDeV, ist in fett dargestellt.

Virus	Wirt	Entdeckungsjahr	Referenz
HDV	Mensch	1980	[11-13]
AvianDV	div. Enten (<i>Anas gracilis</i> , <i>Anas castanea</i> , <i>Anas superciliosa</i>)	2018	[88]
SnakeDV	Timor-Wasserpython und Abgottschlange (<i>Liasis mackloti</i> , <i>Boa constrictor sabogae</i>)	2019	[89]
NewtDV	Feuerbauchmolch (<i>Cynops orientalis</i>)	2019	[90]
ToadDV	asiatische Kröte (<i>Bufo gargarizans</i>)	2019	[90]
TermiteDV	Termite (<i>Schedorhinotermes intermedius</i>)	2019	[90]
FishDV	div. Fische (<i>Macroramphosus scolopax</i> , <i>Ophidion sp.</i> , <i>Eptatretus burgeri</i> , <i>Okamejei acutispina</i> , <i>Proscyllium habereri</i> , <i>Lophius litulon</i> , <i>Eleutheronema tetradactylum</i> , <i>Zeus faber</i> , <i>Antennarius striatus</i> , <i>Halieutaea stellata</i> , <i>Gonorynchus abbreviatus</i>)	2019	[90]
RDeV	Stachelratte (<i>Proechimys semispinosus</i>)	2020	[91]
OvirDV	Weißwedelhirsche (<i>Odocoileus virginianus</i>)	2021	[92, 93]

MmonDV	Waldmurmeltiere (<i>Marmota monax</i>)	2021	[92, 93]
DrDV-A und DrDV-B	Vampirkfledermaus (<i>Desmodus rotundus</i>)	2021	[93]
PmacDV	Hundskopffledermaus (<i>Peropteryx macrotis</i>)	2021	[93]
TgDV	Zebrafink (<i>Taeniopygia guttata</i>)	2021	[92]
LsDV	Bronzemännchen (<i>Lonchura striata</i>)	2021	[92]

All diese HDV-ähnlichen Viren sind bisher noch nicht klassifiziert und haben eine hohe Divergenz innerhalb ihrer Primärsequenz. Trotzdem teilen sie besondere Charakteristika mit dem humanen HDV und werden daher als Deltaviren oder HDV-ähnliche Viren zusammengefasst [94]. Alle bisher charakterisierten Deltaviren haben ein negatives RNA-Genom, mit einem hohen Anteil an intramolekularer Basenpaarung. Diese bilden ebenso wie HDV eine unverzweigte, stäbchenförmige Struktur. Zudem weisen die Genome HDV-typische Ribozyme auf [88, 91-93]. Ferner wurden HDV-ähnliche Ribozyme kürzlich in den Sequenzen von FishDV und NewtDV entdeckt, während innerhalb der Sequenzen von ToadDV und TermiteDV Viroid- und Pflanzenvirus-typische Hammerkopf-Ribozym-Strukturen beschrieben wurden [95].

Ein weiteres HDV-Merkmal ist ein OLR, der für das HDAg kodiert. Alle HDV-ähnlichen Virussequenzen scheinen solch einen OLR zu enthalten, der für ein Protein kodiert. Die Sequenzen variieren zwischen 180 und 225 Aminosäuren in der Länge, dabei sind funktionelle Domänen und post-translationale Modifikationsstellen innerhalb aller tierischen Deltaantigene (DAg) und humaner HDAg konserviert. Innerhalb des DAg fehlt jedoch bei allen das für HDV-typische Farnesylierungsmotiv (CxxQ). Dies geht einher mit einer Besonderheit aller neu identifizierten HDV-ähnlichen Viren: Die Viren wurden alle unabhängig von einer Hepadnavirus-Koinfektion gefunden [88-93].

Während für die meisten HDV-ähnlichen Virussequenzen ein Replikationsnachweis fehlt, konnten *In-vitro*-Daten zeigen, dass das SnakeDV die Oberflächenproteine verschiedener Arenaviren sowie eines Hantavirus, nicht aber HBV-Oberflächenproteine, für die Assemblierung infektiöser Partikel verwenden kann [96].

1.2 Das Hepatitis-B-Virus

Die charakteristischen Symptome einer akuten HBV-Infektion, wie die Gelbsucht (*Ikterus*), wurden bereits von Hippocrates beschrieben [97]. Als in Bremerhaven sowie in einer Anstalt im Saarland nach einer Pockenimpfung, die zur Stabilisierung humane

„Lympe“ enthielt, ein Ausbruch der katarrhalischen Gelbsucht – „Eine Ikterusepidemie“ beobachtet wurde, implizierte A. Lürman, dass es sich um eine Infektionskrankheit handele [98]. S. McDonald schlug 1908 einen viralen Erreger als Auslöser der infektiösen Gelbsucht vor [98, 99]. Weitere Beobachtungen konnten später Unterschiede in der Übertragung der infektiösen Hepatitis feststellen und gaben Anlass, dass die Erreger in zwei Typen unterschieden wurden. Typ A betraf vor allem Kinder und wurde vorwiegend fäkal-oral z. B. über mit Fäkalien verunreinigte Lebensmittel oder Trinkwasser übertragen. Typ B (auch Serumhepatitis genannt) wurde vorwiegend durch medizinische Eingriffe, parenteral bzw. über Blut und Blutprodukte übertragen [100]. Tatsächlich entdeckte der Mediziner B.S. Blumberg und sein Mitarbeiter H. Alter 1963 ein neues Protein im Blut eines australischen Ureinwohners, das fortan als „*Australia Antigen*“ (AuAg) bezeichnet wurde [101, 102]. Auf der Suche nach dem Erreger entdeckte der Virologe D.S. Dane im Elektronenmikroskop, neben einer hohen Anzahl an 20 nm großen AuAg (heute bekannt als subvirale Partikel), 45 nm große Virus-(ähnliche) Partikel (Dane-Partikel), die das AuAg auf ihrer Oberfläche trugen [103]. Kurze Zeit später wurde die virale DNA-Polymerase und anschließend die virale DNA nachgewiesen [104-106]. Die Dane-Partikel sind heute als Hepatitis-B-Virus (HBV) bekannt, während das *Australia Antigen* die Oberflächenproteine des HBV (*engl.: HBV surface antigen, HBsAg*) bezeichnet (Abbildung 3).

1.2.1 Taxonomie der *Hepadnaviridae*

Das Hepatitis-B-Virus ist ein Mitglied der Familie der *Hepadnaviridae*. Diese umfassen hepatotrope DNA-Viren mit partiell doppelsträngigem Genom. Die Infektionen können persistieren oder transient verlaufen. Alle Mitglieder teilen bestimmte Charakteristika: Dazu gehört neben dem DNA-Genom, die Expression von drei Hauptproteinen: Das PräCore/Core, die Polymerase und das PräS/S-Protein sowie die Replikation über eine reverse Transkription. Die Familie der *Hepadnaviridae* setzte sich zunächst aus zwei Gattungen zusammen: Die Avihepadnaviren, welche in Vögeln vorkommen und die Orthohepadnaviren, welche Säugetiere infizieren. Inzwischen sind drei weitere Gattungen hinzugekommen: Die Metahepadnaviren und Parahepadnaviren infizieren

Fische und wurden insbesondere durch metagenomische Analysen entdeckt, sowie die Herpetohepadnaviren, die bei Reptilien und Fröschen vorkommen [107].

1.2.2 Epidemiologie der *Orthohepadnaviridae*

Die Gattung der Orthohepadnaviren (*Orthohepadnaviridae*) setzt sich aus insgesamt 12 Arten/Spezies zusammen. Die wohl bekannteste Spezies ist das HBV des Menschen, welches inzwischen in zahlreiche (Sub-) Genotypen unterteilt ist. Dazu gehören die HBV-Gt A-J, welche in verschiedenen Gebieten der Welt epidemiologisch unterschiedlich verbreitet sind [108].

Der HBV-Gt A kommt primär in Europa, Afrika und Nordamerika vor. Die HBV-Gt B und C dominieren in südostasiatischen Ländern, während der HBV-Gt D in mediterranen sowie in zentralasiatischen Gebieten verbreitet ist. In Australien werden vorwiegend die HBV-Gt C und D nachgewiesen. Der HBV-Gt E ist vorherrschend in der west- und zentralafrikanischen Bevölkerung. Die HBV-Gt F und H sind die mit der höchsten Divergenz und werden primär in Süd- bzw. Mittelamerika gefunden. Der HBV-Gt G wird nur vereinzelt nachgewiesen. In Vietnam, Laos, Indien und China ist der HBV-Gt I verbreitet. Dieser scheint jedoch eine Rekombinante der Gt A, C, G sowie eines weiteren unbekanntes Gt zu sein [108, 109]. Der putative HBV-Gt J stellt eine Ausnahme dar, da bisher nur ein Isolat identifiziert wurde. Dieses stammt von einem 88-jährigen japanischen Patienten mit HCC, der während des Zweiten Weltkriegs auf Borneo lebte. Die höchste Sequenzidentität hat dieser Gt mit den Isolaten aus Gibbons und Orang-Utan, was auf eine Rekombination dieser Stämme mit humanen HBV-Gt hinweist [110].

Neben den Gt A-J werden zusätzlich HBV-Stämme unterschieden, welche in (Menschen-) Affen der Alten Welt entdeckt wurden. Darunter zählen das HBV des Schimpansen [111, 112], des Gorillas [113], des Orang-Utans [114] und des Gibbons [115] (Tabelle 2). Das Artabgrenzungskriterium der Gattung der Orthohepadnaviren liegt bei einem Schwellenwert von >20 % Divergenz der Nukleotidsequenz des Genoms. Eine Nukleotidsequenz-Divergenz von 8 % gilt als Schwellenschwert für die Definition einzelner Genotypen [107], die Subgenotypen werden ab einer Nukleotidsequenz-Divergenz von 4 % unterschieden [108]. Innerhalb dieser HBV-

Isolate aus Altweltaffen gibt es weniger als 20 % Divergenz und die Isolate unterscheiden sich nicht stärker vom HBV des Menschen als die verschiedenen HBV-Gt voneinander und werden daher phylogenetisch als HBV-Gt behandelt. Von seltenen Ausnahmen abgesehen [110], wurden diese HBV-Stämme bisher noch nicht im Menschen nachgewiesen. Allerdings wurden in Schimpansen und Gorillas bereits Isolate identifiziert, die eine hohe Identität zu den humanen HBV-Gt hatten [116, 117]. Dies zeigt, dass die HBV-Gt scheinbar die Speziesbarriere innerhalb der Primaten überschreiten können. 1998 wurde erstmals eine Hepatitis-B-Viruspezies in einer Primatenart der Neuen Welt entdeckt: Das aus in Gefangenschaft lebenden Wollaffen (*Lagothrix lagotricha*) stammende WMHBV (engl.: *Woolly Monkey Hepatitis-B-Virus* (WMHBV)), welches eine Nukleotidsequenz-Divergenz des Genoms von 22 % zu HBV besitzt und eine enge genetische Verwandtschaft zu den humanen HBV-Gt F und H zeigt [118] (Tabelle 2). Studien konnten zeigen, dass die Oberflächenproteine des WMHBV in der Lage sind, humane Hepatozyten zu infizieren, was auf ein zoonotisches Potential hindeuten könnte [119].

Weitere Mitglieder der Orthohepadnaviren bilden Viren, die Fledermäuse infizieren. Hierzu gehören vier Spezies, die in Altwelt-Fledermäusen identifiziert wurden, darunter das LFBHBV (engl.: *Long-fingered bat Hepatitis-B-Virus*) [120], das PBHBV (engl.: *Pomona bat Hepatitis-B-Virus*) [121] und das RBHBV (engl.: *Roundleaf bat Hepatitis-B-Virus*) sowie das nahverwandte HSBHBV (engl.: *Horseshoe bat Hepatitis-B-Virus*) [122] (Tabelle 2). Das zoonotische TBHBV (engl.: *Tent-making bat Hepatitis-B-Virus*) wurde hingegen in Neuwelt-Fledermäusen der Gattung *Uroderma bilobatum* entdeckt [122] (Tabelle 2).

Orthohepadnaviren der Neuen Welt wurden daneben in Nagetieren, die in Gebieten Nordamerikas endemisch sind, wie z. B. dem Erdhörnchen [123], dem arktischen Ziesel [124] und dem Waldmurmeltier [125], identifiziert. Zudem wurden kürzlich bisher unbekannte Orthohepadnaviren in domestizierten Katzen [126], einer Antilope [127] und einer chinesischen Spitzmaus entdeckt [128] (Tabelle 2).

Tabelle 2: Chronologische Reihenfolge der Entdeckung der Orthohepadnaviridae. In Klammern ist die Wirtsspezies der Erstbeschreibung angegeben. Die in dieser Arbeit untersuchten HBV-Spezies sind in fett dargestellt.

Virus	Wirt	Jahr	Referenz
HBV Hepatitis-B-Virus	Mensch	1970	[103]
WHV Woodchuck Hepatitis Virus	Waldmurmeltier (<i>Marmota monax</i>)	1978	[125]
GSHV Ground Squirrel Hepatitis Virus	Erdhörnchen (<i>Spermophilus beecheyi</i>)	1980	[123]
ChHBV Chimpanzee Hepatitis-B-Virus	Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	1988	[111]
GiHBV Gibbon Hepatitis-B-Virus	Gibbon (<i>Hylobates lar</i>)	1996	[115]
ASHV Arctic ground squirrel Hepatitis Virus	Arktischer Ziesel (<i>Spermophilus parryi kennicotti</i>)	1996	[124]
WMHBV Woolly Monkey Hepatitis-B-Virus	Wollaffe (<i>Lagothrix lagotricha</i>)	1998	[118]
OuHBV Orang-Utan Hepatitis-B-Virus	Orang-Utan (<i>Pongo pygmaeus</i>)	1999	[114]
GoHBV Gorilla Hepatitis-B-Virus	Gorilla (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>)	2000	[113]
LBHBV Long-fingered bat Hepatitis-B-Virus	Langflügel Fledermaus (<i>Miniopterus fuliginosus</i>)	2013	[120]
TBHBV Tent-making bat Hepatitis-B-Virus	Zeltbauende Fledermaus (<i>Uroderma bilobatum</i>)	2013	[122]
HSBHBV Horseshoe bat Hepatitis-B-Virus	Hufeisennasen Fledermaus (<i>Rhinolophus alcyone</i>)	2013	[122]
RBHBV Roundleaf bat Hepatitis-B-Virus	Rundblattnasen Fledermaus (<i>Hipposideros cf. ruber</i>)	2013	[122]
PBHBV Pomona bat Hepatitis-B-Virus	Pomona-Rundblattnasen Fledermaus (<i>Hipposideros pomona</i>)	2015	[121]
TFoHBV Tai Forest Hepatitis-B-Virus	Antilope (<i>Philantomba maxwellii</i>)	2019	[127]
DCHBV Domestic cat Hepatitis-B-Virus	Hauskatze (<i>Felis catus</i>)	2018	[126]
CMHBV Capuchin monkey Hepatitis-B-Virus	Kapuzineraffe (<i>Sapajus xanthosternos</i>)	2018	[129]
CSHBV/MSHBV _{CHN} Chinese shrew Hepatitis-B-Virus	Spitzmaus (<i>Anourosorex squamipes</i> , <i>Crocidura attenuate</i> , <i>Crocidura lasiura</i>)	2019	[128]
CSHBV (Gt A und Gt B) Crowned shrew Hepatitis-B-Virus	Spitzmaus (<i>Sorex araneus</i>, <i>Sorex coronatus</i>)	2019	[130]
MSHBV _{CIV} Musk shrew Hepatitis-B-Virus	Spitzmaus (<i>Crocidura olivieri</i>)	2019	[130]
EqHBV Equid Hepatitis-B-Virus	pferdeartige Tiere (<i>Equus asinus</i>, <i>Equus quagga</i>)	2021	[131]

1.2.3 Morphologie des HBV

Die Virionen des HBV besitzen eine sphärische Morphologie und haben einen Durchmesser von 42-45 nm [103, 132]. Sie werden umgeben von einer Lipidmembran, in welcher die drei Oberflächenproteine integriert sind (Abbildung 3). Im Inneren befindet sich in der Regel das 36 nm große, ikosaedrische Nukleokapsid, welches aus etwa 240 Core-Untereinheiten (120 Dimere) besteht und das 3,2 kb große, partiell doppelsträngige, zirkuläre DNA-Genom umschließt [133, 134] (Abbildung 3). Neben den infektiösen Virionen werden auch subvirale Partikel (Abbildung 3) von infizierten

Zellen sekretiert [135]. Diese sind nicht infektiös, da sie nur aus HBsAg bestehen und keine virale DNA enthalten. Sie sind im Durchschnitt kleiner als die Virionen und besitzen eine filamentöse (ca. 20 nm) oder sphärische (ca. 16-25 nm) Morphologie. Sie werden in einem Überschuss von >1000 : 1 gegenüber den Virionen sekretiert und tragen zur viralen Antigenämie bei [23, 107, 136].

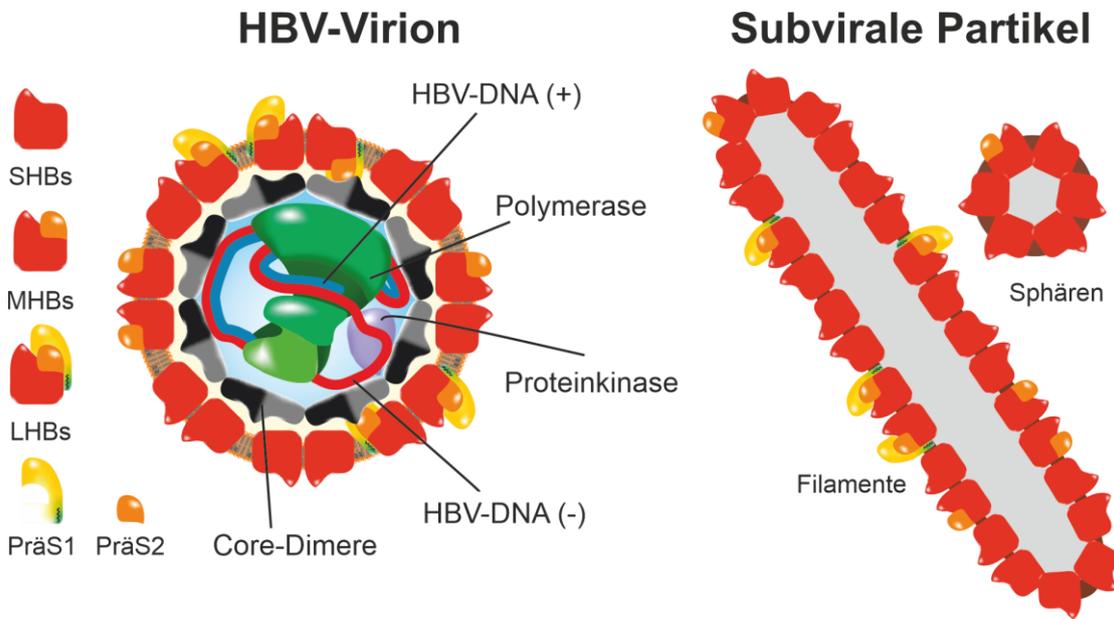


Abbildung 3: Schematische Darstellung des HBV-Virions und subviraler Partikel. Die äußere Hülle bildet eine Lipidhülle bestehend aus den drei Oberflächenproteinen. Das innere Nukleokapsid besteht neben den Core-Dimere, aus einer Wirtszell-entstammenden Proteinkinase, dem partiell doppelsträngigen DNA-Genom und einer Polymerase, die sich aus einer reversen Transkriptase, einer RNase-H, einem terminalen Protein und einer Spacer-Domäne zusammensetzt. Sphären und Filamente sind leere Partikel, ohne Nukleokapsid. HBs – HBV-Oberflächenprotein (engl.: HBV surface protein); SHBs – kleines (engl.: Small) HBV-Oberflächenprotein; MHBs – mittleres (engl.: Middle) HBV-Oberflächenprotein; LHBs – großes (engl.: Large) HBV-Oberflächenprotein. [Verändert nach Glebe & Bremer, 2013 [23]].

1.2.4 Genomaufbau des HBV

Das Genom besteht aus einem kompletten Minusstrang, der Plusstrang ist dagegen inkomplett und besitzt ein variables 3'-Ende. Der Minusstrang des DNA-Genoms ist dabei kovalent mit einer Primer-Domäne (freies Hydroxyl) der viralen Polymerase verbunden [105, 137, 138] und enthält vier OLR:

(1) Pol: ist mit 70 % des Genoms der größte Leserahmen und kodiert für ein Polyprotein bestehend aus Reverser Transkriptase, viraler Polymerase-Domäne, einer RNase H-Domäne und einer Priming-Domäne des terminalen Proteins [104].

(2) S: kodiert für alle drei Oberflächenproteine (HBsAg).

(3) X: Das X-Protein (HBx) ist für die virale Replikation essenziell [139]. Es interagiert mit vielen zellulären Proteinen und scheint insbesondere bei der epigenetischen Regulierung der cccDNA von Bedeutung zu sein [140, 141]. Außerdem beeinflusst es die HBV-assoziierte Karzinogenese [142].

(4) PräCore/Core: kodiert für das dimerisierende Core-Protein (HBc). Die Dimere assemblieren später zu einem Nukleokapsid. Aufgrund einer 5' „in-frame“-Verlängerung (PräCore) des Core-Gens wird neben dem HBc zudem das sekretierte, nicht-strukturelle e-Protein (HBe) translatiert, welches neben dem HBsAg und dem viralen DNA-Nachweis als diagnostischer Marker (HBeAg) einer Infektion dient [143, 144]. Das HBe hat zudem eine immunmodulierende Funktion und nimmt damit großen Einfluss auf die Chronifizierung einer HBV-Infektion [145-147].

1.2.4.1 Die Oberflächenproteine des HBV

Die HBV-Oberflächenproteine setzen sich aus dem kleinen (SHBs: S-Domäne), mittleren (MHBs: PräS2 + S-Domäne) und großen (LHBs: PräS1 + PräS2 + S-Domäne) HBV-Oberflächenprotein zusammen und werden kollektiv als HBs (*engl.: HBV surface protein*) bezeichnet. In der Eigenschaft als diagnostischer Marker einer aktiven HBV-Infektion hat sich die Bezeichnung HBsAg (*engl.: HBV surface antigen*) durchgesetzt. Alle drei viralen Proteine werden von einem einzelnen OLR durch interne Start-Codons kodiert. Die Transkription wird durch zwei unterschiedliche Promotoren initiiert, woraus zwei mRNAs resultieren. Aus einer 2,4 kb langen mRNA wird folgend das LHBs translatiert, eine 2,1 kb große mRNA dient daneben als Matrize für das MHBs sowie das SHBs [23, 107, 148, 149]. Die S-Domäne (226 AS) ist in allen drei Proteinen enthalten und ist wahrscheinlich durch vier Transmembrandomänen (TMD) mit der Membran des ER verbunden [150]. Zwischen der TMD2 und TMD3 liegt die, für das HBsAg charakteristische, antigene Region, „a“ – Determinante genannt, welche durch eine spezifische Konformation des Polypeptids der Antigen Schleife (*engl.: antigenic loop, AGL*) definiert ist. Virus-neutralisierende Antikörper binden bevorzugt Epitope innerhalb dieser Region, wodurch eine Infektion verhindert werden kann [151]. Innerhalb der externen Schleife zwischen TMD2 und TMD3 liegt zudem eine fakultative N-Glykosylierungsstelle (AS: 146), welche zwar keinen Einfluss auf die Sekretion von SVP hat, jedoch für die Sekretion der HBV-Virionen unerlässlich ist [152-154]. Trotz der

Notwendigkeit dieser Glykosylierung für die Assemblierung der Virionen (sowie der Umhüllung von HDV RNP) scheint sie ebenfalls die Bindung an die HSPGs zu stören und dadurch den viralen Eintritt negativ zu beeinflussen [153, 155]. Außerdem konnten Studien zeigen, dass die Antigenschleife des SHBs mit HSPGs auf der Zellmembran elektrostatisch interagiert. Diese Interaktion wird maßgeblich durch die negativ geladenen HSPGs und zwei positiv geladene Aminosäuren (Arginin 122 und Lysin 141) vermittelt [34]. Die Virionen werden durch die HSPGs an der Zellmembran stabilisiert, wodurch die NTCP-vermittelte Infektion ermöglicht wird.

Das MHBs enthält neben der S-Domäne weitere 55 AS am N-Terminus, das PräS2, welches im Lumen des ERs lokalisiert ist [156]. Die PräS2-Domäne besitzt neben einer obligatorischen N-Glykosylierungsstelle (AS: 4) eine weitere fakultative O-Glykosylierungsstelle (AS: 37) [157, 158]. Es wird impliziert, dass die N-Glykosylierung, nicht aber die O-Glykosylierung, eine Interaktion des Chaperones Calnexin mit MHBs vermittelt und daher eine Rolle während der viralen Assemblierung einnimmt [152, 159]. Daneben nimmt das MHBs keine essenzielle Rolle während der viralen Replikation ein, es scheint weder für die Sekretion viraler Partikel, die Formation subviraler Partikel noch für die Infektiosität der Virionen von Bedeutung zu sein [160].

Das LHBs setzt sich aus der S-Domäne, der PräS2-Domäne sowie weiterer Genotyp-abhängiger N-terminaler 108, 118 oder 119 AS (PräS1-Domäne) zusammen [108, 161]. Die PräS1-Domäne ist für den NTCP-abhängigen Zelleintritt erforderlich [39] und kommt innerhalb der Virionen in zwei verschiedenen Topologien vor (Abbildung 3) [162]. Für die Interaktion der Kapside, um die Assemblierung zu gewährleisten, ist eine interne/zytosolische Ausrichtung der PräS1-Domäne notwendig, daneben vermittelt eine externe Topologie die Interaktion mit dem NTCP [39, 163]. Die unterschiedlichen Topologien kommen in der Virushülle zu gleichermaßen vor [162]. Innerhalb der AS 2-9 des LHBs befindet sich ein Signal für die N-terminale Myristoylierung, welche entscheidend für die Bindung und Infektiosität der Virionen ist [164, 165]. Daneben sind insbesondere die Aminosäuren 9-15 für die NTCP-Bindung und Infektion notwendig. Dieser Bereich wird daher als essenzielle Domäne bezeichnet [39, 166, 167]. Die weiter C-terminal liegenden Bereiche der PräS1-Domäne (AS: 28-39 und 39-48) wurden als akzessorische Domänen definiert, die den Effekt der Virusbindung und

Infektion verstärken [39, 166]. Eine Studie um J. Le Seyec et al. konnte zudem durch Deletionsmutanten zeigen, dass die ersten 77 (75) Aminosäuren der PräS1-Domäne essenziell für die Infektiosität von HBV (und HDV) sind [168, 169]. Myristoylierte Peptide der Aminosäuren 2-48 können eine HBV-Infektion inhibieren und werden daher *in vitro* und klinisch als kompetitive Inhibitoren einer (HBV- und) HDV-Infektion eingesetzt (Bulevirtid) [8, 166, 167].

1.2.5 Replikation des HBV

Nach einer niedrigaffinen Bindung der Antigenschleife an HSPGs und einer hochaffinen Interaktion der myristoylierten PräS1-Domäne und dem NTCP der Hepatozyten wird das HBV-Nukleokapsid über eine Clathrin-vermittelte Endozytose in das Zytoplasma freigesetzt [36, 39, 42] (Abbildung 4). Innerhalb der Arginin-reichen Domäne des C-Terminus des HBc befindet sich eine Kernlokalisationssequenz, weshalb das Nukleokapsid über Mikrotubuli-Filamente an die Kernporen transloziert wird [170, 171]. Dort angekommen, werden die reifen Nukleokapside innerhalb einer Korbstruktur (*engl.: nuclear basket*) disassembliert und die entspannt-zirkuläre DNA (*engl.: relaxed circular DNA, rcDNA*), die innerhalb des Nukleokapsids an die Polymerase gebunden ist, in das Kernplasma freigesetzt [172] (Abbildung 4). Die rcDNA besteht dabei aus einem kompletten Minusstrang, der mit seinem 5'-Ende kovalent an die virale Polymerase gebunden ist und einem unvollständigen Plusstrang, der am 5'-Ende ein RNA-Oligonukleotid als Primer für die Synthese des Plusstrangs gebunden hat [173]. Über Interaktion der rcDNA mit nukleären Wirtsfaktoren wird die kovalent geschlossene zirkuläre DNA (*engl.: covalently closed circular DNA, cccDNA*) gebildet, die als Transkriptionsvorlage für alle HBV-RNAs dient (Abbildung 4). Dies umfasst folgende Schritte: (1) Das Entfernen der kovalent mit dem viralen Minusstrang gebundenen DNA-Polymerase, (2) das Entfernen des RNA-Oligonukleotids vom Plusstrang, (3) das Komplementieren des Plusstrangs und (4) die Ligation der verbliebenen Nicks [174-176]. Der Prozess ist noch nicht vollständig verstanden, jedoch konnten kürzlich die minimalen Wirtsfaktoren, die für die Bildung der cccDNA benötigt werden, identifiziert werden [173, 177]. Die cccDNA wird mit Wirtshistonen und zellulären sowie viralen (z. B. HBx) Proteinen zu einer stabilen Chromatin-ähnlichen Struktur verpackt, die als „Minichromosom“ episomal im Zellkern infizierter

Hepatozyten verweilt [178-180] (Abbildung 4). Daraufhin folgt die Transkription der prägenomischen RNA (pgRNA) und vier weiterer viraler mRNAs (HBe und drei subgenomische: HBx, SHBs/MHBs, LHBs) durch die zelluläre RNA-Polymerase II [181]. Es wird impliziert, dass zuerst die Synthese des HBx als erstes erfolgt und dies die Transkription der pgRNA und der subgenomischen RNAs initiiert, indem es unter anderem zelluläre Transkriptionsfaktoren rekrutiert [140, 182-184]. Alle RNAs besitzen eine 5'-Cap-Struktur sowie ein Poly(A)-Signal am 3'-Ende (Nukleotide 1916-1921: UAUAAA) und werden in das Zytoplasma exportiert. Im Zytoplasma wird aus der HBe mRNA zunächst das PräCore Polypeptid translatiert, dieses welches anschließend zum ER transloziert. Dort werden die Signalpeptide entfernt und das reife HBeAg wird in den Blutkreislauf freigesetzt [185] (Abbildung 4). Aus der pgRNA werden das HBc und die virale Polymerase translatiert. Die virale Polymerase bindet wiederum die pgRNA, dieser Komplex wird im Zytosol von HBc-Dimeren umschlossen und die Enkapsidierung eingeleitet. Der Prozess wird über die Bindung der viralen Polymerase an ein *Cis*-aktives Element (Epsilon-Signal) innerhalb einer pgRNA Sekundärstruktur initiiert [186, 187]. Innerhalb der Kapside wird über die Reverse Transkriptase der Polymerase von der pgRNA die rcDNA synthetisiert [138]. Dabei wird zunächst der Minusstrang revers transkribiert, der wiederum als Matrize für die Plusstrang-Synthese dient [188]. Die pgRNA wird während der Minusstrang-Synthese durch die RNase H-Domäne der Polymerase degradiert, dabei bleibt ein kleines RNA-Oligonukleotid als Primer-Domäne zurück (Abbildung 4). Nachdem die Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs am ER translatiert wurden, interagiert ein Teil der reifen Nukleokapside mit der Region zwischen der PräS1 und der PräS2-Domäne der Oberflächenproteine, woraus infektiöse Virionen entstehen [189]. Ein anderer Teil der reifen Nukleokapside wird wiederum in den Nukleus transportiert, bis ausreichend HBsAg translatiert wurde (Abbildung 4). Die infektiösen Virionen und die subviralen Filamente werden über multivesikuläre Körperchen aus den Hepatozyten in die Blutbahn freigesetzt [190, 191], während die subviralen Sphären über den Golgi-Apparat aus den Zellen gelangen [192] (Abbildung 4).

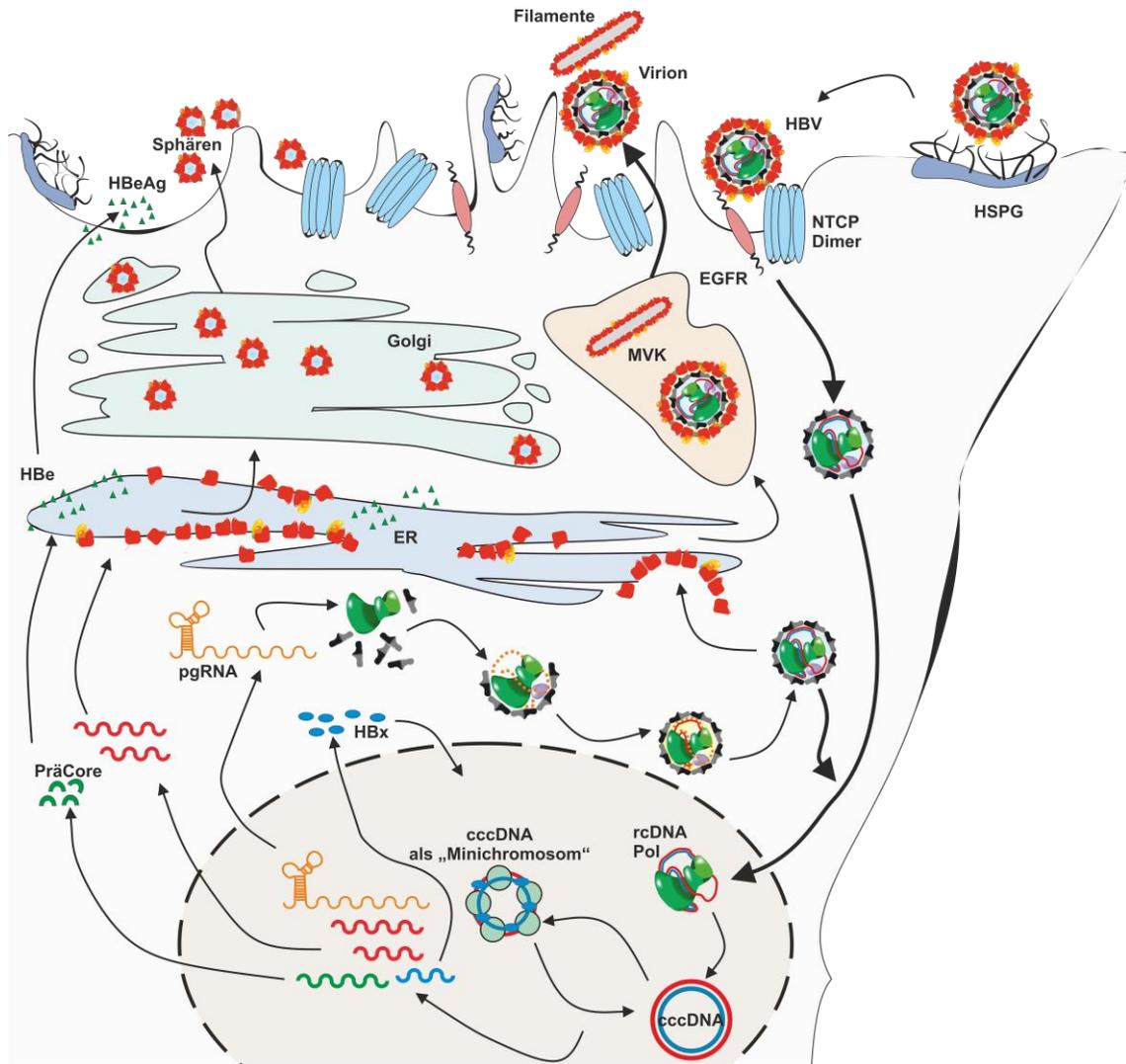


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der Replikation von HBV. Nach der Bindung an HSPGs mit niedriger Affinität und der Bindung mit hoher Affinität an NTCP der basolateralen Hepatozytenmembran tritt das HBV-Virion in das Zytoplasma ein und das Nukleokapsid wird über Mikrotubuli-Filamente zur Kernpore des Nukleus transportiert. Nach einer Disassemblierung wird die rcDNA in das Kernplasma freigesetzt. Aus der rcDNA wird über Interaktion mit Wirtsfaktoren eine kovalent geschlossene zirkuläre DNA (cccDNA). Diese wird zusammen mit Wirtsfaktoren und viralen Proteinen zu einem Minichromosom verpackt, welches episomal im Zellkern verweilt. Aus der cccDNA werden prägenomische (pgRNA) und (subgenomische) mRNAs transkribiert. Eine mRNA dient der Translation eines Vorläufer-Proteins (PräCore), dieses wird weiter prozessiert, woraus ein immunmodulatorisches Protein (HBeAg) resultiert. Die pgRNA dient als Matrize für die Polymerase und das HBcAg, die subgenomischen mRNAs werden für die Translation der Oberflächenproteine (HBsAg) und das HBx benötigt. Durch die Assemblierung der pgRNA, der viralen Polymerase und der HBcAg-Dimere kommt es zur Bildung unreifer Nukleokapside. Während der Reifung wird die rcDNA durch die Reverse Transkriptase synthetisiert. Die reifen Nukleokapside werden entweder wieder direkt in den Zellkern transportiert oder sie translozieren zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) und interagieren dort mit den Oberflächenproteinen. Die Virionen werden zusammen mit den Filamenten über multivesikuläre Körperchen (MVK) aus den Hepatozyten in die Blutbahn sezerniert, die Sphären verlassen die Hepatozyten über den Golgi-Apparat. [Verändert nach Glebe & Bremer, 2013 [23]].

1.3 NTCP als Rezeptor für HBV und HDV

Der NTCP (SLC10A1) gehört, neben weiteren Mitgliedern, zu der *Solute Carrier* Familie 10 (SLC10). Zusammen mit dem apikalen Natrium-abhängigen Gallensalztransporter ASBT (SLC10A2) besteht die physiologische Funktion dieser Proteine darin, ein Gallensalmolekül zusammen mit einem Natriumion durch die Leber- (NTCP) bzw. Darmmembran (ASBT) zu transportieren, wodurch der enterohepatische Kreislauf der Gallensalze und somit die Gallensäurehomöostase aufrechterhalten wird [193, 194]. Gallensalze emulgieren die aufgenommenen Fette aus der Nahrung sowie fettlösliche Vitamine und erleichtern so die Resorption und Verdauung. Es ist üblich, dass das humane SLC10A1 als "NTCP" und nicht-humane SLC10A1-Orthologe als "Ntcp" bezeichnet werden.

Obwohl schon seit längerem bekannt ist, dass insbesondere die PräS1-Domäne des LHBs für den Zelleintritt verantwortlich ist, war lange Zeit unbekannt, welchen Wirtsfaktor HBV/HDV für den Eintritt in Hepatozyten nutzen. Im Jahre 2012 gelang es der Arbeitsgruppe um H. Yan et al. den humanen Gallensäure Transporter NTCP als HBV/HDV Rezeptor zu identifizieren [39]. Innerhalb dieser Arbeiten wurden Hepatomzelllinien, die nur eine sehr niedrige endogene Expression von NTCP aufweisen, mit Expressionsplasmiden des NTCP transfiziert, wodurch sie für eine HBV- und eine HDV-Infektion empfänglich wurden. Die Bindung der Virionen an NTCP ist hochaffin und unter anderem für die hohe Wirtsspezifität sowie den Hepatotropismus des HBV verantwortlich [195, 196].

Der Durchbruch der Identifizierung von NTCP als spezifischer Eintrittsrezeptor für HBV und HDV hat das Verständnis des viralen Eintritts von HBV und HDV erheblich verbessert. So konnte gezeigt werden, dass HBV eher mit hochsulfatierten HSPGs, wie das primär an Hepatozytenmembranen exprimierte Glypikan 5 interagiert [35-37], was den Hepatotropismus begünstigt. Zudem konnte durch weitere Untersuchungen der EGFR als viraler Ko-Rezeptor identifiziert werden. EGFR scheint dabei die Clathrin-abhängige Endozytose des NTCP-HBV-Komplexes zu den späten Endosomen zu vermitteln [40-42]. Die Faktoren, die eine Fusion der viralen mit der zellulären Membran auslösen, sind aber bisher noch unbekannt.

2. Fragestellung

- I. Mitunter eine große Herausforderung in molekularbiologischen Studien, die sich mit der Replikation des Hepatitis-Delta-Virus (HDV) befassen, ist das Fehlen replikativer cDNA-Klone des HDV. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe für Virushepatitis unter der Leitung von Prof. Dr. Maura Dandri (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) sollten zwei HDV-Gt-1 Isolate kloniert und in Hinblick auf ihre Replikation und Sekretion analysiert werden. Folgende Fragestellungen waren dabei relevant:
 - **Gibt es genotypische Unterschiede in der Verpackungs- und Infektionseffizienz der HDV-Genotypen 1-4?**
 - **Ist die Aktivierung der HDV-Replikation durch das virale HDAg Isolat-spezifisch oder kann es durch heterologes HDAg anderer HDV-Isolate in „trans“ komplementiert werden?**

- II. In Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Drosten (Charité Berlin) und Prof. Dr. Sommer (Universität Ulm), wurde in Gewebe- und Blutproben von Stachelratten virale RNA detektiert, die eine hohe Homologie zu dem viralen Genom von HDV aufweist. Daher sollte die HDV-ähnliche virale RNA auf ihre Funktionalität untersucht werden. Folgende Fragestellungen waren dabei relevant:
 - **Kann die HDV-ähnliche RNA-Sequenz aus Stachelratten eigenständig eine Replikation *in vitro* initiieren?**
 - **Wird analog zu HDV von der HDV-ähnlichen RNA-Sequenz ein großes Deltaantigen exprimiert, welches die Fähigkeit zur Interaktion mit den Oberflächenproteinen von Hepadnaviren (HBsAg) ermöglicht?**

- III. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Drexler (Charité Berlin) wurde in Gewebe- und Blutproben von Kapuzineraffen, Spitzmäusen und Equiden virale DNA detektiert, die eine hohe Homologie zu dem Genom des humanen HBV aufweisen und neue HBV-Spezies darstellen. Aufgrund dessen sollte die Interaktion dieser neu entdeckten Viren mit ihrem putativen, zellulären Rezeptor NTCP/Ntcp untersucht werden. Folgende Fragestellungen waren dabei relevant:
 - **Sind die viralen Oberflächenproteine der Hepadnaviren aus Kapuzineraffen, Spitzmaus und Equiden in der Lage an den zellulären NTCP/Ntcp zu binden?**
 - **Können NTCP-Orthologe eine Infektion von humanen Hepatomzelllinien über die Oberflächenproteine dieser neuartigen Viren vermitteln und**
 - **Könnte hierdurch von diesen Hepatitis-B-Viren ein zoonotisches Risiko für den Menschen ausgehen?**

3. Verwendete Materialien

3.1 Plasmide

Tabelle 3: Übersicht aller verwendeten Plasmide sowie neu erzeugter Expressionsvektoren.

Name	Vektor	Insert	Quelle
Ntcps/NTCP Expressionsvektoren			
pcDNA5/FRT/TO_NTCP-FLAG	pcDNA5/FRT/TO	NTCP-FLAG	B. Döring
pcDNA5/FRT/TO_PtroNtcp	pcDNA5/FRT/TO	Pan troglodytes (Schimpanse) Ntcp	S. Müller [197]
pcDNA5/FRT/TO_MfasNtcp	pcDNA5/FRT/TO	Macaca fascicularis (Javaneraffe) Ntcp	
pcDNA5/FRT/TO_SsciNtcp	pcDNA5/FRT/TO	Saimiri sciureus (gew. Totenkopffaffe) Ntcp	
pcDNA5/FRT/TO_CjacNtcp	pcDNA5/FRT/TO	Callithrix jacchus (Weißbüschelaffe) Ntcp	
pcDNA5/FRT/TO_SoedNtcp	pcDNA5/FRT/TO	Saguinus oedipus (Lisztaffe) Ntcp	
pcDNA3.1(+)_SapNtcp	pcDNA3.1(+)	Sapajus apella (Haubenkapuziner) Ntcp	AG Glebe [129]
pcDNA3.1(+)_SorexNtcp	pcDNA3.1(+)	Sorex araneus (Waldspitzmaus) Ntcp	AG Glebe [130]
pcDNA3.1(+)_EselNtcp	pcDNA3.1(+)	Equus asinus (Hauseesel) Ntcp	AG Glebe [131]
Deltavirale Expressionsvektoren			
pSVL(D3)	pSVL	Trimer HDV Genom Gt 1	J. Taylor [56]
pHDV-2_pCR3.1_D2N1	pCR3.1	Dimer HDV Genom Gt 2	M. Chao [198]
pHDV-4_pCR3.1_D2Iib	pCR3.1	Dimer HDV Genom Gt 4	M. Chao
pHDVIII(-)	pCMV3	1.2mer HDV Genom Gt 3	J.L. Casey [199]
WHO_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_1.0mer (CHD_WHO)	pcDNA3.1(+)	Monomer HDV Genom Gt 1 - Sequenz des HDV-RNA WHO Standards [200]	AG Glebe
Taylor_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_1.0mer (pHDV_T)	pcDNA3.1(+)	Monomer HDV Genom Gt 1 - Sequenz siehe pSVL(D3)	
Hamburg_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_1.0mer (CHD_HH)	pcDNA3.1(+)	Monomer HDV Genom Gt 1 - Einzelsequenz einer klinischen Studie [201]	
WHO_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_1.0mer_noHDag (CHD_WHO_ΔS-HDag)	pcDNA3.1(+)	Monomer HDV Genom Gt 1 - Sequenz des HDV-RNA WHO Standards mit S-HDag Start-Codon Mutation [200]	

VERWENDETE MATERIALIEN

Taylor_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_1.0mer_noHDAG (pHDV_T_ΔS-HDAG)	pcDNA3.1(+)	Monomer HDV Genom Gt 1 - mit S-HDAG Start-Codon Mutation; Sequenz siehe pSVL(D3)	AG Glebe
Hamburg_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_1.0mer_noHDAG (CHD_HH_ΔS-HDAG)	pcDNA3.1(+)	Monomer HDV Genom Gt 1 - Einzelsequenz einer klinischen Studie mit S-HDAG Start-Codon Mutation [201]	
Taylor_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_HH-HDAG_1.0mer	pcDNA3.1(+)	Monomer HDV Genom Gt 1 - mit HDAG OLR des Hamburger Isolats.	
Hamburg_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_Taylor-HDAG_1.0mer	pcDNA3.1(+)	Monomer HDV Genom Gt 1 - Einzelsequenz einer klinischen Studie mit HDAG OLR des Taylor Isolats	
RDeV (P.sem183 HDV)_1.0mer in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	Monomer des Genoms des HDV-ähnlichen Virus aus Stachelratten [91]	AG Glebe / AG Muth
WHO_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_2.0mer (CHD_WHO)	pcDNA3.1(+)	Dimer HDV Genom Gt 1 - Sequenz des HDV-RNA WHO Standards [200]	AG Glebe
Taylor_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_2.0mer (pHDV_T)	pcDNA3.1(+)	Dimer HDV Genom Gt 1 - Sequenz siehe pSVL(D3)	
Hamburg_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_2.0mer (CHD_HH)	pcDNA3.1(+)	Dimer HDV Genom Gt 1 - Einzelsequenz einer klinischen Studie [201]	
WHO_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_2.0mer_noHDAG (CHD_WHO_ΔS-HDAG)	pcDNA3.1(+)	Dimer HDV Genom Gt 1 - Sequenz des HDV-RNA WHO Standards mit S-HDAG Start-Codon Mutation [200]	
Taylor_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_2.0mer_noHDAG (pHDV_T_ΔS-HDAG)	pcDNA3.1(+)	Dimer HDV Genom Gt 1 - mit S-HDAG Start-Codon Mutation; Sequenz siehe pSVL(D3)	
Hamburg_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_2.0mer_noHDAG (CHD_HH_ΔS-HDAG)	pcDNA3.1(+)	Dimer HDV Genom Gt 1 - Einzelsequenz einer klinischen Studie mit S-HDAG Start-Codon Mutation [201]	
Taylor_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_HH-HDAG_2.0mer	pcDNA3.1(+)	Dimer HDV Genom Gt 1 - mit HDAG OLR des Hamburger Isolats.	
Hamburg_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_Taylor-HDAG_2.0mer	pcDNA3.1(+)	Dimer HDV Genom Gt 1 - Einzelsequenz einer klinischen Studie mit HDAG OLR des Taylor Isolats	
RDeV (P.sem183 HDV)_2.0mer in pcDNA3.1(+)_Klon 4.8	pcDNA3.1(+)	Dimer des Genoms des HDV-ähnlichen Virus aus Stachelratten [91]	
S-HDAG Expressionsvektoren			
SHDAG-pHDV-1-pSVLD3 in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	S-HDAG aus pSVL(D3)	AG Glebe
SHDAG-pHDV-2 in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	S-HDAG aus pHDV-2_pCR3.1_D2N1	
SHDAG-pHDV-3 in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	S-HDAG aus pHDVIII(-)	

VERWENDETE MATERIALIEN

SHDAg-pHDV-4 in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	S-HDAg aus pHDV-4_pCR3.1_D2IIb	AG Gieße
X60193_Gt 2_SHDAg in pcDNA3.1(+) (gi)	pcDNA3.1(+)	S-HDAg Gt 2 – Genotypen Panel von Annika Giese (gi)	
AB037947_Gt 3_SHDAg in pcDNA3.1(+) (gi)	pcDNA3.1(+)	S-HDAg Gt 3 – Genotypen Panel von Annika Giese (gi)	
AF018077_Gt 4_SHDAg in pcDNA3.1(+) (gi)	pcDNA3.1(+)	S-HDAg Gt 4 – Genotypen Panel von Annika Giese (gi)	
LT594482_Gt 5_SHDAg in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	S-HDAg Gt 5 – Genotypen Panel von Annika Giese (gi)	AG Gieße
JX888102_Gt 6_SHDAg in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	S-HDAg Gt 6 – Genotypen Panel von Annika Giese (gi)	
LT604972_Gt 7_SHDAg in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	S-HDAg Gt 7 – Genotypen Panel von Annika Giese (gi)	
AJ584849_Gt 8_SHDAg in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	S-HDAg Gt 8 – Genotypen Panel von Annika Giese (gi)	
Taylor_SHDAg_HH in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	S-HDAg aus Taylor_HDV_Gt1 in pcDNA3.1(+)_WT_2.0mer	
WHO_SHDAg in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	S-HDAg aus WHO_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_2.0mer	
HH_SHDAg in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	S-HDAg aus Hamburg_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_2.0mer	
Avian-HDAg-MH824555 N-Flag in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	Deltaantigen des HDV-ähnlichen Virus aus Vögeln [88]	
Fish-HDAg-MN031240 N-Flag in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	Deltaantigen des HDV-ähnlichen Virus aus Fischen [90]	
Newt-HDAg-MN031239 N-Flag in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	Deltaantigen des HDV-ähnlichen Virus aus Molchen [90]	
Termite-HDAg-MK962759 N-Flag in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	Deltaantigen des HDV-ähnlichen Virus aus Termiten [90]	
Toad-HDAg-MK962760 N-Flag in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	Deltaantigen des HDV-ähnlichen Virus aus Kröten [90]	
Snake-HDAg-F18-5-MH988742.1 N-Flag in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	Deltaantigen des HDV-ähnlichen Virus aus Schlangen [89]	
Flag-Tag-SHDAg-HDV183 in pcDNA3.1(+)	pcDNA3.1(+)	Deltaantigen des HDV-ähnlichen Virus aus Stachelratten mit N-terminalen FLAG-Taq [91]	
HBV-Oberflächenproteine (HBsAg) zur Erzeugung pseudotypisierter Deltaviren			
Gt_B1_N4124_natProm_LHBs_PolyA in pcDNA3.1+	pcDNA3.1(+)	HBsAg des HBV Gt B1 Subgenotyp adw2	AG Gieße
3091_LHBs_3091EnhPREPolyA in pcDNA3.1+	pcDNA3.1(+)	HBsAg des HBV Gt D3, Subgenotyp ayw3	

pcDNA3.1_CMHBV_LMS_aus12Kol_LHBs_309 1EnhPREPPolyA in pcDNA3.1+	pcDNA3.1(+)	HBsAg des HBV aus Kapuzineraffen (CMHBV)	AG Glebe
EqHBV-Esel-LMS mit 3091-EnhPREPolyA in pCH9-200 (Hygro)	pCH9-200	HBsAg des HBV aus Equiden (EqHBV) [131]	
Crocidura_natProm_LHBs_PolyA in pcDNA3.1+	pcDNA3.1(+)	HBsAg des Spitzmaus HBVs (MSHBV) [130]	
Sorex_K1263_natProm_LHBs_PolyA in pcDNA3.1+	pcDNA3.1(+)	HBsAg des Spitzmaus HBV (CSHBV Gt B) [130]	
Sorex_GF2139_natProm_LHBs_PolyA in pcDNA3.1+	pcDNA3.1(+)	HBsAg des Spitzmaus HBV (CSHBV Gt A) [130]	
B. Döring, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Justus-Liebig-Universität Gießen S. Müller, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Justus-Liebig-Universität Gießen AG Glebe, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen AG Muth, Institut für Virologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin M. Chao, Institut für Mikrobiologie und Immunologie, Chang Gung Universität Taiwan			

3.2 Hepadnavirale Myr-PräS1-Peptide

Für die Peptidbindungsanalysen wurden hepadnavirale Myr-PräS1-Peptide der N-terminalen Aminosäuren 2-48 des großen Oberflächenproteins (PräS1, LHBs) verwendet. Alle Peptide, die für die Peptidbindungsanalysen verwendet wurden, sind C-terminal kovalent an ein Fluorophor (Alexa) gebunden. Für die CMHBV/HBV Inhibitionsversuche wurden zudem CMHBV und HBV Myr-PräS1-Peptide eingesetzt, die C-terminal mit einem Strep-Tag (WSHPQFEK) konjugiert sind. Am N-terminalen Glycinrest wurden alle Peptide zudem mit einer Myristinsäure (Myr) modifiziert. Die verwendeten Peptide wurden von der Firma Bio-Synthesis (Texas, USA) mit einer Reinheit von > 90 % synthetisiert.

CMHBV2-48myr-Alexa633 (CMHBV)

Myr – GLNQSTINPL GFFPSHQLDP LFKANSPAAD WQNPCHKDPW PSAHEVP C – [Alexa633]

CMHBV2-48myr-Strep (CMHBV)

Myr – GLNQSTINPL GFFPSHQLDP LFKANSPAAD WQNPCHKDPW PSAHEVP SA – [Strep-Tag]

DOHBV2-48myr-Alexa633 (EqHBV)

Myr – GQNQSVNPL GFLPVHSIDT SGGGGWDHSI QKDPWPQAKL PSPGNWG C – [Alexa633]

SMHBV-GF21-2-48myr-Alexa633 (CSHBV Gt A)

Myr – GNNWSPGANY GSMDSTPPGV ETLNWLQKL HPAKEDWTLT PQVGTNA C – [Alexa633]

SMHBV-CRO-2-48myr-Alexa633 (MSHBV)

Myr – GNFVDIM GSQAVGT SYGAAEGETFNP LADLGYLSK INPHQPLENY C – [Alexa633]

HBV2-48myr-Alexa568 (HBV Gt D3)

Myr – GQNLSTSNPL GFFPDHQLDP AFRANTANPD WDFNPNKDTW PDANKVG C – [Alexa568]

HBV2-48myr-Strep (HBV Gt D3)

Myr – GQNLSTSNPL GFFPDHQLDP AFRANTANPD WDFNPNKDTW PDANKVG SA – [Strep-Tag]

3.3 Restriktionsendonukleasen und weitere Enzyme

Alle Restriktionsendonukleasen und Enzyme wurden im mitgelieferten Inkubationspuffer eingesetzt oder wurden bereits als gebrauchsfertige Enzym-Puffer-Lösungen geliefert und nach Angaben des Herstellers verwendet.

Tabelle 4: Übersicht aller verwendeten Enzyme inklusive Restriktionsendonukleasen unter Angabe des Herstellers.

Name	Hersteller
In vitro Transkription	
T7 RNA-Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
PCR für Klonierung, Kolonie-PCR und qRT-PCR	
Phusion High Fidelity (HF) DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GoTaq DNA Polymerase	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DNase I, RNase-free	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Restriktionsendonukleasen für die Sequenzierung klonierter RDeV und HDV 2.0mer-Expressionskonstrukte	
XagI (EcoNI)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Eco47III (AfeI)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
BoxI (PshAI)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Weitere Enzyme	
Dpn I	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
RNase freie DNase I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kpn I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
BamHI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Benzonase Nuclease (250U/μl)	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland
T4 Polynucleotide Kinase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SuperScript III Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3.4 Verwendete Größen- und Molekulargewichtsmarker

Alle verwendeten Größen- und Molekulargewichtsmarker wurden nach Angaben des Herstellers verwendet.

Tabelle 5: Übersicht aller Größen- und Molekulargewichtsmarker sowie deren Hersteller und der Angabe der Verwendung.

Name	Hersteller	Verwendung
Quick-Load® 1 kb DNA Ladder	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA	DNA-Größenmarker
Color Prestained Protein Standard(Broad Range)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA	Protein-Molekulargewichtsmarker
SeeBlue Plus2 Prestained Standard	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, MA, USA	
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, MA, USA	

3.5 Kommerzielle Kits und Reagenzien

Tabelle 6: Übersicht aller Reagenzien und Kits unter Angabe der Verwendung sowie der Bezugsquelle.

Name	Hersteller	Verwendung
RNA und DNA Extraktion		
InnuPREP Virus DNA/RNA Kit	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland	HDV-RNA Extraktion aus Zellkulturüberstand
TRIzol Reagent	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, MA, USA	RNA-Isolation aus Zellen
Monarch PCR & DNA Cleanup Kit	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA	DNA-Aufreinigung
Monarch DNA Gel Extraction Kit	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA	
Plasmid Plus Midi Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland	Plasmid-DNA-Aufreinigung
PCR und cDNA Synthese		
Random Hexamers	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, MA, USA	Primer für Reverse Transkriptase
dNTP Set	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, MA, USA	Deoxynukleosidtriphosphate für die Vervielfältigung der DNA über PCR
Northern Blot		
PerfectHyb Plus Hybridization Buffer	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland	Prähybridisierungs- und Hybridisierungspuffer
Ribonucleotide Solution Set	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA	Ribonucleosid-Triphosphate für die Vervielfältigung von RNA über <i>in vitro</i> Transkription
RNase Inhibitor, Murine	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA	Schutz der RNA während IVT vor RNasen

VERWENDETE MATERIALIEN

Klonierung		
In-Fusion HD Cloning Kit	Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich	Erzeugung der 1.0mer HDV-/RDeV-Expressionskonstrukte
HDAg ELISA		
ETI-DELTAK-2	DiaSorin, Saluggia, Italien	Quantifizierung der HDV Infektionsrate
Western Blot		
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, MA, USA	Schutz vor Proteasen während der Lagerung der Proteine und Probenaufbereitung
ROTIPHORESE Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG (ROTH SELECTION), Karlsruhe, Deutschland	Acrylamid-, Bisacrylamid-StammLösung zur Herstellung von SDS-PAGE
4X Protein Sample Loading Buffer for Western Blots	LI-COR Biosciences – GmbH, Bad Homburg, Deutschland	Ladepuffer für SDS-PAGE
Clarity Max Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories, Inc., Feldkirchen, Deutschland	Luminol/Enhancer Reagenz
Radioaktive Nukleotide		
[α - ³² P] rUTP, 3000 Ci/mmol	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland	Radioaktive Nukleotide für die Erzeugung radioaktiv-markierter RNA/DNA-Sonden
[γ - ³² P] dATP, 3000 Ci/mmol		

3.6 *Escherichia coli*

Für die Klonierungen sowie die Plasmidvermehrung wurden kompetente *E.coli* Zellen nach Angaben des Herstellers verwendet.

Tabelle 7: Verwendete *Escherichia coli*.

Name	Stamm	Genotyp	Hersteller
Stellar™ Competent Cells	HST08	<i>F</i> –, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>phoA</i> , Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Δ <i>mcrA</i> , λ –	Takara Bio, USA (Clontech Laboratories, Inc.)

3.7 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden insgesamt drei Zelllinien verwendet, die ausschließlich humanen Ursprungs sind. Es handelte sich dabei um immortalisierte, adhärenz Zelllinien, die in Wachstumsmedium (Tabelle 10) gehalten wurden.

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Zelllinien.

Zelllinien-Name	Herkunft	Besonderheiten und Erstbeschreibung
HuH7	Hepatomzellen M. Ocker	[202]
HepG2	Hepatomzellen M. Ocker	Zellkulturplatten und -Schalen wurden zur Kultivierung mit Collagen Typ I beschichtet. Im Vergleich zu anderen Hepatomzelllinien erfüllen HepG2-Zellen viele differenzierte Leberfunktionen [203].
HepG2 Tet-On-hNTCP (HepG2-hNTCP)	Ursprungszelllinie: HepG2 Tet-On (TO) Advanced Takara Bio (Clontech Laboratories, Inc.), USA	HepG2-Zellen, die einen Tetracyclin regulierten Transaktivator exprimieren; unter Zugabe von Doxycyclin wird die Expression des stabil transfizierten hNTCP induziert. Geneticin: Selektion des pTet-On Advanced Systems Puromycin: Selektion des hNTCP-ZFN-Vektors
M. Ocker, Institut für Chirurgische Forschung, Philipps-Universität Marburg		

3.8 Geräte

Tabelle 9: Verwendete Geräte sowie Hersteller und Verwendung.

Name	Hersteller	Verwendung
Western Blot		
Mini-PROTEAN® Tetra Cell - Set	Bio-Rad Laboratories, Inc., Feldkirchen, Deutschland	SDS-PAGE
Biometra Fastblot	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland	Elektroblotting
ChemoCam Imager ECL	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland	ECL Western Blot Dokumentation
Northern Blot		
Gibco BRL Horizon 11-14 Horizontal Gel Electrophoresis System	Life Technologies Inc./ Gibco-BRL, Carlsbad, CA, USA	RNA-Gelkammer
Mini-Pump Variable Flow Slow	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland	Peristaltische Pumpe zum Umwälzen des MOPS Laufpuffers
VacuGene XL Vacuum-blotting system	Cytiva/ Amersham, Buckinghamshire, England	Vakuumblotting der Nukleinsäuren
Divac 2.4L	Leybold GmbH, Köln, Deutschland	Vakuum Membranpumpe
Amersham Typhoon Biomolecular Imager	Cytiva/ Amersham, Buckinghamshire, England	Phosphorimaging der Radioaktivblots
Fujifilm BAS cassette2 2025	FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland	Autoradiographiefilm (Phosphorschirm) – Visualisierung der RNA
Stratalinker 2400	Stratagene, Bellingham, WA, USA	UV-Crosslinker

VERWENDETE MATERIALIEN

Amersham Eraser	Cytiva/Amersham, Buckinghamshire, England	Löschen von Autoradiographiefilmen (Phosphorschirmen)
OV 2000	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland	Mini-Shaking-Hybridisierungsöfen
Zellkultur		
CO2 Inkubator MCO-19AIC	Panasonic Healthcare/ pHcbi/ PHC Europe B.V., Etten-Leur, Niederlande	Kultivierung von Zellkulturen
DMI6000 B inverted fluorescent microscope	Leica, Wetzlar, Deutschland	Fluoreszenzmikroskop
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)		
LightCycler 480 II	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	Quantitative qRT-PCR
MiniAmp Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems), Waltham, MA, USA	Thermocycler für semiquantitative PCR
Sonstige Geräte		
Consort EV231 Electrophoresis Power Supply	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Elektrophorese-Netzgerät
Herasafe KS	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland	Biologische Sicherheitswerkbank/ Sterilbank
Elektrophorese-Kammer (MINI & MIDI)	Carl Roth GmbH + Co. KG (ROTH SELECTION), Karlsruhe, Deutschland	Elektrophoresekammer für Agarosegele
Durchlichtmikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar, Deutschland	Zellvisualisierung
Lab 845	SI Analytics GmbH, Mainz, Deutschland	pH-Messgerät
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn, Deutschland	
PicoFuge	Stratagene, Bellingham, WA, USA	Mini-Zentrifuge
Sprout	Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA	Mini-Zentrifuge
Centrifuge 5417R/ 5430	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Tischzentrifuge
Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland	Zentrifuge mit Kühlfunktion
PicoDrop	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland	Photometer zur Bestimmung der Plasmid-DNA Konzentration/ Proteinmenge und weitere
G24 environmental incubator shaker/ Innova 44R	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA	Bakterienschüttler/ Inkubationsschüttler
Vortemp56	Labnet, Edison, NJ, USA	Thermoschüttler
MS2 Minishaker	IKA, Staufen, Deutschland	Vortexer

3.9 Puffer, Standardlösungen und Medien

Alle angesetzten Lösungen und Reagenzien wurden mit Wasser angesetzt, welches über eine Reinstwasseranlage aufbereitet wurde und den Qualitätsgrad „*aqua bidest*“ aufweist. Die Lösungen wurden, falls nötig, autoklaviert und/oder filtriert.

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung.

Name	Finale Konzentration - Zusammensetzung	
Western Blot		
OPT-Lysispuffer [204]	20 mM 140 mM 5 % 100 mM 1x	EDTA NaCl SDS [w/v] TRIS pH 8 Halt Protease Inhibitor Cocktail (frisch zufügen)
4x SDS-Probenpuffer	10 % 90 %	β-Mercaptoethanol [v/v] Protein Loading Buffer [v/v]
10x SDS-Laufpuffer	0,25 M 1,92 M 1 %	TRIS pH 8,3 Glycin SDS [w/v]
10x Transferpuffer	5 mM 390 mM 450 mM	EDTA Glycin TRIS pH 8,3
10x TBS pH 7,6	200 mM 1,5 M	TRIS NaCl
TBS-T	1x 0,1 %	TBS Tween 20 [v/v]
Blockierlösung-WB	1x 5 %	TBS Magermilchpulver [w/v]
Antikörperlösung-WB	1x 5 %	TBS-T Magermilchpulver [w/v]
Northern Blot – alle Puffer und Lösungen wurden mit autoklavierten DEPC-H₂O (0,9 ml/l) angesetzt		
10x MOPS pH 7 dunkel lagern	0,2 M 50 mM 10 mM	MOPS Natriumacetat EDTA
20x SSC pH 7	3 M 300 mM	NaCl Tri-Natrium-Dihydrat
Denaturierungspuffer I	1,3x 7,4 % 67 %	MOPS [v/v] Gefiltertes Formaldehyd (37 %) [v/v] Deionisiertes Formamid [v/v]
RNA-Ladepuffer	50 % 1 mM 0,4 % 0,4 %	Glycerin [v/v] EDTA Xylencyanol [w/v] Bromphenolblau [w/v]
Denaturierungspuffer II	50 mM 150 mM	NaOH NaCl

VERWENDETE MATERIALIEN

Neutralisierungspuffer	100 mM 150 mM	TRIS pH 7,5 NaCl
Low Stringency Waschpuffer	2x 0,1 %	SSC SDS [w/v]
High Stringency Waschpuffer	0,5x 0,1 %	SSC SDS [w/v]
Ultra-High Stringency Waschpuffer	0,1x 0,1 %	SSC SDS [w/v]
HDAg ELISA		
Lysepuffer (A)	25 mM 1 % 0,1 % 0,5 % 150 mM	TRIS pH 8 NP-40 SDS Na-Deoxycholate NaCl
Benzonase-Puffer (B)	25 mM 2,5 mM 0,025 U/ μ l	TRIS pH 8 MgCl ₂ Benzonase (frisch hinzufügen)
Zellkultur		
Wachstumsmedium	500 ml 10 % 100 U/ml 100 μ g/ml	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Fetal Bovine Serum (FKS) [v/v] Penicillin Streptomycin
Produktionsmedium	500 ml 2 % 100 U/ml 100 μ g/ml 2 mM 10 mM	William's E Medium, no phenol red Fetal Bovine Serum (FKS) [v/v] Penicillin Streptomycin L-Glutamine HEPES
Hepatocytes Growth Medium (HGM)	500 ml 0,2 % 1x 2 mM 10 nM 1 mM 0,1 mg/ml 10 mM 50 μ g/ml	William's E Medium, no phenol red Albumin Fraction V, very low endotoxin Insulin-Transferrin-Selenium L-Glutamine Dexamethason Natriumpyruvat Gentamicin HEPES Caspofungin/ CANCIDAS (frisch zufügen)
Infektionsmedium	Nach Gebrauch 2 % 6 μ g/ml 4 % 100 ng/ml	HGM Dimethylsulfoxid Doxycyclin Polyethylenglykol – PEG – Lösung 40 % Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)
Immunfluoreszenz		
Fixierungs- und Permeabilisierungslösung	3,8 % 0,1 %	Paraformaldehyd [w/v] Triton X-100
Blockierlösung-IF	1x 5 %	TBS BSA [w/v]

VERWENDETE MATERIALIEN

SEAP-Assay		
SEAP-Puffer (2X)	2 M 1 mM 20 mM	Diethanolamin (100 %) Magnesiumchlorid Hexahydrat L-Homoarginin
SEAP-Substrat	50 mM in ddH ₂ O	pNitrophenolphosphat
Sonstige Puffer/ Lösungen		
50x TAE	2 M 1 M 0.05 M	TRIS Essigsäure EDTA pH 8.0
50x PBS pH 7,4	1,37 M 27 mM 80 mM 18 mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
10x TBS pH 7,6	200 mM 1,5 M	TRIS NaCl
LB-Medium/Agar	1 % 0,5 % 1 % (1,5 %)	Bacto-Trypton [w/v] Bacto-Hefe-Extrakt [w/v] NaCl [w/v] (Bacto-Agar) [w/v]

3.10 Antibiotika

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Antibiotika unter Angabe der finalen Konzentration mit Bezugsquellen.

Name	Bezugsquelle	Finale Konzentration
Eukaryotische Zellkultur		
Gentamicin	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, MA, USA	Zusatz in HGM f.c.: 0,1 mg/ml
Penicillin/ Streptomycin (100x)	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, MA, USA	Zusatz in Zellkulturmedium (1x) Penicillin f.c.: 100 U/ml Streptomycin f.c.: 100 µg/ml
Doxycyclin -hyclate	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland	Induktion des humanen NTCP-Plasmids f.c.: 6 µg/ml
Puromycin Dihydrochlorid ≥98 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Selektion des humanen NTCP-Plasmids f.c.: 1 µg/ml
Geneticin (G418)	Thermo Fisher Scientific (Life technologies), Waltham, MA, USA	Selektion des Tet-on Systems f.c.: 200 µg/ml
Prokaryotische Zellkultur		
Carbenicillin Dinatriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Selektion positiv-transformierter <i>E. coli</i> f.c.: 100 µg/ml

3.11 Antikörper und weitere Marker

Tabelle 12: Liste der verwendeten Primär- und Sekundäntikörper. WB – Western Blot; IF – Immunfluoreszenz. f.c. – Finale Konzentration

Name	Antigenität	Wirt	Bezugsquelle	f.c.	
				WB	IF
Primäntikörper					
Anti-HDV-Antiserum	Gereinigte IgGs eines HBV/HDV positiven Patienten	Mensch	AG Glebe	1:5 000-1:20 000	1:200
Anti-beta Actin Antikörper	Monoklonaler Antikörper gegen Beta-Aktin (Aminosäuren 1-100 (N-terminal))	Maus	Abcam, Berlin, Deutschland	1:10 000-1:50 000	
Anti-Flag M2	Monoklonaler Antikörper gegen FLAG-Sequenz: DYKDDDDK	Maus	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland		1:200
Anti-L-RDeAg	Gereinigte IgGs eines gegen L-RDeAg immunisierten Kaninchens (Peptid: NH ₂ -C+GNLEAKGEPPTSRKIPE-COH ₂)	Kaninchen	AG Müller		1:50
Anti-S-RDeAg	Gereinigte IgGs eines gegen S-RDeAg immunisierten Kaninchens Peptide: NH ₂ -C+RGDGLSLRGEYEPW-COOH und NH ₂ -C+GGDGDVNPPEGTPRG-CONH ₂	Kaninchen	AG Müller	1:1000	1:50
Sekundäntikörper					
Anti-Maus-HRP	Maus IgG Kappa Bindungsprotein (m-IgG _k BP) - HRP konjugiert	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA	1:10 000-1:50 000	
Anti-Maus Alexa 488	IgG (leichte und schwere Kette) aus Maus - Alexa Fluor 488 konjugiert	Ziege	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, MA, USA		1:400
Anti-Rabbit-IgG Alexa 488	IgG (leichte und schwere Kette) aus Kaninchen - Alexa Fluor 488 konjugiert	Ziege	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, MA, USA		1:400
Anti-Meerschweinchen-HRP	IgG (leichte und schwere Kette) aus Meerschweinchen - HRP konjugiert	Ziege	Abcam, Berlin, Deutschland	1:100	
Anti-human Alexa 568	Leichte und schwere Kette des humanem IgG - Alexa Fluor 568 konjugiert	Ziege	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, MA, USA		1:400
Anti-human-HRP	Leichte und schwere Kette des humanem IgG -- HRP konjugiert	Ziege	Nordic-MUbio, Susteren, Niederlande	1:10 000-1:20 000	
Weitere Fluoreszenzfarbstoffe und Marker					
NBD-TC	Fluorophor gekoppeltes Taurocholat		AG Geyer		5 µM
DAPI	Fluoreszenzfarbstoff		Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, MA, USA		0,5-1 µg/ml
Hoechst 33342	Fluoreszenzfarbstoff		Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, MA, USA		0,5-1 µg/ml
AG Glebe, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen AG Müller, Institut für Virologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin AG Geyer, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Justus-Liebig-Universität Gießen					

3.12 Verwendete Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (Primer) dieser Arbeit wurden von der Firma Integrated DNA technologies, IDT (Belgien) synthetisiert. Sie wurden als Sonde für den Nachweis antigenomischer und genomischer RDeV-RNA sowie für die Klonierungen, Mutagenesen und (q-RT) -PCRs verwendet.

Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide/Primer.

Name	Sequenz	Verwendung	Resultierende(s) Plasmid(e)		
Primer für die Klonierung der HDV-Expressionskonstrukte (Dimere)					
pcDNA3.1-Hind-rev	5' – CAA GCT TAA GTT TAA ACG CTA GC – 3'	Amplifikation des Plasmids: RDeV (P.sem183 HDV)_1.0mer in pcDNA3.1(+)	RDeV (P.sem183 HDV)_2.0mer in pcDNA3.1(+)_2.0mer_Klon 4,8		
rodHDV-for	5' – ATG GAA ACA CCT CCT GGA GAA G – 3'				
rodHDV-for-P	5' – Phosphorylierung – ATG GAA ACA CCT CCT GGA GAA G – 3'				
rodHDV-rev-P	5' – Phosphorylierung – CCG GAG AGC GAG GAC CG – 3'				
pcDNA3.1_HDV_HH_FWD	5' – GCG TTT AAA CTT AAG CTC TTG GGC CAC TTC CGA ACG – 3'	Amplifikation des HDV (HH) cDNA Klons	Hamburg_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_Taylor-HDAg_2.0mer	Hamburg_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_2.0mer_noHDAg	Hamburg_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_2.0mer
HDV_HH_HDV_REV	5' – TTC GGA AGT GGC CCA AGC TCG GAC TCG GGC GG – 3'				
pcDNA3.1_HDV_HH_REV	5' – GTT CGG AAG TGG CCC AAG AGC TTA AGT TTA AAC GCT AGC C – 3'	Amplifikation des Plasmids: Hamburg_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_1.0mer / noHDAg/ Taylor-HDAg	Hamburg_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_Taylor-HDAg_2.0mer	Hamburg_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_2.0mer_noHDAg	Hamburg_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_2.0mer
HDV_HH_HDV_FWD	5' – CGC CGC CCG AGT CCG AGC TTG GGC CAC TTC CGA AC – 3'				
pcDNA3.1_HDV_WHO_FWD	5' – GCG TTT AAA CTT AAG CTC ATG AGC CAT AGT TCC GAG C – 3'	Amplifikation des HDV (WHO) cDNA Klons	WHO_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_2.0mer_noHDAg	WHO_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_2.0mer	WHO_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_2.0mer
HDV_WHO_HDV_REV	5' – CGG AAC TAT GGC TCA TGC TCG AAC TTG GGC GGC – 3'				
pcDNA3.1_HDV_WHO_REV	5' – CGG AAC TAT GGC TCA TGA GCT TAA GTT TAA ACG CTA GCC - 3'	Amplifikation des Plasmids: WHO_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_1.0mer / noHDAg	WHO_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_2.0mer	WHO_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_2.0mer	WHO_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_2.0mer
HDV_WHO_HDV_FWD	5' – CGC CGC CCA AGT TCG AGC ATG AGC CAT AGT TCC GAG – 3'				

VERWENDETE MATERIALIEN

Taylor_Backbone_FWD_2 (Taylor_Insert_FWD_2)	5' – CGC CGC CCG AGC CCG AGC CTG AGC CAA GTT CCG AG – 3'	Amplifikation des HDV (Taylor) cDNA Klons	Taylor_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_2.0mer_noHDAg	Taylor_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_2.0mer
Taylor_Insert_2_REV	5' – TTA GGT GAC ACT ATA GAC TCG GGC TCG GGC G – 3'			
Taylor_Backbone_F_2	5' – CGC CGC CCG AGC CCG AGT CTA TAG TGT CAC CTA AAT GAG CTC – 3'	Amplifikation des Plasmids: Taylor_HDV_Gt1 in pcDNA3.1(+) _WT_1.0mer /noHDAg / HH- HDAg	Taylor_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_HH- HDAg_2.0mer	Taylor_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_2.0mer
Taylor_Insert_REV (Taylor_Backbone_REV)	5' – CGG AAC TTG GCT CAG GCT CGG GCT CGG GC – 3'			
Primer für die Mutagenese der HDV Expressionskonstrukte				
WHO_noHDAg_For	5' – GAC CGG CTC AAC TCG ACA AGA GGC GGC AGT – 3'	Site-Directed Mutagenese des Plasmids: WHO_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_1.0mer	WHO_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_1.0mer_noHDAg	
WHO_noHDAg_Rev	5' – TCT TGT CGA GTT GAG CCG GTC CGA GTC GAG – 3'			
SDM_HDAg_FWD	5' – GAC CGG CTC AAC TCG GCT AGA GGC GGC – 3'	Site-Directed Mutagenese des Plasmids: Taylor_HDV_Gt1 in pcDNA3.1(+)_WT_1.0mer	Taylor_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_1.0mer_noHDAg	
SDM_HDAg_REV	5' – TCT AGC CGA GTT GAG CCG GTC CGA GTC – 3'			
Hamburg_NoHDAg_Fwd	5' – GAG CGG CTC AAC TCG GCT AGA GGC GGC AGT – 3'	Site-Directed Mutagenese des Plasmids: Hamburg_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_WT_1.0mer	Hamburg_HDV_Gt1_in pcDNA3.1(+)_1.0mer_noHDAg	
Hamburg_NoHDAg_Rev	5' – CTC TAG CCG AGT TGA GCC GCT CCG AAT CGA – 3'			
Primer für den Nachweis antigenomischer und genomischer RDeV-RNA				
Probe_für_Antigenom RDeV	5' – TGA GGG GCC CGG ACC TCC ATC AAC CTC CAT TTC CTC GCC AAG GCG TCT TTT CTT GGC CTG – 3'	Sonde Northern Blot (Nachweis antigenomischer RDeV-RNA)		
Probe_für_Genom (RDeV)	5' – CAG GCC AAG AAA AGA CGC CTT GGC GAG GAA ATG GAG GTT GAT GGA GGT CCG GGC CCC TCA – 3'	Sonde Northern Blot (Nachweis genomischer RDeV-RNA)		
Primer für die Kolonie-PCR und Sequenzierung aller pcDNA3.1(+) Expressionsvektoren				
BGH_REV	5' – GCA TGC CTG CTA TTG TCT TC – 3'	Kolonie-PCR und Sequenzierung		
CMV_FOR	5' – GTA CAT CAA TGG GCG TGG – 3'	Kolonie-PCR und Sequenzierung		
Primer und Sonde für die HDV qRT-PCR				
HDV-F1378-wobble	5' – KGG MWY TCC CTT WGC CAT CMG – 3'	Forward Primer		
HDV-R	5' – TTC CTC TTC GGG TCG GCA TG – 3'	Reverse Primer		
HDV-P	5' – FAM - CTC CTW CGG ATG CCC AGG TCG GAC - BHQ1 – 3'	Hydrolysis Probe		

3.13 Chemikalien, Reagenzien, Medien

Tabelle 14: Übersicht aller verwendeten Medien und Chemikalien sowie deren Bezugsquellen.

Name	Bezugsquelle
A-C	
Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG (ROTH SELECTION), Karlsruhe, Deutschland
Agarose, low melt	Biozym Scientifi, Oldendorf, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS) ≥98 %	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
Bacto-Agar	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Bacto-Hefe Extrakt	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Bacto-Trypton	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Benzonase	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland
BSA (Albumin Fraction V, very low endotoxin)	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland
Benzonase	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau-Na-Salz	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Chloroform/ Trichlormethan	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Casporfungin/ CANCIDAS	MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar, Deutschland
D-F	
Diethylcarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, MA, USA
Dexamethason	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol ≥99,8 %	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70 %, vergällt	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formamid - deionisiert	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd 37 %-ige Lösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fötales Kälberserum (FKS/FBS)	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, MA, USA
FuGENE HD	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
G-I	
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES (N-2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, MA, USA

VERWENDETE MATERIALIEN

Isopropanol/2-Propanol	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland
Insulin-Transferrin-Selenium	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, MA, USA
J-L	
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamine	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, MA, USA
M-O	
Methanol	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Opti-MEM I Reduced Serum Media	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, MA, USA
N-P	
Natriumpyruvat	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, MA, USA
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na-Deoxycholate	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge (NaOH(aq))	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NP-40	Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA, USA
pNitrophenolphosphat	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Polyethylenglykol – PEG – Lösung 40 %	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland
S-Z	
Salzsäure (HCl) 37 % rauchend	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland
Tri-Natrium-Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, MA, USA
William's E Medium, no phenol red	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, MA, USA
X-tremeGENE HP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Xylencyanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

3.14 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 15: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Name	Bezugsquelle
Bakterienschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Einwegpipetten (5, 10, 25 und 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Glasbehälter (Glaskolben, Messzylinder, Bechergläser, Schottflaschen)	Schott AG, Mainz, Deutschland
G-25 Säulen	Cytiva/ Amersham, Buckinghamshire, England
LightCycler 96-Well-Platten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
MaxiSorb Mikrotiterplatten	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
PCR-Tubes 0,2 ml	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Pipetten	Gilson International B.V., Limburg-Offheim, Deutschland
Pipettenspitzen	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen, gestopft	Nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen/Luhe, Deutschland
MicroAmp Optical Adhesive Film (PCR-Folie)	Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems), Waltham, MA, USA
PVDF-Membran (Transfer membrane Immobilon-P)	Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland
Positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N+)	Cytiva/ Amersham, Buckinghamshire, England
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße 15 und 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Vivaspin 20 (300 000 MWCO)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Multiwell-Platten (96-Well, 48-Well, 6-Well)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen (100/20 MM und 145/20 MM)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

4. Methoden

4.1 Eukaryotische Zellkultur

4.1.1 Transiente Transfektion

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in den jeweiligen Zellkulturschalen mit einer Konfluenz von etwa 40 % ausgesät und in Wachstumsmedium (Tabelle 10) gehalten, sodass sie am Tage der Transfektion eine Konfluenz von etwa 70-90 % besaßen. Die Plasmid-DNA (15 µg / 10 cm Zellkulturschale) wurde in einem angemessenem Volumen Opti-MEM Medium (350 µl / 10 cm Zellkulturschale) verdünnt, gevortext und abzentrifugiert. Für die *trans*-Komplementationsversuche wurde ein molares Verhältnis von 2:1 gewählt (2.0mer_HDV Plasmide:S-HDAg). Das jeweilige Transfektionsreagenz wurde in einem Verhältnis von 3:1 (Transfektionsagens:DNA) hinzugefügt und der Ansatz für 5-10 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden währenddessen mit PBS gewaschen und frisches Wachstumsmedium hinzugefügt. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise gleichmäßig auf die Zellen verteilt. Nach einer Inkubationszeit von etwa 16 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Transfektionsmedium durch Produktionsmedium ersetzt. Abhängig von der verwendeten Zelllinie erfolgte die Transfektion mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien. FuGENE HD wurde dabei für HuH7-Zellen verwendet, während für HepG2-Zellen X-tremeGENE HP verwendet wurde.

4.1.2 Erzeugung pseudotypisierter HDV

Um pseudotypisierte HDV zu erzeugen, wurden am Tag vor der Transfektion je drei 10 cm Zellkulturschalen mit HuH7-Zellen in Wachstumsmedium (Tabelle 10) ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit drei Expressionsplasmiden kotransfiziert (siehe Kapitel 4.1.1). Ein Plasmid kodiert für das gesamte deltavirale Genom (10 µg) und ein zweites Plasmid kodiert für die jeweiligen hepadnaviralen Oberflächenproteine (5 µg). Als Transfektionskontrolle wurde zudem das Plasmid pSEAP2-control (150 ng) kotransfiziert, das zu einer konstitutiven Sekretion einer enzymatisch aktiven Phosphatase führt. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen auf 145/20 MM Zellkulturschalen (Maxi-Platten) umgesetzt und das Medium durch Produktionsmedium (Tabelle 10) ersetzt. Am Tag 3 nach Transfektion erfolgte ein weiterer Mediumwechsel, dabei wurde das gesamte Produktionsmedium verworfen und 20 ml frisches Produktionsmedium auf die Zellen gegeben. Die Zellkulturüberstände wurden beginnend mit Tag 5 nach Transfektion an den Tagen 7 und 9 gesammelt und durch frisches Produktionsmedium ersetzt. Am Tag 11 nach Transfektion wurden die Zellen verworfen und die HDV-RNA in den Zellkulturüberständen durch eine qRT-PCR (siehe Kapitel 4.4.34.4.3) bestimmt und auf die SEAP-Sekretion normalisiert. Die gewonnenen Zellkulturüberstände wurden daraufhin über Vivaspin Zentrifugalkonzentratoren nach Angaben des Herstellers (3000 x g) eingengt. Es folgte erneut eine qRT-PCR und die gewonnenen Viruskonzentrate wurden für weitere Infektionsversuche bei -80 °C gelagert.

4.1.3 *In vitro* Infektion mit pseudotypisierten HDV

Um die Infektiosität der erzeugten pseudotypisierten HDV (psHDV) zu untersuchen, wurden HepG2-Zellen verwendet, die den humanen NTCP unter Zugabe von 6 µg/ml Doxycyclin stabil exprimieren (HepG2-hNTCP-Zellen) oder zwei Tage zuvor mit den entsprechenden NTCP/Ntcp-Expressionsplasmiden transient transfiziert wurden. Die Zellen wurden bereits 24 h vor Infektion in HGM (Tabelle 10) mit 2 % DMSO kultiviert. Für die Infektionsversuche wurden stets 48-Multiwell-Platten verwendet. Die Zellen wurden entweder mit 1×10^8 oder 5×10^7 HDV-Genomäquivalenten pro Well infiziert. Hierzu wurde ein Gesamtvolumen von 300 µl (Viruskonzentrat in Infektionsmedium) verwendet. Für Inhibitionsversuche wurden die Zellen für 60 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ mit den entsprechenden Myr-PäS1-Peptiden in HGM (f.c. 1 µM) präinkubiert. Zudem wurde diesen Ansätzen zusätzlich 1 µM der jeweiligen Myr-PräS1-Peptide während der Infektion hinzugefügt. Die Zellen wurden 11 Tage in HGM mit 2 % DMSO kultiviert, dabei wurde das Medium alle zwei Tage gewechselt. Nach 11 Tagen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend entweder in 3,8 % Paraformaldehyd und 0,1 % Triton X-100 für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und permeabilisiert (siehe Kapitel 4.3.1) oder für 5 Minuten bei Raumtemperatur in Lysepuffer A (siehe Tabelle 10 und Kapitel 4.3.4) lysiert.

4.1.4 NBD-Taurocholat-Aufnahme

Um die funktionelle Expression des Rezeptors NTCP/Ntcp vor einer Infektion zu untersuchen, wurde 48 Stunden nach Transfektion der Transport des fluoreszierenden Gallensalzes 4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole-Taurocholat untersucht. Hierzu wurde das Wachstumsmedium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Das Substrat NBD-TC (f.c. 5 µM) sowie der Zellkern-Farbstoff Hoechst 33342 (f.c. 0,5-1 µg/ml) wurden in 37 °C warmen DMEM ohne Phenolrot verdünnt (Gesamtvolumen 200 µl/48 Well) und auf die Zellen getropft. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen dreimal mit 37 °C warmem DMEM ohne Phenolrot gewaschen. Die Zellen wurden mit DMEM ohne Phenolrot benetzt und die NTCP/Ntcp Expression über die Transportfunktion des NBD-TC an einem Fluoreszenzmikroskop qualitativ ausgewertet.

4.1.5 Myr-PräS1-Peptidbindung

Mit Hilfe Fluorophor-markierter Myr-PräS1-Peptide (siehe Kapitel 3.2) wurde die spezifische Bindungsfähigkeit hepadnaviraler PräS1-Domänen an NTCP/Ntcp untersucht.

Das Wachstumsmedium wurde entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Myr-PräS1-Peptide (f.c. 100 nM) sowie der Zellkern-Farbstoff Hoechst 33342 (f.c. 0,5-1 µg/ml) wurden in 37 °C warmen DMEM ohne Phenolrot verdünnt (Gesamtvolumen 200 µl/48 Well) und auf die Zellen getropft. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C im Dunkeln wurden die Zellen dreimal mit DMEM gewaschen und die Peptidbindung qualitativ an einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

4.2 Prokaryoten

4.2.1 Transformation kompetenter *E. coli*

Für die Vervielfältigung der Plasmid-DNA wurden Aliquote von 50 µl chemisch kompetenten Stellar *E. coli* auf Eis aufgetaut und 1-5 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA hinzugefügt. Die Zellen wurden für 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 45 Sekunden bei 42 °C erhitzt. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden dem Transformationsansatz 250 µl vorgewärmtes und antibiotikafreies LB-Medium hinzugefügt. Der Transformationsansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C bei 225 rpm inkubiert. Die Zellen wurden kurz pelletiert, auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.2.2 *E. coli* Flüssigkultur und Plasmidpräparation

In einem Erlenmeyerkolben wurden 50 ml selektives LB-Medium mit je einer Kolonie der jeweiligen Kultur aus Kapitel 4.2.1 angeimpft. Ein einzelner Klon wurde durch eine sterile Pipettenspitze von den Agarplatten entfernt und in die Erlenmeyerkolben überführt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C und 225 rpm, wurde die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus der *E. coli* Flüssigkultur unter Verwendung des Plasmid Plus Midi Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde dabei stets in 200 µl RNase/DNase freiem Wasser eluiert und die DNA-Konzentration am PicoDrop gemessen.

4.3 Immunologische Nachweismethoden

4.3.1 Immunfluoreszenz

Für den Nachweis der Expression der jeweiligen Deltaantigene wurden die Zellen, abhängig von der Fragestellung, zu den in den Ergebnissen angegebenen Zeitpunkten einmal mit PBS gewaschen und in 3,8 % Paraformaldehyd und 0,1 % Triton X-100 für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und permeabilisiert. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden die Zellen 60 Minuten bei Raumtemperatur in Blockierlösung-IF (Tabelle 10) inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin in der entsprechenden Verdünnung mit den/dem jeweiligen Primärantikörper/n (Tabelle 12) in Blockierlösung-IF (Tabelle 10) für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit den/dem jeweiligen Alexa-konjugierten Sekundärantikörper/n sowie dem Kernfarbstoff DAPI (Tabelle 12) in Blockierlösung-IF für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und an einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

4.3.2 Semi-dry Western Blot

Um die Expression der Deltaantigene sowie die Immunantwort der RDeV-positiven Stachelratten zu untersuchen, wurden die unter Kapitel 4.4.2 aufgereinigten Proteine einer Western Blot Analyse unterzogen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine, nach ihrem Molekulargewicht, erfolgte mit Hilfe einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Etwa 10 µg der Protein-Eluate wurden hierzu mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 Minuten bei 90 °C denaturiert und auf das SDS-Gel (Tabelle 16) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer für 10 Minuten bei 100 Volt, anschließend wurde die elektrische Spannung auf 150 Volt erhöht.

Tabelle 16: Zusammensetzung eines 14 %-igen SDS-Gels.

Sammelgel	ddH ₂ O [μl]	SDS 10 % [μl]	0,5 M Tris-Cl pH 6,8 [μl]	Acrylamid/Bisacrylamid -Stammlösung (37,5:1) [ml]	TEMED [μl]	APS 10 % [μl]
4 %	1590	25	630	330	10	100

Trenngel	ddH ₂ O [μl]	SDS 10 % [μl]	1,5 M Tris-Cl pH 8,8 [μl]	Acrylamid/Bisacrylamid -Stammlösung (37,5:1) [ml]	TEMED [μl]	APS 10 % [μl]
14 %	1033	40	1000	1867	15	150

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran transferiert. Hierzu wurde zunächst die PVDF-Membran für 10 Minuten in 100 % Methanol aktiviert. Die Whatman-Papiere (Grade 3MM Chr) und die Membran wurden anschließend in 1x Transferpuffer (Tabelle 10) für etwa 5 Minuten inkubiert und in folgender Reihenfolge geschichtet: 2 Whatman-Papiere, PVDF-Membran, SDS-Gel, 2 Whatman-Papiere. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten bilden. Der Transfer erfolgte in 1x Transferpuffer mittels des Biometra Fastblot Systems für 45 Minuten bei konstanter Stromstärke (2,5 mA/cm²). Um eventuelle Gelreste zu entfernen, wurde die Membran daraufhin mit 1x TBS-T (Tabelle 10) gewaschen. Durch eine 60-minütige Inkubation in Blockierlösung-WB (Tabelle 10) wurden anschließend freie Protein-Bindungsstellen gesättigt. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte in der entsprechenden Verdünnung (Tabelle 12) über Nacht bei 4 °C in Antikörperlösung-WB (Tabelle 10). Am Folgetag wurde die Membran fünfmal mit TBS-T gewaschen und mit dem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper (Tabelle 12) in Antikörperlösung-WB (Tabelle 10) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 1x TBS-T erfolgte die Detektion mittels Chemilumineszenz. Die Membran wurde hierzu mit dem Clarity Max Western ECL Substrat nach Angaben des Herstellers benetzt. Die Proteine wurden anschließend am ChemoCam-Imager visualisiert.

4.3.3 Quantitative Bestimmung der HBsAg-Konzentration

Die Messung des HBsAg in den gesammelten Überständen (siehe Kapitel 4.1.2) erfolgte in der Virusdiagnostik der Medizinischen Virologie in Gießen. Hierzu wurde das Kit „HBsAg (Quant.Autodilution)“ im quantitativen Testsystem „Architect“ der Firma Abbott nach Angaben des Herstellers verwendet.

4.3.4 Quantitative Bestimmung der HDV-Infektion mittels eines diagnostischen ELISA

An Tag 11 nach Infektion (siehe Kapitel 4.1.3) wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend für fünf Minuten in 50 µl Lysepuffer (A) (Tabelle 10) bei Raumtemperatur lysiert. Um die Nukleinsäuren in den Zelllysaten zu verdauen, wurden anschließend 200 µl des Benzonase-Puffers (B) (Tabelle 10) hinzugefügt und die Proben für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Für den Nachweis des HDV in den infizierten Zellen wurden ein diagnostisches Kit (ETI-DELTA-2), welches auf der Technik eines ELISA basiert, nach Angaben des Herstellers verwendet.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Extraktion totaler RNA aus Zellen mittels TRIzol

Für den Nachweis antigenomischer (und genomischer) HDV- und RDeV-RNA nach transienter Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die Gesamt-RNA mittels TRIzol Reagent nach Angaben des Herstellers isoliert. Hierzu wurden die Zellen mit TRIzol Reagent (500 µl/6 Well) versetzt, fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und durch mehrmaliges Pipettieren resuspendiert. Nachdem die Lysate in ein steriles Reaktionsgefäß überführt wurden, wurden 100 µl Chloroform/Trichlormethan hinzugefügt, die Proben für 30 Sekunden invertiert. Nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 4 °C und 12 000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Die Interphase und die untere organische Phase wurden für die Proteinextraktion (siehe Kapitel 4.4.2) bei 4 °C gelagert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die RNA auszufällen, wurden 250 µl 2-Propanol hinzugefügt, die Proben mehrmals invertiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt von 12 000 x

g für 10 Minuten bei 4°C wurde die Gesamt-RNA pelletiert. Das resultierende Pellet wurde mit 500 µl 75 %-igen Ethanol [v/v] gewaschen und anschließend getrocknet. Die RNA wurde in 20 µl DEPC-H₂O eluiert, die Konzentration am PicoDrop bestimmt und 10 µg Aliquots bei -80 °C gelagert.

4.4.2 Extraktion von Gesamtprotein aus Zellen mittels TRIzol

Die aus Kapitel 4.4.1. gewonnene Interphase sowie die organische Phenol-Chloroform Phase wurden mit 150 µl 100 %-igen Ethanol versetzt, invertiert und für 3 Minuten inkubiert. Die ausgefällte DNA wurde durch Zentrifugation bei 2000 x g für 5 Minuten bei 4 °C pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 750 µl 2-Propanol und einer Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Minuten wurde das Protein gefällt. Nach einer Zentrifugation bei 12 000 x g für 10 Minuten bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Protein-Pellet dreimal für 20 Minuten mit 1 ml 0,3 M Guanidinhydrochlorid, 2,5 % Glycerin [v/v] in 95 % Ethanol gewaschen. Die Zentrifugation nach dem jeweiligen Waschschrift wurde bei 7500 x g und 4 °C für jeweils 5 Minuten durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand verworfen und das Protein-Pellet erneut mit 1 ml 100%-igem Ethanol für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Probe erneut bei 7500 x g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Protein-Pellet für 10 Minuten bei 50 °C getrocknet. Anschließend wurde das Protein-Pellet in 100 µl OPT-Lysispuffer (Tabelle 10) bei 50 °C über Nacht gelöst. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden Ansätze mit einer 1:10 Verdünnung der Protein-Eluate angesetzt und die Konzentration photometrisch am PicoDrop bestimmt.

4.4.3 Quantifizierung pseudotypisierter HDV mittels qRT-PCT

Um die sekretierten HDV-Partikel zu quantifizieren, wurde eine Reverse Transkriptase Real Time PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die HDV-RNA aus den Zellkulturüberständen mit dem innuPREP Virus DNA/RNA Kit von Analytik Jena GmbH nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA wurde dabei stets in 50 µl RNase/DNase freiem Wasser eluiert. Die genomische HDV-RNA wurde, durch die in der qRT-PCR verwendeten, spezifischen Primer (Tabelle 13), amplifiziert. Die HDV-RNA wurde mit Hilfe eines mitgeführten, *in vitro* transkribierten HDV-RNA Standards quantifiziert. Um

mögliche Plasmid-DNA in den Überständen zu entfernen, wurde zunächst ein DNase I-Verdau durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 5 µl der HDV-RNA auf einer 96-Well-PCR-Platte vorgelegt und mit 0,9 µl DNase Puffer, 1,1 ddH₂O und 2 µl DNase I versetzt. Die Platte wurde mit einer PCR-Folie luftdicht versiegelt, bei 900 x g für 1 Minute zentrifugiert und bei 37 °C für eine Stunde und anschließend bei 95 °C für eine Minute im LightCycler 480 II inkubiert. Zu jedem DNase-Ansatz wurde daraufhin folgender Mastermix hinzugefügt:

- 1 µl HDV-R [f.c. 500 nm]
- 1 µl HDV-F1378-wobble [f.c. 500nm]
- 0,5 µl HDV-P [f.c. 250 nm]
- 5 µl TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix
- 3,5 µl DNase/RNase freies Wasser.

Die Platten wurden erneut mit einer PCR-Folie luftdicht versiegelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 900 x g für 1 Minute. Die qRT-PCR wurde unter den in Tabelle 17 angegebenen Bedingungen im LightCycler 480 II durchgeführt:

Tabelle 17: PCR-Bedingungen für die Quantifizierung von HDV-RNA. Die quantitative PCR beinhaltet im ersten Schritt eine reverse Transkription, daraufhin wird in einem zweiten Schritt die Reverse Transkriptase inaktiviert, woraufhin die Amplifikation mittels einer „touchdown“-PCR beginnt.

1. Reverse Transkription					
Zyklen: 1 x		Analyse: keine			
Temperatur [°C]	Messung	Inkubationszeit [hh:mm:ss]	Temperaturveränderung [°C/s]		
53	keine	00:05:00	4.4		
2. Inaktivierung der Reversen Transkriptase/Initiale Denaturierung					
Zyklen: 1 x		Analyse: keine			
Temperatur [°C]	Messung	Inkubationszeit [hh:mm:ss]	Temperaturveränderung [°C/s]		
95	keine	00:00:20	4.4		
3. Amplifikation					
Zyklen: 45 x		Analyse: Quantifizierung			
Temperatur [°C]	Messung	Inkubationszeit [hh:mm:ss]	Temperaturveränderung [°C/s]	Finale Temperatur [°C]	Temperatursenkung pro Zyklus [°C]
95	Keine	00:00:20	4.4	Keine	
64	Einmalig	00:00:30	2.2	60	0.5
72	Keine	00:00:10	4.4	keine	

4.4.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz (pSEAP-Assay)

Da neben den viralen Expressionsvektoren auch das Plasmid pSEAP2-control, welches zu einer konstitutiven Sekretion einer enzymatisch aktiven Phosphatase führt, kotransfiziert wurde (siehe Kapitel 4.1.2), konnte die Transfektionseffizienz mit Hilfe des SEAP-Tests bestimmt werden. Über die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase wird das farblose Substrat in alkalischen Lösungen zu einem gelben Produkt gespalten. Um endogene Phosphatasen zu inaktivieren, wurden zunächst 50 µl der jeweiligen Zellkulturüberstände für 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Zusätzlich wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe eines laboreigenen SEAP-Standards sowie eine Negativkontrolle (untransfizierter Zellkulturüberstand) aufgetragen. Jeder Probe wurden 100 µl 2x SEAP-Puffer und 50 µl frisch angesetztes SEAP-Substrat zugefügt. Nach etwa 15 Minuten wurde die Optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels eines Photometers gemessen.

4.4.5 Northern Blot

Die aus Kapitel 4.4.1 extrahierte Gesamt-RNA (10 µg) wurde mit je 3 Volumen Denaturierungspuffer I (Tabelle 10) versetzt und für 15 min bei 65 °C denaturiert. Währenddessen wurde ein einprozentiges denaturierendes Agarosegel (1 % [w/v] Agarose, 6 % [v/v] Formaldehyd, 1 x MOPS) vorbereitet. Nach der Inkubation wurden die Proben mit je 0,5 µl RNA-Ladepuffer (Tabelle 10) versetzt und kurz abzentrifugiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x MOPS-Puffer (Tabelle 10) bei konstanten 100 V für etwa 3,5 Stunden. Der Laufpuffer wurde während der gesamten Elektrophorese über eine peristaltische Pumpe, die von der Anode zur Kathode pumpte, umgewälzt. Nach der Elektrophorese erfolgte eine 30-minütige Inkubation des Gels in Denaturierungspuffer II (Tabelle 10) und anschließend ein Waschschrift in Neutralisierungspuffer (Tabelle 10) für weitere 30 Minuten. Das Gel wurde zusammen mit einer positiv geladenen Nylonmembran für 10 min in 10x SSC (Tabelle 10) inkubiert. Der Transfer der RNA-Fragmente auf die Nylonmembran erfolgte durch Vakuumblotting für 2 h bei konstanten 0,2 bar in 10x SSC. Anschließend wurde die RNA durch zweimaliges Crosslinking in einem UV-Crosslinker (120 mJ x [100]) auf der

Membran fixiert. Die Prähybridisierung der Nylonmembran erfolgte für 30 Minuten bei 68 °C in PerfectHyb Plus-Hybridisierungspuffer.

Als Sonde für die RDeV-RNA dienten einzelsträngige Oligonukleotide (Tabelle 13), welche mittels einer T4-Polynukleotidkinase am 5'-Ende mit [γ - ^{32}P] dATP radioaktiv markiert wurden. Hierzu wurden 3 μl [γ - ^{32}P] ATP (10 mCi/ml) mit 3 μl Oligonukleotid (10 pmol/ μl), 2 μl ddH₂O, 1 μl T4-Polynukleotidkinase Puffer (10x) und 1 μl T4-Polynukleotidkinase versetzt und die Proben bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Nach der Markierung wurden die freien Nukleotide über G-25 Säulen gemäß den Anweisungen des Herstellers entfernt. Die markierte Sonde wurde der Nylonmembran und dem Hybridisierungspuffer hinzugefügt und über Nacht bei 45 °C hybridisiert.

Als Sonde für die HDV-RNA wurden radioaktiv-markierte, *in vitro* transkribierte RNAs verwendet, die die gesamte Sequenz des HDV-Genoms wiederspiegeln. Um diese zu erzeugen, wurden die jeweiligen 1.0mer-Expressionskonstrukte der HDV-Isolate mit dem Restriktionsenzym BamHI linearisiert und mit Hilfe des Monarch PCR & DNA Cleanup Kits nach Angaben des Herstellers gereinigt. Für die *in vitro* Transkription wurde folgender Reaktionsansatz in angegebener Reihenfolge angesetzt:

- RNase/DNase freies Wasser: 20 μl finales Volumen
- 10x T7-Polymerase Puffer: 2 μl
- rNTP-Mix (25 mM: rATP, rCTP, rGTP; 5 mM: rUTP): 2 μl
- RNase Inhibitor: 0,5 μl
- Linearisierte DNA: 1 μg
- [α - ^{32}P] rUTP: 3 μl
- T7 RNA-Polymerase: 2 μl

Nach drei- bis fünfstündiger Inkubation bei 37 °C wurden freie Nukleotide über G-25 Säulen gemäß den Angaben des Herstellers entfernt. Die markierte RNA wurde zum Hybridisierungspuffer auf die Nylonmembran gegeben und über Nacht bei 68 °C hybridisiert.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran zweimal mit dem Low Stringency Waschpuffer (Tabelle 10) für fünf Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Danach folgten zwei weitere Waschräume für je 20 Minuten in High Stringency Waschpuffer (Tabelle 10) sowie ein zwanzigminütiger Waschräume in Ultra-high Stringency Waschpuffer (Tabelle 10) bei Hybridisierungstemperatur. Der Blot wurde über Nacht

auf einen Autoradiographiefilm gelegt, anschließend wurde die virale RNA mittels eines Phosphorimagers visualisiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit der Software Image Studio Lite (Version 5.2, LI-COR Lincoln, NB, USA).

4.4.6 Klonierung deltaviraler Expressionskonstrukte

Eine schematische Darstellung der Klonierung deltaviraler Expressionskonstrukte ist in Abbildung 5, Kapitel 5.1.1 dargestellt.

4.4.6.1 Klonierung der 1.0mer-Expressionskonstrukte

Die 1.0mer-Expressionskonstrukte wurden mit Hilfe des In-Fusion HD Cloning Kits (Tabelle 6) kloniert. Hierzu wurde die cDNA des deltaviralen Genoms in zwei Fragmente aufgeteilt, die als gBlocks von der Firma Integrated DNA technologies, IDT (Belgien) synthetisiert wurden. Diese wurden so erzeugt, dass an beiden Enden jeweils 18 bp lange Überhänge angefügt wurden, die komplementär zu den Enden des Vektors pcDNA3.1(+) oder dem Ende des jeweils anderen Fragments waren. Der Vektor wurde mit Kpn I linearisiert und mittels des Monarch PCR & DNA Cleanup Kits nach Angaben des Herstellers gereinigt. Für den Klonierungsansatz wurden 2 µl 5x In-Fusion HD Enzyme Mix, 50 ng des Vektors sowie die gelösten dsDNA-Fragmente in einem molaren Verhältnis von 3:3:1 (dsDNA:dsDNA:Vektor) zusammengefügt und auf 10 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Nach einer Inkubation für 15 Minuten bei 50 °C wurden 2,5 µl des Ansatzes für die Transformation (siehe Kapitel 4.2.1) verwendet. Nach der Transformation erfolgte eine Kolonie-PCR über die gesamte Länge des HDV-Genoms (siehe Kapitel 4.4.6.3).

Um 1.0mer-Expressionskonstrukte zu erzeugen, die eine Mutation innerhalb des S-HDAg Start-Codons trugen, wurde eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt. Die Primersequenzen können der Tabelle 13 entnommen werden. Um die Fehlerrate zu minimieren, wurde die DNA-Polymerase Phusion High Fidelity laut Herstellerangaben verwendet.

4.4.6.2 Klonierung der 2.0mer-Expressionskonstrukte

Für die Erzeugung der 2.0mer-Expressionskonstrukte wurde die Methode des FastCloning [205] in einer leicht abgewandelten Form angewandt. Die

Vektoramplifikation erfolgte dabei über die gesamte Länge der zuvor erzeugten 1.0mer Expressionskonstrukt. Die Primerpaare (Tabelle 13) besaßen dabei jeweils 17-20 bp Überhänge, welche komplementär zu den Enden des Inserts (einzufügendes HDV-Genom) verliefen. Für die Amplifikation des HDV-Genoms aus dem Monomer (Insertamplifikation) wurden ebenfalls Primerpaare verwendet, die jeweils 17-20 bp Überhänge besaßen. Diese Überhänge verliefen dabei komplementär zu den Vektorenden (amplifiziertes 1.0mer-Expressionskonstrukt). Die Primersequenzen können der Tabelle 13 entnommen werden. Für die Amplifikation des Vektors und Inserts wurde folgender Reaktionsansatz zusammengefügt:

- 5x HF-Puffer: 10 µl
- dNTPs (2,5 mM): 5 µl
- Primer-Mix (10 pM) 1 µl
- Template (1.0mer-Expressionskonstrukt): 10 ng
- Phusion HF-Polymerase: 0,5 µl
- ddH₂O: Gesamtvolumen 50 µl

Die PCR-Bedingungen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde eine Gesamtzahl von 18 Zyklen gewählt. In einem weiteren Schritt wurden Vektor- und Insertamplifikate 1:1 (v/v) in einem Ansatz mit 2 µl Dpn1 versetzt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2 % des Ansatzes in kompetente *E. coli* transformiert (siehe Kapitel 4.2.1). Am Folgetag erfolgte eine Kolonie-PCR (siehe Kapitel 4.4.6.3) einzelner Klone über die gesamte Länge der beiden HDV-Genome.

4.4.6.3 Kolonie-PCR

Um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen wurden Klone mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze in 10 µl ddH₂O resuspendiert und einer Kolonie-PCR über die gesamte Länge des/der deltaviralen Genome(s) unterzogen. Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz zusammengefügt:

- GoTaq Hot Start 2X Green Master Mix: 12,5 µl
- Primer-Mix CMV-Fwd und BGH-Rev (10 pM): 2,5 µl
- Template (Kolonie in 10 µl ddH₂O): 4 µl
- ddH₂O: 6 µl

Die PCR-Bedingungen wurden nach Angaben des Herstellers auf die GoTaq-Polymerase

angewandt. Die Primersequenzen können der Tabelle 13 entnommen werden. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, bei positiven Klonen wurde eine DNA-Bande bei etwa 2000 bp (1.0mer) beziehungsweise 4000 bp (2.0mer) erwartet. Im Anschluss wurden die positiven Klone, welche bereits in ddH₂O gelöst wurden in eine LB-Flüssigkultur (Tabelle 10) unter Zugabe von Carbenicillin (Tabelle 11) überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Plasmid Plus Midi Kits nach Angaben des Herstellers.

4.4.6.4 Sequenzierung der 1.0mer- / 2.0mer-Expressionskonstrukte

Die Sequenzierungen wurden von der Firma LGC Genomics (Berlin) durchgeführt. Für die Sequenzierung der 1.0mer-Expressionskonstrukte sowie der 2.0mer-Expressionskonstrukte wurden die Primer BGH_REV und CMV_FOR (Tabelle 13) verwendet. Diese wurden ebenfalls von der Firma LGC Genomics synthetisiert. Da in die 2.0mer-Expressionskonstrukte zwei Vollängen der HDV-cDNA kloniert wurden, musste für die Sequenzierung eine Möglichkeit der Diskriminierung zwischen den beiden cDNA-Kopien entwickelt werden. Daher wurde das Plasmid mittels Restriktionsverdau so geschnitten, dass zwei Fragmente entstanden. Hierzu wurden FastDigest Restriktionsendonukleasen der Firma Thermo Fisher Scientific (USA) verwendet und die Restriktion nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Inkubation wurde der gesamte Ansatz einer Gelelektrophorese unterzogen. Die Fragmente wurden anschließend mit Hilfe des Monarch DNA Gel Extraction Kits nach Angaben des Herstellers gereinigt. Primer, die innerhalb der HDV-cDNA binden, konnten nun genutzt werden, um die Sequenz der Genome vollständig zu überprüfen.

5. Ergebnisse

5.1 Klonierung und Charakterisierung humaner HDV-Gt 1-Isolate

5.1.1 Klonierung humaner HDV-Gt 1-Isolate

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe für Virushepatitis unter der Leitung von Prof. Dr. Maura Dandri (Medizinische Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) sollten neue HDV-Gt 1-Isolate in der Zellkultur charakterisiert werden. Hierfür wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit eine Klonierungsmethode für Expressionsvektoren entwickelt, die ein Dimer der cDNA des HDV-RNA-Genoms enthalten. HDV repliziert sich mit einem zirkulären RNA-Genom in einem Pflanzenvirus-typischen „Rolling-Circle“ Mechanismus, daher sind bei linearer Orientierung in DNA-Plasmiden, Überlängen-Expressionskonstrukte der HDV Genome für die Replikation *in vitro* notwendig. Dies erforderte die Entwicklung einer optimierten Klonierungsstrategie: Hierzu wurden verschiedene Methoden, wie z. B. kommerzielle Kits von NEB und Takara oder unterschiedliche Ligationsprotokolle miteinander verglichen. Die besten Ergebnisse wurden mit einem abgewandelten Klonierungsprotokoll nach Li et al. erzielt [205]. In dieser Publikation werden doppelsträngige (ds) DNA-Fragmente mit 15-17 Basenpaar-Überhängen mittels PCR erzeugt, mit dem Restriktionsenzym Dpn1 verdaut und ohne weitere Reinigungsschritte direkt in kompetente Bakterien transformiert. Da dieses Protokoll zunächst jedoch nicht erfolgreich war (kein Erscheinen von bakteriellen Kolonien auf der antibiotikahaltigen Agar-Platte), wurden die Primer so abgewandelt, dass die Überhänge nicht nur an einem DNA-Fragment angehängt wurden, sondern an beiden Primerpaaren, welche in die jeweiligen Fragmente übergehen, sodass eine Überlappung der dsDNA-Fragmente um 34-40 Basenpaare entsteht (siehe Kapitel 4.4.6.2 und Abbildung 5). Diese Änderung führte dazu, dass nach Transformation zwischen 50 bis 80 % der erhaltenen bakteriellen Klone die richtige Größe in der Kolonie-PCR hatten. Auch nach Sequenzierung der Klone zeigte sich, dass dieses Protokoll die bestmöglichen Ergebnisse erzielte. Eine weitere Herausforderung lag in

der Überprüfung der Sequenz der erhaltenen Dimere. Da in das Plasmid zwei Vollängen der HDV-cDNA kloniert wurden, musste für die Sequenzierung eine Möglichkeit der Diskriminierung zwischen den beiden cDNA-Kopien entwickelt werden. Daher wurde das Plasmid mittels Restriktionsverdau so geschnitten, dass zwei Fragmente entstanden (siehe Kapitel 4.4.6.4). Diese konnten folglich mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und im Anschluss gereinigt werden. Primer, die innerhalb der HDV-cDNA binden, konnten nun genutzt werden, um die Sequenz der Genome vollständig zu überprüfen. In Abbildung 5 ist eine schematische Darstellung der gesamten Klonierung von 2.0mer-HDV-Expressionskonstrukten dargestellt.

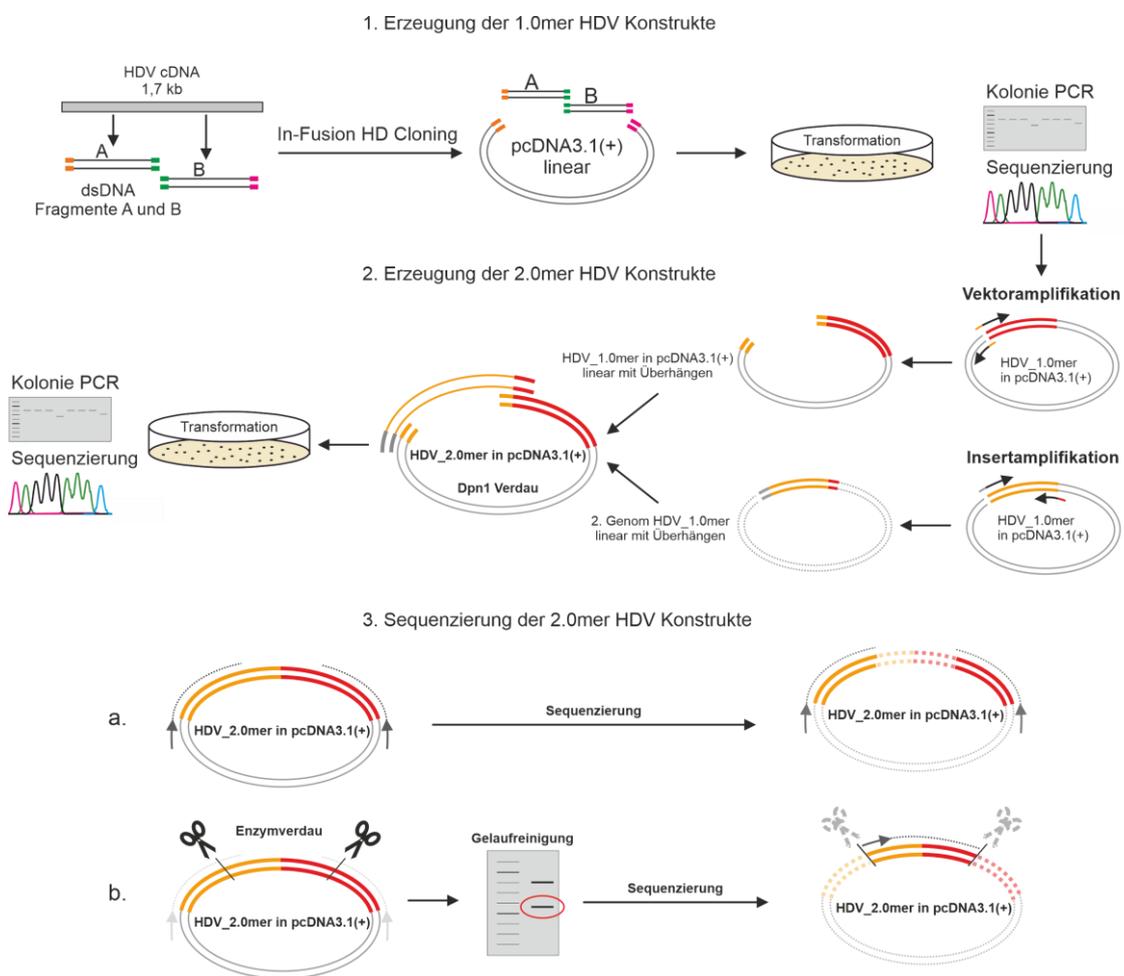


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Klonierung von 2.0mer HDV-Expressionskonstrukten. 1. Die **Klonierung der Monomere** erfolgt mithilfe von dsDNA-Fragmenten (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgien), welche jeweils 17 bp Überhänge in die Sequenz des Vektors pcDNA3.1(+) (orange, pink) oder in das nächste Fragment (grün) aufweisen. Der Vektor wird linearisiert und in einem molaren Verhältnis von 1:3 mit den dsDNA-Fragmenten zusammengefügt. Die Rekombination erfolgt mithilfe des In-Fusion Cloning Kit (Takara Bio, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich). Nach Transformation des Ansatzes in kompetente *E. coli* erfolgt eine Kolonie-PCR, in der das gesamte Insert amplifiziert wird. Klone der richtigen Größe werden anschließend Sanger-sequenziert (LGC Genomics, Berlin, Deutschland). 2. **PCR-Amplifikation von Vektor und Insert.** Die Vektoramplifikation erfolgt über die gesamte Länge des HDV_1.0mer Plasmids (siehe Schritt 1). Dabei besitzen die Primerpaare

jeweils 17-20 bp Überhänge, welche komplementär zu den Enden des Inserts (orange) sind. Für die Insertamplifikation werden die Primerpaare so gewählt, dass sie ebenfalls jeweils 17-20 bp Überhänge besitzen, die mit den Vektorenden (grau, rot) überlappen. In einem weiteren Schritt werden Vektor- und Insertamplifikate 1:1 (v/v) in einem Ansatz mit Dpn1 versetzt, um eventuell noch vorhandene HDV-Ursprungsplasmide (aus Bakterien) spezifisch enzymatisch zu degradieren. Nach der Inkubation werden 2 % des Ansatzes in kompetente *E. coli* transformiert, woraufhin über eine Kolonie-PCR Klone, Plasmide mit erwarteter Größe diskriminiert werden. **3. Sequenzierung der 2.0mer HDV Konstrukte.** In einem ersten Schritt werden die Primer so gesetzt, dass sie von beiden Seiten aus dem Vektor heraus in das Insert sequenzieren (a). In einem zweiten Schritt wird das Plasmid mit einem Restriktionsenzym verdaut, welches die cDNA des HDV an jeweils einer Position im Genom schneidet. Da zwei Vollängen vorliegen wird das Plasmid in zwei Teile geschnitten, die DNA des kleineren Fragments, welches auch den Übergang von der ersten in die zweite HDV Sequenz enthält wird anschließend aus einem Agarosegel aufgereinigt und Sanger-sequenziert (LGC Genomics, Berlin, Deutschland).

5.1.2 Replikation humaner HDV-Gt 1-Isolate

Um nun zu untersuchen, ob die klonierten Expressionskonstrukte der HDV-Gt 1-Isolate zu replikativen HDV-RNA Genomen führten, wurde die Synthese der antigenomischen HDV-RNA, welche als Marker einer aktiven Replikation dient (siehe Kapitel 1.1.2), mittels Northern Blot Analyse nachgewiesen (siehe Kapitel 4.4.5). Hierzu wurden HuH7-Zellen mit den jeweiligen 2.0mer Expressionsplasmiden transfiziert, die RNA sechs Tage nach Transfektion mittels TRIzol aufgereinigt, auf einem denaturierenden Agarosegel der Größe nach aufgetrennt und auf eine positivgeladene Membran geblottet. Nachfolgend konnten durch Hybridisierung mit einem Pool aus [α -³²P] UTP-markierten *in vitro* transkribierten genomischen HDV-RNAs (spezifisch für die jeweilige antigenomische RNA), erfolgreich alle drei HDV Isolate nachgewiesen werden (Abbildung 6; A). Dabei konnte das stärkste Signal für das Isolat pHDV_T nachgewiesen werden, während die Signalstärke der Isolate CHD_WHO und CHD_HH etwa von gleicher Intensität waren (Abbildung 6; A). Um zudem zu verdeutlichen, dass die Synthese der antigenomischen RNA an die Replikation von HDV-RNA gebunden ist, wurde ein replikationsinkompetentes 2.0mer-Expressionskonstrukt des WHO-Isolats (CHD_WHO_ Δ S-HDAg) transfiziert, welches eine Start-Codon-Mutation des S-HDAg trägt. Hier konnte keine antigenomische HDV-RNA nachgewiesen werden (Abbildung 6; A). Die Transfektion mit dem verwendeten Leervektor (pcDNA3.1) zeigte erwartungsgemäß kein nachweisbares HDV-RNA Signal.

Da gezeigt wurde, dass HDV-RNA in humanen Zellen während der Mitose unspezifisch an die Tochterzellen weitergegeben wird (Giersch et al., 2019), wurde ein Expansionsversuch der HDV-Konstrukte als weiterer Replikationsnachweis vorgenommen. Hierbei wurden HuH7-Zellen mit den entsprechenden HDV-

Konstrukten als Doppelansatz transfiziert. Ein Ansatz wurde hierfür 4 Tage nach Transfektion fixiert, der andere wurde mit dem Faktor 1:5 in eine geringere Zellzahl gesplittet und weitere 6 Tage bis Tag 10 nach Transfektion in Wachstumsmedium gehalten. Eine Immunfluoreszenzfärbung des HDAg diente als Marker der HDV-RNA-positiven Zellen. Dabei konnten deutliche Zellcluster, positiv für HDAg, nachgewiesen werden, was auf eine über Zellteilung vermittelte HDV-RNA-Ausbreitung hinweist (Abbildung 6; B).

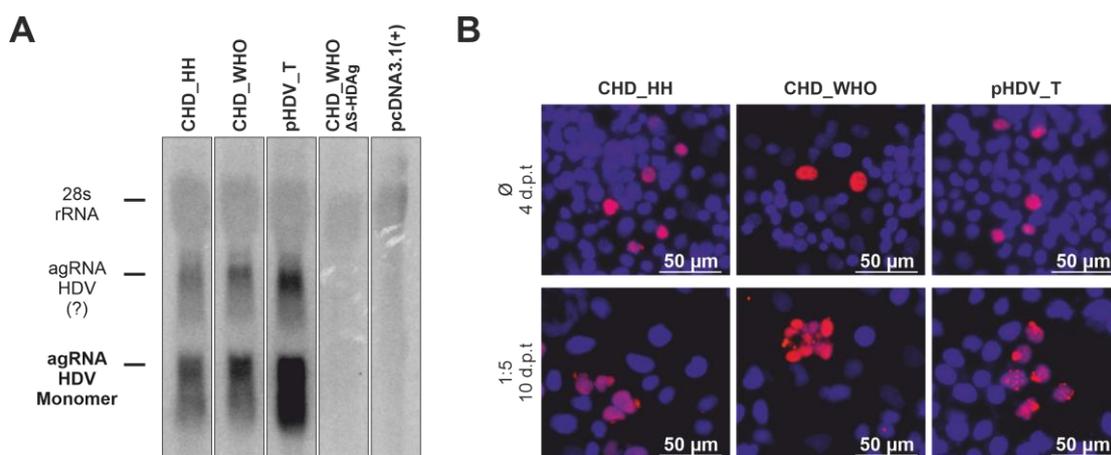


Abbildung 6: Replikation neu klonierter HDV-Gt 1-Isolate in vitro. A) Nachweis antigenomischer HDV-RNA (agRNA HDV) 6 Tage nach Transfektion der HDV Überlängen Expressionskonstrukte in HuH7-Zellen mittels [α - 32 P] UTP-markierter genomischer RNA. B) Nachweis des HDAg nach klonaler Expansion der HDV-Gt 1-Isolate in HuH7-Zellen nach Splitten der Zellen 1:5 an Tag 4 nach Transfektion (d.p.t). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. agRNA – antigenomische RNA; rRNA – ribosomale RNA; S-HDAg – Small Deltaantigen; CHD – chronische HDV-Patienten isolate; CHD_WHO – Sequenz des HDV-RNA WHO Standards [200]; CHD_HH – Einzelsequenz einer klinischen Studie [201]; pHDV_T – neu kloniertes HDV Konstrukt der pSVL(D3) Sequenz [56, 206].

Fazit: Northern Blot und Immunfluoreszenz bestätigen die autonome Replikation neu klonierter Expressionskonstrukte dreier Isolate des humanen HDV-Gt 1.

5.1.3 Interaktion humaner HDV-Gt 1-4 mit HBsAg der HBV-Gt B1 und D3

Die in Abschnitt 5.1.2 klonierten HDV-Expressionskonstrukte, sowie drei weitere der Gt 2-4, wurden nun in Hinblick auf ihre Umhüllung und Sekretion mit HBsAg der HBV-Gt B und D untersucht. Hierzu wurden die jeweiligen HDV-Konstrukte mit Expressionsvektoren in HuH7-Zellen kotransfiziert, die alle drei HBV-Oberflächenproteine exprimieren (zusammengefasst als HBsAg bezeichnet) und der

Zellkulturüberstand zwischen Tag 3 und Tag 11 nach Transfektion gesammelt. Ein Plasmid, welches für eine sekretierbare Form einer alkalischen Phosphatase (*Secreted Alkaline Phosphatase*, SEAP) kodiert, wurde für die Vergleichbarkeit der Transfektionseffizienz kotransfiziert (siehe Kapitel 4.1.2). Sekretiertes HBsAg wurde mittels eines quantitativen Test Kit der Firma Abbott gemessen. Dabei werden sowohl subvirale Partikel (SVP) als auch das HBsAg, welches die HDV-Partikel umhüllt, nachgewiesen. Parallel wurde die RNA der Überstände extrahiert und die sekretierten HDV-Partikel mittels einer qRT-PCR der HDV-RNA bestimmt. Sowohl das HBsAg als auch die Konzentration an HDV-Partikeln wurden auf die SEAP-Sekretion normalisiert. In der Gesamtheit wurde die höchste Konzentration an HBsAg in den Überständen der Kotransfektionen mit HBsAg des HBV-Gt B1 nachgewiesen (Abbildung 7; A), hier lag der niedrigste Wert bei 122,8 internationalen Einheiten pro Milliliter (*engl.: international units; IU/ml*) (HDV-Gt 4) und der höchste Wert bei 561,4 IU/ml (HDV-Gt 2). Dabei entspricht eine IU etwa 0,88 Nanogramm HBsAg [207]. Der zweithöchste Wert wurde für die Kotransfektion mit dem HDV-Gt 1-Isolate CHD_HH gemessen, welcher 483,8 IU/ml entsprach. Im mittleren Bereich lagen die Werte der Kotransfektionen mit dem HDV-Gt 3 (238,6 IU/ml) und den beiden HDV-Gt 1-Isolaten pSVL(D3) (290,1 IU/ml) und CHD_WHO (340 IU/ml) (Abbildung 7; A).

Innerhalb der Werte für die Kotransfektionen mit HBsAg des HBV-Gt D3 wurde die höchste Konzentration an HBsAg im Überstand der HDV-Gt 3 Partikel nachgewiesen (129 IU/ml). Die niedrigsten Konzentrationen an HBsAg wurden in den Überständen der pSVL(D3) (14,9 IU/ml) und der HDV-Gt 2 (22,7 IU/ml) kotransfizierten Zellen gemessen, während CHD_WHO (80,1 IU/ml), CHD_HH (80,3 IU/ml) und HDV-Gt 4 (72 IU/ml) kotransfizierte Zellen HBsAg im mittleren Bereich sekretierten (Abbildung 7; A).

Für alle HDV-Gt konnte HDV-RNA im Überstand der transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Die meisten HDV-Partikel wurden von den CHD_HH transfizierten Zellen sekretiert (HBsAg D3: 7×10^8 Genomäquivalente pro Milliliter (*engl.: genome equivalent; GE/ml*), HBsAg B1: 8×10^8 GE/ml). Auffällig ist zudem, dass die Zellen, welche mit dem HBsAg des HBV-Gt B1 kotransfiziert wurden, mehr Partikel in den Überstand sekretierten, als solche, die mit HBsAg des HBV-Gt D3 kotransfiziert wurden. Eine Ausnahme bildet hier der HDV-Gt 3. Die Konzentration an sekretierten

HDV Partikeln umhüllt mit HBsAg des Gt D3 lag bei 7×10^7 GE/ml während 5×10^7 GE/ml mit dem Oberflächenprotein des HBV-Gt B1 sekretiert wurden. Auch die Konzentrationen für die HDV-Partikel pseudotypisiert mit HBsAg der Gt B1 und D3 des Isolats CHD_HH lagen sehr eng aneinander, so wurden 8×10^8 GE/ml mit HBsAg des Gt B1 und 7×10^8 GE/ml mit HBsAg des Gt D3 sekretiert. Am größten war der Unterschied bei dem HDV-Gt 2. Hier wurden 1×10^8 GE/ml pseudotypisierter HDV-Partikel mit HBsAg des Gt B1 und 3×10^6 GE/ml mit HBsAg des Gt D3 sekretiert. Zellen transfiziert mit HDV-Gt 4 sekretierten 6×10^7 GE/ml umhüllte HDV-Partikel mit Oberflächenprotein des HBV-Gt D3 und 2×10^8 GE/ml mit Oberflächenprotein des HBV-Gt B1. Für die Isolate des HDV-Gt 1 lagen die Konzentrationen für die Sekretion der HDV-Partikel pseudotypisiert mit HBsAg des HBV-Gt D3 bei 5×10^7 GE/ml für pSVL(D3), bei $5,8 \times 10^7$ GE/ml für das Isolat pHDV_T und bei 2×10^8 GE/ml für das Isolat CHD_WHO. Verglichen mit HBsAg des HBV-Gt B1 stieg auch hier die Sekretion auf 5×10^8 GE/ml für pSVL(D3) und auf 4×10^8 GE/ml für das Isolat CHD_WHO (Abbildung 7; B).

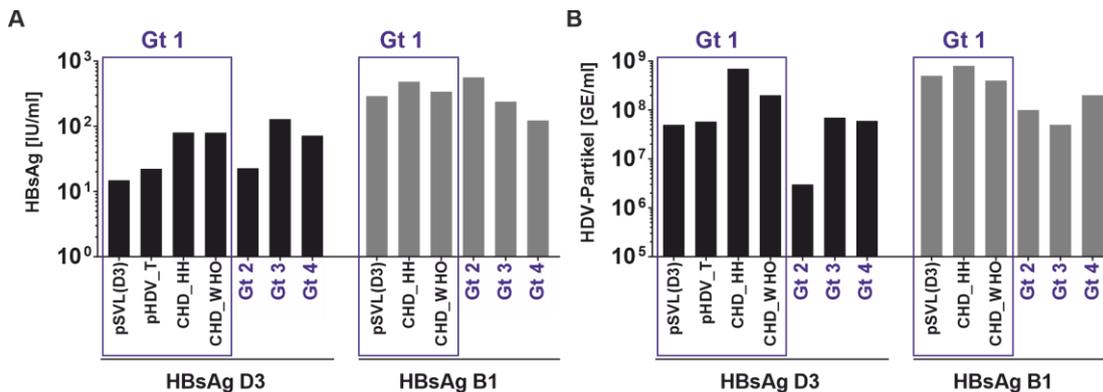


Abbildung 7: Sekretiertes HBsAg und sekretierte HDV-Partikel aus HDV-/ HBsAg-Kotransfektionen.

HDV-Expressionskonstrukte wurden zusammen mit Expressionsplasmiden für das HBsAg der HBV-Gt B1 und D3 in HuH7-Zellen kotransfiziert. Der Überstand wurde von Tag 3 bis Tag 11 gesammelt. **A)** Sekretiertes HBsAg wurde im quantitativen Testsystem (HBsAg (Quant.Autodilution)) Architect der Firma Abbott bestimmt. **B)** Nach RNA-Extraktion wurden die HDV Genomäquivalente pro Milliliter (GE/ml) Zellkulturüberstand mittels qRT-PCR ermittelt. Alle Werte wurden auf die SEAP-Sekretion normalisiert. Gt – Genotyp; CHD – chronische HDV-Patientenisolate; CHD_WHO – Sequenz des HDV-RNA WHO Standards [200]; CHD_HH – Einzelsequenz einer klinischen Studie [201]; pHDV_T – neu kloniertes HDV Konstrukt der pSVL(D3) Sequenz [56, 206].

Fazit: Im Vergleich zu Kotransfektionen der HDV-Konstrukte mit HBsAg des HBV-Gt D3 konnten mehr HDV-Partikel und HBsAg im Überstand aus Kotransfektionen mit HBsAg des HBV-Gt B1 nachgewiesen werden.

5.1.4 Infektion umhüllter HDV-Partikel der HDV-Gt 1-4 mit HBsAg der HBV-Gt B1 und D3

Die pseudotypisierten HDV-Partikel wurden nun im Folgenden auf ihre Infektiosität *in vitro* untersucht. Hierzu wurde eine hNTCP-exprimierende Hepatomzelllinie (HepG2-hNTCP) verwendet. Es wurden jeweils zwei Wells einer 48er Well Platte mit jeweils identischen HDV-Genomäquivalenten (5×10^7) an pseudotypisierten HDV-Partikeln infiziert. Jeweils ein Well wurde 11 Tage nach Infektion (d.p.i) lysiert und die Infektion mittels eines diagnostischen ELISA-Assays auf zelluläres HDAg nachgewiesen (ETI-Deltak, DiaSorin). Die Zellen des anderen Wells wurden fixiert und das intrazelluläre HDAg als Marker einer Infektion mittels IgGs eines HDV/HBV Patientenantiseraums in der Immunfluoreszenzfärbung detektiert.

Alle *in vitro* produzierten HDV-Partikel konnten die Hepatomzelllinie HepG2-hNTCP infizieren, dabei waren jedoch deutliche Unterschiede in der Infektiosität ersichtlich. Während mittels des diagnostischen ELISA-Assays Infektionen der Isolate des Gt 1 und des Gt 4 eindeutig nachgewiesen werden konnten, lagen die Werte für die Infektion des Gt 2 und 3 nahe am *Cut-off* (Abbildung 8; B). Da mittels Immunfluoreszenz auch einzelne Infektionsereignisse auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden können, wurde diese zusätzlich zum ELISA durchgeführt (Abbildung 8; A). Innerhalb des Gt 1 konnten für die Isolate CHD_WHO und CHD_HH die meisten Infektionen mittels Immunfluoreszenz und ELISA nachgewiesen werden. HDV-Partikel des Gt 4 zeigten eine annähernd gleiche Infektionsrate, wie die Isolate des Gt 1 (Abbildung 8; A). Anhand der Immunfluoreszenz ließen sich keine Unterschiede der Infektionseffizienz zwischen den zwei verwendeten HBV-Oberflächenproteinen feststellen. HDV-Partikel, die mit Oberflächenproteinen des HBV-Gt B1 umhüllt wurden, zeigten eine ähnliche Infektionsrate wie solche, die mit Oberflächenprotein des HBV-Gt D3 umhüllt wurden (Abbildung 8; A). Anhand der ELISA Daten zeigte sich eine leichte Tendenz, dass die HDV-Partikel pseudotypisiert mit HBsAg des HBV-Gt D3 eine erhöhte Infektionsrate erzielten, dabei stellt der HDV-Gt 2 eine Ausnahme dar, die Werte für die Infektion waren mit HBsAg des HBV-Gt B1 höher als mit HBsAg des Gt D3 (Abbildung 8; B).

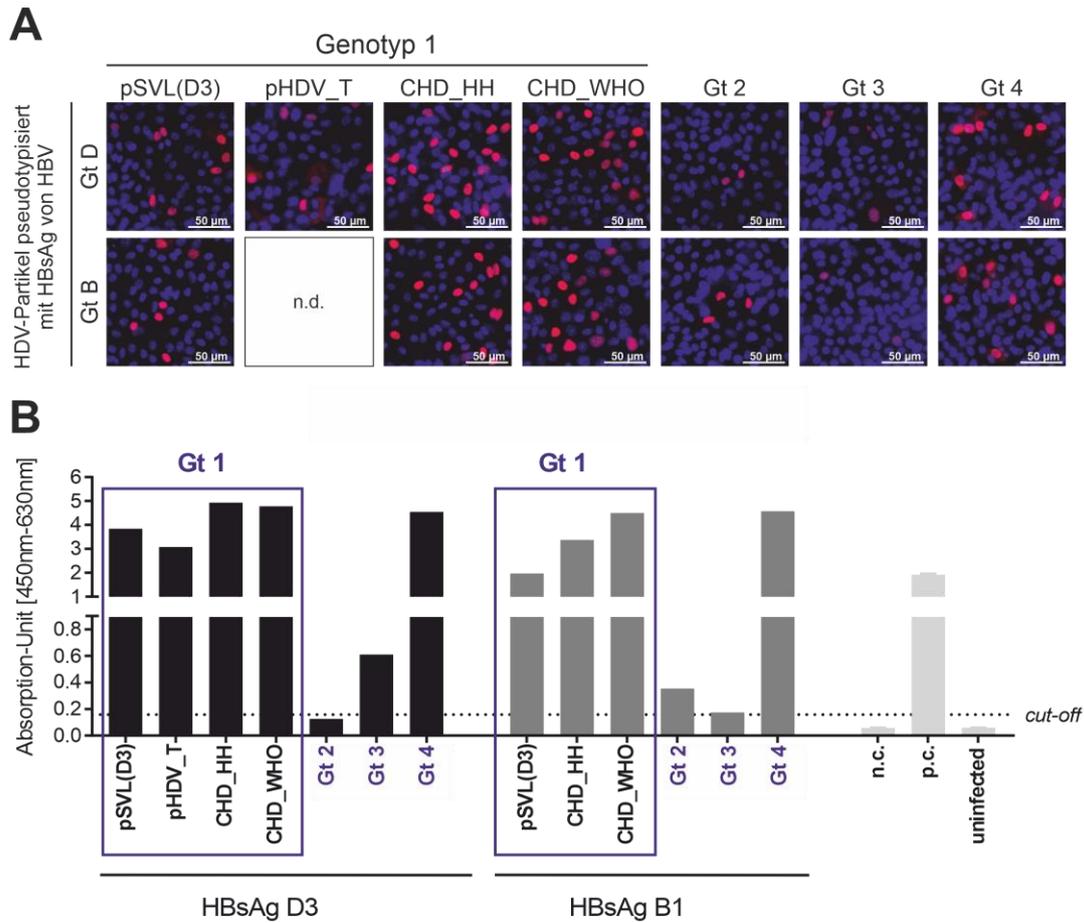


Abbildung 8: Infektion pseudotypisierter HDV-Partikel der HDV-Gt 1-4 mit Oberflächenproteinen von HBV-Gt D3 und HBV-Gt B1. HepG2-hNTCP-Zellen wurden im Parallelansatz über 20 Stunden mit jeweils 5×10^7 HDV Genomäquivalenten inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin mehrfach mit HGM gewaschen und in HGM + 2 % DMSO gehalten. **A)** Nach 11 Tagen wurde bei einem Ansatz die Zellen fixiert, permeabilisiert und das Deltaantigen (HDAg), als Marker einer Infektion, mittels anti-HDAg IgGs eines humanen Patientenserums und eines Alexa568 konjugierten anti-human IgG-Antikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden parallel mit DAPI gefärbt. **B)** Die Zellen des zweiten Ansatzes wurden nach 11 Tagen lysiert und die Infektion mittels eines diagnostischen ELISA-Assays nachgewiesen (ETI-Deltak, DiaSorin). Der Cut-off wurde, nach Angaben des Herstellers, aus dem Mittelwert der internen Negativkontrolle (Negativserum, n.c.) und dem Nullwert + 0,1 errechnet. N.c. – interne Negativkontrolle, HDAg-negatives Human-Serum/Plasma; p.c. – interne Positivkontrolle, rekombinantes HDAg, Human-Serum/Plasma; n.d. – nicht durchgeführt; Gt – Genotyp; CHD – chronische HDV-Patientenisolat; CHD_WHO – Sequenz des HDV-RNA WHO Standards [200]; CHD_HH – Einzelsequenz einer klinischen Studie [201]; pHDV_T – neu kloniertes HDV Konstrukt der pSVL(D3) Sequenz [56, 206].

Fazit: Für alle HDV-Partikel konnten Infektionen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Dabei ergaben sich Unterschiede in der Infektionseffizienz der HDV-Gt und -Isolate sowie leichte Variationen bei den zwei zur HDV-Umhüllung verwendeten Isolate der HBV-Oberflächenproteine. Die Isolate CHD_WHO und CHD_HH des HDV-Gt 1 und HDV-Gt 4 zeigten die höchste Infektionsrate. Die HDV-Gt 2 und 3 waren in der Immunfluoreszenz deutlich weniger infektiös. Mittels ELISA konnten keine Infektionen des HDV-Gt 2 umhüllt mit HBsAg des HBV-Gt D3 nachgewiesen werden.

5.1.5 *Trans*-Komplementation der HDV-Replikation durch S-HDAg-Isolate des HDV-Gt 1

Das S-HDAg des HDV hat eine besondere Bedeutung im Replikationszyklus des HDV-Genoms (siehe Kapitel 1.1.2). Es stellte sich die Frage, ob die Aktivierung der HDV-Replikation durch das HDAg Isolat-spezifisch ist oder ob es intrazellulär durch heterologes HDAg anderer HDV-Isolate in „*trans*“ ersetzt werden kann (z. B. im Rahmen einer Koinfektion des Patienten mit unterschiedlichen HDV-Stämmen).

Im Folgenden wurde zunächst die *trans*-Aktivierung der HDV-Replikation verschiedener HDV-Gt 1-Isolate durch heterologes S-HDAg untersucht. Hierzu wurden 2.0mer HDV-Expressionskonstrukte mit defektem HDAg-OLR konstruiert. Dabei wurde eine Transversion innerhalb der cDNA vorgenommen, indem das Adenin des HDAg Start-Codons (AUG) durch ein Thymin (UUG) ausgetauscht wurde. Es wurde eine Einbasen-Substitution verwendet, um mögliche Auswirkungen auf die RNA-Sekundärstruktur des HDV-Genoms zu minimieren, die zu Replikationsstörungen führen könnten. Die so entstandenen cDNA-Klone der HDV-Genome sind ohne die Expression des HDAg nicht in der Lage *in vitro* zu replizieren (siehe auch Abbildung 6). Dieser Defekt sollte durch Kotransfektion eines Plasmids, das für das S-HDAg, welches unter einem CMV-Promoter konstitutiv überexprimiert wird, wieder aufgehoben werden. Die Messung der HDV-Replikation erfolgte durch Nachweis der antigenomischen HDV-RNA (agrNA HDV), welche mittels Northern Blot und [α -³²P] UTP-markierter *in vitro* transkribierter genomischer HDV-RNA nachgewiesen werden

kann (Abbildung 9; A). Die Radioaktivblots wurden mit Hilfe der Software Image Studio Lite (Version 5.2, LI-COR Lincoln, NB, USA) densitometrisch ausgewertet.

Die Replikation des Isolats CHD_WHO wurde durch die S-HDAg der Isolate CHD_HH und pHDV_T stärker reaktiviert als durch Kotransfektion des S-HDAg des Isolats CHD_WHO, dessen Intensität nur etwa 12 % des Wildtyps erreichte. Dabei konnten maximal 67 % der Signalstärke des Wildtyps durch Kotransfektion des S-HDAg des CHD_HH Isolats wiederhergestellt werden (Abbildung 9; B). Während die Kotransfektion des leeren Vektors pcDNA3.1(+) zu keinem deutlichen Signal führte, konnte die Replikation aller HDV-Gt 1-Isolate durch Überexpression von S-HDAg verschiedener HDV-Gt 1-Isolate in *trans* reaktiviert werden.

Auch die Replikation des Isolats pHDV_T konnte unter konstitutiver Überexpression des S-HDAg des pHDV_T Isolats ebenfalls reaktiviert werden, dabei erreichte die Signalstärke etwa 78 % der der Wildtyp Intensität. Durch Überexpression der S-HDAg der Isolate CHD_HH und CHD_WHO konnten nur etwa 49 % und 54 % der Signalstärke des Wildtyps gemessen werden. Die Kotransfektion des leeren Vektors pcDNA3.1(+) führte erwartungsgemäß in keinem Fall zu einer Wiederherstellung der HDV-Replikation der HDV-Genom-Mutanten (Abbildung 9; B).

Die Replikation des Isolats CHD_HH wurde durch konstitutive Überexpression des S-HDAg der Isolate pHDV_T und CHD_WHO im Vergleich zum Wildtyp deutlich verstärkt. Die relativen RNA Intensitäten Kotransfektionen aus S-HDAg der Isolate pHDV_T und CHD_WHO stiegen im Vergleich zu der des Wildtyps um das 3,68- bzw. das 2,49-fache an. Durch Kotransfektion des S-HDAg des Isolats CHD_HH konnten etwa 85 % der Replikation des Wildtyps reaktiviert werden (Abbildung 9; B).

ERGEBNISSE

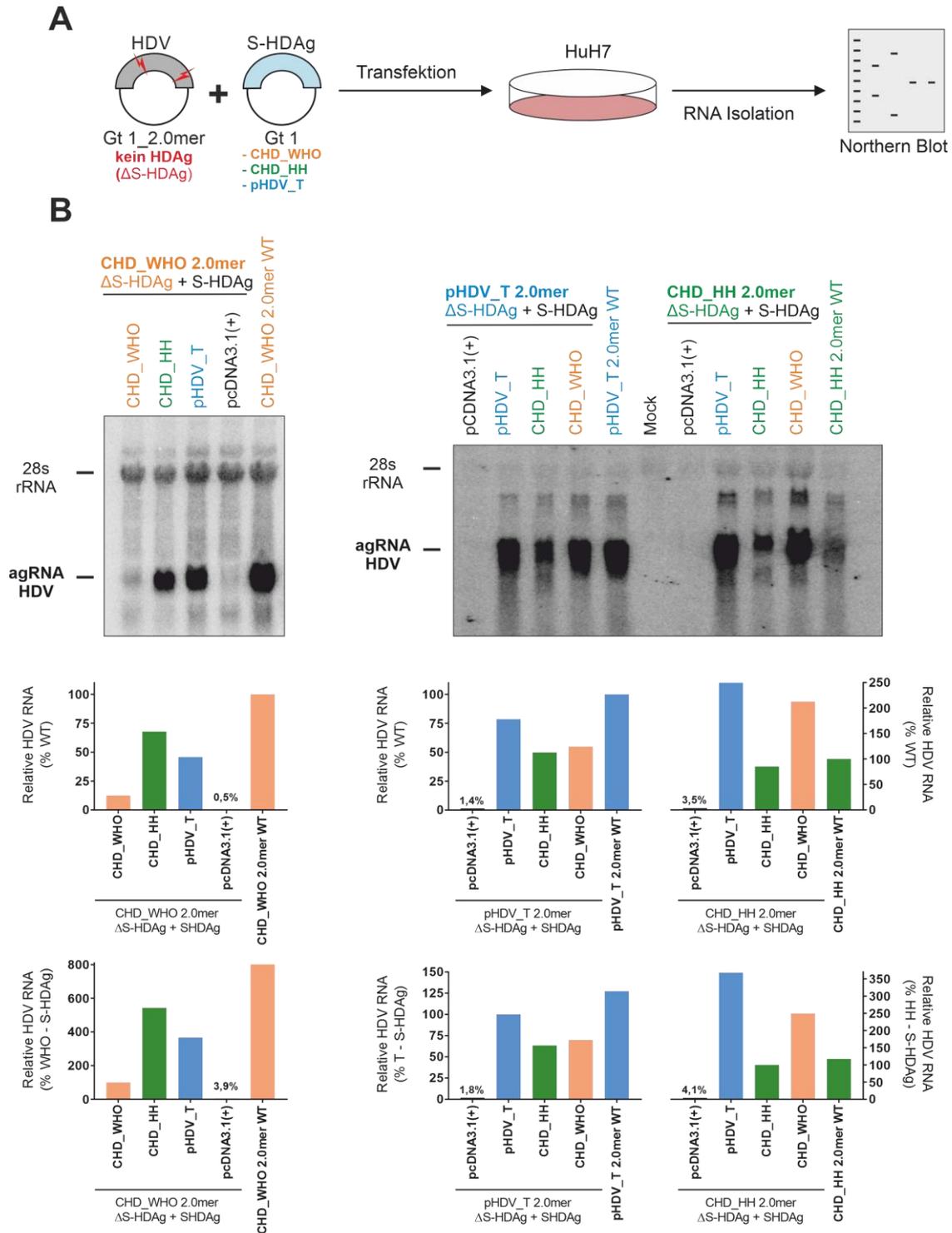


Abbildung 9: Wiederherstellung der Replikation replikationsinkompetenter HDV-Gt 1-cDNA-Dimere durch Koexpression von S-HDAg verschiedener Isolate des HDV-Gt 1 in trans. A) Schema des experimentellen Versuchsaufbaues. Es wurden replikationsinkompetente 2.0mer-Expressionskonstrukte der HDV-Gt 1-Isolate CHD_WHO, pHDV_T und CHD_HH kloniert, welche eine Start-Codon Mutation des S-HDAg in beiden Genomen tragen (Δ S-HDAg). Diese Expressionsplasmide wurden zusammen mit Vektoren, die für die S-HDAg der jeweiligen HDV-Gt 1-Isolate kodieren kotransfiziert. Als Kontrolle wurde der Leervektor pcDNA3.1(+) anstatt der S-HDAg Expressionsplasmide kotransfiziert. Nach 6 Tagen wurde die Gesamt-RNA der Zellen mittels TRIzol isoliert und die antigenomische HDV-RNA als Marker der Replikation in einem Northern Blot nachgewiesen und quantifiziert. B) Nachweis antigenomischer HDV-RNA (agRNA HDV) 6 Tage nach Transfektion der HDV 2.0mer-Expressionskonstrukte in HuH7-Zellen mittels [α - 32 P] UTP-markierter genomischer RNA. Als Spezifitätsnachweis der eingesetzten

Sonden wurde RNA von nicht-transfizierten Zellen („Mock“), sowie RNA aus Kotransfektionen der jeweiligen Δ S-HDAg-HDV-Expressionskonstrukte und des leeren Vektors pcDNA3.1(+) verwendet. Die Quantifizierung der Signalstärke wurde mithilfe der Software Image Studio Lite 5.2 (LI-COR Lincoln, NB, USA) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die jeweiligen allgemeinen Hintergrund-Signale der Blotmembran von allen Werten abgezogen, danach wurden die spezifischen Signale der agRNA HDV auf die Signale der zellulären 28s rRNA normalisiert. Die Berechnung der relativen Intensitäten der antigenomischen RNA wurde mit den normalisierten Werten durchgeführt. S-HDAg – Small Deltaantigen; WT – Wildtyp (keine S-HDAg Start-Codon-Mutation); agRNA – antigenomische RNA; rRNA – ribosomale RNA; CHD – chronische HDV-Patientenisolate; CHD_WHO – Sequenz des HDV-RNA WHO Standards [200]; CHD_HH – Einzelsequenz einer klinischen Studie [201]; pHDV_T – neu kloniertes HDV Konstrukt der pSVL(D3) Sequenz [56, 206].

5.1.6 *Trans*-Komplementation der HDV-Replikation durch S-HDAg der HDV-Gt 1-8

Da zuvor gezeigt wurde, dass S-HDAg des HDV-Gt 1 die Replikation verschiedener Isolate des Gt 1 in *trans* komplementieren kann, wurde nun im Folgenden untersucht, ob das S-HDAg der phylogenetisch weiter entfernt verwandten HDV-Gt 2, 3 und 4 die Replikation des HDV-Gt 1 in *trans* reaktivieren können. Hierzu wurde zunächst das replikationsinkompetente Expressionskonstrukt des Isolats CHD_WHO, welches eine Start-Codon Mutation des S-HDAg in beiden Genomen trägt, verwendet. Dieses wurde mit S-HDAg der HDV-Gt 1-4 in HuH7-Zellen kotransfiziert, nach sechs Tagen die Synthese der antigenomischen HDV-RNA mittels Northern Blot nachgewiesen und die Radioaktivblots densitometrisch ausgewertet (Abbildung 10; A). Die Replikation des Isolats CHD_WHO konnte durch Kotransfektion des eigenen S-HDAg wieder reaktiviert werden, erreichte dabei aber nur etwa 76 % des Wildtypniveaus. Das S-HDAg des HDV-Gt 2 konnte die Replikation dagegen vollständig *trans*-komplementieren. Dabei verstärkte sich die Replikation, verglichen zu der des Wildtyp HDV-Dimers, um etwa 7 % und um etwa 40 % im Vergleich zu der des eigenen S-HDAg (Gt 1, Isolat CHD_WHO). Durch Kotransfektion der Expressionsplasmide für S-HDAg der Gt 3 und 4 konnte im Northern Blot keine antigenomische HDV-RNA des HDV-Gt 1 nachgewiesen werden (Abbildung 10; B). Trotz der Expression des S-HDAg der Gt 3 und 4 im Nukleus der transfizierten Zellen (siehe Anhang: Abbildung 37), konnte die Replikation des HDV-Gt 1 durch S-HDAg der HDV-Gt 3 und 4 nicht *trans*-komplementiert werden.

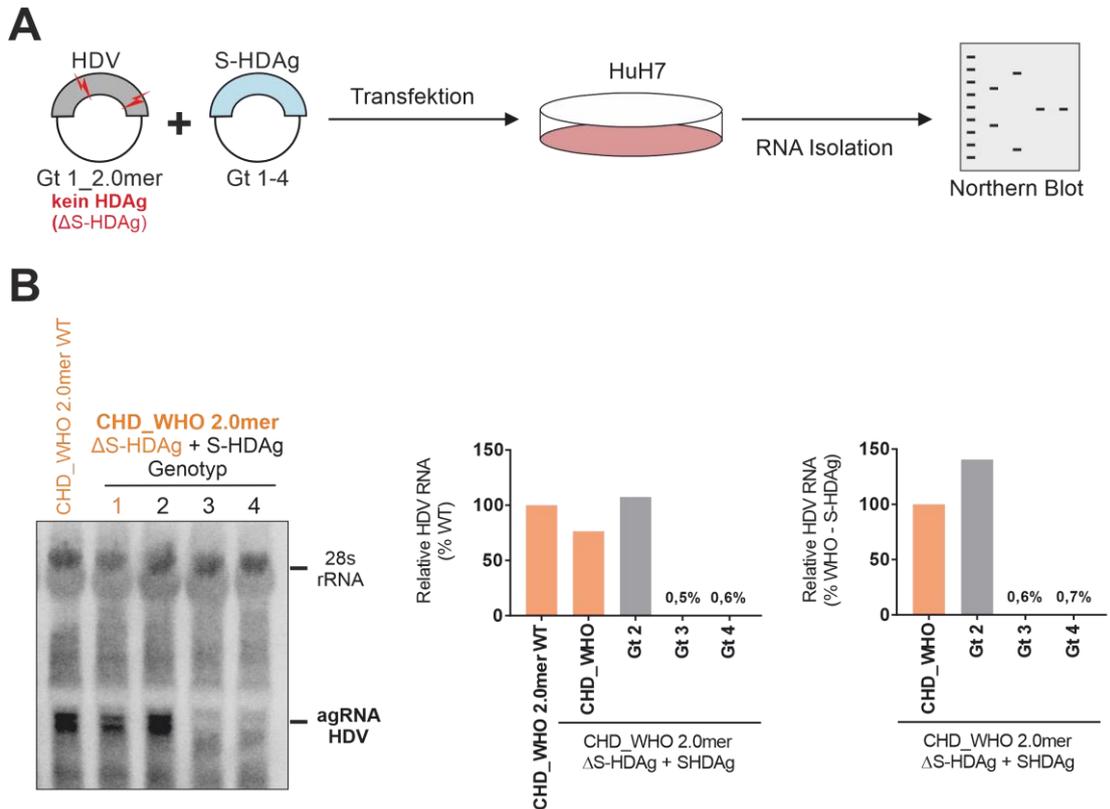


Abbildung 10: Wiederherstellung der Replikation des replikationsinkompetenten HDV-Gt 1 cDNA-

Klons CHD_WHO durch Zugabe von S-HDAg der HDV-Gt 1-4 in trans. A) Schema des experimentellen

Versuchsaufbaues. Es wurde eine replikationsinkompetente Mutante des HDV-Gt 1-Isolates CHD_WHO als 2.0mer-

Expressionskonstrukt kloniert und zusammen mit Vektoren, kodierend für die S-HDAg der HDV-Gt 1 – 4 in HuH7-Zellen

kotransfiziert. Nach 6 Tagen wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und die antigenomische HDV-RNA als Marker der Replikation

mittels [α -³²P] UTP-markierter genomischer RNA in einem Northern Blot nachgewiesen. B) Nachweis antigenomischer HDV-RNA

(agRNA HDV) 6 Tage nach Transfektion in HuH7-Zellen mittels [α -³²P] UTP-markierter genomischer RNA. Die Quantifizierung der

Signalstärke wurde mithilfe der Software Image Studio Lite 5.2 (LI-COR Lincoln, NB, USA) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst der

Hintergrund von allen Werten abgezogen und die Signale der agRNA HDV auf die Signale der 28s rRNA normalisiert. Die

Berechnung der relativen Intensitäten der antigenomischen RNA wurde mit den normalisierten Werten durchgeführt. S-HDAg –

Small Deltaantigen; WT – Wildtyp (keine S-HDAg Start-Codon-Mutation); agRNA – antigenomische RNA; rRNA – ribosomale RNA;

Gt – Genotyp; CHD – chronische HDV-Patientenisolate; CHD_WHO – Sequenz des HDV-RNA WHO Standards [200]; CHD_HH –

Einzelsequenz einer klinischen Studie [201]; pHDV_T – neu kloniertes HDV Konstrukt der pSVL(D3) Sequenz [56, 206].

Fazit: Die Replikation des replikationsinkompetenten HDV-Gt 1-Expressionskonstrukts (CHD_WHO) konnte durch heterologes S-HDAg des Gt 2 transreaktiviert werden, nicht aber durch das S-HDAg der Gt 3 und 4. Dabei wurde die Replikation unter S-HDAg des Gt 2 im Vergleich zur Replikation des CHD_WHO_S-HDAg stärker reaktiviert.

Um zu überprüfen, dass die oben gezeigten Effekte Gt- und nicht Isolat-spezifisch sind, wurden neue Isolate, die am Institut für Virologie in Gießen klonierten HDV-Gt 2-4 (gi), mit S-HDAg Start-Codon Mutanten verschiedener Isolate des HDV-Gt 1 kotransfiziert und die Synthese der antigenomischen RNA als Marker der eigenständigen Replikation mittels Northern Blot (siehe Kapitel 4.4.5) nachgewiesen und quantifiziert (Abbildung 11; A). Um weiterhin festzustellen, ob auch S-HDAg von anderen, phylogenetisch entfernteren, HDV-Gt die Replikation des HDV-Gt 1 reaktivieren können, wurden gleichzeitig S-HDAg der HDV-Gt 5-8 verwendet.

Analog zu den obigen Ergebnissen, *trans*-komplementierte das S-HDAg der neuen HDV-Isolate der HDV-Gt 3 und 4 (Abk. gi) die Replikation des CHD_WHO Isolats (Gt 1) ebenfalls nicht (Abbildung 11; B). Die Replikation des CHD_WHO Isolats konnte unter Expression des S-HDAg des Gt 2 im Vergleich zum S-HDAg des CHD_WHO Isolats (100 %) circa 1,7-fach (171 %) verstärkt werden. Das S-HDAg der HDV-Gt 5 und 6 steigerte die Replikation des CHD_WHO sogar um den Faktor drei (316,7 %, Gt 5 und 337,1 %, Gt 6). Das S-HDAg der HDV-Gt 7 und 8 konnte die CHD_WHO-Replikation im Vergleich zum S-HDAg des CHD_WHO um mehr als das 8- (819,4 %, Gt 7) bzw. 7-fache (722,1 %, Gt 8) erhöhen (Abbildung 11; B).

Auch die Replikation des Isolats CHD_HH Δ S-HDAg (HDV-Gt 1) konnte mit Hilfe des S-HDAg der HDV-Gt 2, 5, 6, 7 und 8 in *trans* reaktiviert und gesteigert werden, während keine *trans*-Komplementation mit dem S-HDAg der HDV-Gt 3 und 4 beobachtet werden konnte (Abbildung 11; C). Die HDV-Replikation unter S-HDAg der HDV-Gt 2, 5 und 6 ist etwa 40 % stärker als unter S-HDAg des eigenen Isolats. Das S-HDAg des HDV-Gt 7 verstärkt diesen Effekt nochmals. Dabei ist die HDV-Replikation um mehr als doppelt so stark reaktiviert (214,5 %) als unter Expression von S-HDAg des eigenen Isolats CHD_HH (100 %). Das S-HDAg des HDV-Gt 8 weist hingegen nur einen um etwa 15 % verstärkenden Effekt auf die Replikation auf (114,9 %) und steigert damit die Replikation im Vergleich zu S-HDAg des CHD_HH nur geringfügig (Abbildung 11; C).

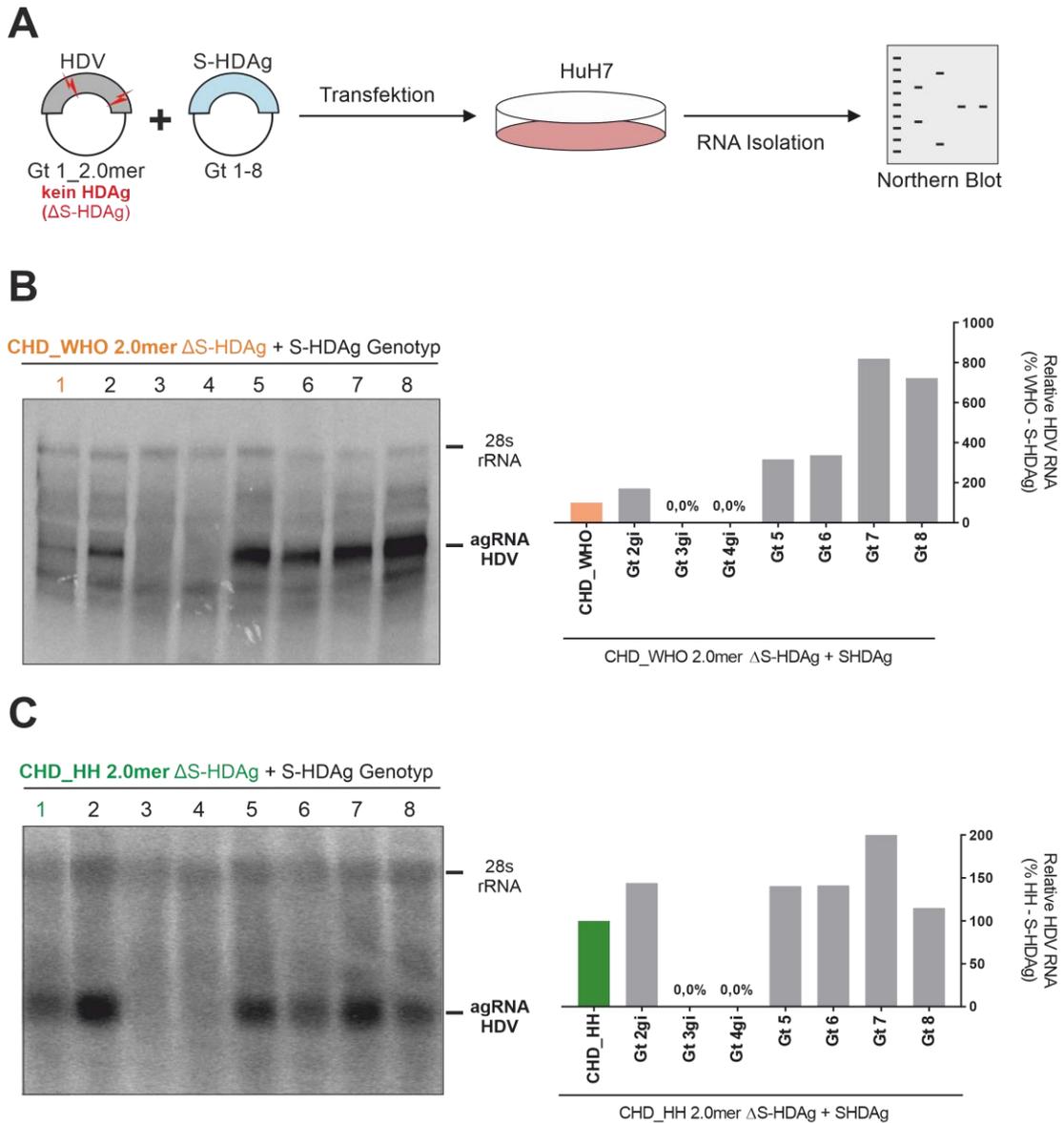


Abbildung 11: Wiederherstellung der Replikation replikationsinkompetenter HDV-Gt 1-cDNA-Dimere

durch Zugabe von S-HDAg der HDV-Gt 1-8 in trans. **A)** Schema des experimentellen Versuchsaufbaues. Es wurden replikationsinkompetente Mutanten der cDNA-Klone der HDV-Gt 1-Isolate CHD_WHO und CHD_HH zusammen mit Vektoren, kodierend für die S-HDAg der HDV-Gt 1 – 8 in HuH7-Zellen kotransfiziert. **B und C)** Nachweis antigenomischer HDV-RNA (agRNA HDV) 6 Tage nach Transfektion in HuH7-Zellen. Die gesamt-RNA der Zellen wurde mittels TRIzol isoliert und die antigenomische HDV-RNA als Marker der Replikation mittels [α - 32 P] UTP-markierter genomischer RNA in einem Northern Blot nachgewiesen. Die Quantifizierung der Signalstärke wurde mithilfe der Software Image Studio Lite 5.2 (LI-COR Lincoln, NB, USA) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst der Hintergrund von allen Werten abgezogen und die Signale der agRNA HDV auf die Signale der 28s rRNA normalisiert. Die Berechnung der relativen RNA wurde mit den normalisierten Werten durchgeführt. Negative Werte wurden auf null Prozent gesetzt. S-HDAg – Small Deltaantigen; WT – Wildtyp (keine S-HDAg Start-Codon-Mutation); agRNA – antigenomische RNA; rRNA – ribosomale RNA; Gt – Genotyp; CHD – chronische HDV-Patienten isolate; CHD_WHO – Sequenz des HDV-RNA WHO Standards [200]; CHD_HH – Einzelsequenz einer klinischen Studie [201]; pHDV_T – neu kloniertes HDV Konstrukt der pSVL(D3) Sequenz [56, 206].

Fazit: Die Replikation des replikationsinkompetenten HDV-Gt 1-Isolats CHD_WHO und des Isolats CHD_HH konnte durch S-HDAg des Gt 2 und der Gt 5-8 in *trans* reaktiviert werden, nicht aber durch das S-HDAg der Gt 3 und 4. Dabei wurde die Replikation unter S-HDAg der Gt 5-8 und des Gt 2 im Vergleich zur Replikation des Isolat-eigenen S-HDAg verstärkt.

5.1.7 *Cis*-Komplementation der HDV-Replikation durch S-HDAg verschiedener Isolate des HDV-Gt 1

In den obigen Versuchsteilen konnte bereits gezeigt werden, dass S-HDAg unterschiedlicher HDV-Gt (mit Ausnahme der HDV-Gt 3 und 4) die Replikation des HDV-Gt 1 in *trans* komplementieren und teilweise sogar steigern können. Nun sollte untersucht werden, ob die HDV-Replikation nicht nur in *trans*, sondern auch durch die Expression eines Isolat-fremden S-HDAg innerhalb eines HDV-Genoms („*in cis*“) beeinflusst wird. Hierzu wurden cDNA-Klone der HDV-Gt 1-Isolate pHDV_T und CHD_HH kloniert, welche den gesamten HDAg-OLR des jeweiligen anderen Isolats in beiden HDV-Genomen tragen (Abbildung 12; A). Die chimären Expressionskonstrukte sowie die jeweiligen Wildtypen wurden in HuH7-Zellen transfiziert und das Gesamtprotein und die totale RNA mittels TRIzol isoliert. Die Synthese der antigenomischen RNA, als Marker der Replikation, wurde mittels Northern Blot analysiert und die S-/L-HDAg Expression mittels Western Blot untersucht (Abbildung 12; A).

Während für die Wildtypen antigenomische HDV-RNA durch Northern Blot nachweisbar war, konnte für die jeweiligen Chimären kein Signal der antigenomischen RNA detektiert werden (Abbildung 12; B). Während der HDV-Replikation wird in einem Editierungsschritt die antigenomische HDV-RNA durch die zelluläre RNA-abhängige Adenosin-Deaminase (*ADAR1*) so verändert, dass eine mRNA transkribiert wird, von welcher ein um etwa 19 Aminosäuren verlängertes HDAg (L-HDAg) translatiert wird (siehe Kapitel 1.1.2). So kann neben der Synthese der antigenomischen RNA auch die Expression des L-HDAg ein indirekter Hinweis auf autonome HDV-Replikation sein. Die Wildtypen der HDV-Gt 1-Isolate zeigten an Tag 2 nach Transfektion bereits eine deutliche Expression des S-HDAg. Die L-HDAg Synthese war an Tag 6 nach Transfektion

im Western Blot nachweisbar, damit einhergehend nahm die S-HDAg Synthese ab (Abbildung 12; C). Die chimären Expressionsvektoren der HDV-Gt 1-Isolate exprimierten ebenso an Tag 2 nach Transfektion S-HDAg, jedoch nahm diese an Tag 6 bereits ab, ohne dass die L-HDAg Expression detektiert werden konnte.

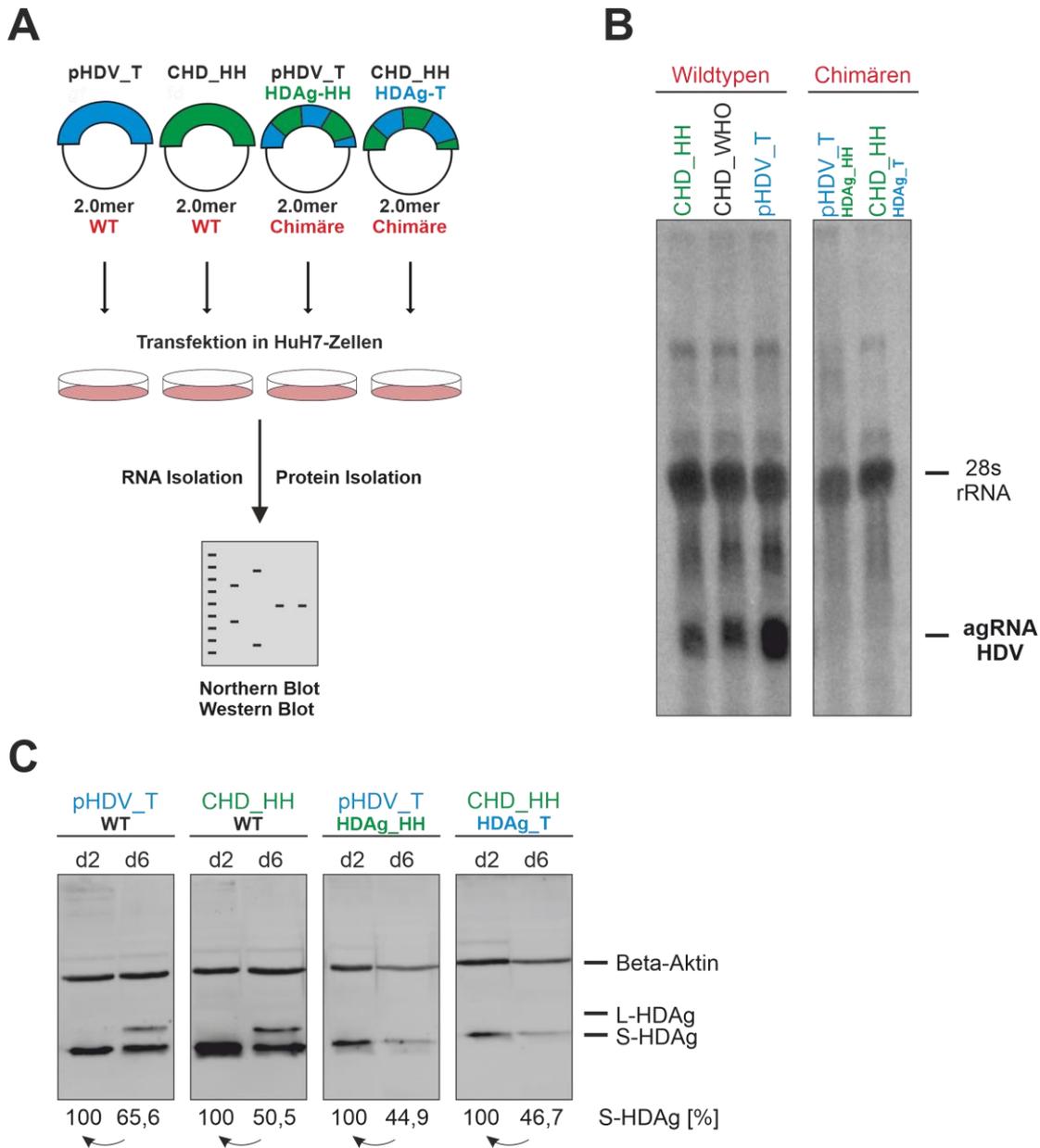


Abbildung 12: Replikation chimärer HDV-Gt 1-Isolate. **A)** Schema des Versuchsaufbaus: Chimäre HDV-Gt 1-Expressionskonstrukte wurden so kloniert, dass die HDAg-OLRs gegen die anderer HDV-Gt 1-Isolate ausgetauscht wurden. Diese Konstrukte wurden in HuH7-Zellen transfiziert und die RNA sowie das Protein mittels TRIzol isoliert. Der Nachweis der Synthese der antigenomischen RNA erfolgte mittels Northern Blot, die Expression des L-HDAg wurde mittels Western Blot nachgewiesen. **B)** Nachweis antigenomischer HDV-RNA der Wildtyp HDV-Gt 1-Isolate sowie chimärer HDV-Gt 1-Konstrukte 6 Tage nach Transfektion mittels [α - 32 P] UTP-markierter genomischer RNA. **C)** Nachweis der beiden HDAg-Isoformen (L-HDAg/S-HDAg) mittels eines HDV/HBV-Antiserums sowie Beta-Aktin als Ladekontrolle 2 (d2) und 6 (d6) Tage nach Transfektion der 2.0mer-Expressionskonstrukte. Die Quantifizierung der Signalstärke wurde mithilfe der Software Image Studio Lite 5.2 (LI-COR Lincoln, NB, USA) durchgeführt, dargestellt ist jeweils die Expression des S-HDAg 2 (entspricht 100 %) und 6 Tage (x % von d2) nach Transfektion.

Die Expression des S-HDAg wurde auf die Beta-Aktin Expression normalisiert. S-HDAg – Small Deltaantigen; L-HDAg – Large Deltaantigen; WT – Wildtyp; agRNA – antigenomische RNA; rRNA – ribosomale RNA; CHD – chronische HDV-Patientenisolat; CHD_WHO – Sequenz des HDV-RNA WHO Standards [200]; CHD_HH – Einzelsequenz einer klinischen Studie [201]; pHDV_T – neu kloniertes HDV Konstrukt der pSVL(D3) Sequenz [56, 206].

Fazit: HDV-Gt 1-Expressionskonstrukte (2.0mer), die in beiden Genomen den HDAg-OLR anderer HDV-Gt 1-Isolate aufweisen, waren nicht fähig, *in vitro* zu replizieren. Dies konnte anhand der fehlenden Synthese der antigenomischen HDV-RNA sowie fehlender Expression des L-HDAg gezeigt werden.

5.1.8 *Trans*-Komplementation der HDV-Replikation durch Deltaantigene Hepatitis-Delta-Virus ähnlicher Viren

Seit der Entdeckung der ersten Hepatitis-Delta-Virus-ähnlicher (HDV-ähnliche) RNA-Sequenz im Jahre 2018 wurden fortlaufend weitere HDV-ähnliche Virus Sequenzen in Transkriptomen unterschiedlicher Tiere gefunden (siehe Kapitel 1.1.3) [88-90, 92, 93]. Zudem konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit die HDV-RNA eines HDV-ähnlichen Virus aus Stachelratten (*Proechimys semispinosus*) charakterisiert werden (siehe Kapitel 5.2) [91]. All diese neuartigen HDV-ähnlichen Viren scheinen bestimmte Charakteristika des humanen HDV zu besitzen. Innerhalb humaner Hepatitis-Delta-Viren ist die Expression des S-HDAg essentiell für die virale Replikation. Auch die tierischen HDV-ähnlichen Viren scheinen einen OLR für ein Deltaantigen (DAg) zu besitzen. Daher wurden diese nun in Hinblick auf die Fähigkeit die Replikation des HDV-Gt 1-Isolates CHD_HH zu reaktivieren untersucht (Abbildung 13; A). Hierzu wurden Expressionsvektoren der putativen DAg mit einem FLAG-Tag versehen, in HuH7-Zellen konstitutiv unter einem CMV-Promoter überexprimiert und die erfolgreiche Expression des DAg mittels Immunfluoreszenzfärbung überprüft (Abbildung 13; B). Während die DAg der HDV-ähnlichen Viren aus der Schlange, des Molches, der Vögel, der Fische und der Kröte ähnlich zu HDAg des humanen HDV im gesamten Zellkern sowie verstärkt in den Nukleoli des Nukleus exprimiert wurden, zeigte sich die Expression des DAgs des Stachelratte-Deltavirus über den gesamten Nukleus verteilt. Auch das DAg des Termiten-Deltavirus wird im gesamten Nukleus exprimiert, jedoch scheint die Expression auch im Cytoplasma der Zelle stattzufinden (Abbildung 13; B). Erstaunlicherweise zeigte die Immunfluoreszenzfärbung durch anti-HDAg IgGs eines

HBV/HDV positiven Patientenserums eine Kreuzreaktivität gegenüber allen anderen DAg (Abbildung 13; B).

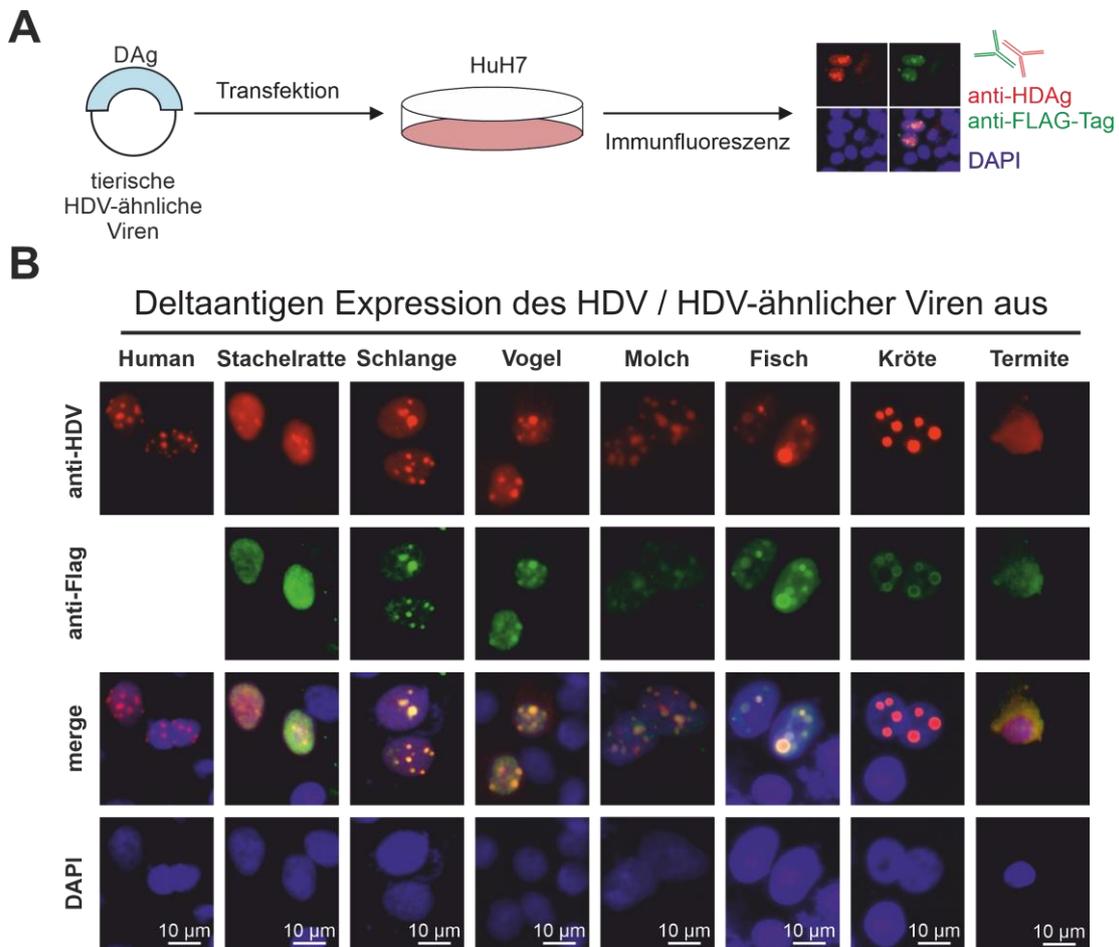


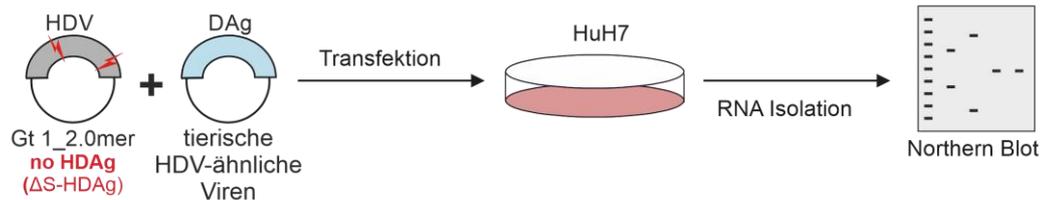
Abbildung 13: Deltaantigenexpression von HDV / HDV-ähnlichen Viren in humanen Hepatomzellen.

A) HuH7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren der tierischen DAg (mit N-terminalem FLAG-tag) transfiziert. Nach 4 Tagen wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. **B)** Immunfluoreszenz der Deltaantigene (DAg) Hepatitis-Delta-Virus (HDV) ähnlicher Viren. Die Färbung des Deltaantigens erfolgte zum einen mit Anti-HDAg IgGs eines HBV/HDV-co-infizierten Patienten und zum anderen mittels eines anti-FLAG Antikörpers. Alexa-488- und 594-markierte anti-human und anti-mouse IgGs wurden als Sekundärantikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. DAg – Deltaantigen.

Im Folgenden wurde die *trans*-Aktivierung der HDV-Replikation der Start-Codon Mutante der HDV-Gt 1-Isolate CHD_HH durch die jeweiligen DAg der tierischen Deltaviren untersucht. Hierzu wurde das replikationsinkompetente 2.0mer-Expressionskonstrukt des Isolat CHD_HH verwendet (ohne endogene Expression eines L/S-HDAg) und mit den Expressionsplasmiden der tierischen DAg in HuH7-Zellen kotransfiziert (Abbildung 14; A). Als Kontrolle diente ein Ansatz mit dem humanen CHD_WHO S-HDAg. Durch Nachweis der antigenomischen HDV-RNA (agRNA HDV), welche mittels Northern Blot und [α - 32 P] UTP-markierter *in vitro* transkribierter

genomischer HDV-RNA nachgewiesen werden kann, wurde die Synthese der antigenomischen HDV-RNA spezifisch detektiert. Trotz der Bestätigung, dass die DA_g der tierischen HDV-ähnlichen Viren ebenso wie das humane HD_{Ag} im Nukleus exprimiert wurden, konnte die RNA-Replikation des Isolats CHD_HH des humanen HDV-Gt 1 durch tierisches DA_g nicht aktiviert werden (Abbildung 14; B)

A



B

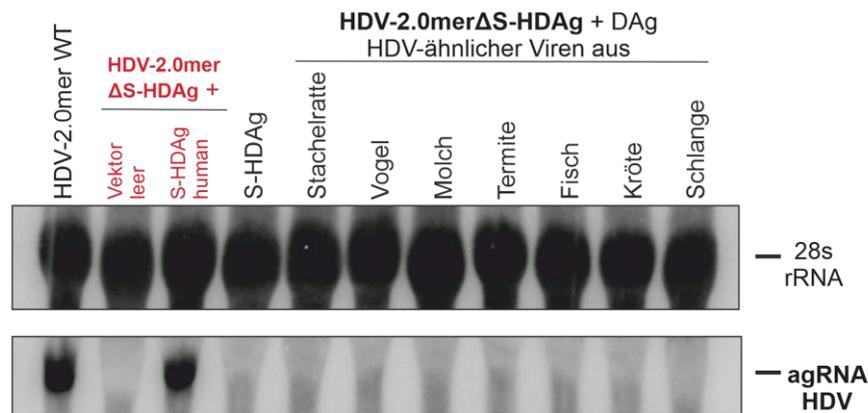


Abbildung 14: Fähigkeit der Wiederherstellung der RNA-Replikation einer replikationsinkompetenten Mutante des HDV-Gt 1 durch Deltaantigene tierischer HDV-ähnlicher Isolate (DA_g). **A)** Es wurde ein replikationsinkompetentes 2.0mer-Expressionskonstrukt des Isolats CHD_HH zusammen mit den Deltaantigenen HDV-ähnlicher Viren in HuH7-Zellen kotransfiziert. Nach 7 Tagen wurde die RNA isoliert und die Replikation mittels Northern Blot untersucht. **B)** Nachweis antigenomischer HDV-RNA 7 Tage nach Transfektion mittels einer [α -³²P] UTP-markierten genomischen RNA. S-HDA_g – Small Deltaantigen; WT – Wildtyp (keine S-HDA_g Start-Codon-Mutation); agRNA – antigenomische RNA; rRNA – ribosomale RNA.

Fazit: Die Replikation des replikationsinkompetenten cDNA Dimer-Klons des HDV-Gt 1-Isolats CHD_HH konnte durch die DA_g von HDV-ähnlichen Viren nicht *trans*-komplementiert werden.

5.2 Charakterisierung eines neuen tierischen Hepatitis-D-Virus-ähnlichen Virus aus der Stachelratte „*Proechimys semispinosus*“

Im Rahmen einer internationalen Studie unter der Leitung von Prof. Dr. Drosten (Direktor des Instituts für Virologie der Charité Berlin), Prof. Dr. Sommer (Direktorin des Instituts für Evolutionsökologie und Naturschutzgenomik der Universität Ulm) und Prof. Dr. Glebe (Leiter des Nationalen Referenzzentrums für Hepatitis-B- und -D-Viren, Institut für Medizinische Virologie, Direktor: Prof. Dr. Ziebuhr), wurde im Jahr 2020 erstmalig ein HDV-ähnliches Virus in Säugetieren außerhalb des Menschen entdeckt. Innerhalb einer Studie entlang des Panamakanals, welche sich mit den Auswirkungen von Habitatsstörungen auf die Infektionsrate des Hepacivirus der Nager beschäftigt [208], wurden 30 Blutproben der Stachelratte „*Proechimys semispinosus*“ positiv auf das neuartige Deltavirus („Rodent Deltavirus“, RDeV) getestet. Das gesamte Virusgenom wurde in Berlin durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Drosten amplifiziert und anschließend sequenziert (Rodent Deltavirus; GenBank accession numbers: MK598003-MK598012). Dabei zeigte eine Sequenzanalyse von den zehn Vollgenomen, dass diese zu 97,5-99,6 % identisch waren. Zudem konnte ein HDAg-ähnlicher OLR sowie grundlegende HDV-Domänen in allen RDeV Sequenzen gefunden werden [91]. Die vergleichende Sequenzanalyse zeigt, dass sich RDeV, bezogen auf das Gesamtgenom, zu humanem HDV in 54,5-52,7 % aller Nukleotide unterscheidet (Abbildung 15; grüne Färbung). Innerhalb des putativen RDeV Deltaantigens (RDeAg) sind zwischen 52,8-56,9 % aller Aminosäuren identisch zu denen des HDAg humaner HDV-Gt (Abbildung 15; blaue Färbung). Kürzlich wurden zwei Genotypen HDV-ähnlicher Viren in Vampirfledermäusen (*Desmodus rotundus*) entdeckt (Gt DrDV-A und Gt DrDV-B), die zusammen mit einem weiteren HDV-ähnlichen Virus, welches in Lebertranskriptomen einer Hundskopffledermaus (*Peropteryx macrotis*; PmacDV) entdeckt wurde, die Gruppe der Deltaviren der Fledermäuse bildet [93]. Interessanterweise sind die Genome von PmacDV und RDeV zu 95,4 % identisch. Auch innerhalb des DAG weisen diese HDV-ähnlichen Viren eine Aminosäureidentität von 97,5 % auf (Abbildung 15).

ERGEBNISSE

		Gt 1																							
Gt 1		pHDV_T	CHD_HH	CHD_WHO	Gt 2	Gt 3	Gt 4	Gt 5	Gt 6	Gt 7	Gt 8	OvirDV	MmonDV	DrDV-A	PmacDV	RDeV	DrDV-B	TgDeV	LsDeV	SnakeDV	AvianDV	NewtDV	FishDV	ToadDV	TermiteDV
		pHDV_T		85,7	87,4	73,9	60,3	73,3	71,4	70,5	71,5	70,0	58,0	51,4	53,3	47,6	47,2	45,9	42,6	42,8	42,5	37,3	32,0	31,4	26,4
	CHD_HH	87,8		87,3	72,5	59,3	71,9	70,0	70,3	69,3	69,7	57,1	50,7	52,6	46,7	46,7	46,8	42,5	42,7	41,4	36,7	32,5	30,6	26,0	30,6
	CHD_WHO	88,8	85,2		72,8	60,6	73,1	70,7	71,7	70,5	69,0	57,7	51,4	53,3	47,0	47,0	46,0	42,6	43,0	43,2	37,2	33,0	30,8	25,9	29,7
	Gt 2	79,2	76,6	77,7		63,0	77,0	76,3	74,2	71,9	73,4	60,1	53,6	55,6	47,6	47,3	46,6	42,9	43,0	41,2	38,0	33,5	30,5	27,0	29,7
	Gt 3	68,4	63,8	66,3	68,9		62,8	59,8	63,1	61,6	61,2	57,0	51,6	52,0	45,8	45,5	45,6	44,6	44,8	40,3	35,9	30,7	28,8	26,1	28,9
	Gt 4	73,5	70,9	74,0	76,0	65,1		73,7	74,1	73,7	74,5	62,1	54,2	56,2	48,5	48,8	47,8	44,1	44,3	42,2	37,1	32,7	31,2	26,2	29,8
	Gt 5	78,2	75,6	76,1	81,6	66,8	74,5		73,7	72,4	73,5	59,7	53,6	55,6	47,7	47,5	47,6	42,5	42,6	42,0	38,4	33,9	30,8	26,8	30,5
	Gt 6	70,9	68,4	71,4	74,5	65,6	70,3	70,9		72,3	72,7	59,4	53,0	56,0	48,0	47,3	47,5	42,5	42,6	41,8	37,6	33,1	30,2	26,0	30,4
	Gt 7	70,9	67,3	71,4	73,0	67,2	69,7	74,5	76,4		75,8	60,4	51,3	54,6	47,4	47,2	46,5	42,4	42,5	42,3	36,5	33,7	30,8	25,1	29,7
	Gt 8	70,6	72,1	68,5	74,5	65,3	71,4	77,6	71,9	74,5		59,4	52,0	54,6	46,5	45,9	46,5	43,1	43,1	41,6	37,1	33,7	30,7	25,0	29,1
	OvirDV	64,3	61,2	63,3	63,3	63,6	66,2	63,3	64,6	63,1	65,8		55,7	63,4	47,2	47,3	47,5	43,2	43,3	41,5	35,3	32,1	31,6	25,2	28,7
	MmonDV	59,2	55,6	55,1	58,2	61,5	58,5	55,1	55,9	56,4	54,6	67,2		58,2	47,1	46,7	45,9	43,2	43,4	43,0	35,1	32,2	30,2	25,0	28,6
	DrDV-A	65,3	61,7	66,3	63,3	60,5	62,6	62,2	61,0	59,0	59,7	74,9	70,3		46,8	47,0	48,0	43,6	43,6	41,6	36,0	32,2	29,4	24,1	27,9
	PmacDV	56,1	53,0	55,1	55,6	53,3	54,3	55,1	55,3	52,3	54,0	57,9	54,8	56,3		95,4	69,7	50,0	49,7	44,7	35,7	31,5	30,8	24,2	29,3
	RDeV	56,6	53,5	55,6	56,1	54,3	54,8	55,6	56,9	52,8	54,5	58,4	54,8	56,3	97,5		70,4	50,2	49,8	44,3	35,9	31,4	30,6	23,7	28,8
	DrDV-B	54,5	53,5	53,0	55,1	56,3	52,3	53,5	54,8	50,3	53,0	57,9	56,3	57,9	78,2	80,2		52,1	52,2	44,1	36,4	31,2	29,5	24,8	29,7
	TgDeV	52,0	52,0	53,5	52,5	55,8	51,8	50,5	52,3	52,8	53,5	58,8	55,8	57,3	61,5	62,5	62,5		98,4	46,0	34,6	31,0	28,6	24,5	26,9
	LsDeV	51,5	51,5	53,0	51,5	55,3	51,3	50,5	52,3	52,8	53,5	58,3	55,8	56,8	61,5	62,5	62,5	99,0		46,0	34,6	30,9	28,6	24,4	27,2
	SnakeDV	48,3	47,8	51,7	48,0	48,5	48,0	45,0	49,5	46,5	47,0	51,5	50,0	51,0	53,2	54,7	53,7	52,9	52,5		33,1	30,1	28,2	22,5	27,5
	AvianDV	40,5	40,0	40,5	37,4	38,1	38,6	36,8	36,5	37,0	36,3	37,6	39,2	38,1	34,6	35,1	37,7	37,3	37,8	35,1		26,8	28,5	23,9	27,5
	NewtDV	21,6	22,4	21,2	21,2	20,4	21,3	21,6	20,8	23,8	24,5	20,4	21,7	20,8	18,6	18,6	18,6	19,8	19,8	19,6	20,1		25,6	24,9	27,7
	FishDV	22,0	20,6	21,5	22,0	20,2	19,2	21,5	19,7	20,2	21,0	22,5	19,8	21,6	20,6	20,6	21,5	20,8	20,4	18,8	16,1	13,9		22,2	24,6
	ToadDV	21,2	20,7	21,6	23,6	21,7	21,7	22,6	22,7	23,2	20,7	22,2	22,8	21,7	20,2	20,2	19,7	23,6	23,6	19,8	17,1	14,3	14,8		20,6
	TermiteDV	21,0	22,0	22,0	21,0	19,3	20,7	21,5	22,6	20,7	21,0	21,1	20,3	22,1	18,6	21,0	19,1	18,5	18,5	19,7	15,1	13,5	16,4	13,2	

Abbildung 15: Prozentuale Nukleotid- und Aminosäureidentitäten zwischen humanen HDV-Gt 1-8 und HDV-ähnlichen Viren. Grün hinterlegt sind die prozentualen Nukleotididentitäten bezogen auf die Gesamtgenome. Blau hinterlegt sind die Aminosäureidentitäten bezogen auf das (kleine) Deltaantigen. HDV-ähnliche Viren aus: Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus* Deltavirus, OvirDV), Waldmurmeltier (*Marmota monax* Deltavirus, MmonDV), Vampirfledermaus (*Desmodus rotundus* Deltavirus, DrDV-A, Genbank accession number: MT649207; DrDV-B, Genbank accession number: MT649206), Stachelratte (*Proechimys semispinosus*, Rodent Deltavirus, RDeV; Genbank accession number: MK598004), kleine Hundskopffledermaus (*Peropteryx macrotis* Deltavirus, PmacDV), Zebrafink (*Taeniopygia guttata* Deltavirus, TgDV), Bronzemännchen (*Lonchura striata* Deltavirus, LsDV, Genbank accession number: LC575944), Schlangen (*Boa constrictor sabogae*; Snake Deltavirus, SnakeDV, Genbank accession number: MH988742), Enten (*Anas gracilis*, *Anas castanea*, *Anas superciliosa*; Avian Deltavirus, AvianDV, Genbank accession number: MH824555), Feuerbauchmolch (*Cynops orientalis*; Newt Deltavirus, NewtDV, Genbank accession number: MN031239), asiatischer Kröte (*Bufo gargarizans*; Toad Deltavirus, ToadDV, Genbank accession number: MK962760), Termiten (*Schedorhinotermes intermedius*; Termiten Deltavirus, TermitenDV, Genbank accession number: MK962759) und Kiemenproben verschiedener Fische (*Macroramphosus scolopax*, *Ophidion* sp., *Eptatretus burgeri*, *Okamejei acutispina*, *Proscyllium habereri*, *Lophius litulon*, *Eleutheronema tetradactylum*, *Zeus faber*, *Antennarius striatus*, *Haliutaea stellata*, *Gonorynchus abbreviatus*; Fish Deltavirus, FishDV, GenBank accession number: MN031240). Deltavirus-Sequenzen von: MmonDV, OvirDV, PmacDV und TgDV sind verfügbar unter: <https://serratus.io/access>. MAFFT-Alignment wurde mit der Software Geneious Prime (Version 2021.1.1) durchgeführt. Gt – Genotyp; HDV – Hepatitis-Delta-Virus; CHD – chronische HDV-Patientenisolat; CHD_WHO – Sequenz des HDV-RNA WHO Standards [200]; CHD_HH – Einzelsequenz einer klinischen Studie [201]; pHDV_T – neu kloniertes HDV Konstrukt der pSVL(D3) Sequenz [56, 206].

Innerhalb humaner HDV bilden die Gt 1, 2 und 4-8 eine gemeinsame Klade, während der Gt 3 am stärksten divergent ist (Abbildung 16). Eine Schwesterklade zu den humanen HDV-Gt bilden die HDV-ähnlichen Viren aus dem Waldmurmeltier (MmonDV), dem Weißwedelhirsch (OvirDV) und der Vampirfledermaus (DrDV-A). Sie

bilden momentan die nächsten Verwandten der humanen HDV-Gt. DrDV-B der Vampirfledermaus und PmacDV der Hundskopffledermaus bilden zusammen mit RDeV der Stachelratte eine phylogenetische Klade und stehen somit mit DrDV-A und MmonDV des Waldmurmeltiers in einer paraphyletischen Beziehung. Die HDV-ähnlichen Viren der Amphibien (ToadDV, NewtDV), der Fische (FishDV) und der Termiten (TermiteDV) bilden die divergenteste Klade der HDV-ähnlichen Viren (Abbildung 16).

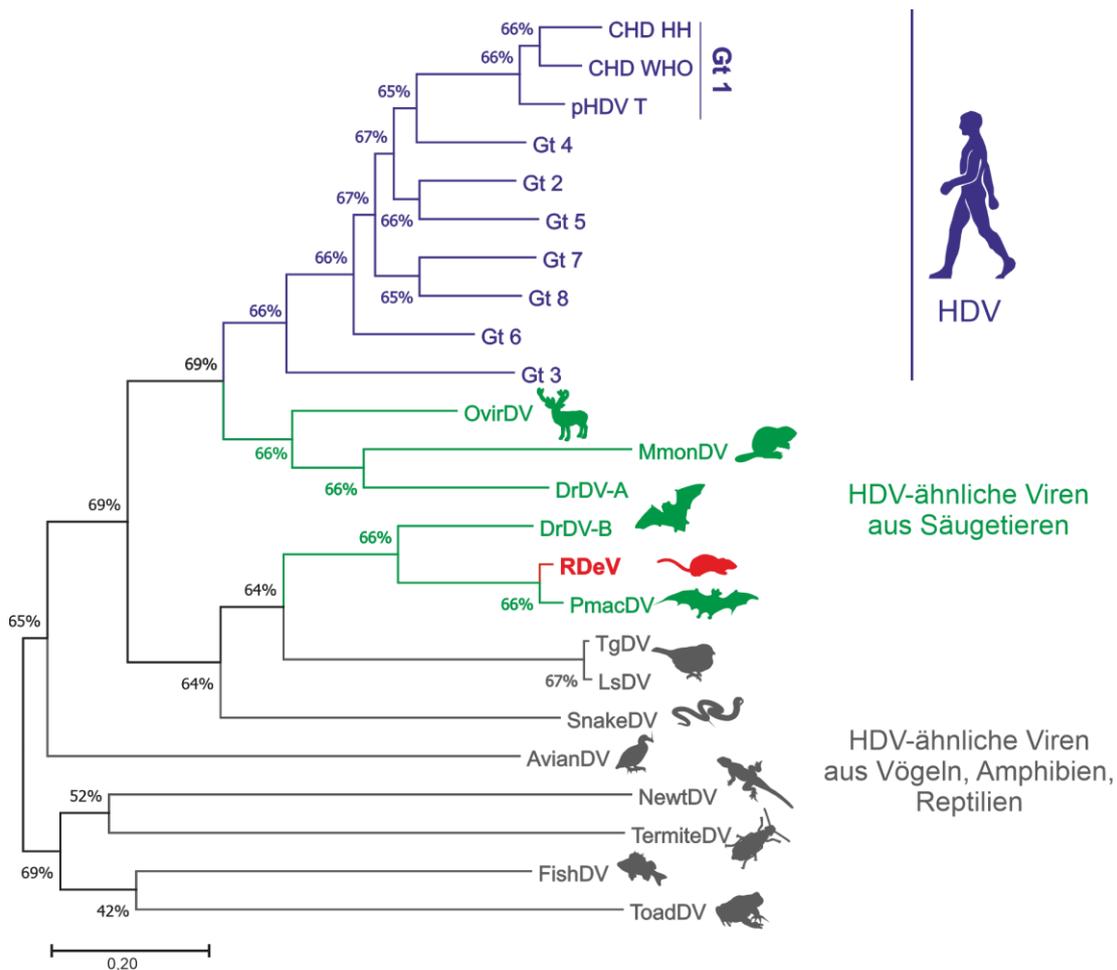


Abbildung 16: Phylogenetischer Stammbaum humaner HDV-Gt und HDV-ähnlicher Viren bezogen auf das gesamte virale RNA-Genom. Die evolutive Beziehung wurde mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Methode und dem Hasegawa-Kishino-Yano-Modell [209] abgeleitet (MEGA X Software). Der Prozentsatz der Bäume, in denen die zugehörigen Taxa zusammen geclustert wurden, wird neben den Zweigen angezeigt (Bootstrap: 1000). Die Astlängen geben die Anzahl der Nucleotidsubstitutionen pro Position („site“) an. HDV-ähnliche Viren aus: Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus* Deltavirus, OvirDV), Waldmurmeltier (*Marmota Monax* Deltavirus, MmonDV), Vampirfledermaus (*Desmodus rotundus* Deltavirus, DrDV-A, Genbank accession number: MT649207; DrDV-B, Genbank accession number: MT649206), Stachelratte (*Proechimys semispinosus*, Rodent Deltavirus, RDeV; Genbank accession number: MK598004), kleine Hundskopffledermaus (*Peropteryx macrotis* Deltavirus, PmacDV), Zebrafink (*Taeniopygia guttata* Deltavirus, TgDV), Bronzemännchen (*Lonchura striata* Deltavirus, LsDV, Genbank accession number: LC575944), Schlangen (*Boa constrictor sabogae*; Snake Deltavirus, SnakeDV, Genbank accession number: MH988742), Enten (*Anas gracilis*, *Anas castanea*, *Anas superciliosa*; Avian Deltavirus, AvianDV, Genbank accession number:

MH824555), Feuerbauchmolch (*Cynops orientalis*; Newt Deltavirus, NewtDV, Genbank accession number: MN031239), asiatischer Kröte (*Bufo gargarizans*; Toad Deltavirus, ToadDV, Genbank accession number: MK962760), Termite (*Schedorhinotermes intermedius*; Termite Deltavirus, TermiteDV, Genbank accession number: MK962759) und Kiemenproben verschiedener Fische (*Macroramphosus scolopax*, *Ophidion* sp., *Eptatretus burgeri*, *Okamejei acutispina*, *Proscyllium habereri*, *Lophius litulon*, *Eleutheronema tetradactylum*, *Zeus faber*, *Antennarius striatus*, *Halieutaea stellata*, *Gonorynchus abbreviatus*; Fish Deltavirus, FishDV, GenBank accession number: MN031240). Deltavirus-Sequenzen von: MmonDV, OvirDV, PmacDV und TgDV sind verfügbar unter: <https://serratus.io/access>. Gt – Genotyp; HDV – Hepatitis-Delta-Virus; CHD – chronische HDV-Patientenisolat; CHD_WHO – Sequenz des HDV-RNA WHO Standards [200]; CHD_HH – Einzelsequenz einer klinischen Studie [201]; pHDV_T – neu kloniertes HDV Konstrukt der pSVL(D3) Sequenz [56, 206]. Analysen wurden in MEGA X durchgeführt [210].

5.2.1 Klonierung und Expression eines RDeV-Expressionsklons *in vitro*

Das humane HDV besitzt zwei virale Proteine (S-HDAg und L-HDAg), welche aus einem einzigen OLR entstehen. Während des Replikationszyklus von HDV (siehe Kapitel 4, Abbildung 2) kommt es zu einer Umwandlung der antigenomischen HDV-RNA durch das zelluläre Protein ADAR1. An der Position des Amber-Codons wird UAG zu UIG deaminiert. Während der weiteren HDV-Replikation wird Inosin als Guanin interpretiert. Die daraus resultierende Synthese der genomischen RNA und der damit einhergehenden mRNA Synthese führt zur Expression des carboxyterminal verlängerten L-HDAg, welches für den nuklearen Export und der damit verbundenen Interaktion mit dem HBsAg essenziell ist (siehe Kapitel 1.1.2). Da auch das hier beschriebene RDeV weitere 19 Aminosäuren hinter dem Stopp-Codon (UAG) des DAG aufweist (Abbildung 17), wurde untersucht, ob das RDeV ähnlich zu HDV ein großes DAG exprimiert.

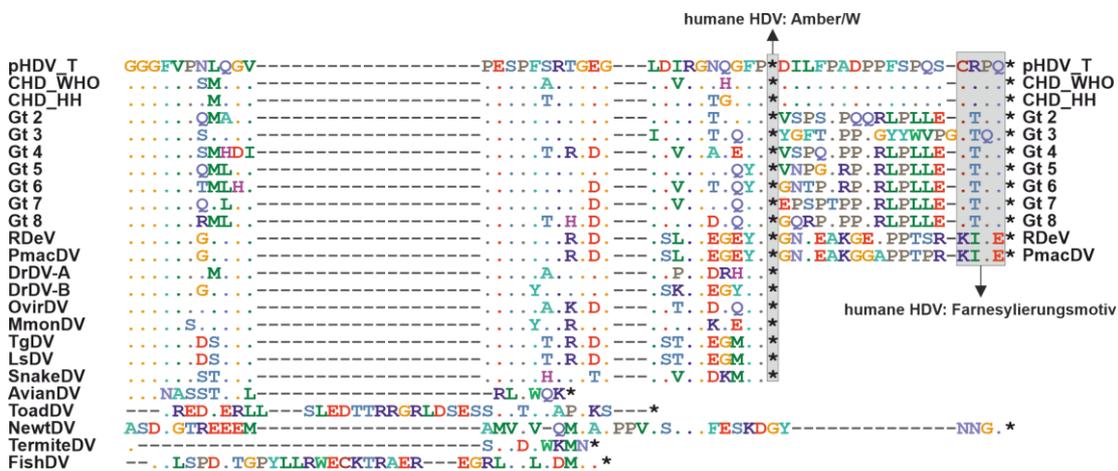


Abbildung 17: Aminosäurealignment des Carboxy-Terminus des Deltaantigens humaner HDV-Gt (HDAg) und HDV-ähnlicher Viren (DAG). Es wurde ein Proteinsequenzalignment (MAFFT) mit Geneious Prime (Version 2021.1.1) durchgeführt. Die Sterne geben das jeweilige Stopp-Codon an (humane HDV-Gt: S-HDAg und L-HDAg). HDV-ähnliche

Viren aus: Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus* Deltavirus, *OvirDV*), Waldmurmeltier (*Marmota monax* Deltavirus, *MmonDV*), Vampirfledermaus (*Desmodus rotundus* Deltavirus, *DrDV-A*, Genbank accession number: MT649207; *DrDV-B*, Genbank accession number: MT649206), Stachelratte (*Proechimys semispinosus*, Rodent Deltavirus, *RDeV*; Genbank accession number: MK598004), kleine Hundskopffledermaus (*Peropteryx macrotis* Deltavirus, *PmacDV*), Zebrafink (*Taeniopygia guttata* Deltavirus, *TgDV*), Bronzemännchen (*Lonchura striata* Deltavirus, *LsDV*, Genbank accession number: LC575944), Schlangen (*Boa constrictor sabogae*; *Snake* Deltavirus, *SnakeDV*, Genbank accession number: MH988742), Enten (*Anas gracilis*, *Anas castanea*, *Anas superciliosa*; *Avian* Deltavirus, *AvianDV*, Genbank accession number: MH824555), Feuerbauchmolch (*Cynops orientalis*; *Newt* Deltavirus, *NewtDV*, Genbank accession number: MN031239), asiatischer Kröte (*Bufo gargarizans*; *Toad* Deltavirus, *ToadDV*, Genbank accession number: MK962760), Termite (*Schedorhinotermes intermedius*; *Termite* Deltavirus, *TermiteDV*, Genbank accession number: MK962759) und Kiemenproben verschiedener Fische (*Macroramphosus scolopax*, *Ophidion* sp., *Eptatretus burgeri*, *Okamejia acutispina*, *Proscyllium habereri*, *Lophius litulon*, *Eleutheronema tetradactylum*, *Zeus faber*, *Antennarius striatus*, *Haliutaea stellata*, *Gonorynchus abbreviatus*; *Fish* Deltavirus, *FishDV*, GenBank accession number: MN031240). Deltavirus-Sequenzen von: *MmonDV*, *OvirDV*, *PmacDV* und *TgDV* sind verfügbar unter: <https://serratus.io/access>. Die Sequenzen der humanen HDV-Genotypen können unter folgender Nummer auf NCBI gefunden werden: Gt 2 – X60193, Gt 3 – AB037947, Gt 4 – AF018077, Gt 5 – LT594482, Gt 6 – JX888102, Gt 7 – LT604972 und Gt 8 – AJ584849. Gt – Genotyp; HDV – Hepatitis-Delta-Virus; CHD – chronische HDV-Patientenisolate; CHD_WHO – Sequenz des HDV-RNA WHO Standards [200]; CHD_HH – Einzelsequenz einer klinischen Studie [201]; pHDV_T – neu kloniertes HDV Konstrukt der pSVL(D3) Sequenz [56, 206].

Hierzu wurde zunächst das RDeV Genom (Isolat 0183; Genbank accession number: MK598004) als 2.Omer cDNA in einen Expressionsvektor kloniert (Abbildung 18; A), HuH7-Zellen transient transfiziert und die Expression des RDeAg mittels Immunfluoreszenz analysiert (Abbildung 18; B). Dabei wurden spezifische Peptidantiseren verwendet, welche in immunisierten Kaninchen generiert wurden und spezifisch gegen Epitope des putativen S-RDeAg oder des putativen L-RDeAg gerichtet sind. Nach konstitutiver Überexpression des klonierten L-RDeAg und S-RDeAg konnte die Expression der RDeAg mittels dieser Peptidantiseren durch Immunfluoreszenzfärbung spezifisch nachgewiesen werden (Abbildung 18; B grün). Die Immunfluoreszenzfärbung durch anti-HDAg IgGs eines HBV/HDV-Koinfizierten Patientenserums zeigte zudem eine Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen das humane HDAg zu RDeAg (Abbildung 18; B rot) wie bereits zuvor in Abbildung 13 gezeigt. Nach Transfektion des 2.Omer RDeV-Expressionskonstrukts konnte das S-RDeAg durch die Peptidantiseren und das kreuzreaktive Humanserum detektiert werden, während eine Expression des L-RDeAg aus dem RDeV-Expressionskonstrukts durch spezifisches anti-L-RDeAg Peptidantiserum nicht bestätigt werden konnte (Abbildung 18; B grün). Diese Ergebnisse wurden durch Western Blot Analysen bestätigt. Hierzu wurden HuH7-Zellen mit 2.Omer-Expressionskonstrukten für das humane HDV und das RDeV transfiziert und das Gesamtprotein mittels TRIzol extrahiert. S-HDAg sowie S-RDeAg konnten bereits zwei Tage nach Transfektion

detektiert werden, wobei die Expression des S-RDeAg bis Tag 10 zunahm (Abbildung 18; C). Die Expression des humanen S-HDAg stieg ebenso wie die Expression des S-RDeAg bis Tag 6 an, nahm jedoch mit Nachweis des L-HDAg wieder leicht ab (Abbildung 18; C). Während L-HDAg ab Tag 6 nach Transfektion konstant exprimiert wurde, konnte kein L-RDeAg mittels Western Blot detektiert werden (Abbildung 18; C). Um dies auch auf HDV-RNA-Genom-Ebene zu bestätigen, wurde die totale RNA der transfizierten Zellen sechs Tage nach Transfektion isoliert, worauf eine cDNA-Synthese folgte, welche als Matrize für eine PCR des Deltaantigens diente. Die PCR-Produkte wurden gereinigt und sequenziert (LGC, Berlin, Deutschland). Während nach der Sequenzierung für das HDV-Genom sowohl Sequenzen mit einem Adenin als auch Sequenzen mit einem Guanin an der Position 587 im HDAg gefunden wurden, konnten für die RDeV-RNA ausschließlich Sequenzen mit einem Adenin an Position 590 im RDeAg nachgewiesen werden, woraus stets ein Stopp-Codon resultiert (Abbildung 18; D).

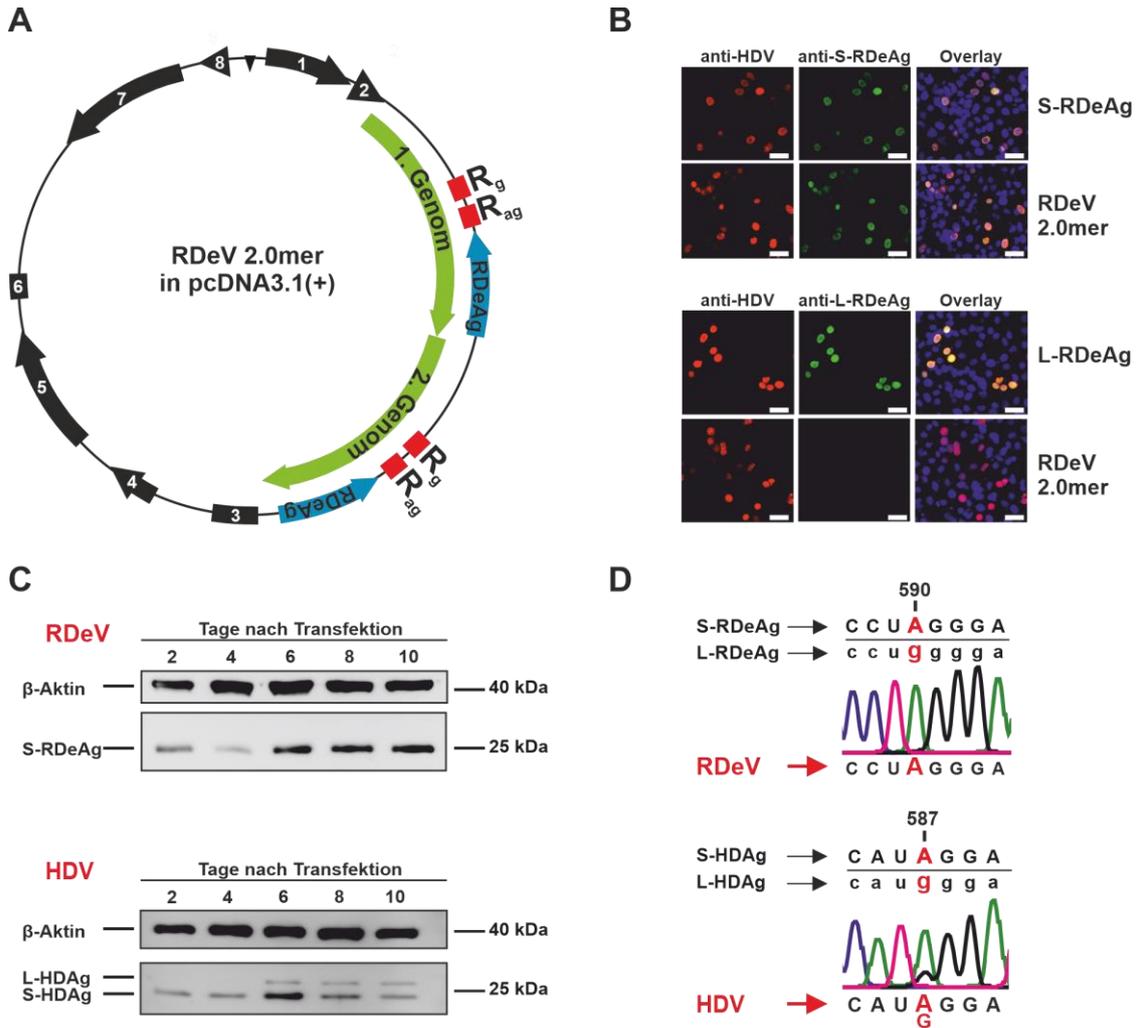


Abbildung 18: Analyse der RNA-Genom-Editierung von HDV und RDeV-Genomen. **A)** Schema des Expressionskonstrukts RDeV_2.0mer. Die cDNA des RDeV wurde in genomischer Orientierung als 2.0mer hinter einen CMV-Promoter in pcDNA3.1(+) kloniert. Dabei liegt die Sequenz der Antigene des RDeV (RDeAg, blau) in antisense Richtung vor. Vor den RDeAg liegen jeweils die beiden Ribozyme (rot): das antigenomische Ribozym (R_{ag}) und das genomische Ribozym (R_g). Weitere Bereiche des Vektors, die für die eukaryotische oder prokaryotische Genexpression von Bedeutung sind, sind mit Zahlen nummeriert: 1 – CMV-Promoter; 2 – T7-Promoter; 3 – bGH-PolyA Signal; 4 – SV40-Promoter; 5 – Neomycin/Kanamycin Resistenzgen (NeoR/KanR); 6 – SV40-PolyA Signal; 7 – Ampicillin-Resistenzgen (ampR); 8 – ampR-Promoter. **B)** Immunfluoreszenz des kleinen Deltaantigens (S-RDeAg) und des hypothetischen großen Deltaantigens (L-RDeAg) des Nager Deltavirus - RDeV. Die Färbung des Deltaantigens erfolgte zum einen mit Anti-HDAg IgGs eines HBV/HDV-koinfizierten Patienten und zum anderen mittels spezifischer Antiseren gegen S-RDeAg und L-RDeAg. Alexa-488- und -594-markierte anti-human und anti-rabbit IgGs wurden als Sekundärantikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Immunfluoreszenz S-/L-RDeAg mit aufgereinigten IgGs spezifischer Antiseren gegen S-RDeAg und L-RDeAg. Scale bar – 30 µm. **C)** Nachweis der Deltaantigene von HDV und RDeV (L-HDAg/S-HDAg, S-RDeAg) mittels eines HDV/HBV-Antiserums sowie Beta-Aktin als Ladekontrolle 2, 4, 6, 8 und 10 Tage nach Transfektion der Überlängen-Expressionskonstrukte. **D)** Sanger-Sequenzierung 6 Tage nach Transfektion der Volllängen-Expressionskonstrukte. HDV – Hepatitis-D-Virus; RDeV – Deltavirus der Stachelratte; S-HDAg – Kleines (Small) Deltaantigen; L-HDAg – Großes (Large) Deltaantigen; RDeAg – Deltaantigen des RDeV. [verändert nach Paraskevopoulou et al., 2020 [91]].

Fazit: Anhand von Western Blot, Immunfluoreszenz und Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass das neu entdeckte Deltavirus der Stachelratte „*Proechimys semispinosus*“ im Gegensatz zu HDV des Menschen nur ein Deltaantigen (RDeAg) in humanen Hepatomzelllinien exprimiert.

5.2.2 Nachweis von RDeV-spezifischen Antikörpern in Serumproben von *Proechimys semispinosus*

Um nachzuweisen, dass die RDeV positiven Stachelratten auch spezifische Antikörper gegen das S-RDeAg besitzen (vergleichbar zur HDV-Infektion des Menschen) wurde das S-RDeAg in HuH7-Zellen konstitutiv überexprimiert und zelluläres Gesamtprotein mittels TRIzol extrahiert. Die Reaktivität der Antiseren wurde mittels Western Blot Analysen nachgewiesen, wonach alle fünf verwendeten Seren der Stachelratten reaktiv gegenüber S-RDeAg waren (Abbildung 19). Das Serum aus einem gegen S-RDeAg immunisierten Kaninchen wurde als Positivkontrolle verwendet (Abbildung 19; anti-S-RDeAg).

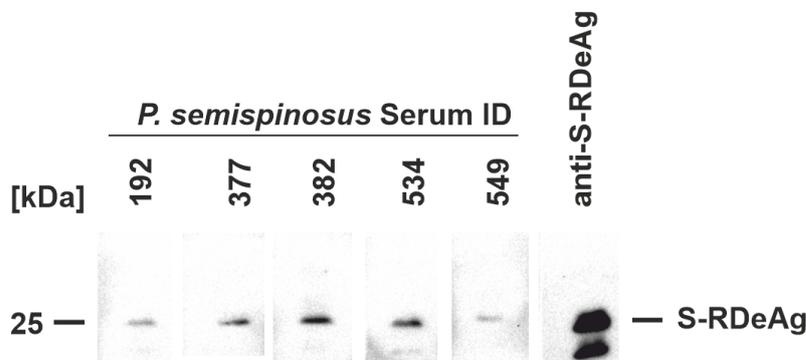


Abbildung 19: Spezifische Reaktivität RDeV-RNA positiv getesteter *Proechimys semispinosus* Seren gegen das kleine Antigen des RDeV (S-RDeAg). S-RDeAg wurde in HuH7-Zellen überexprimiert und totales Protein mittels TRIzol-Extraktion isoliert. Die Seren wurden 1:1000 verdünnt, ein anti-guinea pig horseradish peroxidase (HRP) gekoppelter Antikörper (1:100) diente als Sekundäntikörper. Als Positivkontrolle wurde Serum aus S-RDeAg immunisierten Kaninchen eingesetzt (anti-S-RDeAg). [verändert nach Paraskevopoulou et al., 2020 [91]].

Fazit: Alle untersuchten RDeV-positiven Stachelratten besitzen Antikörper im Serum, die spezifisch gegen RDeAg gerichtet sind.

5.2.3 Replikation des RDeV in humanen Zellen

Um nun zu zeigen, dass das neu entdeckte HDV-ähnliche Virus der Stachelratte „*Proechimys semispinosus*“ (RDeV) replikationskompetent ist, wurde das Auftreten der antigenomischen RNA des RDeV mittels Northern Blot Analyse als Nachweis einer autonomen RDeV-RNA Replikation verwendet. Nach Transfektion des RDeV-Expressionskonstrukts (Abbildung 18; A) sollte die RDeV cDNA des Plasmids in genomische RDeV-RNA umgeschrieben werden, es folgt die Synthese der viralen mRNA des RDeAg und antigenomischer RDeV-RNA. Durch Einsatz von 5'-endmarkierten Oligonukleotiden mit [γ -³²P] ATP, kann die antigenomische RDeV-RNA mittels Northern Blot strangspezifisch nachgewiesen werden. Hierzu wurde die totale RNA 4, 6, 8 und 10 Tage nach Transfektion mittels TRIzol isoliert, auf einem denaturierenden Gel der Größe nach aufgetrennt und auf eine positivgeladene Membran geblottet. Nach einer Stunde Prähybridisierung folgte die Hybridisierung mit radioaktiv-markierten Oligonukleotiden spezifisch für antigenomische (Abbildung 20; A) bzw. genomische (Abbildung 20; B) RDeV-RNA. Als Spezifitätsmerkmal der Sonde wurde zusätzlich zu den zellulären RNA-Proben auch *in vitro* transkribierte antigenomische RNA aufgetrennt. In HuH7-Zellen konnte ein konstantes Signal an antigenomischer und genomischer RDeV-RNA nachgewiesen werden. Da gezeigt wurde, dass HDV in humanen Zellen während der Mitose an die Tochterzellen weitergegeben wird [86] (Abbildung 6), wurde zudem ein Expansionsversuch des RDeV und HDV als weiterer Replikationsnachweis vorgenommen. Vergleichbar zu der Versuchsdurchführung in Kapitel 5.1.2 wurden HuH7-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten als Doppelansatz transfiziert. Ein Ansatz wurde 4 Tage nach Transfektion fixiert, der andere wurde 1:64 gesplittet und bis Tag 10 nach Transfektion in Wachstumsmedium gehalten. Eine Immunfluoreszenzfärbung des RDeAg bzw. des HDAg diente als Marker RDeV- oder HDV-positiver Zellen. Ebenfalls wurden als Kontrolle HuH7-Zellen mit dem RDeV-Dimer-Expressionskonstrukt transfiziert, welches in beiden cDNA-Kopien des Dimers eine Start-Codon Mutation des RDeAg aufweist (RDeV-Mutante). Zehn Tage nachdem die Zellen gesplittet wurden, waren deutliche Zellcluster zu erkennen, die positiv für HDAg bzw. RDeAg waren. Dabei überstieg die Anzahl RDeAg-positiver Zellen die der HDAg-positiver Zellen (Abbildung 20; C).

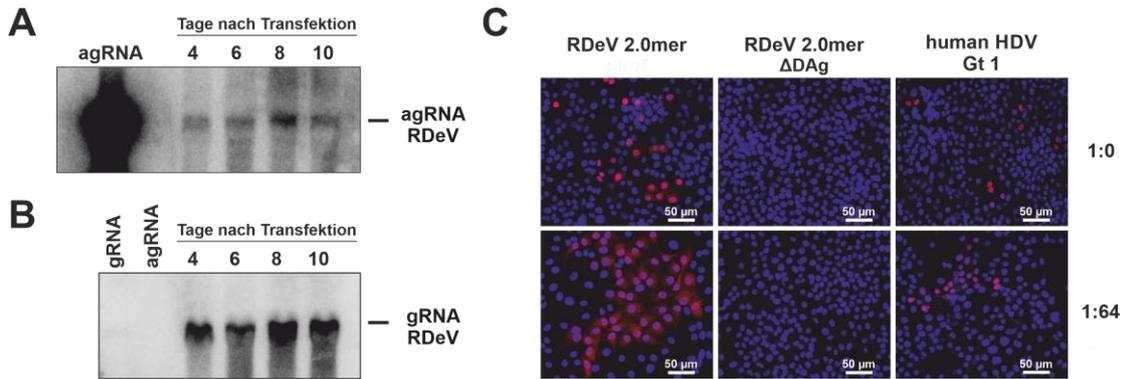


Abbildung 20: Replikation des RDeV in humanen Zellen. A) Nachweis antigenomischer RDeV-RNA 4, 6, 8 und 10 Tage nach Transfektion des RDeV Überlängenexpressionskonstrukts in HuH7-Zellen mit einem [γ - 32 P] ATP-markierten Oligonukleotid in genomischer Orientierung. B) Nachweis genomischer RDeV-RNA 4, 6, 8 und 10 Tage nach Transfektion des RDeV Überlängen Expressionskonstrukts HuH7-Zellen. C) Nachweis des RDeAg / HDAg nach klonaler Expansion des HDV / RDeV Überlängenkonstrukt in HuH7-Zellen nach Splitten der Zellen 1:64 an Tag 4 nach Transfektion (1:0) [91]. agRNA – antigenomische RNA; gRNA – genomische RNA; RDeV – HDV-ähnliches Virus der Stachelratte; Gt – Genotyp; S-HDAg – kleines Deltaantigen. [verändert nach Paraskevopoulou et al., 2020 [91]].

Fazit: Die neu entdeckte HDV-ähnliche RNA-Sequenz aus der Stachelratte „*Proechimys semispinosus*“ besitzt die Fähigkeit eine Replikation in humanen Zellen zu initiieren.

5.3 Kreuzinfektiosität neu entdeckter Orthohepadnaviren

5.3.1 Rezeptorinteraktion einer neuen Neuweltaffen Hepatitis-B-Virus Spezies

Im Rahmen einer internationalen Studie unter der Leitung von Prof. Dr. Drexler (Leiter der Arbeitsgruppe Virusepidemiologie am Institut für Virologie der Charité Berlin, Direktor: Prof. Dr. Drosten) und Prof. Dr. Glebe (Leiter des Nationalen Referenzzentrums für Hepatitis-B- und -D-Viren, Institut für Medizinische Virologie, Direktor: Prof. Dr. Ziebuhr, Institut für Medizinische Virologie, Direktor: Prof. Dr. Ziebuhr) wurde eine neue Hepatitis-B-Virus Spezies in Serum eines weiblichen Kapuzineraffen der Spezies Gelbbrust-Kapuziner (*Sapajus xanthosternos*) entdeckt, welches entsprechend der Taxonomie der *Hepadnaviridae* nach dessen Wirtstier als *Capuchin Monkey Hepatitis-B-Virus* (CMHBV) benannt wurde. Das gesamte Virusgenom wurde in Berlin durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Drexler aus Serum

amplifiziert und anschließend sequenziert (CMHBV; GenBank accession number: KY703886). Dabei zeigte eine Sequenzanalyse des Gesamtgenoms, dass CMHBV zu allen anderen Primatenhepadnaviren, einschließlich WMHBV, einen Sequenzabstand von mindestens 20,4 % aufweist. Das Artabgrenzungskriterium der Gattung der Orthohepadnaviren liegt bei einem Schwellenwert von >20 % Divergenz der Nukleotidsequenz [107]. CMHBV bildet somit eine neue Spezies der Orthohepadnaviren und ist damit die zweite HBV-Spezies, welche aus nicht-menschlichen Primaten (NHP) der Neuen Welt (Amerika) isoliert werden konnte [118, 129].

Innerhalb dieser Arbeit wurden die vorliegenden Oberflächenproteine (HBsAg) des CMHBV verwendet, um die frühen Phasen der Virusbindung an seinen putativen Rezeptor Ntcp/NTCP zu untersuchen.

5.3.1.1 Analyse der PräS1-Domäne und Ntcp/NTCP-Bindung des CMHBV

Einer der ersten Schritte während der Hepatitis-B-Virus-Infektion des Menschen ist die spezifische und hochaffine Bindung der PräS1-Domäne innerhalb des LHBs an den Gallensäuretransporter NTCP von Leberzellen. Dabei wird die Bindung an den NTCP-Rezeptor und den damit verbundenen Eintritt in die Wirtszelle durch zwei funktionelle Abschnitte der PräS1-Domäne vermittelt [39]. Zum einen sind insbesondere die aminoterminalen Aminosäuren 2-48 für die Rezeptorinteraktion und Infektion nötig [166]. Dabei ist eine N-terminale Myristoylierung des Glycins an Position zwei der PräS1-Domäne für eine erfolgreiche Infektion unerlässlich [164, 165]. Die weiteren C-terminalen Bereiche der PräS1-Domäne (AS: 28-39 und 39-48) wurden als akzessorische Domänen definiert, die den Effekt der Virusbindung und Infektion verstärken [166].

Nach einem Sequenzvergleich der PräS1-Domänen aller bekannten Primaten-HBV (Abbildung 21) wurde deutlich, dass der Bereich der essenziellen viralen NTCP-Bindedomäne (AS 9-15: NPLGF(F/L)P) auch bei dem hier beschriebenen CMHBV hoch konserviert ist. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass CMHBV ebenfalls NTCP/Ntcp als primären zellulären Rezeptor für Bindung und Aufnahme verwendet (Abbildung 21).

In einem ersten Schritt wurde zunächst getestet, ob die PräS1-Domäne des LHBs des CMHBVs myristoyliert werden kann, da sich dies bei HBV als eine der Voraussetzungen für eine effiziente Virusbindung an den NTCP herausstellte [164, 165]. Alle in Abbildung 17 gezeigten Sequenzen enthalten ein Glycin an Position 2 der PräS1-Domäne d. h. an der Aminosäure, an der auch eine N-Myristoylierung für das HBV des Menschen nachgewiesen werden konnte. Nun galt es herauszufinden, ob sich bei CMHBV in der nachfolgenden Sequenz auch ein geeignetes N-terminales Myristoylierungssignal befindet. Hierfür wurde eine Software herangezogen, welche die mögliche N-terminale Myristoylierung von Proteinen mittels einer Punktzahl „Score“ postuliert (Abbildung 21; (1)). Ein Wert nahe 1 weist auf eine hohe Wahrscheinlichkeit für N-terminale Myristoylierung hin, während ein Wert bei -1 auf das Fehlen einer N-terminalen Myristoylierung hindeutet. Für die Vorhersage wurden jeweils die Aminosäuren 1-18 verwendet. Innerhalb der humanen HBV-Gt variierte der vorhergesagte Score zwischen -0,88 und 0,99, da die Werte für die HBV-Gt E und G unterhalb von 0 lagen und somit gegen eine Myristoylierung sprechen, wurde eine zweite Software hinzugezogen, welche eine potentielle N-Myristoylierung vorhersagt (Abbildung 21; (2)). Während der Wert für die N-terminale Myristoylierung des HBV-Gt G (-0,21) auch mit der zweiten Software innerhalb einer Grauzone liegt, wurde für den HBV-Gt E (1,25) eine zuverlässige Myristoylierungsstelle an Position 2 vorhersagt. Da CMHBV mit einem Wert von -0,13 ebenfalls unterhalb von 0 liegt wurde auch hier eine zweite Myristoylierungsvorhersage vorgenommen, wobei eine zuverlässige Myristoylierungsstelle an Position 2 (S: 0,24) vorhersagt wurde. Eine N-Myristoylierung der CMHBV PräS1-Domäne des LHBs an Position 2 erzielte daher bei den beiden verwendeten Vorhersageprogrammen keine übereinstimmenden Vorhersagen. Daher kann keine eindeutige Aussage über eine mögliche Myristoylierung der PräS1-Domäne des CMHBV gegeben werden.

ERGEBNISSE

		essenzielle Domäne für NTCP-Bindung										akzessorische Domänen für NTCP-Bindung										S (1)	S (2)	Vorhersage Score [S] für N-terminale Myristoylierung					
Consensus		MCGNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANSNNPDWDFNPNKDNWPEANKVGVGAFGGFTP																											
human HBV	Gt A	MCGWSSKPRKG	T	VP																							0,94	1,56	
	Gt B	MCGWSSKPRKG	T	VP																							0,94	1,56	
	Gt C	MCGWSSKPRQG	T	VP																							0,97	1,16	
	Gt D																										0,99	2,63	
	Gt E	MG-LSWTVPLEW	K	H																								-0,33	1,25
	Gt F	MGAPLSTTRRG		VP																								0,99	-0,18
	Gt G	MG-LSWTVPLEW	K																									-0,88	-0,21
	Gt H	MGAPLSTARRG		VP																								0,99	0,30
non-human primate HBV	ChHBV																											0,99	2,81
	GoHBV																											0,99	2,81
	OuHBV																											0,99	1,33
	GiHBV																											0,98	-0,10
	WMHBV																											-0,21	-0,15
	CMHBV																											-0,13	0,24

Abbildung 21: Sequenzvergleich des N-terminalen Bereichs der PräS1-Domänen des HBsAg humaner sowie nicht-humaner Primaten HBVs. Grün hinterlegte Aminosäuren deuten auf (mögliche) Myristoylierungsstellen hin. Grau hinterlegte Aminosäuren heben mit NTCP/Ntcp interagierende Domänen der humanen HBV-Gt hervor: Essenzielle Domäne (AS: 9 - 15) und Akzessorische Domäne 1 (AS: 28 - 39) und 2 (AS: 39 - 48). **Rechts:** Vorhersage Score für N-terminale Myristoylierung. Je höher ein Wert über 0 liegt, desto höher ist das Konfidenzniveau für eine Myristoylierung. Score [S] < 0,0 keine Myristoylierung, > 0,0 Myristoylierung. Für die Vorhersage der N-Myristoylierung wurden jeweils die ersten 18 Aminosäuren verwendet. (1): <https://web.expasy.org/myristoylator/myristoylator-doc.html>. (2): <https://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredictor.htm>. Gt – Genotyp; ChHBV – Chimpanzee Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: AB032433); GoHBV – Gorilla Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: AJ131567); OuHBV – Orang-Utan Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number EU155824); GiHBV – Gibbon Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: HQ603061); WMHBV – Woolly Monkey Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: AY226578); CMHBV – Capuchin Monkey Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: NC043528).

Da die essenzielle NTCP-bindende Domäne im PräS1 zwischen CMHBV und dem HBV des Menschen hoch konserviert ist, wurde im Folgenden untersucht, ob die Oberflächenproteine des CMHBV an NTCP/Ntcp verschiedener Primaten binden können. Als Arbeitshypothese wurde vermutet, dass das CMHBV nicht nur an den Ntcp der eigenen Gattung (*Sapajus*) binden kann, und diesen Rezeptor für den viralen Eintritt in die Zelle benutzt, sondern dass dies auch für die Ntcp anderer Primaten gilt, inklusive dem NTCP des Menschen. Dies würde bedeuten, dass CMHBV über ein zoonotisches Potential, für eine mögliche Übertragung des Virus auf den Menschen, verfügt.

Zur Überprüfung der Hypothese wurde zunächst das Bindungsverhalten der isolierten PräS1-Domäne an NTCP-Orthologe unterschiedlicher Spezies analysiert. Hierzu wurden synthetische N-terminal myristoylierte PräS1-Peptide (AS: 2-48; Myr-PräS1-Peptide) verwendet, die C-terminal mit einem Alexa633 Fluorophor konjugiert sind und deren Bindung an NTCP-exprimierende Zellen *in vitro* mittels Fluoreszenzmikroskopie direkt detektiert werden können. Vorab wurden HepG2-Zellen, die mit Expressionsvektoren verschiedener Primaten NTCP/Ntcp transient transfiziert wurden, auf die Expression von funktionalen NTCP/Ntcp überprüft. Das

NTCP-Homolog des Kapuzineräffchen *Sapajus xanthosternos* war zur Zeit dieser Studie unbekannt und Leber-Gewebeproben zur Isolierung der Ntcp mRNA für die nachfolgende Klonierung und Charakterisierung nicht verfügbar. Da auch Tiere der nahe verwandten Spezies *Sapajus apella* positiv auf CMHBV-Antikörper getestet wurden, wurde innerhalb dieser Studie der Ntcp des *Sapajus apella* charakterisiert [129]. Die korrekte Zelloberflächenexpression und Transportfunktion der jeweiligen NTCP/Ntcp konnte durch die Aufnahme des NTCP/Ntcp Fluoreszenz-markierten Taurocholats (NBD-TC) Substrates bestätigt werden (Abbildung 22).

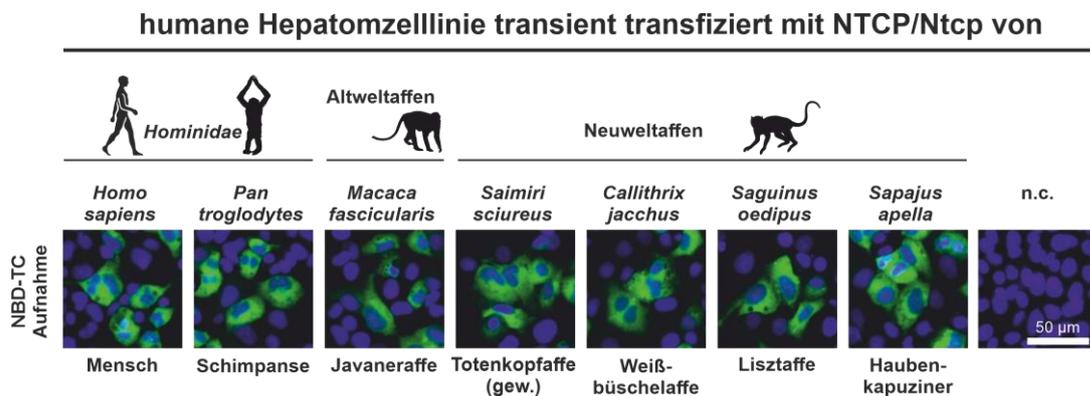


Abbildung 22: Transportfunktion unterschiedlicher primaten NTCP/Ntcp in humanen Hepatomzellen.

HepG2-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden der genannten Primaten NTCP/Ntcp transfiziert. Nach 48 h wurde die NBD-Taurocholats (NBD-TC)-Aufnahme durch 15-minütige Inkubation mit 5 µM des Fluorophor-markierten NTCP/Ntcp Substrat (grün) und mehrmaligem Waschen am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Zellkerne wurden mit Hoechst detektiert. Gew.–Gewöhnlicher; n.c. – untransfizierte Zellen.

Die Bindung der PräS1-Domäne des LHBs von CMHBV und HBV an NTCP/Ntcp und somit die essenzielle hochaffine Bindung an den viralen Rezeptor wurde mittels synthetischen Myr-PräS1-Peptiden (AS: 2-48) untersucht. Die in Abbildung 23 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass CMHBV und HBV Myr-PräS1-Peptide an den humanen NTCP sowie an Schimpansen (*Pan troglodytes*), Totenkopffaffen (*Saimiri sciureus*), Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) und Haubenkapuziner (*Sapajus apella*) Ntcp binden. Im Gegensatz hierzu binden weder CMHBV noch HBV Myr-PräS1-Peptide an den Altweltaffen Ntcp des Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) und den Neuweltaffen Ntcp des Lisztaffen (*Saguinus oedipus*) (Abbildung 23).

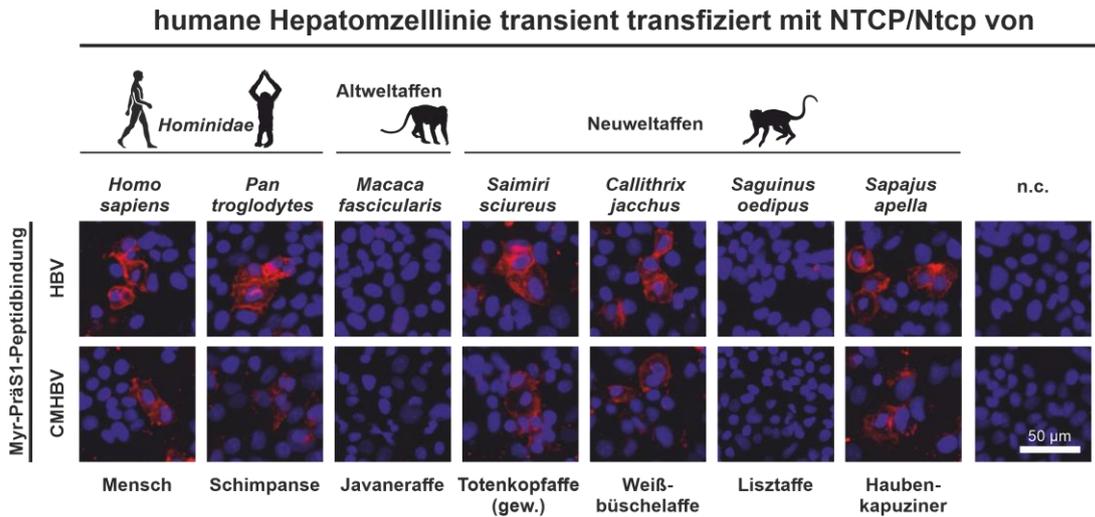


Abbildung 23: Bindung von CMHBV und HBV Myr-PräS1-Peptiden an NTCP/Ntcp. HepG2-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für verschiedene NTCP/Ntcp transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit 100 nM der jeweiligen Myr-PräS1-Peptide inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Bindung der Peptide, welche C-terminal mit einem Alexa633 Fluorophor markiert sind, mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Zellkerne wurden mit Hoechst detektiert. Gew. – Gewöhnlicher; n.c. – untransfizierte Zellen.

Fazit: Myr-PräS1-Peptide der Oberflächenproteine von CMHBV und HBV binden jeweils an ihre eigenen spezies-spezifischen NTCP, können aber auch an den NTCP der jeweils anderen Spezies binden. Die Myr-PräS1-Peptide beider Viren binden zudem selektiv an die gleichen NTCP/Ntcp unterschiedlicher Primaten. Eine spezifische Myr-PräS1-Peptidbindung des CMHBV sowie des HBV an den Ntcp des Altwelt-Javaneraffens und den Ntcp des Lisztaffen der neuen Welt konnte nicht detektiert werden.

5.3.1.2 Untersuchung des Infektionsverhaltens von CMHBV und HBV mit Hilfe von pseudotypisiertem HDV

Da in den oben dargestellten Versuchen gezeigt werden konnte, dass die PräS1-Domäne des CMHBVs an den humanen NTCP sowie an weitere Ntcp verschiedener Affen binden kann, sollte im Folgenden das Infektionspotential des CMHBVs, insbesondere die Interaktion der Oberflächen mit hNTCP untersucht werden. Hierzu wurden aus Gründen der biologischen Sicherheit pseudotypisierte HDV (psHDV) als etabliertes Surrogatmodell für die Infektion von Hepadnaviren gewählt [211]. Zudem hängt eine erfolgreiche Infektion neben der Virus-Rezeptor-Interaktion auch von intrazellulären Prozessen, wie Freisetzung der viralen Nukleinsäure, Kerneintritt und

cccDNA-Bildung ab. Diese Unsicherheiten können mit einem Ersatzmodell umgangen werden [212]. Vorab wurde analysiert, ob die Oberflächenproteine von CMHBV (vergleichbar zu HBV) in der Lage sind, HDV-Partikel zu umhüllen. Dazu wurde zunächst der bekannte Sequenzbereich des SHBs untersucht, an dessen C-terminalem Ende eine Tryptophan-reiche Domäne (AS 196-201: WMM(I/W)YW) für die Umhüllung des HDV mit HBsAg des humanem HBV entscheidend ist (Abbildung 24; A) [79]. Dabei interagiert diese im ER mit dem C-Terminus des L-HDAg des HDV, wodurch es zur Sekretion umhüllter HDV-Partikel kommt. Ebenso wie alle HBV-Gt scheint auch HBsAg des CMHBV eine Tryptophan-reiche Domäne im SHBs zu besitzen. Mit einem Phenylalanin an Position 200 (Y200F) ähnelt sie der des WMHBV und besitzt gleichzeitig die Aminosäure Isoleucin an Position 198, welche auch innerhalb der Tryptophan-reichen Domäne des GiHBV und der humanen HBV-Gt F und H vorkommt (Abbildung 24; A). Um die Verpackung nun *in vitro* zu untersuchen, wurden HuH7-Zellen mit Expressionsplasmiden für die Oberflächenproteine des CMHBV oder HBV zusammen mit Expressionsplasmiden für das deltavirale Genom kotransfiziert. Für die Vergleichbarkeit der Transfektionseffizienz wurde zudem ein Plasmid kotransfiziert, welches für eine alkalische Phosphatase (*Secreted Alkaline Phosphatase*, SEAP) kodiert. Die sekretierten umhüllten HDV-Partikel wurden im Überstand gesammelt und die HDV Genomäquivalente pro Milliliter (GE/ml) mittels einer qRT-PCR bestimmt. Die Werte wurden anschließend auf die SEAP-Sekretion normalisiert. Es wurden sowohl pseudotypisierte HDV-Partikel mit HBV-Oberflächenproteinen sowie mit CMHBV-Oberflächenproteinen im Überstand der transfizierten HuH7-Zellen gemessen, was auf eine effiziente Umhüllung und Sekretion der Viruspartikel hindeutet. Dabei wurden etwa 2×10^{10} HDV-Genomäquivalente mit HBV-Oberflächenprotein pro ml gemessen, dies entspricht etwa 2,8-mal der Konzentration an CMHBV pseudotypisierter HDV-Partikel (7×10^9 GE/ml) (Abbildung 24; B).

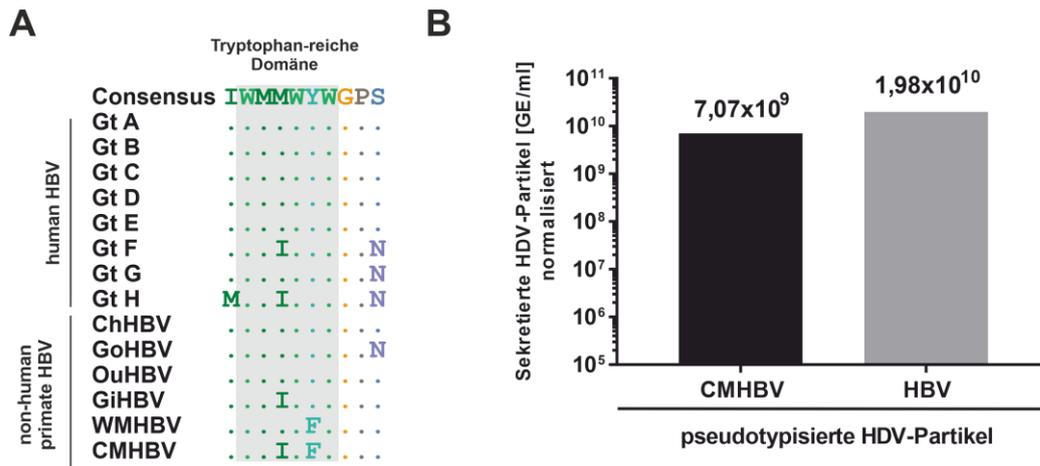


Abbildung 24: Vergleich der für die Sekretion von HDV essenziellen HDV-Interaktions-Domäne im SHBs unterschiedlicher Hepadnaviren und Sekretion pseudotypisierter HDVs.

A) Sequenzvergleich des SHBs (Aminosäuren: 195-204) humaner HBV-Gt sowie nicht-humaner Primaten HBVs. Grau hinterlegt ist die Tryptophan-reiche Domäne, welche für die Interaktion mit dem L-HDAg des HDV und der damit verbundenen Verpackung und Sekretion infektiöser HDV-Partikel essenziell ist. **B)** Pseudotypisierte HDV-Partikel mit Oberflächenproteinen von CMHBV und HBV-Gt D3. HuH7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für das deltavirale Genom sowie mit Expressionsplasmiden für HBV und CMHBV-Oberflächenproteinen kotransfiziert. Als Transfektionskontrolle wurde zudem das Plasmid pSEAP (1:10) kotransfiziert, das zur konstitutiven Sekretion einer enzymatisch aktiven Phosphatase führt. Die in den Überstand sekretierten HDV-Partikel wurden ab Tag 3 bis Tag 11 gesammelt, die RNA extrahiert und die Genomäquivalente pro ml Zellkulturüberstand mittels qRT-PCR ermittelt. Die Werte wurden anschließend auf die SEAP-Sekretion normalisiert. Gt – Genotyp; ChHBV – Chimpanzee Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: AB032433); GoHBV – Gorilla Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: AJ131567); OuHBV – Orang-Utan Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number EU155824); GiHBV – Gibbon Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: HQ603061); WMHBV – Woolly Monkey Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: AY226578); CMHBV – Capuchin Monkey Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: NC043528).

Fazit: Es konnten pseudotypisierte HDV-Partikel mit Oberflächenproteinen des HBV und CMHBV im Überstand von transfizierten HuH7-Zellen in vergleichbaren Konzentrationen gemessen werden.

Um nun zu untersuchen, ob die sekretierten HDV-Partikel mit CMHBV und HBV-Oberflächenproteinen in der Lage sind, mittels Bindung an den NTCP/Ntcp, Zellen *in vitro* zu infizieren, wurden transient mit den jeweiligen NTCP/Ntcp transfizierte HepG2-Zellen mit je 1×10^8 HDV-Genomen der jeweiligen psHDV infiziert. Als Marker einer erfolgreichen psHDV-Infektion wurde 11 Tage nach Inkubation mit den psHDVs das (im Fall einer Infektion) neusynthetisierte Deltaantigen in den Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Um die Spezifität der psHDV-Infektion über die jeweiligen transfizierten NTCP/Ntcp zu zeigen, wurden in einem Kontrollansatz vor und

während der Inkubation der psHDVs, Myr-PräS1-Peptide hinzugegeben. Diese Peptide haben nachweislich einen stark interferierenden Effekt auf eine HBV/psHDV-Infektion, indem sie die PräS1-NTCP/Ntcp-Interaktion des Virus effizient blockieren [166]. Die in Abbildung 25 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass psHDV-Partikel pseudotypisiert mit CMHBV-Oberflächenproteinen (psHDV/CMHBV) spezifisch über den humanen NTCP sowie über die Ntcp des Schimpansen (*Pan troglodytes*), Totenkopffaffen (*Saimiri sciureus*) und des Haubenkapuziner (*Sapajus apella*) infizieren kann. Im Gegensatz hierzu konnten psHDV/CMHBV jedoch nicht die Ntcp des Altweltaffen Javaneraffe (*Macaca fascicularis*) und die Neuweltaffen Ntcp des Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) und des Lisztaffen (*Saguinus oedipus*) für eine spezifische Infektion benutzen (Abbildung 25). Die gleichen Ergebnisse zeigten sich bei Infektionen mit HDV-Partikel pseudotypisiert mit HBV-Oberflächenproteinen (psHDV/HBV). Dass es sich bei den gezeigten Infektionsereignissen in der IF um spezifisch über NTCP/Ntcp-vermittelte Infektionen handelt, konnte durch die Verwendung der jeweiligen Myr-PräS1-Peptide sichergestellt werden. In diesen Fällen konnte die psHDV-Infektion durch (Prä-) Inkubation der Peptide vollständig inhibiert werden (Abbildung 25).

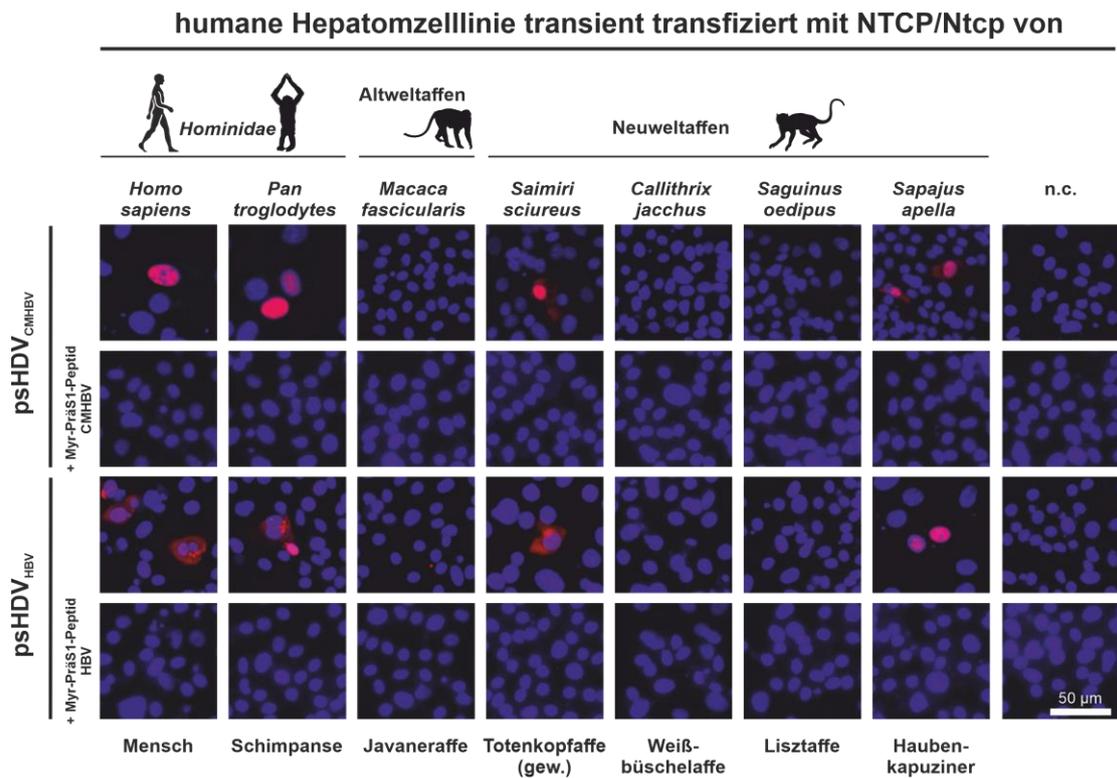


Abbildung 25: Spezies-spezifische Infektion von HDV-Partikeln pseudotypisiert mit CMHBV- oder HBV-Oberflächenproteinen in Abhängigkeit von der Anwesenheit spezies-spezifischer NTCP/Ntcp. HepG2-Zellen wurden in 48-Wellplatten mit verschiedenen NTCP/Ntcp Expressionsplasmiden transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit 1×10^8 Genomäquivalenten psHDV_{CMHBV} bzw. psHDV_{HBV} für ca. 20 Stunden inkubiert. Als Kontrolle, dass die Infektion über den jeweiligen NTCP/Ntcp vermittelt wird, wurden parallel Ansätze mit den entsprechenden inhibitorischen Myr-PräS1-Peptiden für eine Stunde präinkubiert. Nach 11 Tagen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und das Deltaantigen (HDAg) als Marker einer Infektion mittels anti-HDAg IgGs eines humanen Patientenserums und eines Alexa568 markierten anti-human IgG-Antikörpers detektiert (rot). Die Zellkerne wurden parallel mit DAPI (blau) gefärbt. Gew. – Gewöhnlicher Totenkopffaffe; n.c. – uninfizierte Zellen; psHDV – pseudotypisierte HDV-Partikel.

Fazit: Die über humanes NTCP vermittelte Infektion des psHDV/CMHBV gibt einen Hinweis darauf, dass CMHBV ein zoonotisches Potenzial besitzt und humane Hepatozyten infizieren könnte. Infektionsversuche mit psHDV_{HBV}- und psHDV_{CMHBV}-Partikeln zeigten, dass CMHBV vergleichbar zu HBV verschiedenste NTCP/Ntcp für eine Spezies-übergreifende Infektion *in vitro* verwenden kann.

5.3.2 Rezeptorinteraktion neuartiger Hepatitis-B-Viren aus Spitzmäusen

Im Rahmen einer internationalen Studie unter der Leitung von Prof. Dr. Drexler (Leiter der Arbeitsgruppe Virusepidemiologie am Institut für Virologie der Charité Berlin, Direktor: Prof. Dr. Drosten) und Prof. Dr. Glebe (Leiter des Nationalen Referenzzentrums für Hepatitis-B- und -D-Viren, Institut für Medizinische Virologie, Direktor: Prof. Dr. Ziebuhr) wurden neuartige Hepatitis-B-Viren in Leberproben verschiedener Spitzmäuse der Gattungen *Sorex* und *Crocidura* entdeckt, welche entsprechend der Taxonomie der *Hepadnaviridae* nach deren Wirtstieren als *Crowned Shrew* Hepatitis-B-Virus (CSHBV) und *Musk Shrew* Hepatitis-B-Virus der Elfenbeinküste (nach franz: Côte D'Ivoire) (MSHBV_{CIV}) benannt wurden. Dabei konnten insgesamt 10 Gesamtvirusgenome an der Charité in Berlin durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Drexler amplifiziert und anschließend sequenziert werden, wobei für das CSHBV zwei Genotypen (Gt A und Gt B) identifiziert wurden (GenBank accession numbers: MK345460-MK345467, MK345470, MK345474, und MK345475). Eine Sequenzanalyse der Gesamtgenome zeigte dabei, dass die neuen Hepatitis-B-Viren der Spitzmäuse einen Sequenzabstand zu anderen Orthohepadnaviren, einschließlich CMHBV von mindestens 39 % aufwiesen. Wie bereits im Abschnitt zuvor beschrieben, liegt das Artabgrenzungskriterium der Gattung der Orthohepadnaviren bei einem Schwellenwert von >20 % Divergenz der Nukleotidsequenz des Genoms [107]. MSHBV_{CIV} und CSHBV bilden somit zwei neue Spezies der Orthohepadnaviren [130].

Innerhalb dieser Arbeit wurden die vorliegenden Oberflächenproteine (HBsAg) des CSHBV der Gt A und B sowie des MSHBV verwendet, um eine mögliche Beteiligung des Ntcp an der viralen Bindung und Infektion dieser Viren zu untersuchen.

5.3.2.1 Analyse der PräS1-Domäne und NTCP/Ntcp-Bindung des LHBs von HBV, CSHBV und MSHBV

Die hochaffine Bindung der PräS1-Domäne an das hNTCP von Hepatozyten ist einer der entscheidenden Schritte bei der Infektion des Hepatitis-B-Virus des Menschen. Hierbei spielen insbesondere die N-terminale Myristoylierung an Position 2 sowie die essenzielle (AS: 9-15) und die akzessorischen Domänen I (AS: 28-39) und II (AS: 39-48) der PräS1-Domäne eine entscheidende Rolle. Wie bereits in Kapitel 5.3.1.1 ausgeführt,

sind diese Domänen innerhalb der humanen HBV-Gt stark konserviert. Verglichen mit den humanen HBV-Gt, sind die PräS1-Domänen von MSHBV_{CIV} und CSHBV stark heterogen, was mit dem Fehlen einer konservierten essenziellen und der akzessorischen Domäne(n) einhergeht (Abbildung 26). Die beiden Gt des CSHBV unterscheiden sich innerhalb der Aminosäuren 2-48 nur in einer Aminosäure (Abbildung 26; Pfeil), weisen aber eine starke Heterogenität gegenüber MSHBV auf (Abbildung 26).

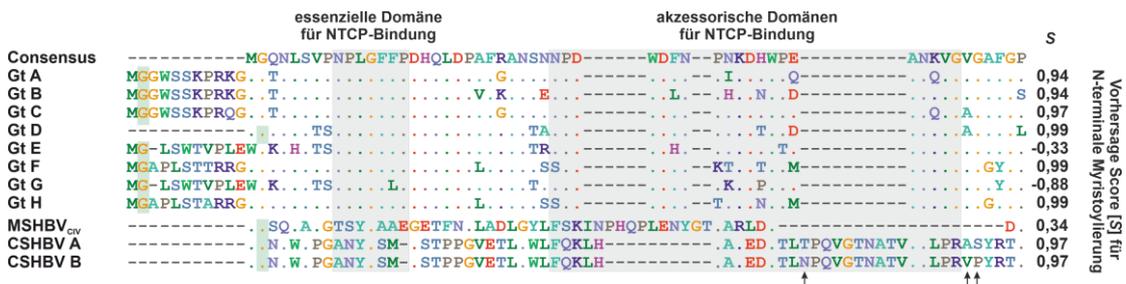


Abbildung 26: Sequenzvergleich des N-terminalen Bereichs der PräS1-Domänen des HBsAg humaner HBVs sowie nicht humaner HBV aus Spitzmäusen (MSHBV und CSHBV). Grün hinterlegte Aminosäuren deuten auf (mögliche) Myristoylierungsstellen hin. Grau hinterlegte Aminosäuren heben mit NTCP/Ntcp interagierende Domänen der humanen HBV-Gt hervor: Essenzielle Domäne (AS: 9-15) und Akzessorische Domäne 1 (AS: 28-39) und 2 (AS: 39-48). Rechts: Vorhersage Score für N-terminale Myristoylierung. Je höher ein Wert über 0 liegt, desto höher ist das Konfidenzniveau für eine Myristoylierung. Score [S] < 0,0 keine Myristoylierung, > 0,0 Myristoylierung. Für die Vorhersage der N-Myristoylierung wurden jeweils die ersten 18 Aminosäuren verwendet (<https://web.expasy.org/myristoylator/myristoylator-doc.html>). Gt – Genotyp; MSHBV_{CIV} – Musk Shrew Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: MK345462); CSHBV – Crowned Shrew Hepatitis-B-Virus Gt A (Genbank accession number: MK345465) und Gt B (Genbank accession number: MK345467). Pfeile: Unterschiede in Aminosäuresequenz zwischen CSHBV-Gt A und CSHBV-Gt B.

Da sich die NTCP-interagierenden Bereiche innerhalb der PräS1-Domäne der CSHBV und MSHBV_{CIV} stark von denen der humanen HBV-Gt unterscheiden, wurde die Hypothese aufgestellt, dass NTCP-Orthologe eine Infektion der Spitzmaus-HBVs nicht vermitteln und Spitzmaus-HBVs daher über kein zoonotisches Potential verfügen. Aus diesem Grund wurde experimentell untersucht, ob die Oberflächenproteine der Spitzmaus Hepatitis-B-Viren den humanen NTCP und/oder Ntcp der Spitzmaus (Sorex Ntcp) über alternative Motive/Domänen binden und anschließend ihre Zielzellen infizieren könnten. Durch Verwendung einer Vorhersagesoftware, welche N-terminale Myristoylierung *in silico* postuliert, wurde angenommen, dass die PräS1-Domäne des MSHBV_{CIV} und des CSHBV ebenso wie HBV N-terminal myristoyliert ist (Abbildung 26). Dabei lagen beide berechneten Werte oberhalb von 0 (CSHBV A und B: 0,97; MSHBV 0,34) was auf eine N-terminale Myristoylierung hindeutet (Abbildung 26). Für die

folgenden Untersuchungen wurden daher synthetische myristoylierte Peptide (AS: 2-48) verwendet. Nach Überexpression der NTCP-Orthologe in HuH7- und HepG2-Zellen konnte die korrekte Zelloberflächenexpression und Transportfunktion der jeweiligen NTCP/Ntcp durch die Aufnahme des NTCP/Ntcp Fluoreszenz-markierten Taurocholat (NBD-TC) Substrates bestätigt werden (Abbildung 27; grün). Für die Myr-PräS1-Peptidbindungen wurden HuH7- und HepG2-Zellen mit Expressionsplasmiden des jeweiligen hNTCP/Sorex Ntcp transfiziert und nach zwei Tagen ein Peptidbindungsassay durchgeführt. Interessanterweise zeigen die aufgeführten Ergebnisse, dass das humane HBV Myr-PräS1-Peptid sowohl an den humanen Rezeptor als auch an Sorex Ntcp binden konnte, währenddessen die Spitzmaus HBV Myr-PräS1-Peptide des MSHBV_{Sciv} und eines Vertreters des CSHBVs (Gt A) weder an den Ntcp der Spitzmaus (Sorex Ntcp) noch an den humanen NTCP (hNTCP) binden (Abbildung 27; rot).

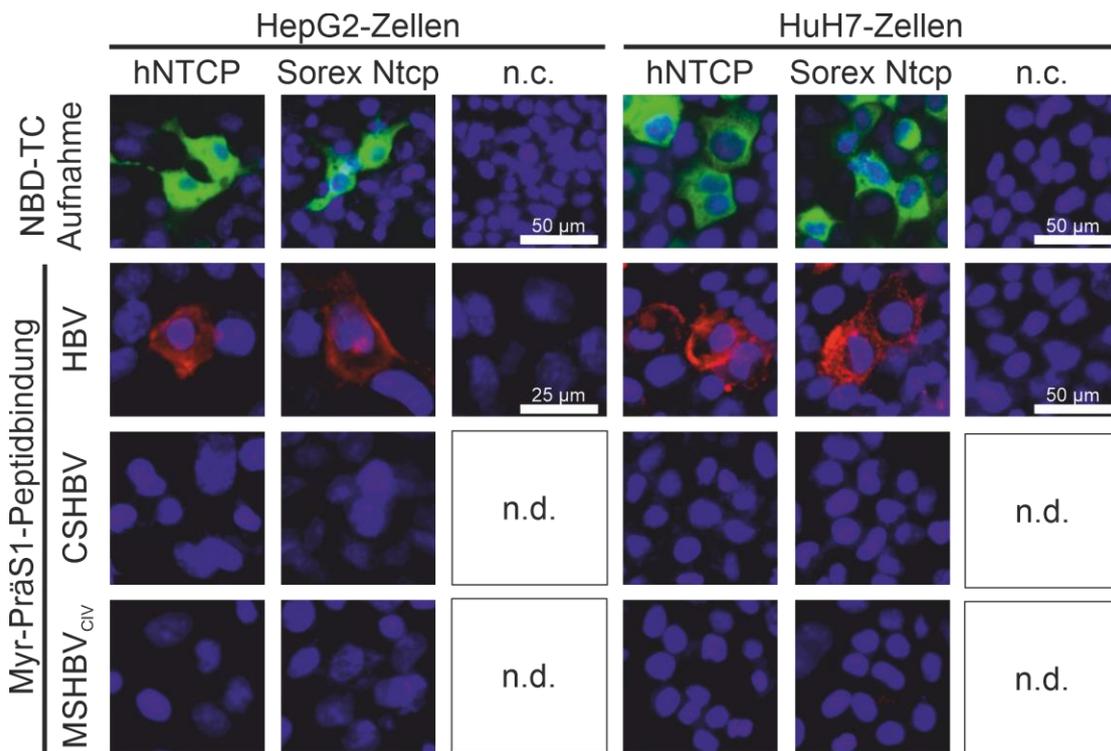


Abbildung 27: NBD-Taurocholat (NBD-TC) Transport und Myr-PräS1-Peptidbindung von hNTCP und Sorex Ntcp transfizierten HepG2- und HuH7-Zellen. Humane Zellkulturzelllinien wurden mit Expressionsplasmiden für hNTCP und Sorex Ntcp transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen entweder mit 5 μ M des Fluorophor-markierten NTCP/Ntcp Substrats (grün) oder jeweils mit 100 nM eines Alexa633 Fluorophor markierten Myr-PräS1-Peptids (rot) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde die NBD-TC Aufnahme (grün) sowie die Peptidbindung (rot) an einem Immunfluoreszenzmikroskop untersucht. Zellkerne wurden mit Hoechst detektiert. MSHBV_{Sciv} – Musk Shrew Hepatitis-B-Virus; CSHBV – Crowned Shrew Hepatitis-B-Virus Gt A; n.d. – nicht durchgeführt; n.c – untransfizierte Zellen.

Fazit: Die Myr-PräS1-Peptide (AS: 2-48) der Spitzmaus-Hepadnaviren MSHBV_{CIV} und CSHBV binden weder an den Ntcp der Spitzmaus, noch an den humanen NTCP. Umgekehrt kann das Myr-PräS1-Peptid des HBV an den Ntcp der Spitzmaus (Sorex) binden.

5.3.2.2 Untersuchung des Infektionsverhaltens von MSHBV, CSHBV und HBV mit Hilfe von pseudotypisiertem HDV

Die Spitzmaus HBV besitzen, ebenso wie HBV, in der Aminosäuresequenz der Oberflächenproteine eine Tryptophan-reiche Domäne (AS 196-201: WMM(I/W)YW), welche für die Interaktion mit HDV benötigt wird [79]. Dabei ist die Sequenz des MSHBV identisch zu der der humanen HBV-Gt F und H, während die des CSHBV mit der Sequenz der humanen HBV-Gt A-E und G übereinstimmt (Abbildung 28; A). Um weiterhin auszuschließen, dass mögliche Domänen außerhalb der Aminosäuren 2-48 die Infektion vermitteln und um zu untersuchen, ob HBV über Sorex Ntcp infizieren kann, wurden pseudotypisierte HDV-Partikel mit Oberflächenproteinen von HBV, MSHBV_{CIV} und CSHBV erzeugt und für Infektionsversuche verwendet. Hierzu wurden HuH7-Zellen mit Expressionsplasmiden für HDV und die Oberflächenproteine von HBV, MSHBV_{CIV} oder CSHBV kotransfiziert. In einem Verhältnis von 1:10 wurde zudem ein Plasmid kotransfiziert, welches für eine alkalische Phosphatase kodiert und deren Sekretion als Transfektionskontrolle diente. Der Überstand wurde dabei alle drei Tage beginnend mit Tag 3 nach Transfektion gesammelt, virale RNA extrahiert und die Genomäquivalente pro ml mittels einer qRT-PCR bestimmt. Die ermittelten Werte wurden anschließend auf die SEAP-Sekretion normalisiert. Die Ergebnisse in Abbildung 28; B zeigen den zeitlichen Verlauf der Sekretion von HDV-Partikeln in Zellkulturüberständen. Es konnten sowohl HDV-Partikel umhüllt mit Oberflächenprotein von MSHBV_{CIV} als auch CSHBV A und B erzeugt werden. Dabei wurden zwischen Tag 9 und 11 nach Transfektion die größte Konzentration an HDV-RNA in den Zellkulturüberstand sekretiert. Die höchste Konzentration an HDV-RNA (ca. 7×10^{10} GE/ml) wurden für psHDV_{HBV} gewonnen, wohingegen psHDV_{CSHBV A} am niedrigsten sekretiert (ca. 7×10^8 GE/ml) wurde. HDV-Partikel, die mit MSHBV_{CIV} und

CSHBV B umhüllt wurden (ca. 9×10^9 und 5×10^9 GE/ml), wurden etwa um eine Log-Stufe niedriger als psHDV_{HBV} sekretiert (Abbildung 28; B).

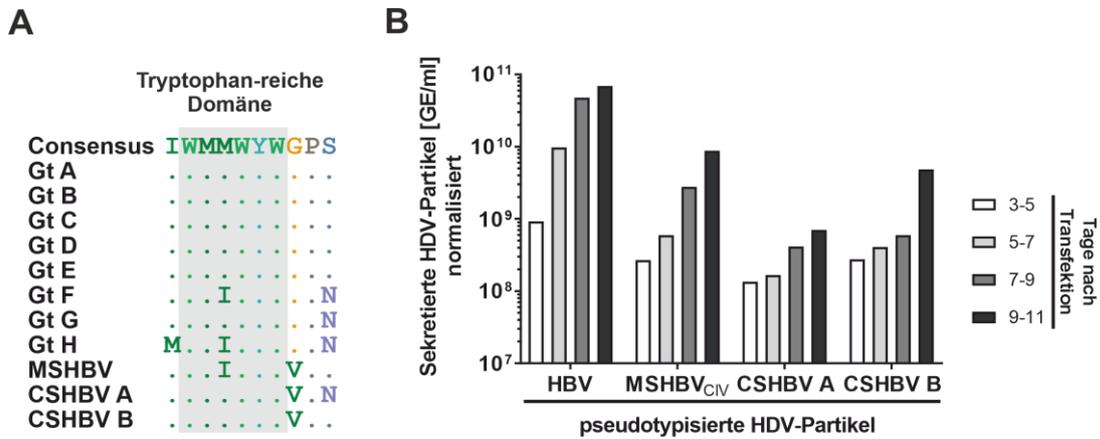


Abbildung 28: Vergleich der für die Sekretion von HDV essenziellen HDV-Interaktions-Domäne im SHBs unterschiedlicher Hepadnaviren und zeitlicher Verlauf der Sekretion pseudotypisierter HDVs. A)

Sequenzvergleich des SHBs (Aminosäuren: 195-204) humaner HBV-Gt sowie MSHBV und CSHBV (Gt A und B). Grau hinterlegt ist die Tryptophan-reiche Domäne, welche für die Interaktion mit dem L-HDAg des HDVs und der damit verbundenen Verpackung und Sekretion infektiöser HDV-Partikel essenziell ist. **B)** Pseudotypisierte HDV-Partikel mit Oberflächenproteinen von MSHBV_{CIV}, CSHBV A und CSHBV B und HBV-Gt D3. HuH7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für das deltavirale Genom sowie mit Expressionsplasmiden für HBV-Gt D3, MSHBV_{CIV}, CSHBV A und CSHBV B Oberflächenproteine kotransfiziert. Als Transfektionskontrolle wurde zudem das Plasmid pSEAP (1:10) kotransfiziert, das zur konstitutiven Sekretion einer enzymatisch aktiven Phosphatase führt. Die in den Überstand sekretierten HDV-Partikel wurden alle drei Tage bis Tag 11 gesammelt, die RNA extrahiert und die Genomäquivalente pro ml Zellkulturüberstand mittels qRT-PCR ermittelt. Die Werte wurden anschließend auf die SEAP-Sekretion normalisiert. Gt – Genotyp; MSHBV_{CIV} – Musk Shrew Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: MK345462); CSHBV – Crowned Shrew Hepatitis-B-Virus Gt A (Genbank accession number: MK345465) und Gt B (Genbank accession number: MK345467).

Fazit: MSHBV_{CIV} und CSHBV (Gt A und B) Oberflächenproteine können erfolgreich HDV-Partikel verpacken. Es konnten pseudotypisierte HDV-Partikel mit MSHBV_{CIV} und CSHBV-Gt A und B Oberflächenproteinen im Überstand von transfizierten HuH7-Zellen bestimmt werden. Die niedrigste Konzentration wurde für psHDV mit CSHBV-Gt A Oberflächenprotein ermittelt.

Die erzeugten psHDV-Partikel wurden nun im Anschluss verwendet, um zu untersuchen, ob die Hepatitis-B-Viren aus Spitzmäusen in der Lage sind, humane Leberzellkulturen über NTCP und/oder Sorex Ntcp zu infizieren. *Vice versa* wurde mittels den erzeugten psHDV_{HBV} zudem untersucht, ob die Oberflächenproteine von HBV über den Sorex Ntcp humane Zellkulturen infizieren können. Hierzu wurden

HepG2-Zellen zunächst mit den Expressionsplasmiden für hNTCP und Sorex Ntcp transfiziert, und zwei Tage nach Transfektion mit 1×10^8 Genomäquivalenten der jeweiligen psHDVs infiziert. An Tag 11 nach Infektion wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert, 0,2 % Triton-X-100 permeabilisiert und das Deltaantigen mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Während psHDV_{HBV} über Sorex Ntcp humane Hepatomzellen infizieren konnte, wurden keine Infektionen der psHDV-Partikeln, die mit den Spitzmaus HBV-Oberflächenproteinen umhüllt sind, über die NTCP-Orthologe vermittelt (Abbildung 29). Die Infektion wurde parallel zu den NBD-TC Transportanalysen und Myr-PräS1-Peptidbindungsversuchen (Abbildung 27) durchgeführt, wodurch die funktionelle Expression des Sorex Ntcp und hNTCP während der Infektion gewährleistet wurde.

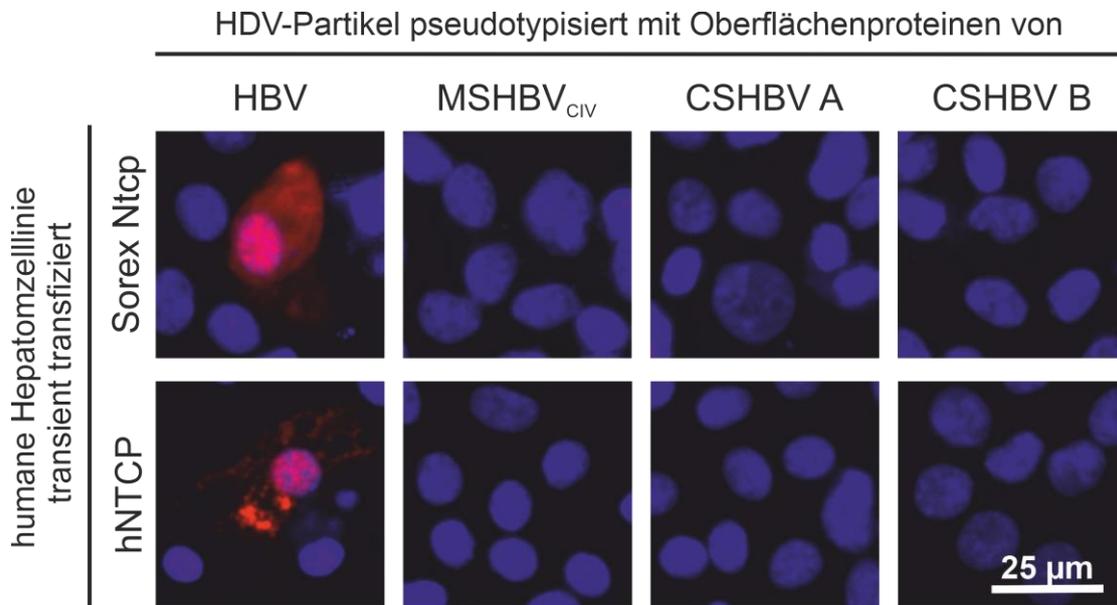


Abbildung 29: Untersuchung des Infektionsverhalten pseudotypisierter HDV-Partikel mit Oberflächenproteinen von HBV-Gt D3, MSHBV_{CIV}, CSHBV A und CSHBV B. HepG2-Zellen wurden in 48 Wellplatten mit hNTCP und Sorex Ntcp Expressionsplasmiden transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit 1×10^8 Genomäquivalenten psHDV_{HBV}, psHDV_{MSHBV}, psHDV_{CSHBV A} bzw. psHDV_{CSHBV B} für ca. 20 Stunden inkubiert. Nach 11 Tagen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und das Deltaantigen (HDAg) als Marker einer Infektion mittels anti-HDAg IgGs eines humanen Patientenserums und eines Alexa568 markierten anti-human IgG-Antikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden parallel mit DAPI gefärbt. MSHBV_{CIV} – Musk Shrew Hepatitis-B-Virus; CSHBV – Crowned Shrew Hepatitis-B-Virus Gt A und Gt B.

Fazit: Die Infektionsversuche pseudotypisierter HDVs mit Oberflächenprotein der HBVs aus Spitzmäusen deuten darauf hin, dass die hier beschriebenen Hepatitis-B-Viren aus Spitzmäusen im Gegensatz zu HBV der Primaten ihre Zielzellen nicht über NTCP/Ntcp infizieren. Im Gegensatz hierzu konnte anhand der HBV-Myr-PräS1-Peptidbindung und durch Infektionsversuche mit pseudotypisierten HDVs mit HBV Oberflächenproteinen gezeigt werden, dass das humane HBV über den Ntcp der Spitzmaus humane Hepatomzellen *in vitro* infizieren kann.

5.3.3 Rezeptorinteraktion einer neuartigen Hepatitis-B-Virus Spezies aus der Gattung der Equiden (*Equus asinus*)

Im Rahmen einer internationalen Studie unter der Leitung von Prof. Dr. Drexler (Leiter der Arbeitsgruppe Virusepidemiologie am Institut für Virologie der Charité Berlin, Direktor: Prof. Dr. Drosten) wurde eine neue Hepatitis-B-Virus Spezies in Serum und Organen von 24 Hauseseln (*Equus asinus*) und in 5 wilden Zebras (*Equus quagga*) entdeckt, welches entsprechend der Taxonomie der *Hepadnaviridae* nach dessen Wirtstieren als *Equide* Hepatitis-B-Virus (EqHBV) benannt wurden. Das gesamte Virusgenom wurde in Berlin durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Drexler aus Organ- und Serumproben amplifiziert und anschließend sequenziert (EqHBV; GenBank accession numbers: MT134279, MT134282-MT134284, MT134294, MT134306-MT134321). Dabei zeigte eine Sequenzanalyse des Gesamtgenoms, dass EqHBV zu anderen Hepadnaviren aus Säugetieren einen Sequenzabstand von mindestens 30,4 % aufweist. Das Artabgrenzungskriterium der Gattung der Orthohepadnaviren liegt bei einem Schwellenwert von >20 % Divergenz der Nukleotidsequenz [107]. Das EqHBV bildet somit eine neue Spezies der Orthohepadnaviren [131].

Innerhalb dieser Arbeit wurden die vorliegenden Oberflächenproteine (HBsAg) des EqHBV verwendet, um die Ntcp/NTCP Bindung und Infektion zu untersuchen.

5.3.3.1 Analyse der PräS1-Domäne und NTCP/Ntcp-Bindung des LHBs von HBV und EqHBV

Im folgenden Abschnitt wurde das neue Hepatitis-B-Virus der Equiden auf seine NTCP/Ntcp Rezeptorinteraktion getestet. Hierzu wurde zunächst der N-terminale Abschnitt der PräS1-Domäne, welche die essenzielle sowie die akzessorischen Domänen beinhaltet, untersucht. Verglichen mit der Sequenz der HBV-Gt A-H, zeigte EqHBV eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz innerhalb der essenziellen Domäne. Dabei ist sie identisch zu der des HBV-Gt G. Die Aminosäuren der akzessorischen Domänen des EqHBV ähneln hingegen nur in einigen wenigen der der HBV-Gt (Abbildung 30). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Bindung der Oberflächenproteine an NTCP-Orthologe stattfinden kann. Eine Vorhersagesoftware, welche die Wahrscheinlichkeit einer N-terminalen Myristoylierung von Proteinen postuliert, wurde hinzugezogen, um zu untersuchen, ob das LHBs des EqHBV ebenso wie HBV an Position zwei myristoyliert sein könnte. Hier wurde eine zuverlässige Myristoylierungsstelle an Position 2 mit einem Score von 0,87 vorhersagt (Abbildung 30).

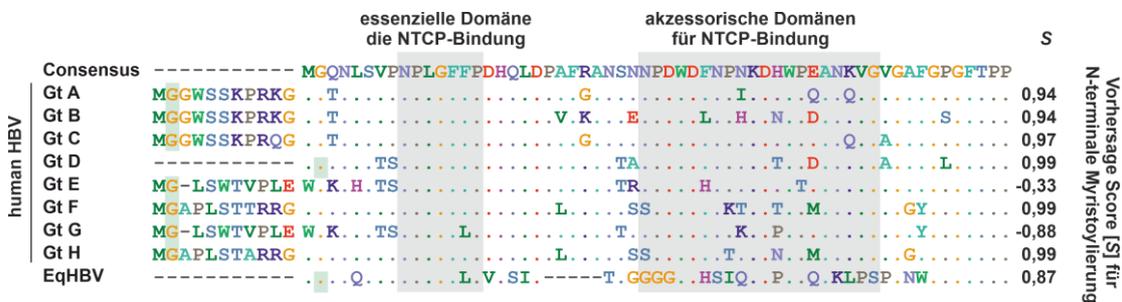


Abbildung 30: Sequenzvergleich des N-terminalen Bereichs der PräS1-Domänen des HBsAg humaner HBVs sowie des Hepatitis-B-Virus aus Equiden (EqHBV). Grün hinterlegte Aminosäuren deuten auf (mögliche) Myristoylierungsstellen hin. Grau hinterlegte Aminosäuren heben mit NTCP/Ntcp interagierende Domänen der humanen HBV-Gt hervor: Essenzielle Domäne (AS: 9-15) und Akzessorische Domäne 1 (AS: 28-39) und 2 (AS: 39-48). **Rechts:** Vorhersage Score für N-terminale Myristoylierung. Je höher ein Wert über 0 liegt, desto höher ist das Konfidenzniveau für eine Myristoylierung. Score [S] < 0,0 keine Myristoylierung, > 0,0 Myristoylierung. Für die Vorhersage der N-Myristoylierung wurden jeweils die ersten 18 Aminosäuren verwendet (<https://web.expasy.org/myristoylator/myristoylator-doc.html>). Gt – Genotyp; EqHBV – Equid Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: MT134313).

Um nun eine mögliche Interaktion der Oberflächenproteine des EqHBV mit NTCP/Ntcp experimentell zu untersuchen, wurde ein Myr-PräS1-Peptid der Aminosäuren 2-48 der PräS1-Domäne des EqHBVs eingesetzt, welches C-terminal an ein Fluorophor gekoppelt ist und so unter einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden kann.

Dieses Peptid wurde auf die Bindung an HepG2 -Zellen, die humanen NTCP oder Ntcp des Esels konstitutiv exprimieren, untersucht. Nach Überexpression der NTCP-Orthologe in HuH7- und HepG2-Zellen konnte die korrekte Zelloberflächenexpression und Transportfunktion der jeweiligen NTCP/Ntcp durch die Aufnahme des NTCP/Ntcp Fluoreszenz-markierten Taurocholat (NBD-TC) Substrates bestätigt werden (Abbildung 31; grün). Während das humane HBV Myr-PräS1-Peptid sowohl an seinen eigenen Rezeptor (hNTCP) als auch an Ntcp des Esels binden kann, konnte keine Bindung an hNTCP oder Esel Ntcp des EqHBV Myr-PräS1-Peptids beobachtet werden (Abbildung 31; rot).

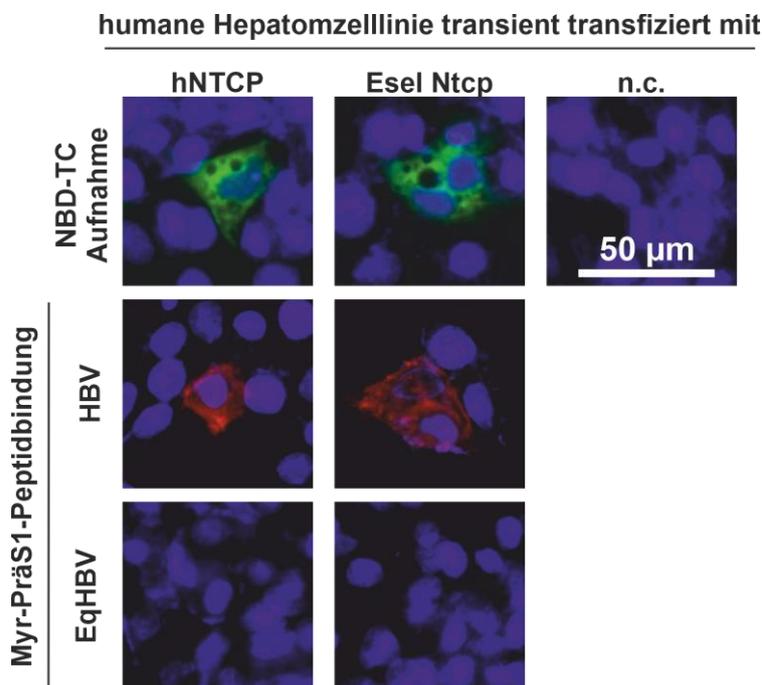


Abbildung 31: NBD-Taurocholat (NBD-TC) Transport und EqHBV/HBV Myr-PräS1-Peptidbindung von hNTCP und Esel Ntcp transfizierten HepG2- und HuH7-Zellen. Humane Zellkulturzelllinien (HepG2-Zellen) wurden mit Expressionsplasmiden für hNTCP und Esel Ntcp transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen entweder mit 5 μM des Fluorophor-markierten NTCP/Ntcp Substrats (grün) oder jeweils mit 100 nM eines Alexa633 Fluorophor markierten Myr-PräS1-Peptids (rot) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde die NBD-TC Aufnahme (grün) sowie die Peptidbindung (rot) an einem Immunfluoreszenzmikroskop untersucht. Zellkerne wurden mit Hoechst detektiert. EqHBV – Equid Hepatitis-B-Virus; n.c. – untransfizierte Zellen.

Fazit: Das Myr-PräS1-Peptid (AS: 2-48) des Hepatitis-B-Virus der Equiden (EqHBV) bindet weder an humanen NTCP (hNTCP) noch an Esel Ntcp, während das HBV Myr-PräS1-Peptid neben dem hNTCP auch an Esel Ntcp binden kann.

5.3.3.2 Produktion und Infektion pseudotypisierter Deltaviren mit EqHBV und HBV-Oberflächenproteinen

Das humane HBV besitzt ebenso wie andere Säugetier Hepatitis-B-Viren eine Tryptophan-reiche Domäne (AS 196-201: WMM(I/W)YW) innerhalb der Aminosäuresequenz des SHBs. Diese ist für die Interaktion mit HDV und somit für dessen Verpackung und Sekretion essenziell [79]. Auch innerhalb des SHBs des EqHBV ist eine solche Domäne vorhanden, die Aminosäuresequenz ist dabei identisch zu der des Neuweltaffen Hepatitis-B-Virus CMHBV (Abbildung 32; A). Um nun zu untersuchen, ob HDV effizient mit EqHBV-Oberflächenproteinen verpackt werden kann und folgend zu untersuchen, ob EqHBV über NTCP oder Esel Ntcp humane Zellen infizieren kann, wurden pseudotypisierte HDV-Partikel mit Oberflächenproteinen von EqHBV und HBV erzeugt und für Infektionsversuche verwendet. Hierzu wurden HuH7-Zellen mit Expressionsplasmiden für HDV und die Oberflächenproteine von HBV oder EqHBV kotransfiziert. Ein Plasmid, das für eine alkalische Phosphatase kodiert, wurde in einem Verhältnis von 1:10 ebenfalls kotransfiziert. Die virale RNA wurde aus Überstand der Tage 3 bis 11 nach Transfektion extrahiert und die Genomäquivalente pro ml mittels einer qRT-PCR bestimmt. Die ermittelten Werte wurden anschließend auf die SEAP-Sekretion normalisiert. Die höchste Konzentration an HDV-Partikeln wurde zwischen Tag 9 und 11 nach Transfektion ermittelt. Es wurden jedoch etwa 100x weniger HDV-Partikel mit EqHBV-Oberflächenproteinen ($8,4 \times 10^8$ GE/ml) sekretiert als mit HBV-Oberflächenprotein ($6,9 \times 10^{10}$ GE/ml) (Abbildung 32; B).

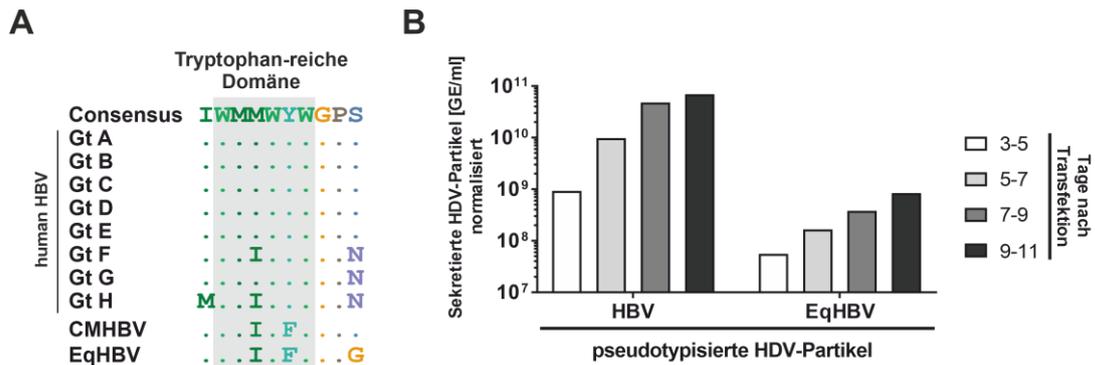


Abbildung 32: Vergleich der für die Sekretion von HDV essenziellen HDV-Interaktions-Domäne im SHBs unterschiedlicher Hepadnaviren und zeitlicher Verlauf der Sekretion pseudotypisierter HDVs. A)

Sequenzvergleich des SHBs (Aminosäuren: 195-204) humaner HBV-Gt, CMHBV sowie EqHBV. Grau hinterlegt ist die Tryptophan-reiche Domäne, welche für die Interaktion mit dem L-HDAg und der damit verbundenen Verpackung und Sekretion infektiöser HDV-Partikel essenziell ist. B) Pseudotypisierte HDV-Partikel mit Oberflächenproteinen von EqHBV und HBV-Gt D3. HuH7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für das deltavirale Genom sowie mit Expressionsplasmiden für HBV-Gt D3 und EqHBV kotransfiziert. Als Transfektionskontrolle wurde zudem das Plasmid pSEAP (1:10) kotransfiziert. Die in den Überstand sekretierten HDV-Partikel wurden ab Tag 3 bis Tag 11 gesammelt, die RNA extrahiert und die Genomäquivalente pro ml Zellkulturüberstand mittels qRT-PCR ermittelt. Die Werte wurden anschließend auf die SEAP-Sekretion normalisiert. CMHBV – Capuchin Monkey Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: NC043528); Gt – Genotyp; EqHBV – Equid Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: MT134313).

Fazit: Es konnten pseudotypisierte HDV-Partikel mit EqHBV-Oberflächenproteinen im Überstand von transfizierten HuH7-Zellen bestimmt werden.

Die pseudotypisierten HDV-Partikel wurden im Anschluss auf ihre Fähigkeit untersucht über hNTCP oder Esel Ntcp humane Zellkulturen zu infizieren. Hierzu wurden HepG2-Zellen mit den Expressionsplasmiden für hNTCP und Esel Ntcp transfiziert und zwei Tage nach Transfektion mit 1×10^8 Genomäquivalenten der jeweiligen psHDV infiziert. An Tag 11 nach Infektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und das Deltaantigen, als Marker der Infektion, mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Während psHDV_{HBV} die Fähigkeit besitzt Hepatomzelllinien zu infizieren, die Esel Ntcp exprimieren, konnten psHDV_{EqHBV} weder über hNTCP noch über Esel Ntcp in diese eindringen (Abbildung 33).

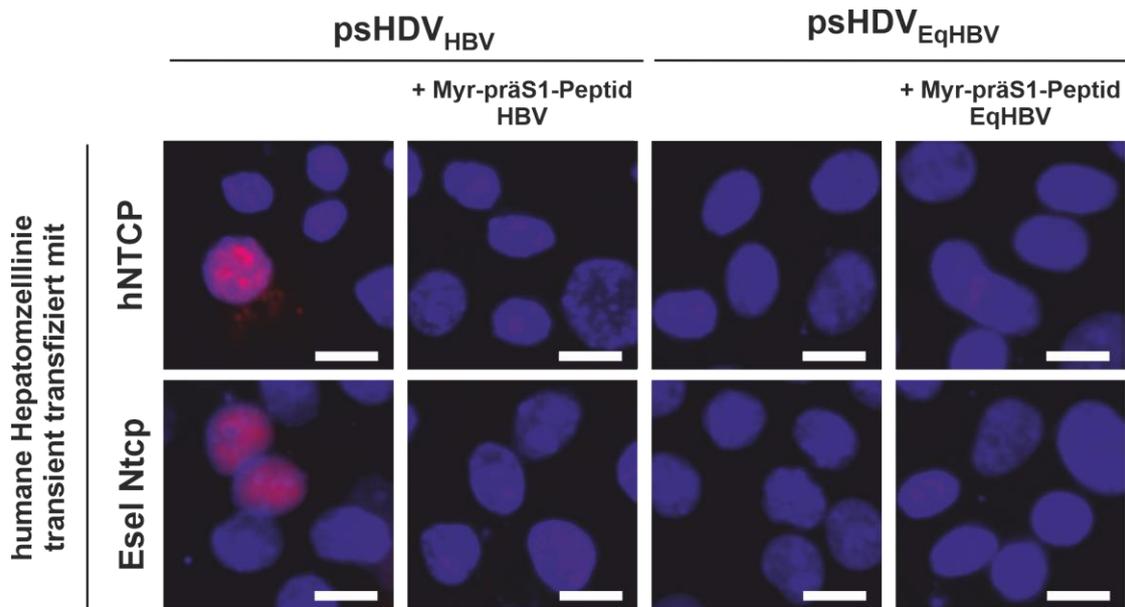


Abbildung 33: Infektionsverhalten von psHDV-Partikeln, pseudotypisiert mit Oberflächenproteinen von HBV-Gt D3 und EqHBV. HepG2-Zellen wurden in 48 Wellplatten mit hNTCP und Esel Ntcp Expressionsplasmiden transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit 1×10^8 Genomäquivalenten psHDV_{HBV}, psHDV_{EqHBV} für ca. 20 Stunden inkubiert. Nach 11 Tagen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und das Deltaantigen (HDAg) als Marker einer Infektion mittels anti-HDAg IgGs eines humanen Patientenserums und eines Alexa568 markierten anti-human IgG-Antikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden parallel mit DAPI gefärbt. Weiße Balken entsprechen 12,5 μ m. EqHBV – Equid Hepatitis-B-Virus; psHDV – pseudotypisierte HDV-Partikel.

Fazit: Die Infektionsversuche pseudotypisierter HDVs mit Oberflächenproteinen des EqHBV deuten darauf hin, dass das hier beschriebene Hepatitis-B-Virus der Equiden nicht über NTCP/ Esel Ntcp infizieren kann. Das humane HBV scheint jedoch die Fähigkeit zu besitzen, über Esel Ntcp *in vitro* in humane Hepatomzellen einzudringen, was durch die Infektionsversuche verdeutlicht wurde.

6. Diskussion

6.1 Klonierung und Charakterisierung humaner HDV-Gt 1-Isolate

Mitunter eine große Herausforderung in Studien, die die Replikation des Hepatitis-Delta-Virus umfassen, ist das Fehlen replikativer cDNA-Klone verschiedener HDV-(Sub)-Gt. Ein Großteil der bisherigen Arbeiten zu HDV beziehen sich hauptsächlich auf einen einzigen cDNA Klon eines HDV-Gt 1-Isolates (pSVL(D3)), welches nicht direkt aus

dem Serum eines HDV-infizierten Patienten isoliert wurde, sondern nachfolgend artifiziell in einem HBV-infizierten Schimpansen und einem WHV-infizierten Nordamerikanischen Waldmurmeltier (*Marmota monax*) passagiert wurde [206, 213, 214] und *in vitro* gegenüber IFN α insensitiv ist [215]. Fraglich ist daher, inwieweit dieses Konstrukt die Diversität von Gt 1 Isolaten repräsentieren kann. Um antivirale Effekte insbesondere von Interferon zu untersuchen, war es daher notwendig, repräsentative cDNA-Klone von HDV-RNA zu verwenden, die direkt aus dem Serum von HDV-Patienten isoliert wurden. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe für Virushepatitis unter der Leitung von Prof. Dr. Maura Dandri (Medizinische Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) wurden innerhalb dieser Arbeit drei HDV-Gt 1-Isolate kloniert, welche *in vitro* replizierten (Abbildung 6) und nach Kotransfektion mit HBsAg pseudotypisierte Deltaviren sekretierten (Abbildung 7). Da gezeigt wurde, dass HDV-RNA in humanen Zellen während der Mitose ungerichtet an die Tochterzellen weitergegeben wird (Giersch et al., 2019), wurde ein zellulärer Expansionsversuch der transfizierten HDV-Konstrukte als indirekter Replikationsnachweis vorgenommen. Dabei konnten deutliche Zellcluster, positiv für HDAg nachgewiesen werden, was auf eine über Zellteilung vermittelte HDV-RNA-Ausbreitung hinweist. Da keine Kotransfektion von HBsAg-produzierenden Plasmiden erfolgte (HBsAg ist für die Umhüllung und die Sekretion von HDV-Partikel essenziell), konnte eine Übertragung des HDV durch sekretiertes HDV ausgeschlossen werden. Anhand des Northern Blot wird deutlich, dass insbesondere pHDV_T *in vitro* mehr antigenomische RNA (agRNA) synthetisiert als die neuen Isolate CHD_HH und CHD_WHO aus Patientenseren, welche ähnliche Intensitäten an antigenomischer RNA zeigten (Abbildung 6). Obwohl die Transfektionsansätze der Isolate alle identisch behandelt wurden, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Effekte auf eine effizientere Transfektion von pHDV_T zurückzuführen sind.

Nach Kotransfektion der HDV-Expressionskonstrukte mit HBsAg des HBV-Gt D3 sekretierten die Zellen, welche mit pHDV_T transfiziert wurden, deutlich weniger HBsAg als solche, die mit den Isolaten CHD_HH oder CHD_WHO transfiziert wurden (Abbildung 7). Dies spiegelte sich auch in der Sekretion der pseudotypisierten Deltaviren mit HBsAg des HBV-Gt D3 wieder. Die meisten Viren wurden hier nach Kotransfektion der Isolate CHD_HH und CHD_WHO sekretiert. Eine verstärkte

Replikation scheint demnach nicht mit der Konzentration an sekretieren Deltaviren einherzugehen, vielmehr scheint das Zusammenspiel zwischen HBsAg und HDV für die Sekretionseffizienz verantwortlich zu sein.

Da innerhalb dieser Arbeit 2.0mer HDV-Expressionskonstrukte kloniert und für weitere Versuche verwendet wurden, wurde zusätzlich zu diesen das Plasmid pSVL(D3) verwendet [56, 206]. Dieses enthält das HDV-Genom in genomischer Orientierung als 3.0mer im Vektor pSVL und ist identisch mit der HDV-Sequenz des pHDV_T 2.0mer-Expressionskonstrukts. Anhand der Ergebnisse in Abbildung 3 und 4 ließen sich erwartungsgemäß keine Diskrepanzen zwischen der Verwendung des HDV-Dimers und -Trimers feststellen. Die pseudotypisierten Deltaviren wurden in ähnlichen Konzentrationen sekretiert und auch das Infektionspotential beider ist nahezu gleich (Abbildung 7 und Abbildung 8).

Ein deutlicher Unterschied konnte jedoch innerhalb der HDV-Gt und der Sekretion viraler Partikel festgestellt werden. Nach Kotransfektion mit HBsAg des HBV-Gt D3 wurden die wenigsten HDV-Partikel mit HDV-Gt 2 sekretiert, während die Isolate des Gt 1 aus Patientenserum CHD_HH und CHD_WHO die meisten Viren sekretierten. Dies ist in Übereinstimmung mit einer Studie um S. C. Hsu et al., in der gezeigt wurde, dass die Verpackungseffizienz des HDV-Gt 1 höher als die des HDV-Gt 2 ist. Dies ließe sich unter anderem mit einer niedrigeren Editierungseffizienz des Gt 2 erklären, welche auf Unterschiede innerhalb der Primärsequenz und insbesondere der Sekundärstruktur entlang der Editierungsposition zurückzuführen sein könnte [216]. Eine niedrigere Editierungseffizienz könnte gleichsam bedeuten, dass das HDV-RNP weniger farnesyliertes L-HDAg aufweist. Durch die Farnesylierung erhält das L-HDAg einen hydrophoben C-Terminus, der benötigt wird, um das L-HDAg (integriert im HDV-RNP) stabil an der ER-Membran zu koppeln und so die molekulare Wechselwirkung mit dem dort in der Membran verankerten HBsAg zu ermöglichen. Auffällig war zudem, dass insgesamt mehr HDV-Partikel und auch mehr HBsAg nach Kotransfektion mit HBsAg des HBV-Gt B1 sekretiert wurden (Abbildung 7). Die gesteigerte HBsAg Sekretion könnte damit zu erklären sein, dass *in vivo*, aber auch im verwendeten HBsAg-Expressionskonstrukt, endogene HBV-Promotoren die Expression der jeweiligen HBV-Oberflächenproteine steuern. In einer kürzlich veröffentlichten Studie um W. Wang et al. wurde zudem gezeigt, dass HBsAg des HBV-Gt B stärker als HBsAg des HBV-Gt D

sekretiert wird [217]. Auch hier wurden mit HBsAg des Gt B die meisten HDV-Partikel sekretiert, dabei wurde aber ein anderes Isolat als in dieser Doktorarbeit verwendet [217]. Da bislang insgesamt nur wenige Isolate der einzelnen HBV-Gt in diesem Zusammenhang untersucht wurden, kann weiterhin nicht ausgeschlossen werden, dass diese oben genannten Effekte eher Isolat-abhängig, als generell vom HBV-Gt abhängig, sein könnten. Eine zusätzliche quantitative Bestimmung der Sekretion von S-, M- und LHBs des HBV in Abwesenheit von HDV könnte dabei helfen, zu unterscheiden, ob die jeweiligen Effekte allein auf die Expression des HBsAg zurückzuführen sind oder, ob das Zusammenspiel mit der Replikation des HDV eine Änderung des Sekretionsverhaltens von HBsAg zur Folge hat. Vergleicht man die Ergebnisse der HDV-Infektionsrate (bei gleichem Virusinokulum), so lässt sich nicht feststellen, ob die bestmögliche Infektionsrate des HDV per se von den Oberflächenproteinen eines bestimmten HBV-Gt bestimmt wird. Deutlich wird jedoch, dass die HDV-Gt 2 und 3 die niedrigste Infektionsrate hatten, während der HDV-Gt 4 im Bereich des HDV-Gt 1 lag (Abbildung 8). Innerhalb der oben genannten Publikation um W. Wang et al. wurde das identische Isolat des HDV-Gt 3 verwendet, während für die HDV-Gt 1, 2 und 4 sowie für das HBsAg andere Isolate verwendet wurden [217]. Die höchste Infektionsrate wurde auch hier für HDV-Partikel umhüllt mit HBsAg des HBV-Gt B beobachtet. Die niedrigsten Infektionsereignisse wurden innerhalb der genannten Studie für den HDV-Gt 2 und 4 ermittelt, während die Infektionen des Gt 1 und 3 eine höhere Infektionsrate erreichten [217]. Die Ergebnisse des HDV-Gt 3 sind dabei besonders hervorzuheben, da es sich um das identische (in dieser Doktorarbeit verwendete) HDV-Gt 3-Isolat handelt, jedoch ein anderes HBsAg-Isolat verwendet wurde. In der vorliegenden Doktorarbeit wurden verhältnismäßig wenige Infektionsereignisse des HDV-Gt 3 gemessen, was darauf hindeutet, dass die Infektiosität des HDV nicht nur vom HDV-Gt, sondern insbesondere vom HBsAg- sowie HDV-Isolat abhängt.

Um ferner zu prüfen, ob das HDV-Gt1-Isolat-CHD_HH für Interferon sensitiv ist, wurden am Institut für Virushepatitis in Hamburg-Eppendorf, die im Rahmen dieser Doktorarbeit aus humanen Zellkulturen gewonnenen Viren, verwendet, um chronisch HBV infizierte, humanisierte uPA/SCID Mäuse zu infizieren. Dafür wurde ein Teil der

HDV/HBV-infizierten Mäuse einer Therapie mit PegIFN α unterzogen. Wodurch die HDV- und die HBV-Virämie im Serum der Tiere um mindestens 2log-Stufen reduziert werden konnte. Auch die intrahepatischen Marker einer HDV-Infektion nahmen stark ab, was folglich führend zu einer Reduktion von HDAg-positiven Zellen um 38 % (42 % zu 4 %) führte. Im Gegensatz dazu zeigten HDV/HBV koinfizierte Mäuse, die mit dem HDV-Gt-1-Isolat pHDV_T infiziert waren, unter Gabe von PegIFN α keine Senkung der HDV-Titer. Hier konnte nur eine Senkung der HBV-Virämie um 2log beobachtet werden, die Behandlung führte jedoch zu keiner Änderung der HDV-Virämie [218]. Zusammenfassend konnte mit dem Institut für Virushepatitis in Hamburg-Eppendorf ein IFN α -sensitives, von Patienten stammendes, HDV-Gt-1-Isolat (CHD_HH) identifiziert und kloniert werden, welches geeignet ist, antivirale Effekte von Interferon *in vivo* und *in vitro* zu untersuchen. In weiteren Analysen sollten die speziellen HDV-RNA-genomtypischen Motive für die beobachtete Interferonsensitivität des HDV identifiziert werden. Sind dies konservierte RNA-Motive, so könnte in der klinischen Anwendung durch Sequenzierung des HDV-Genoms aus dem Serum von HDV/HBV-infizierten Patienten im Vorfeld bestimmt werden, ob ein Ansprechen des Patienten auf eine HDV-Interferontherapie zu erwarten wäre. Durch diesen neuartigen Biomarker könnte die Belastung der Patienten durch die starken Nebenwirkungen einer Interferontherapie bei nicht-ansprechenden HDV/HBV-infizierten Patienten vor Therapiebeginn vermieden werden.

6.1.1 Einfluss von exogenem S-HDAg unterschiedlicher HDV-Gt auf die Replikation von HDV-Gt 1-Isolaten

HDV wurde entsprechend seines RNA-Genoms ursprünglich in drei HDV-Gt klassifiziert, durch weitere Analysen sind inzwischen insgesamt 8 HDV-Gt bekannt [24, 26, 29]. Hier ist zu beachten, dass die acht bekannten Gt untereinander eine hohe Nukleotid-Diversität von bis zu 40 % aufweisen (Abbildung 15) [24]. Zudem wurden Unterschiede im Hinblick auf die Krankheitsverläufe bei HDV/HBV-infizierten Patienten beobachtet (siehe Kapitel 1.1.1). Als Grund für die unterschiedlichen klinischen Verläufe wird unter anderem impliziert, dass bestimmte Kombinationen an HDV- und HBV-Gt mitverantwortlich für den Verlauf der Pathogenese sind. Bisher gibt es hierfür jedoch keine direkten Nachweissysteme, da es unter anderem an authentischen

Infektionssystemen und gut charakterisierten HDV-cDNA-Klonen mangelt. Ein weiterer Aspekt, der für spezielle HDV/HBV-Infektionsverläufe interessant sein könnte, sind Ko- bzw. Superinfektionen von HDV/HBV-Patienten mit weiteren HDVs unterschiedlicher Gt. Weitere Infektionen mit HDV und/oder HBV sind bei diesen chronisch HDV/HBV-infizierten Patienten weiterhin möglich, da keinerlei wirksame Immunabwehr gegen Neuinfektionen mit HDV oder HBV besteht und ein etwaiger Verlust der zellulären HDV/HBV-Rezeptoren von bereits HDV/HBV-infizierten Hepatozyten bislang nicht beschrieben wurde. Nach einer HDV-Infektion einer bereits HDV/HBV-infizierten Zelle besteht daher, während der parallel verlaufenden HDV-RNA Replikation zweier HDV-Isolate, die Möglichkeit der RNA-Rekombination der HDV-Genome. Obwohl natürliche Intergenotyp-Rekombinationen nur selten beschrieben worden sind, haben klinische Studien bereits gezeigt, dass homologe Rekombination der HDV-RNA sowohl in der Natur (Patient mit HDV-Mischinfektion) als auch in der Zellkultur (nach HDV-Kotransfektion) auftreten kann [219-222]. Es gibt jedoch nur wenige Informationen über die Fähigkeit von S/L-HDAg, die Replikation anderer HDV-Gt während der HDV-Infektion zu *trans*-aktivieren oder zu inhibieren. Da S-HDAg das einzige virale Protein ist, welches für die Replikation von HDV notwendig ist, wurde in dieser Arbeit der Einfluss exogener S-HDAg aller acht bekannten HDV-Gt auf die virale Replikation des HDV-Gt 1 untersucht. Dabei wurden genomische cDNA-Klone dreier HDV-Gt 1-Isolate, deren Replikation durch das Ausschalten der HDV-Genom-eigenen S-HDAg-Expression inhibiert wurde, mit S-HDAg der HDV-Gt 1-8 *trans*-komplementiert und eine Rekonstitution der HDV-Replikation mittels Northern Blot analysiert. Durch Kotransfektion der S-HDAg der HDV-Gt 1,2 und 5-8 konnte die Replikation aller drei verwendeten Isolate des mutierten HDV-Gt 1 in *trans* reaktiviert werden, während S-HDAg der HDV-Gt 3 und 4 zu keiner Reaktivierung der HDV-Replikation führte (Abbildung 9, Abbildung 10 und Abbildung 11). Auch die Deltaantigene der kürzlich entdeckten tierischen HDV-ähnlichen Viren waren nicht in der Lage die Replikation in *trans* zu komplementieren, was aufgrund ihrer extremen Divergenz zu humanen HDV zu erwarten war (Abbildung 15 und Abbildung 16). In Ansätzen wurde der Effekt der Genotyp-spezifischen Aktivität des S-HDAg bei der Steuerung der HDV-Replikation bereits postuliert. So wurde im Jahr 1998 im Rahmen einer kleinen Studie gezeigt, dass verschiedene Isolate des S-HDAg der HDV-Gt 1 und 3 die Replikation des eigenen Gt in

trans komplementieren können [199]. In Gegensatz hierzu, konnte das S-HDAg des divergenten Gt 3 die Replikation des Gt 1 ebenfalls nicht reaktivieren [199]. Dies geht einher mit den Beobachtungen innerhalb dieser Arbeit und deutet darauf hin, dass es sich bei der Fähigkeit der *trans*-Aktivierung eher um ein Gt- als um ein Isolat-spezifisches Merkmal handelt. Die beobachteten Intensitäten der S-HDAg-*trans*-Aktivierung der HDV-Replikation waren jedoch sehr unterschiedlich, was darauf hindeutet, dass es zudem Isolat-spezifische Unterschiede gibt. So wurde die Replikation des HDV-Gt 1 durch S-HDAg verschiedener HDV-Gt-1-Isolate unterschiedlich stark reaktiviert (Abbildung 9). Auch in der bereits genannten Studie wurden bei der *trans*-Aktivierung des HDV-Gt 1-Isolate spezifische Unterschiede beobachtet [199]. In einer nachfolgenden Studie konnten ebenfalls Isolat-spezifische Unterschiede durch *trans*-Aktivierung der HDV-Gt-1 Replikation beobachtet werden [223]. So wurde die HDV-Gt-1-Replikation durch S-HDAg eines bestimmten HDV-Gt-1-Isolates 72 % stärker reaktiviert als unter S-HDAg der Kontrolle. Das S-HDAg eines anderen HDV-Gt-1-Isolates konnte die Replikation zwar *trans*-komplementieren, erreichte jedoch nur 14 % der Kontrolle [223]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die S-HDAg-Expression der HDV-Gt 2, 5-8 die Replikation des HDV-Gt-1 in *trans* komplementieren und sogar verstärken konnte (Abbildung 10 und Abbildung 11). Für ein S-HDAg-Isolat des HDV-Gt 2 konnte dieser Effekt auf die Replikation des HDV-Gt 1 auch in einer anderen Studie gezeigt werden [223].

Für die HDV-Gt 4-8 wurden zu diesem Thema bislang noch keine Daten veröffentlicht. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten jedoch, dass auch S-HDAg des Gt 4, analog zu S-HDAg des Gt 3, die Replikation des HDV-Gt 1 nicht *trans*-komplementieren konnte, während die HDV-Gt 5-8 die Replikation reaktivieren und verstärken konnten. Bezogen auf die Aminosäuresequenz des S-HDAg (Abbildung 15) fällt insbesondere auf, dass das S-HDAg des HDV-Gt 3 unter den humanen HDV die größte Divergenz aufweist. Dies könnte erklären, weshalb eine Reaktivierung der Replikation des Gt 1 nicht möglich war. Da jedoch die Aminosäureidentität des S-HDAg des Gt 4 zu S-HDAg des HDV-Gt 1 im Bereich derer der HDV-Gt 6 bis 8 (die die Replikation durch *trans*-Komplementation verstärken) liegt, ist ein Zusammenhang zwischen der Fähigkeit der *trans*-Komplementation und der Aminosäureidentität der einzelnen HDV-Gt eher unwahrscheinlich.

Um diese Effekte genauer zu untersuchen, sollten in der Zukunft weitere Versuche mit verschiedenen Isolaten an S-HDAg der jeweiligen HDV-Gt durchgeführt werden. Für die Analysen des S-HDAg der HDV-Gt 2-4 wurden zwei verschiedene Isolate verwendet, die darauf hindeuten, dass die Unfähigkeit des S-HDAg des HDV-Gt 4 die Replikation des HDV-Gt 1 zu reaktivieren, ein grundsätzliches, Genotyp-spezifisches Merkmal sein könnte, während die Intensität der Komplementation der Replikation des Gt 1 mit anderen S-HDAg eher Isolat-spezifisch zu sein scheint. Weitere Analysen mit replikationsinkompetenten cDNA-Klonen aller HDV-Gt (sowie tierischer HDV-ähnlicher Viren) in Kombination mit verschiedenen Isolaten des S-HDAg, inklusive chimärer Konstrukte, könnten dabei helfen, einzelne relevante Domänen oder Aminosäuren zu identifizieren, um damit ein besseres Verständnis der Replikation von HDV-ähnlichen Viren und HDV zu erhalten. Dabei müsste in weiteren Untersuchungen die Expression an S-HDAg auch quantitativ bestimmt werden, um Aussagen zu treffen, inwieweit die HDV-Replikation von der intrazellulären Konzentration an S-HDAg abhängt. Innerhalb dieser Arbeit wurde die Expression an exogenem S-HDAg nicht quantitativ bestimmt, da alle S-HDAg-Konstrukte einen sehr starken (CMV-) Promoter besaßen, der zur Überexpression des S-HDAg in der Zelle führen sollte. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass es Genotyp-spezifische Unterschiede in der Translation geben könnte, die die Ursache für die unterschiedlichen Reaktivierungsmuster der HDV-Replikation sein könnten. Weiterhin gilt es zu beachten, dass das S-HDAg einiger posttranslationaler Modifikationen unterzogen wird. Hierzu gehören z. B. die Sumoylierung, Methylierung, Acetylierung und Phosphorylierung [224-228]. Diese sind insbesondere für die Synthese antigenomischer HDV-RNA und HDV-mRNA während der Replikation notwendig [229] und könnten innerhalb der HDV-Gt und Isolate unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Diese Unterschiede könnten ebenso einen Einfluss auf die Fähigkeit der *trans*-Komplementation des S-HDAg auf die HDV-Replikation ausüben.

Neben dem Einfluss von S-HDAg auf die HDV-Replikation in *trans*, können bei Doppelinfektionen mit zwei HDV-Gt durch intrazelluläre Rekombinationsereignisse auch chimäre HDV-Genome mit einem Gt-fremden S-HDAg entstehen. Chimäre cDNA-Klone zweier Isolate des HDV-Gt 1 wurden in dieser Arbeit kloniert, um zu untersuchen, inwieweit intragenotypische Rekombinationen innerhalb der HDAg-Region die

Replikation beeinflussen. Aufgrund der Tatsache, dass die klonierten Konstrukte nicht replizierten (Abbildung 12; B), konnte der Einfluss des endogenen HDAg auf die Replikation nicht weiter untersucht werden. Mögliche Gründe für die fehlende Replikationskompetenz könnte eine gestörte RNA-Sekundärstruktur sein. HDV besitzt ein zirkuläres Genom, welches durch ein hohes Ausmaß (ca. 74 %) an intramolekularer Basenpaarung mit internen Schleifen und Ausbuchtungen, nicht aber mit Verzweigungen, charakterisiert ist [20, 21, 230]. Hierdurch entsteht die HDV-typische quasi-doppelsträngige unverzweigte Stäbchenform des Genoms. Dass diese Struktur für HDV von Bedeutung ist, könnte dadurch begründet werden, dass sich mehr als die Hälfte der Basen mit der kodierenden Region des HDAg paart, um diese stäbchenartige RNA-Sekundärstruktur zu bilden. Zudem wurde gezeigt, dass die charakteristische Sekundärstruktur und nicht die primäre RNA-Sequenz die Hauptdeterminante der HDAg-RNA-Bindungsspezifität ist [231]. Durch den Austausch großer Fragmente, wie den OLR eines HDAg eines anderen Gt, könnte die Basenpaarung dieser chimären Sequenz gestört werden, wodurch die Sekundärstruktur stark beeinträchtigt würde. Das HDAg, welches für die Replikation essenziell ist, sowie zelluläre Proteine, die an der Replikation beteiligt sind, könnten dadurch nicht mehr richtig binden. Um die Replikationsfähigkeit dieses chimären HDV-Genoms wiederherzustellen, könnte versucht werden, die postulierten komplementären Basen innerhalb des HDV-Genoms ebenso auszutauschen, um die für die Replikation postulierte Sekundärstruktur der HDV-RNA wiederherzustellen. Eine weitere Möglichkeit wäre, zunächst nur einen sukzessiven Basenaustausch kleinerer Fragmente innerhalb des Deltaantigens vorzunehmen

6.2 Charakterisierung eines neuen tierischen Hepatitis-D-Virus-ähnlichen Virus aus der Stachelratte „*Proechimys semispinosus*“

Seit seiner Entdeckung gegen Ende der 1970er Jahre galt das humane HDV als einziger Vertreter seiner Gattung und als kleinstes humanpathogenes RNA Virus, welches nur durch eine Koinfektion mit HBV verbreitet wird. Diese Einzigartigkeit des HDV musste mit der Entdeckung neuartiger HDV-ähnlicher Virussequenzen in Enten (AvianDV) und in *Boa constrictors* (SnakeDV) fast 40 Jahre später aufgegeben werden [88, 89]. Auch

die Frage nach dem Ursprung und der Evolution von HDV geriet dadurch wieder mehr in den Mittelpunkt. HDV ist mittlerweile in 8 Genotypen unterteilt, welche sich um bis zu 40 % in ihrer Nukleotidsequenz unterscheiden können (Abbildung 15). In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Drosten (Direktor des Instituts für Virologie der Charité Berlin und Leiter der Arbeitsgruppe Evolution und Biodiversität von RNA-Viren, Coronaviren) und der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Sommer (Direktorin des Instituts für Evolutionsökologie und Naturschutzgenomik der Universität Ulm) konnte innerhalb dieser Arbeit erstmals ein HDV-ähnliches Virus in Säugetieren außerhalb der Spezies Mensch (Ordnung: Primaten) charakterisiert werden [91]. Da RDeV zu diesem Zeitpunkt der einzige Vertreter HDV-ähnlicher Viren aus Säugetieren außerhalb des Menschen war, stand es phylogenetisch zunächst den humanen HDV-Gt am nächsten [91]. Durch die Identifizierung weiterer HDV-ähnlicher Viren wurden nach und nach neue phylogenetische Modelle aufgestellt. So wurden weitere HDV-ähnliche Sequenzen aus Fischen (FishDV), zwei Amphibienarten (ToadDV, NewtDV) und in Termiten (TermiteDV) gefunden [90]. Kürzlich wurden zudem HDV-ähnliche Virussequenzen in einer Vampirfledermaus (DrDV-A und DrDV-B), in einem Lebertranskriptom der Hundskopffledermaus (PmacDV) sowie in Transkriptomen von Weißwedelhirschen (OvirDV) und von in Gefangenschaft geborenen Murmeltieren (MmonDV) identifiziert [92, 93]. Auch wurden weitere HDV-ähnliche Sequenzen in Sperlingsvögeln identifiziert, unter anderem in einem Zebrafinken (TgDV) und einem Spitzschwanz-Bronzemännchen (LsDV) [92].

Innerhalb dieser Arbeit deuten RNA-Vollgenom-Analysen darauf hin, dass DrDV-A, OvirDV und MmonDV die bisher engsten Verwandten der humanen HDVs sind (Abbildung 16). Die Klade um RDeV, PmacDV und Dr-DV-B bilden zusammen mit SnakeDV, TgDeV und LsDV eine monophyletische Gruppe. Die HDV-ähnlichen Viren aus Amphibien, Fischen und Invertebraten bilden die am weitesten von anderen bekannten Deltaviren entfernten HDV-ähnlichen Viren. Dieses Modell wird durch eine weitere Analyse, welche sich auf die Aminosäuresequenz des DAGs bezieht, unterstützt [93]. Trotz allem wird durch die niedrigen Prozentsätze an den Knotenpunkten in Abbildung 16 deutlich, dass weitere (noch unentdeckte) HDV-ähnliche Viren in dieser Analyse fehlen, um ein besseres Verständnis für die Entstehung und den Ursprung der Deltaviren zu erlangen. Dabei stellt sich insbesondere die Frage, wie das HDV in

Säugetiere und insbesondere in den Menschen gelangt ist. Durch Entdeckung verschiedener HDV-ähnlicher Viren scheint eine Anpassung an den Menschen durch artübergreifende Übertragung möglich. Das Farnesylierungsmotiv im L-HDAg scheint eine spezifische Anpassung an das humanpathogene HBV (und möglicherweise HCV) zu sein. Auch das DA_g des RDeV und PmacDV scheint einen verlängerten C-Terminus zu enthalten, welcher bereits eine Vorstufe für eine Anlage des L-HDAg des HDV sein könnte (siehe auch folgendes Kapitel 6.2.1.).

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass das RDeV und PmacDV eine Sequenzhomologie von über 95 % aufweisen und sich somit nur unwesentlich unterscheiden (Abbildung 15). Da beide Sequenzen in jeweils unabhängigen Studien unterschiedlicher Autoren [91, 93] gefunden wurden, könnte es sich hierbei um das identische Virus in zwei unterschiedlichen Wirten handeln. Dies könnte dadurch gestützt werden, dass sowohl die Stachelratte (*Proechimys semispinosus*) wie auch die Hundskopffledermaus (*Peropteryx macrotis*) ähnliche Verbreitungsgebiete haben, worunter unter anderem Gebiete entlang des Panamakanals gehören. Unklar bleibt dabei jedoch, ob und wie es zu einer möglichen Übertragung von RDeV oder PmacDV zwischen den einzelnen Tieren kommen könnte und ob Vektoren (z. B. blutsaugende Insekten) hierbei eine Rolle spielen.

6.2.1 Klonierung und Expression eines RDeV-Expressionsklon

Eine Besonderheit des humanen HDVs ist die Expression zweier Proteine von einem OLR. Dabei wird während der viralen RNA-Replikation das Stopp-Codon des S-HDAg deaminiert, wodurch es letztlich zur Expression eines um 19 AS carboxyterminal verlängerten L-HDAg kommt. Die Schlüsselfunktion des L-HDAg besteht zum einem in dem nuklearen Export und zum anderen in der Verankerung des HDV-RNP an der Membran des ERs, wodurch es mit HBsAg interagieren kann. Letzteres wird durch eine Farnesylierung des Cystein an Position 211 innerhalb der carboxyterminal verlängerten 19 AS des L-HDAg (CxxQ-Motiv) hervorgerufen [76-78]. Analog zu HDV besitzt RDeV weitere 19 AS hinter dem Stopp-Codon des RDeAg, während ein CxxQ-Motiv nicht vorhanden ist (Abbildung 17). RNA-Viren haben jedoch hohe Mutationsraten und RDeV könnte durch zwei Mutationen ein solches Motiv erwerben, wenn es einen

Selektionsvorteil in der weiteren Verbreitung des Virus bietet. Um daher eine mögliche Expression des L-RDeAg zu untersuchen, wurde das RDeV-Genom als 2.0mer in genomischer Orientierung unterhalb eines CMV-Promotors kloniert (Abbildung 18; A). Nach Transfektion in HuH7-Zellen wurde die spezifische S- oder L-RDeAg-Expression durch Immunfluoreszenz mit IgGs von Kaninchen untersucht, die mit synthetischen Peptiden gegen S-RDeAg oder das putative L-RDeAg immunisiert wurden. Als Positivkontrolle dienten S-RDeAg und L-RDeAg Expressionskonstrukte. Dabei konnte das S-RDeAg durch die Peptidantiseren spezifisch nachgewiesen werden, während die Expression des putativen des L-RDeAg (aus dem RDeV-Expressionskonstrukts) durch spezifisches anti-L-RDeAg Peptidantiserum nicht bestätigt werden konnte (Abbildung 18; B). Auch Western Blot Analysen bestätigten die fehlende Expression des putativen L-RDeAg (Abbildung 18; C). Ebenso konnten durch Sequenzierung der RNA aus transfizierten Zellen ausschließlich Sequenzen mit einem Adenin an Position 590 im RDeAg für die RDeV-RNA nachgewiesen werden, woraus stets ein Stopp-Codon resultiert (Abbildung 18; D). All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das RDeV im Gegensatz zu HDV kein zweites Deltaantigen exprimiert. Untermauert werden diese Ergebnisse mit der Tatsache, dass das RDeV in Tieren identifiziert wurde, die keine Anzeichen einer Infektion mit einem Hepadnavirus zeigten [91]. Eine Interaktion von RDeV mit einem Hepadnavirus, ähnlich wie für HDV beschrieben, scheint für die Übertragung des RDeV keine Rolle zu spielen. Im Einklang hierzu konnte auch für SnakeDV, MmonDV und TgDV experimentell gezeigt werden, dass HBsAg nicht in der Lage ist, die Assemblierung und Infektiosität dieser Viren zu unterstützen [92, 96]. Woraufhin sich die Frage ergibt, ob und welche Oberflächenproteine RDeV für die Übertragung verwendet. RDeV wurde in Tieren mit hoher Hepacivirus-Prävalenz identifiziert, dabei wurden von 30 RDeV positiv getesteten Stachelratten insgesamt 26 zusätzlich positiv auf ein Nager-Hepacivirus getestet [91]. Daher die Vermutung nahe, dass das Nager-Hepacivirus ein mögliches Helfervirus des RDeV darstellt. Begünstigt wird diese Hypothese durch eine kürzlich veröffentlichte Studie, in der gezeigt wurde, dass das humane HDV für seine Umhüllung *in vitro* nicht auf HBV beschränkt ist [16]. Neben dem HBsAg des HBV wurden infektiöse HDV-Partikel mit Oberflächenproteinen des Hepatitis-C-Virus (HCV), Vesikulären Stomatitis Virus (VSV), Dengue Virus (DENV), West-Nil-Virus (WNV), Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus (LCMV) und Humanen

Metapneumovirus (HMPV) generiert. Außerdem wurde bereits gezeigt, dass SnakeDV die Oberflächenproteine eines Hartmanvirus (*engl.: Haartman Institute Snake virus-1, HISV-1*), Puumala Virus (PUUV), Junin Virus (JUNV), LCMV und Reptarenavirus (*engl.: University of Giessen virus-1, UGV-1*) nicht aber von HBV für die Produktion infektiöser Partikel *in vitro* nutzen kann [96]. In der oben genannten Studie von Perez-Vargas et al. konnte die HDV-Assemblierung mit VSV-, HBV- und HCV-Oberflächenprotein durch Einsatz des Prenylierungsinhibitors Lonafarnib *in vitro* inhibiert werden [16]. Dies impliziert, dass das Farnesylierungsmotiv CxxQ des L-HDAg auch für die Interaktion des HDV mit den Oberflächenproteinen des HCV vorhanden sein muss. In Kontrast zu HDV fehlt dieses Motiv innerhalb des RDeAg von RDeV, wie auch innerhalb des SnakeDV-Deltaantigens (Abbildung 17). Ebenso wurden in der Studie um Paraskevopoulou et al. neben den 26 Hepacivirus-positiven Tieren, vier der RDeV-positiven Tiere negativ auf eine Hepacivirus-Koinfektion getestet [91]. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die RDeV-Infektion der Stachelratten auch unabhängig von einer Hepacivirus-Infektion zu sein scheint und die Hepacivirus-Infektion der Tiere keinen Einfluss auf die RDeV-Infektion zu haben scheint [91]. Dennoch besteht die Möglichkeit alternativer Hüllungsmechanismen, die die Verwendung von Hepacivirus- oder alternativen viralen Oberflächenproteinen durch RDeV ermöglichen und sollte, ebenso wie alternative Zellaustritts- und Übertragungswege, weiter untersucht werden. Eine weitere wichtige Analyse wäre zudem zu untersuchen, ob es sich bei den bekannten HDV-ähnlichen Viren tatsächlich um umhüllte Virionen handelt und nicht nur um RNP ohne Virushülle. Um Partikel zu separieren, besteht die Möglichkeit der Dichtegradientenzentrifugation. So könnte Serum aus z. B. RDeV-positiven Tieren und als Kontrolle ein HDV-positives Patientenserum einem Caesiumchlorid (CsCl)-Dichtegradienten unterzogen werden. Nach Ultrazentrifugation entstehen Fraktionen mit unterschiedlicher Dichte. Für HDV ist bereits bekannt, dass umhüllte Virionen bei einer Schwebedichte von etwa 1,24 bis 1,25 g/cm³ migrieren [60, 232, 233]. Diese Fraktionen können ferner über Northern Blot und PCR auf RDeV-/HDV-RNA analysiert werden. Darüber hinaus eignen sich Western Blot Analysen, um die Fraktionen auf DAG oder auf Oberflächenproteine der möglicherweise koinfizierenden Viren zu untersuchen. Die RDeV-/HDV-positiven Fraktionen könnten weiterhin auf das Vorhandensein von virusartigen Partikeln mittels Elektronenmikroskopie analysiert

werden. Zur Bestimmung möglicher Oberflächenproteine könnten die Proteine der gereinigten Viren z. B. mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie (*engl.: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI); time of flight (TOF)*) analysiert und bestenfalls identifiziert werden.

6.2.2 Replikation des RDeV in humanen Zellen

Die Entdeckung HDV-ähnlicher Viren lag zu Anfang der Identifikation HDV-ähnlicher RNA-Sequenzen in Transkriptomen in Enten und Schlangen zugrunde [88, 89]. Dabei stellt sich jedoch die Frage, ob es sich bei den entdeckten Sequenzen tatsächlich um autonom-replizierende RNA-Elemente handelt. Um zu untersuchen, ob die HDV-ähnliche RNA-Sequenz aus Stachelratten (RDeV) die Fähigkeit besitzt, eigenständig zu replizieren, wurde eine humane Hepatomzelllinie mit einem Expressionskonstrukt transfiziert, welches ein Dimer des vollständigen RDeV-Genoms in genomischer Orientierung trägt. Im Zuge dieser Methode als Nachweis autonomer RDeV-RNA Replikation, erfolgt die erste Synthese der genomischen RDeV-RNA DNA-abhängig und unter der Kontrolle eines heterologen CMV-Promotors. In dem nachfolgenden Zyklus findet die RNA-abhängige Synthese antigenomischer RDeV-RNA und RDeV-mRNA autonom statt (siehe Kapitel 1.1.2) [56]. Die konstante Synthese beider RDeV-RNA-Replikationsintermediate konnte durch strangspezifische Sonden über einen Zeitraum von 10 Tagen nachgewiesen werden (Abbildung 20; A). Dies zeigt, dass die genomische Replikation eine interne Initiierung der Replikation beinhaltet, da antigenomische RDeV-RNA nicht vom Plasmid transkribiert werden kann. Zudem nimmt die Synthese der genomischen RDeV-RNA über den genannten Zeitraum nicht ab (Abbildung 20; B), was bei einer DNA-abhängigen Synthese der genomischen RDeV-RNA vom Plasmid zu erwarten wäre. Auch die klonale Expansion von RDeV-transfizierten Zellen (in Form von RDeAg-positiven Zellen) bestätigt die autonome Replikation des RDeV und die Fähigkeit in humanen Zellen zu replizieren (Abbildung 20; C). Dabei besteht zudem die Möglichkeit, dass die RDeV-RNA nicht nur während der Mitose an Tochterzellen übertragen wird, wie für HDV bereits beschrieben wurde [86], sondern auch ohne die Anwesenheit eines Helfervirus als reine RNA oder als RNP aus den Zellen in den Überstand abgegeben werden könnte und bereits in diesem Zustand infektiös ist. Dies konnte in dem oben genannten Versuchsaufbau nicht ausgeschlossen werden, da die

erhaltenen Zellkultur-Überstände nicht direkt auf mögliche Infektiosität überprüft wurden. Andererseits müsste es beim Vorhandensein von sekretierter und infektiöser RNA oder RNP im Überstand beim Expansionsversuch nach HDV/RDeV-Plasmid-Transfektion (Abbildung 20) zumindest einige Einzelinfektionsereignisse während den Zellkulturpassagen geben. Dagegen zeigten sich jedoch ausschließlich Cluster an Deltaantigen-positiven Zellen, die eher für eine Zell-Zell-vermittelte Übertragung sprechen, als über sekretierte, infektiöse HDV-RNA oder -RNP.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse des Western Blot, dass die Seren RDeV-positiver Stachelratten Antikörper gegen S-RDeAg enthalten, was darauf hindeutet, dass RDeV eine aktive Immunantwort in Stachelratten hervorruft (Abbildung 19). Dies weist darauf hin, dass es sich bei RDeV um ein exogenes Agens und nicht um ein endogenes Element handelt, da ansonsten eine Reaktion des Immunsystems unter natürlichen Gegebenheiten unwahrscheinlich wäre.

Im Gegensatz dazu konnte bislang noch kein Replikationsnachweis der HDV-ähnlichen RNA-Sequenz aus Enten (AvianDV), der Kröte (ToadDV), der Termiten (TermiteDV), der Fische (FishDV) und des Molches (NewtDV) gezeigt werden. Lediglich Hetzel et al. konnten eine Proteinexpression in Organen derjenigen Schlangen nachweisen, in denen virale Sequenzen des SnakeDV identifiziert wurden [88-90]. Bislang zeigte nur die Arbeit von Szirovicza et al. eine Replikation des SnakeDV in Säugetier- sowie Schlangenzelllinien. Weiterhin wurde die infektiöse Natur des SnakeDV erstmalig gezeigt, indem das SnakeDV die Oberflächenproteine verschiedener Viren für die Produktion infektiöser Partikel nutzen kann [96]. Analog hierzu wurde von den Autoren um M. Iwamoto postuliert, dass auch TgDV und MmonDV in verschiedenen Zelltypen replizieren kann [92]. Hierzu wurde die Expression des jeweiligen Antigens nach Transfektion der Plasmid-basierten Überlängenkonstrukte in humanen und Murmeltier-Zelllinien mittels Immunfluoreszenzfärbung und Western Blot analysiert [92]. Es konnte jedoch bei Verwendung dieser Methode nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Proteinexpression von einem heterologen Promotor des Plasmids ausgeht. In diesen Arbeiten fehlt der sichere Nachweis zur eigenständigen Replikation des TgDV und MmonDV, z. B. durch antigenomische RNA, die während der Replikation transkribiert wird. Zusammengefasst implizieren alle diese Daten, dass die neu identifizierten HDV-ähnlichen Viren, analog zu HDV, in einer

Vielzahl von Zelltypen und Spezies replizieren können [84, 89, 91, 92, 96, 234]. Die Replikation der Deltaviren scheint dabei nicht auf einen bestimmten Zelltyp beschränkt zu sein. Dies würde den Deltaviren einen breiten Wirtsbereich ermöglichen, welcher lediglich durch die Oberflächenproteine möglicher Helferviren eingeschränkt wäre. Die Fähigkeit der Replikation in humanen Zellen und der Nutzung einer Vielzahl viraler Oberflächenproteine, wie für HDV und SnakeDV bereits beschrieben [16, 96], lässt zudem die Möglichkeit einer Zoonose zu, wodurch sich diese ebenfalls in der menschlichen Population verbreiten könnten. Die Übertragungswege und mögliche Helferviren HDV-ähnlicher Viren zu identifizieren, wäre daher von hohem Interesse.

6.3 Kreuzinfektiosität neu entdeckter Orthohepadnaviren

Die präsentierten Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln diskutiert, insbesondere im Hinblick auf die Frage, ob die Nutzung des NTCP innerhalb der beschriebenen neuartigen Hepadnaviren aus Kapuzineraffen (CMHBV), Equiden (EqHBV) und Spitzmäusen (CSHBV und MSHBV) konserviert ist und diese möglicherweise die Speziesbarriere zum Menschen durchbrechen könnten.

Die Interaktion viraler Proteine mit Membranstrukturen der Wirtszelle ist ein entscheidender Schritt der frühen viralen Infektion und ein Hauptfaktor, der Wirts- und Gewebetropismus bzw. artübergreifende Übertragung einschränkt. So wurde 2012 beschrieben, dass NTCP der funktionelle Eintrittsrezeptor für HBV und HDV ist. Dabei wird die virale Bindung über die Interaktion der PräS1-Domäne des LHBs vermittelt [39]. Eine funktionelle HBV-NTCP-Interaktion kann jedoch auch durch Sequenzpolymorphismen im NTCP selbst verhindert werden [39, 197, 235].

Die Ähnlichkeit der PräS1-Domänen von CMHBV, WMHBV und HBV gaben bereits Anlass zu der Vermutung, dass CMHBV nicht nur über den Ntcp der Wirtsgattung (*Sapajus*), sondern auch über den humanen NTCP infizieren kann und somit eine spezies-übergreifende Infektion *in vitro* stattfinden kann (Abbildung 34; B). Durch Peptid-Bindungsanalysen konnte innerhalb dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Oberflächenproteine des CMHBV mit Ntcp verschiedener Primaten, einschließlich des

humanen NTCP interagieren können (Abbildung 34; A). Das CMHBV Myr-PräS1-Peptid zeigten dabei die gleiche Lokalisation (entlang der Plasmamembran) wie für HBV Peptidbindungen beschrieben [195]. Auffallend war hier, dass keine Bindung der Myr-PräS1-Peptide von CMHBV und HBV mit dem Ntcp des Javaneraffens (*Macaca fascicularis*) der alten Welt und des Lisztaffens (*Saguinus oedipus*) der neuen Welt beobachtet wurde (Abbildung 34; A). Da eine Myr-PräS1-Peptidbindung jedoch nicht immer mit der Aufnahme der Viruspartikel einhergeht [236], wurde das Infektionsverhalten der CMHBV-Oberflächenproteine ferner anhand des Surrogatmodells HDV untersucht [211]. CMHBV konnte analog zu HBV verschiedenste NTCP/Ntcp für eine Spezies-übergreifende Infektion *in vitro* verwenden (Abbildung 34; A).

A - HBV relevante Regionen innerhalb der Ntcps ausgewählter Spezies

Spezies	80-90	150-160	170	Spezies	HBV Bindung	HBV Infektion
<i>Homo sapiens</i>	GKVFRLKNI EA	LKDKVPYK GIVISLV LVLIP C		Mensch	ja	ja
<i>Pan troglodytes</i>				Schimpanse	ja	ja
<i>Macaca fascicularis</i>	Q N	GR IL P		Javaneraffe	nein	nein
<i>Saimiri sciureus</i>	Q NK	G M I		Totenkopffaffe	ja	ja
<i>Callithrix jacchus</i>	NK	MR I		Weißbüschelaffe	ja	nein
<i>Saguinus oedipus</i>	L NKT	S M I		Lisztaffe	nein	nein
<i>Sapajus apella</i>	NK	G M I		Haubenkapuziner	ja	ja
<i>Uroderma bilobatum</i>	I Q N T	R N I G M I M I T		Zeltbauende Fledermaus	unb.	unb.
<i>Hipposideros ruber</i>	N	G L I		Rundblat fledermaus	unb.	unb.
<i>Rhinolophus alcyone</i>	I N	E G L I		Hufeisenfledermaus	unb.	unb.
<i>Equus asinus</i>	Q N V	G I I		Hausesel	ja	ja
<i>Sorex araneus</i>	R I K N	M T S I T I V		Rotzahnspitzmaus	ja	ja
<i>Tupaia belangeri</i>	P N	V I		Spitzhörnchen	ja	ja
<i>Marmota monax</i>	Q N	E M M		Waldmurmeltier	ja	ja
<i>Mus musculus</i>	H T S	M L M		Hausmaus	ja	nein

B - NTCP relevante Regionen innerhalb der PräS1-Domäne ausgewählter Hepadnaviren

Virus	essenzielle Domäne NTCP-Bindung AS: 9-15 (HBV)	akzessorische Domänen NTCP-Bindung AS: AS 28-39 und 39-48 (HBV)	Wirt	hNTCP-vermittelte Infektion
HBV Gt D	SNPLGFFPD	ANPD---WDFN---PNKDTW---PDANKV---GA	Mensch	ja
ChHBV	E	N---K---Y---E---	Schimpanse	ja
GoHBV	E	N---N---K---E---V	Gorilla	ja
OuHBV	E	NS---H---E---T---V	Orang-Utan	ja
GiHBV	T	N---N---E---T---V	Gibbon	ja
WMHBV	F---S	GSA---K---P---Q---HDT---AV	Wollaffe	ja
CMHBV	I---S	PAA---Q---H---P---S---HE---PV	Kapuzineraffe	ja
TBHBV	P---L---E	SQE---MSG---GK---P---Q---HQ---	Zeltbauende Fledermaus	ja
RBHBV	P---V---G	TD---ALGPTY---RV---F---D---RE---LRAWARGDPP	Rundblat fledermaus	nein
HBHBV	T---L---G	KDTL---PGWY---D---LAGYG---ERK---LQQWAIKESP	Hufeisenfledermaus	nein
EqHBV	P---L---V	GGGG---HS---IQ---P---Q---KLP---SP	pferdeartige Tiere	nein
MSHBV	GTSY---AAEG	--A---LG---YL---SKINPHQPLENYGT---ARLD---DPNWNP---QQ---MT---	Weißzahnspitzmaus	nein
CSHBV Gt A	GANY---SMDS	---	Rotzahnspitzmaus	nein
CSHBV Gt B	GANY---SMDS	---	Rotzahnspitzmaus	nein
WHV	T---N---	---	Waldmurmeltier	nein

Abbildung 34: Aminosäuresequenzvergleich relevanter Regionen der HBV-NTCP-Interaktion. A)

Relevante Aminosäure-Motive innerhalb des NTCP/Ntcp verschiedener Spezies. Grün hinterlegt sind Aminosäureregionen, welche für die HBV-Bindung und-Infektion von Bedeutung sind. Pfeil: Position 158. Genbank accession numbers: *Pan troglodytes* – XM510035; *Macaca fascicularis* – KT382286; *Saimiri sciureus* – KR153328; *Callithrix jacchus* – KT382285; *Saguinus oedipus* – KT382284 [197]; *Sapajus apella* – unpublished [129]; *Uroderma bilobatum* – unpublished; *Hipposideros ruber* – unpublished; *Rhinolophus alcyone* – unpublished; *Equus asinus* – unpublished [131]; *Sorex araneus* – unpublished [130]; *Tupaia belangeri* – JQ608471; *Marmota monax*; ANS14265; *Mus musculus* – NM001361972. Die bisher unpublizierten Sequenzen wurden von Prof.

Drexler zur Verfügung gestellt. **B)** Relevante Aminosäure-Motive innerhalb der PräS1-Domäne ausgewählter Hepadnaviren. **Gelb** hinterlegte Aminosäuren heben mit NTCP/Ntcp interagierende Domänen der humanen HBV-Gt hervor: Essenzielle Domäne (AS: 9-15) und Akzessorische Domäne 1 (AS: 28-39) und 2 (AS: 39-48). ChHBV – Chimpanzee Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: AB032433); GoHBV – Gorilla Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: AJ131567); OuHBV – Orang-Utan Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: EU155824); GiHBV – Gibbon Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: HQ603061); WMHBV – Woolly Monkey Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: AY226578); CMHBV – Capuchin Monkey Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: NC043528); MSHBV_{clv} – Musk Shrew Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: MK345462); CSHBV – Crowned Shrew Hepatitis-B-Virus Gt A (Genbank accession number: MK345465) und Gt B (Genbank accession number: MK345467) WHV – Woodchuck Hepatitis Virus (Genbank accession number: M18752); EqHBV – Equid Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: MT134313); TBHBV – Tent-making bat Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: KC790379); HBHBV – Horseshoe bat Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: KC790377); RBHBV – Roundleaf bat Hepatitis-B-Virus (Genbank accession number: KC790373).

Die Infektionen konnten zudem mit CMHBV Myr-PräS1-Peptid inhibiert werden, was zeigt, dass diese spezifisch über die jeweiligen Ntcp vermittelt wurden (Abbildung 25). Eine Infektion über den Ntcp des Javaneraffens (*Macaca fascicularis*), des Lisztaffens (*Saguinus oedipus*) und des Weißbüschelaffens (*Callithrix jacchus*) konnte weder für CMHBV- noch für HBV-pseudotypisierte Deltaviren beobachtet werden. Im Jahr 2012 konnten eine Studie um Yan et al. bereits zeigen, dass der Ntcp des Javaneraffens nicht für HBV/HDV empfänglich ist [39]. Über chimäre Expressionskonstrukte des humanen NTCP und des Ntcp der Javaneraffens (*Macaca fascicularis*) konnte zudem die Region identifiziert werden, die für die HBV/HDV Suszeptibilität essenziell ist. Der Austausch der Aminosäuren 157-165 innerhalb des Javaneraffens Ntcps mit der Region des hNTCP reichte aus, um eine Infektion mit HDV sowie mit HBV zu ermöglichen (Yan et al., 2012). Kürzlich wurde beschrieben, dass eine einzige Aminosäure (Position 158) innerhalb des NTCP/Ntcp der Primaten die Suszeptibilität für HBV bestimmt [197, 237]. Ein experimentell erfolgreicher, spezifischer Aminosäureaustausch an Position 158 (R158G) im Ntcp verschiedener Altweltaffen scheint für eine artübergreifende Übertragung von humanem HBV auf Altweltaffen auszureichen [197]. So konnte zwischen HBV-empfindlichen Gruppen der Menschen und Menschenaffen (Aminosäure Glycin (G) an Position 158 des Ntcp/NTCP, 158G) und der nicht-empfindlichen Gruppe der Altweltaffen (Aminosäure Arginin (R) an Position 158 des Ntcp/NTCP, 158R) unterschieden werden [197]. Dies scheint der Grund dafür zu sein, dass in bislang allen untersuchten Spezies der Familie *Cercopithecidae* der Altweltaffen (*Catarrhini*) niemals ein Hepadnavirus entdeckt wurde und steht in Einklang mit den Ergebnissen dieser Doktorarbeit. Dabei konnten weder Infektionen über den Ntcp des Altwelt-Javaneraffens (*Macaca fascicularis*; R158) noch über den Ntcp des Neuwelt-Lisztaffens

(*Saguinus oedipus*; S158) mit Deltaviren pseudotypisiert mit Oberflächenprotein von CMHBV und HBV vermittelt werden. In Übereinstimmung hierzu stehen Analysen der einzig anderen Neuweltaffen-HBV-Spezies aus Wollaffen (*Lagothrix lagotricha*; *Wolly Monkey HBV, WMHBV*) [118]. Studien an WMHBV und WMHBV-pseudotypisierten HDV zeigten, dass WMHBV andere Primaten der Neuen Welt, nicht aber Primaten der Alten Welt *in vivo* und *in vitro* effizient infizieren kann [119, 197, 238]. Interessanterweise konnten die Myr-PräS1-Peptide des CMHBV und des HBV den Ntcp des Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) binden, eine Infektion mit HBV- und CMHBV- pseudotypisierten HDV aber nicht vermittelt werden (Abbildung 34; A) [197]. Wie bereits beschrieben, geht eine Myr-PräS1-Peptidbindung nicht immer mit der Aufnahme der Viruspartikel einher [236]. So wurde bereits in einer Studie gezeigt, dass der Ntcp der Hausmaus (*Mus musculus*) das HBV Myr-PräS1-Peptid bindet, eine Infektion von HBV/HDV jedoch nicht vermittelt werden kann [196, 234]. Eine Substitution der Aminosäuren 84-87 des *Mus musculus* Ntcp (AS 84-87: HLTS) durch die des humanen NTCPs (AS 84-87: RLKN) war dagegen ausreichend, um den viralen Eintritt von HBV/HDV in die Zelle zu ermöglichen [196, 234]. Innerhalb des Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) Ntcp ist ebenfalls ein Glycin an Position 158 vorhanden (Abbildung 34; A). Die Ntcp-Sequenz ähnelt in den bekannten HBV-relevanten Bereichen der des Haubenkapuziners (*Sapajus apella*), welcher eine Infektion mit HBV- und CMHBV- pseudotypisierten HDV vermittelt. Lediglich die Aminosäure 161 unterscheidet sich, während der Ntcp des Haubenkapuziners (*Sapajus apella*) ein Isoleucin aufweist, trägt der Ntcp des Weißbüschelaffen ein Arginin an dieser Position (Abbildung 34; A). Diese Aminosäureposition (161) könnte für die Differenzierung der HBV-Bindung und -Infektion verantwortlich sein und wäre ein interessantes Ziel für weitere Studien. Neben der NTCP/Ntcp-Sequenz können jedoch auch weitere intrazelluläre Prozesse die Infektion einschränken (s.u.).

Die über den humanen NTCP vermittelte Infektion von CMHBV-pseudotypisierten HDVs impliziert darüber hinaus, dass CMHBV ein zoonotisches Potenzial besitzt und humane Hepatozyten infizieren könnte. Analog hierzu konnte bereits gezeigt werden, dass mit WMHBV pseudotypisierte HDV primäre humane Hepatozyten sowie primäre Klammeraffen-Hepatozyten *in vitro* infizieren kann [119]. Zusammenfassend wäre es daher denkbar, dass die bislang bekannten Hepadnaviren aus Neuweltaffen (CMHBV

und WMHBV) beide die Speziesbarriere überschreiten können und über ein für den Menschen zoonotisches Potential verfügen. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass die Untersuchungen in dieser Arbeit mit pseudotypisierten Deltaviren durchgeführt wurden, die nur die Oberflächenproteine der jeweiligen Hepadnaviren trugen. Es sind weitere Speziesbarrieren denkbar, die einen Wirtswechsel von Hepadnaviren noch verhindern könnten. Dazu gehören alle nach der Virus-Rezeptor-Interaktion folgenden intrazellulären Prozesse, wie Kerntransport des Core-Partikels, Kerneintritt und Freisetzung der viralen Nukleinsäure sowie cccDNA-Bildung und nachfolgend die Synthese und Freisetzung des Virus [212]. Ob CMHBV daher tatsächlich menschliche Hepatozyten infizieren und seinen Replikationszyklus abschließen kann, müssen Infektionsversuche mit Viruspartikeln von CMHBV und primären humanen Hepatozyten zeigen.

In Kontrast zu den Hepadnaviren aus Primaten scheinen weder das EqHBV noch Spitzmaus-HBV den NTCP/Ntcp als viralen Rezeptor zur Infektion von Hepatozyten zu nutzen. Eine Interaktion der Myr-PräS1-Peptide von CSHBV, MSHBV und EqHBV konnte weder mit dem hNTCP noch mit dem Spezies-eigenen Ntcp-Orthologen beobachtet werden. Auch konnten die jeweiligen Ntcp-Orthologe der Wirtsspezies keine Infektion von pseudotypisierten HDV vermitteln (Abbildung 34; A). Dies war insbesondere für das EqHBV überraschend, da das EqHBV, im Gegensatz zu den Hepadnaviren der Spitzmäuse, eine konservierte essenzielle NTCP-Bindedomäne besitzt. Gleichzeitig weist es aber eine starke Heterogenität gegenüber primaten HBV, innerhalb der akzessorischen Domänen, auf (Abbildung 34; B). Auch das zoonotische Hepadnavirus der Fledermaus *Uroderma bilobatum* [122], TBHBV, unterscheidet sich innerhalb der akzessorischen Domäne zu anderen NTCP-nutzenden HBVs, ist aber wie CMHBV in 10 der 20 Aminosäuren homolog zu denen des HBV-Gt D (Abbildung 34; B). Die Fledermausviren RBHBV (aus *Hipposideros cf. ruber*) und das nahverwandte HSBHBV (aus *Rhinolophus alcyone*), die hNTCP nicht binden können [122], weisen nur eine Sequenzhomologie von 8 bzw. 5 Aminosäuren auf, während 7 Aminosäuren des EqHBV denen des HBV Gt D3 entsprechen (Abbildung 34; B). In der Studie um Drexler et al. lassen sich außerdem Unterschiede in der Bindungsstärke von Fledermaus-HBV Myr-PräS1-Peptiden und primären humanen Hepatozyten beobachten. Die Infektion von primären humanen Hepatozyten mit HBV wurde umso stärker inhibiert, je höher die

Homologie der PräS1-Domäne mit der HBV-Sequenz war [122]. Um eine NTCP/Ntcp-Interaktion des EqHBVs daher vollständig ausschließen zu können, müssten Versuche mit rekombinanten EqHBV und primären humanen und Eselhepatozyten durchgeführt werden.

Innerhalb der Studie um Rasche et al. wurden neben Esel auch Zebras auf HBV untersucht. Dabei wurde EqHBV auch in fünf Steppenzebras (*Equus quagga*) entdeckt. Die Nukleotid-Divergenz aller isolierten EqHBVs lag jedoch unter 8 % (4,6 %), sodass diese Stämme nach dem Kriterium der ICTV [107] zu einem Gt zusammengefasst wurden. Neben dem hier beschriebenen Isolat aus einem Esel wurden innerhalb der Publikation weitere Analysen mit einem EqHBV-Isolat aus Zebras (Ze-EqHBV) durchgeführt [131]. Interessanterweise konnten psHDV_{Ze-EqHBV} primäre Pferdehepatozyten infizieren, nicht aber Zellkulturen, die hNTCP oder Esel-Ntcp exprimieren [131]. Der Ntcp der Pferde und der Esel ist allerdings innerhalb der postulierten HBV-interagierenden Domänen identisch (Abbildung 35).

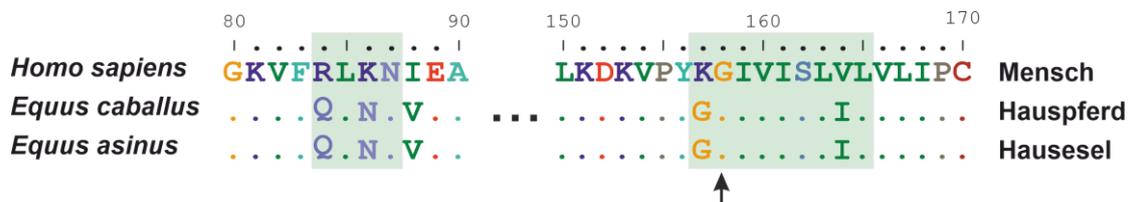


Abbildung 35: Vergleich ausgewählter Aminosäuren des humanen NTCP und Equider Ntcps. Grün hinterlegt sind Aminosäureregionen, welche für die HBV Bindung und Infektion von Bedeutung sind. Genbank accession numbers: *Equus caballus*: XM_001500563; *Equus asinus* – unpublished [131].

Die EqHBV Stämme unterscheiden sich dagegen innerhalb der für HBV postulierten NTCP-interagierenden Domänen in einer Aminosäure (Abbildung 36; Pfeilspitzen). Das EqHBV-Isolat aus dem Esel besitzt an der Position ein Isoleucin, während das Isolat der Zebras das Konstitutionsisomer Leucin an der Stelle aufweist. Die Isolate aus Esel und Zebra unterscheiden sich zusätzlich in 10 weiteren Aminosäuren innerhalb der Oberflächenproteine (Abbildung 36; Pfeile). Diese liegen außerhalb von putativen NTCP-Bindedomänen, was ein Hinweis auf alternative (Ko-)Rezeptoren innerhalb der Hepatozyten sein könnte.



Abbildung 36: EqHBV Aminosäuresequenz-Vergleich des OLRs der viralen Oberflächenproteine. *Farbig hinterlegt sind die Bereiche der NTCP-Bindedomänen humaner HBVs; grün: essenzielle Domäne, gelb: akzessorische Domänen. EqHBV – Equides HBV; Do-EqHBV – Esel Isolat (Genbank accession number: MT134313); Ze-EqHBV – Zebra Isolat (Genbank accession number: MT134320). Pfeil(-spitze): Unterschiede in Aminosäuresequenz.*

Gudima et al. konnten in einer Studie beobachten, dass pseudotypisierte Deltaviren mit Oberflächenprotein des WHVs (*Woodchuck Hepatitis Virus*) aus *Marmota Monax* (Waldmurmeltier) neben den primären Hepatozyten des Waldmurmeltier auch primäre humane Hepatozyten (PHH) infizieren können [239]. Da die Infektion nicht durch das HBV Myr-präS1-Peptid inhibiert werden konnte und eine Bindung des WHV Myr-PräS1-Peptids an (WM)HBV-suszeptible primäre Hepatozyten von Spitzhörnchen (*Tupaia belangeri*) nicht beobachtet werden konnte, wird auch hier ein bisher unbekannter (Ko-)Rezeptor vermutet, der sowohl in Waldmurmeltier als auch in humanen Hepatozyten vorkommt [195, 239, 240]. Um ein zoonotisches Risiko des EqHBV für Menschen, die mit Equiden umgehen, daher vollständig auszuschließen, müssten Versuche mit rekombinantem EqHBV und primären humanen Hepatozyten durchgeführt werden.

Zusammengefasst deuten die Daten darauf hin, dass das EqHBV sowie die Hepadnaviren der Spitzmäuse NTCP/Ntcp nicht als hochaffinen Rezeptor benutzen und sehr wahrscheinlich über einen anderen Rezeptor in die Zellen gelangen und/oder von unbekanntem Ko-Rezeptoren abhängen.

Die Fähigkeit des humanen HBV verschiedene NTCP-Orthologe zu binden und über diese zu infizieren, scheint insbesondere auf die Aminosäuren an Position 87, 158 und 161 innerhalb des jeweiligen NTCP limitiert zu sein (Abbildung 34; A). Sofern weitere Analysen mit rekombinanten HBVs und primären Hepatozyten bestätigen, dass HBV in Hepatozyten aus Kapuzineraffen und Eseln repliziert, könnten diese zudem ein

geeignetes Tiermodell für die Aufklärung der Pathogenese, insbesondere der Chronifizierung, liefern.

Zusammenfassend scheint die Verwendung von NTCP/Ntcp als hochaffinen viralen Rezeptor auf die HBV-Spezies der Primaten beschränkt zu sein. Alle anderen Säugetier-Hepadnaviren scheinen den Leberspezifischen NTCP/Ntcp als viralen Rezeptor nicht zu nutzen. Eine Ausnahme scheint hier das Hepadnavirus TBHBV der Neuweltfledermausvirus *Uroderma bilobatum* zu sein, das zumindest den humanen NTCP zur Infektion von humanen Hepatozyten benutzen kann. Dabei ist derzeit aber unklar, ob TBHBV bei seinem Wirtstier ebenfalls den Ntcp zur Infektion von Hepatozyten benutzt. Es könnten sich daher im Laufe der Evolution der HBV-Infektion alternative Übertragungswege, wie die Nutzung unterschiedlicher zellulärer Rezeptoren oder Korezeptoren, für Spitzmaus-HBVs und die EqHBV entwickelt haben.

7. Zusammenfassung

Eine HDV Infektion bei bereits HBsAg-positiven Patienten (Superinfektion) führt oft zu sehr schweren Verlaufsformen. Neben der Art der HDV-Infektion (Superinfektion oder Koinfektion) können die Krankheitsverläufe auch von den jeweiligen HBV- und HDV-Genotypen (Gt) abhängen. Daher ist es von großer Bedeutung ein besseres Verständnis der HDV-Replikation und der Interaktion mit HBsAg zu erhalten. Innerhalb dieser Arbeit wurde die Verpackungs- und Infektionseffizienz von Isolaten der HDV-Gt 1-4 untersucht. Für die Freisetzung viraler HDV-Partikel zeigte das HBsAg eines Isolats des HBV-Gt B die besten Ergebnisse. Im Gegensatz dazu scheint die Infektiosität der gebildeten viralen HDV-Partikel nicht nur vom HDV-Gt, sondern insbesondere vom HBsAg- sowie vom HDV-Isolat abzuhängen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss exogenen S-HDAg aller HDV-Gt auf die virale Replikation des HDV-Gt 1 analysiert. Die Replikation dreier HDV-Gt 1-Isolate konnte durch das S-HDAg der Gt 3 und 4 in *trans* nicht reaktiviert werden, was für eine Genotyp-spezifische Fähigkeit der *trans*-Komplementation spricht. HDV war für lange Zeit der einzige Vertreter der Deltaviren. Die Charakterisierung des ersten Säugetier-Deltavirus (aus *Proechimys semispinosus*; Rodent Deltavirus, RDeV) war daher von besonderem Interesse. Innerhalb dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass RDeV wie HDV die Fähigkeit besitzt in humanen Zellen zu replizieren, aber im Gegensatz zu HDV während der Replikation kein zweites virales Delta-Antigen exprimiert. Daher scheint eine Interaktion mit den Oberflächenproteinen eines Hepadnavirus (wie bei humanem HDV zur Umhüllung, Sekretion und Infektion essentiell) daher unwahrscheinlich. Ob das RDeV die Oberflächenproteine anderer Helferviren zur Umhüllung, Sekretion und Infektion verwendet, ist momentan weiterhin unklar.

Im Jahre 2012 wurde der Gallensäuretransporter NTCP als ein funktioneller Rezeptor für HBV und HDV identifiziert. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Drexler, Charité, Berlin wurden die Oberflächenproteine neu entdeckter Hepatitis-B-Viren aus Kapuzineraffen (CMHBV), Spitzmäusen (CSHBV, MSHBV) und Equiden (EqHBV) auf die Fähigkeit untersucht, mit NTCP-Orthologen zu interagieren. CMHBV scheint analog zu WMHBV und HBV mit diversen Primaten-Ntcps, einschließlich NTCP des Menschen, zu interagieren und scheint daher, wie WMHBV, über ein zoonotisches

Potential zu verfügen. Das EqHBV und die Spitzmaus-HBVs scheinen dagegen über alternative, bislang noch unbekannte Rezeptoren in ihre Zielzellen zu gelangen. Die Verwendung von NTCP/Ntcp als hochaffiner Eintrittsrezeptor für Hepadnaviren beschränkt sich wohl auf die Familie der Primaten-HBVs und ihrer Wirte. Als bislang einzige Ausnahme ist hierbei das TBHBV der Fledermaus *Uroderma bilobatum* zu nennen, welches zumindest experimentell den humanen NTCP als Rezeptor zur Infektion verwenden kann. Ob TBHBV, oder andere Hepadnaviren der Fledermäuse auch *in vivo* einen Fledermaus-Ntcp zur Übertragung verwenden, ist bislang unklar.

8. Summary

HDV infection in already HBsAg-positive patients (superinfection) often leads to very severe courses of disease. In addition to the type of HDV infection (superinfection or coinfection), the course of the disease may also depend on the respective HBV- and HDV-genotypes (Gt). Therefore, it is of importance to gain a better understanding of HDV replication and its interaction with HBsAg. In this work, the packaging and infection efficiency of isolates of HDV-Gt 1-4 was investigated. HBsAg of a HBV-Gt B isolate showed the best results for the release of viral HDV-particles. In contrast, the infectivity of the formed viral HDV-particles seems to depend not only on the HDV-Gt, but in particular on the HBsAg- as well as the HDV-isolate. In this work, the effect of exogenous S-HDAg of all HDV-Gt on viral replication of HDV-Gt 1 was analyzed. Replication of three HDV-Gt 1 isolates could not be reactivated by S-HDAg of Gt 3 and 4 in *trans*, suggesting a genotype-specific ability of *trans*-complementation. HDV has long been the sole representative of the deltaviruses. Therefore, the characterization of the first mammalian deltavirus (from *Proechimys semispinosus*; Rodent deltavirus, RDeV) was of particular interest. This work demonstrated for the first time that RDeV, like HDV, has the ability to replicate in human cells but, unlike HDV, does not express a second viral delta antigen during replication. Therefore, interaction with the surface proteins of a hepadnavirus (for envelopment, secretion, and infection, as it is known for HDV) seems unlikely. Whether RDeV uses the surface proteins of other helper viruses for envelopment, secretion, and infection remains unclear.

In 2012, NTCP was identified as a functional receptor for HBV and HDV. In collaboration with Prof. Drexler's group at Charité, Berlin, the surface proteins of newly discovered hepatitis B viruses from capuchin monkeys (CMHBV), shrews (CSHBV, MSHBV) and equids (EqHBV) were investigated for their ability to interact with NTCP-orthologs. CMHBV appears to interact with several primate Ntcps, including the human NTCP, in a manner similar to WMHBV and HBV, and thus, like WMHBV, appears to have zoonotic potential. In contrast, EqHBV and shrew HBV appear to reach their target cells via alternative, still unknown receptors. The use of NTCP/Ntcp as a high-affinity entry receptor for hepadnaviruses appears to be limited to the primate HBV family and their hosts. The only exception so far is the TBHBV of the bat *Uroderma bilobatum*, which,

SUMMARY

at least experimentally, can use the human NTCP as a receptor for infection. Whether TBHBV or other bat hepadnaviruses also use a bat Ntcp for transmission *in vivo* is still unclear.

9. Literaturverzeichnis

1. WHO, *Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021. Accountability for the global health sector strategies 2016–2021: actions for impact.* 2021, World Health Organization: Geneva.
2. Chen, H.Y., D.T. Shen, D.Z. Ji, P.C. Han, W.M. Zhang, J.F. Ma, W.S. Chen, H. Goyal, S. Pan, and H.G. Xu, *Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis.* Gut, 2019. **68**(3): p. 512-521.
3. Wedemeyer, H. and F. Negro, *Devil hepatitis D: an orphan disease or largely underdiagnosed?* Gut, 2019. **68**(3): p. 381-382.
4. Farci, P., *Delta hepatitis: an update.* J Hepatol, 2003. **39** Suppl 1: p. S212-9.
5. Stockdale, A.J., B. Kreuels, M.Y.R. Henrion, E. Giorgi, I. Kyomuhangi, C. de Martel, Y. Hutin, and A.M. Geretti, *The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis.* J Hepatol, 2020. **73**(3): p. 523-532.
6. Papatheodoridi, M. and G.V. Papatheodoridis, *Is hepatitis delta underestimated?* Liver Int, 2021. **41** Suppl 1: p. 38-44.
7. Farci, P. and G.A. Niro, *Clinical features of hepatitis D.* Semin Liver Dis, 2012. **32**(3): p. 228-36.
8. Kang, C. and Y.Y. Syed, *Bulevirtide: First Approval.* Drugs, 2020. **80**(15): p. 1601-1605.
9. Wedemeyer, H., C. Yurdaydin, G.N. Dalekos, A. Erhardt, Y. Cakaloglu, H. Degertekin, S. Gurel, S. Zeuzem, K. Zachou, H. Bozkaya, A. Koch, T. Bock, H.P. Dienes, M.P. Manns, and H.S. Group, *Peginterferon plus adefovir versus either drug alone for hepatitis delta.* N Engl J Med, 2011. **364**(4): p. 322-31.
10. Deterding, K. and H. Wedemeyer, *Beyond Pegylated Interferon-Alpha: New Treatments for Hepatitis Delta.* AIDS Rev, 2019. **21**(3): p. 126-134.
11. Rizzetto, M., B. Hoyer, M.G. Canese, J.W. Shih, R.H. Purcell, and J.L. Gerin, *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.
12. Rizzetto, M., M.G. Canese, S. Arico, O. Crivelli, C. Trepo, F. Bonino, and G. Verme, *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.
13. Rizzetto, M., M.G. Canese, J.L. Gerin, W.T. London, D.L. Sly, and R.H. Purcell, *Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees.* J Infect Dis, 1980. **141**(5): p. 590-602.
14. Magnus, L., J. Taylor, W.S. Mason, C. Sureau, P. Deny, H. Norder, and C. Ictv Report, *ICTV Virus Taxonomy Profile: Deltavirus.* J Gen Virol, 2018. **99**(12): p. 1565-1566.
15. King, A.M., E. Lefkowitz, M.J. Adams, and E.B. Carstens, *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Vol. 9. 2012: Elsevier.
16. Perez-Vargas, J., F. Amirache, B. Boson, C. Mialon, N. Freitas, C. Sureau, F. Fusil, and F.L. Cosset, *Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo.* Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 2098.
17. Ryu, W.S., H.J. Netter, M. Bayer, and J. Taylor, *Ribonucleoprotein complexes of hepatitis delta virus.* Journal of Virology, 1993. **67**(6): p. 3281-3287.
18. Dingle, K., G. Moraleda, V. Bichko, and J. Taylor, *Electrophoretic analysis of the ribonucleoproteins of hepatitis delta virus.* J Virol Methods, 1998. **75**(2): p. 199-204.
19. Gudima, S., J. Chang, G. Moraleda, A. Azvolinsky, and J. Taylor, *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.
20. Kos, A., R. Dijkema, A.C. Arnberg, P.H. van der Meide, and H. Schellekens, *The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA.* Nature, 1986. **323**(6088): p. 558-60.
21. Wang, K.S., Q.L. Choo, A.J. Weiner, J.H. Ou, R.C. Najarian, R.M. Thayer, G.T. Mullenbach, K.J. Denniston, J.L. Gerin, and M. Houghton, *Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome.* Nature, 1986. **323**(6088): p. 508-14.
22. Weiner, A.J., Q.L. Choo, K.S. Wang, S. Govindarajan, A.G. Redeker, J.L. Gerin, and M. Houghton, *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.
23. Glebe, D. and C.M. Bremer, *The molecular virology of hepatitis B virus.* Semin Liver Dis, 2013. **33**(2): p. 103-12.
24. Le Gal, F., E. Gault, M.P. Ripault, J. Serpaggi, J.C. Trinchet, E. Gordien, and P. Deny, *Eighth major clade for hepatitis delta virus.* Emerg Infect Dis, 2006. **12**(9): p. 1447-50.
25. Le Gal, F., S. Brichtler, T. Drugan, C. Alloui, D. Roulot, J.M. Pawlotsky, P. Deny, and E. Gordien, *Genetic diversity and worldwide distribution of the deltavirus genus: A study of 2,152 clinical strains.* Hepatology, 2017. **66**(6): p. 1826-1841.
26. Deny, P., *Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades?* Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **307**: p. 151-71.
27. Su, C.W., Y.H. Huang, T.I. Huo, H.H. Shih, I.J. Sheen, S.W. Chen, P.C. Lee, S.D. Lee, and J.C. Wu, *Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients.* Gastroenterology, 2006. **130**(6): p. 1625-35.

28. Wu, J.C., K.B. Choo, C.M. Chen, T.Z. Chen, T.I. Huo, and S.D. Lee, *Genotyping of hepatitis D virus by restriction-fragment length polymorphism and relation to outcome of hepatitis D*. *Lancet*, 1995. **346**(8980): p. 939-41.
29. Casey, J.L., T.L. Brown, E.J. Colan, F.S. Wignall, and J.L. Gerin, *A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(19): p. 9016-20.
30. Watanabe, H., K. Nagayama, N. Enomoto, R. Chinzei, T. Yamashiro, N. Izumi, H. Yatsushashi, T. Nakano, B.H. Robertson, H. Nakasone, H. Sakugawa, and M. Watanabe, *Chronic hepatitis delta virus infection with genotype IIb variant is correlated with progressive liver disease*. *J Gen Virol*, 2003. **84**(Pt 12): p. 3275-3289.
31. Spaan, M., I. Carey, M. Bruce, D. Shang, M. Horner, G. Dusheiko, and K. Agarwal, *Hepatitis delta genotype 5 is associated with favourable disease outcome and better response to treatment compared to genotype 1*. *J Hepatol*, 2020. **72**(6): p. 1097-1104.
32. Qiao, L. and G.G. Luo, *Human apolipoprotein E promotes hepatitis B virus infection and production*. *PLoS Pathog*, 2019. **15**(8): p. e1007874.
33. Esser, K., J. Lucifora, J. Wettengel, K. Singethan, A. Glinzer, A. Zerneck, and U. Protzer, *Lipase inhibitor orlistat prevents hepatitis B virus infection by targeting an early step in the virus life cycle*. *Antiviral Res*, 2018. **151**: p. 4-7.
34. 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.
35. Verrier, E.R., C.C. Colpitts, C. Bach, L. Heydmann, A. Weiss, M. Renaud, S.C. Durand, F. Habersetzer, D. Durantel, G. Abou-Jaoude, M.M. Lopez Ledesma, D.J. Felmler, M. Soumillon, T. Croonenborghs, N. Pochet, M. Nassal, C. Schuster, L. Brino, C. Sureau, M.B. Zeisel, and T.F. Baumert, *A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses*. *Hepatology*, 2016. **63**(1): p. 35-48.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. Yan, H., G. Zhong, G. Xu, W. He, Z. Jing, Z. Gao, Y. Huang, Y. Qi, B. Peng, H. Wang, L. Fu, M. Song, P. Chen, W. Gao, B. Ren, Y. Sun, T. Cai, X. Feng, J. Sui, and W. Li, *Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus*. *Elife*, 2012. **3**.
40. Iwamoto, M., W. Saso, R. Sugiyama, K. Ishii, M. Ohki, S. Nagamori, R. Suzuki, H. Aizaki, A. Ryo, J.H. Yun, S.Y. Park, N. Ohtani, M. Muramatsu, S. Iwami, Y. Tanaka, C. Sureau, T. Wakita, and K. Watashi, *Epidermal growth factor receptor is a host-entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019. **116**(17): p. 8487-8492.
41. Iwamoto, M., W. Saso, K. Nishioka, H. Ohashi, R. Sugiyama, A. Ryo, M. Ohki, J.H. Yun, S.Y. Park, T. Ohshima, R. Suzuki, H. Aizaki, M. Muramatsu, T. Matano, S. Iwami, C. Sureau, T. Wakita, and K. Watashi, *The machinery for endocytosis of epidermal growth factor receptor coordinates the transport of incoming hepatitis B virus to the endosomal network*. *J Biol Chem*, 2020. **295**(3): p. 800-807.
42. Herrscher, C., F. Pastor, J. Burlaud-Gaillard, A. Dumans, F. Seigneuret, A. Moreau, R. Patient, S. Eymieux, H. de Rocquigny, C. Hourieux, P. Roingeard, and E. Blanchard, *Hepatitis B virus entry into HepG2-NTCP cells requires clathrin-mediated endocytosis*. *Cell Microbiol*, 2020. **22**(8): p. e13205.
43. 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.
44. Chou, H.C., T.Y. Hsieh, G.T. Sheu, and M.M. Lai, *Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA*. *J Virol*, 1998. **72**(5): p. 3684-90.
45. Tavanez, J.P., C. Cunha, M.C. Silva, E. David, J. Monjardino, and M. Carmo-Fonseca, *Hepatitis delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm*. *RNA*, 2002. **8**(5): p. 637-46.
46. Sureau, C. and F. Negro, *The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis*. *J Hepatol*, 2016. **64**(1 Suppl): p. S102-S116.
47. Branch, A.D. and H.D. Robertson, *A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's*. *Science*, 1984. **223**(4635): p. 450-5.
48. Filipovska, J. and M.M. Konarska, *Specific HDV RNA-templated transcription by pol II in vitro*. *RNA*, 2000. **6**(1): p. 41-54.
49. Kuo, M.Y., L. Sharmeen, G. Dinter-Gottlieb, and J. Taylor, *Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus*. *J Virol*, 1988. **62**(12): p. 4439-44.
50. Sharmeen, L., M.Y. Kuo, G. Dinter-Gottlieb, and J. Taylor, *Antigenomic RNA of human hepatitis delta virus can undergo self-cleavage*. *J Virol*, 1988. **62**(8): p. 2674-9.
51. Sharmeen, L., M.Y. Kuo, and J. Taylor, *Self-ligating RNA sequences on the antigenome of human hepatitis delta virus*. *J Virol*, 1989. **63**(3): p. 1428-30.
52. Reid, C.E. and D.W. Lazinski, *A host-specific function is required for ligation of a wide variety of ribozyme-processed RNAs*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(1): p. 424-9.
53. Lucifora, J. and M. Delphin, *Current knowledge on Hepatitis Delta Virus replication*. *Antiviral Res*, 2020. **179**: p. 104812.
54. Wu, H.N., Y.J. Lin, F.P. Lin, S. Makino, M.F. Chang, and M.M. Lai, *Human hepatitis delta virus RNA subfragments contain an autocleavage activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(6): p. 1831-5.

55. Harichandran, K., Y. Shen, S. Stephenson Tsoris, S.C. Lee, and J.L. Casey, *Hepatitis Delta Antigen Regulates mRNA and Antigenome RNA Levels during Hepatitis Delta Virus Replication*. J Virol, 2019. **93**(8).
56. Kuo, M.Y., M. Chao, and J. Taylor, *Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: role of delta antigen*. J Virol, 1989. **63**(5): p. 1945-50.
57. Chao, M., S.Y. Hsieh, and J. Taylor, *Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication*. J Virol, 1990. **64**(10): p. 5066-9.
58. Glenn, J.S. and J.M. White, *trans-dominant inhibition of human hepatitis delta virus genome replication*. J Virol, 1991. **65**(5): p. 2357-61.
59. Modahl, L.E. and M.M. Lai, *The large delta antigen of hepatitis delta virus potently inhibits genomic but not antigenomic RNA synthesis: a mechanism enabling initiation of viral replication*. J Virol, 2000. **74**(16): p. 7375-80.
60. Chang, F.L., P.J. Chen, S.J. Tu, C.J. Wang, and D.S. Chen, *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.
61. Luo, G.X., M. Chao, S.Y. Hsieh, C. Sureau, K. Nishikura, and J. Taylor, *A specific base transition occurs on replicating hepatitis delta virus RNA*. J Virol, 1990. **64**(3): p. 1021-7.
62. 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.
63. 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.
64. Alves, C., H. Cheng, H. Roder, and J. Taylor, *Intrinsic disorder and oligomerization of the hepatitis delta virus antigen*. Virology, 2010. **407**(2): p. 333-40.
65. Cornillez-Ty, C.T. and D.W. Lazinski, *Determination of the multimerization state of the hepatitis delta virus antigens in vivo*. J Virol, 2003. **77**(19): p. 10314-26.
66. Zuccola, H.J., J.E. Rozzelle, S.M. Lemon, B.W. Erickson, and J.M. Hogle, *Structural basis of the oligomerization of hepatitis delta antigen*. Structure, 1998. **6**(7): p. 821-30.
67. Defenbaugh, D.A., M. Johnson, R. Chen, Y.Y. Zheng, and J.L. Casey, *Hepatitis delta antigen requires a minimum length of the hepatitis delta virus unbranched rod RNA structure for binding*. J Virol, 2009. **83**(9): p. 4548-56.
68. 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.
69. Wang, J.G. and S.M. Lemon, *Hepatitis delta virus antigen forms dimers and multimeric complexes in vivo*. J Virol, 1993. **67**(1): p. 446-54.
70. Xia, Y.P. and M.M. Lai, *Oligomerization of hepatitis delta antigen is required for both the trans-activating and trans-dominant inhibitory activities of the delta antigen*. J Virol, 1992. **66**(11): p. 6641-8.
71. Wang, C.C., T.C. Chang, C.W. Lin, H.L. Tsui, P.B. Chu, B.S. Chen, Z.S. Huang, and H.N. Wu, *Nucleic acid binding properties of the nucleic acid chaperone domain of hepatitis delta antigen*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(22): p. 6481-92.
72. Poisson, F., P. Roingard, A. Baillou, F. Dubois, F. Bonelli, R.A. Calogero, and A. Goudeau, *Characterization of RNA-binding domains of hepatitis delta antigen*. J Gen Virol, 1993. **74** (Pt 11): p. 2473-8.
73. Daigh, L.H., B.L. Griffin, A. Soroush, M.R. Mamedov, and J.L. Casey, *Arginine-rich motifs are not required for hepatitis delta virus RNA binding activity of the hepatitis delta antigen*. J Virol, 2013. **87**(15): p. 8665-74.
74. Lee, C.H., S.C. Chang, C.H. Wu, and M.F. Chang, *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.
75. Macnaughton, T.B. and M.M. Lai, *Genomic but not antigenomic hepatitis delta virus RNA is preferentially exported from the nucleus immediately after synthesis and processing*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 3928-35.
76. Glenn, J.S., J.A. Watson, C.M. Havel, and J.M. White, *Identification of a prenylation site in delta virus large antigen*. Science, 1992. **256**(5061): p. 1331-3.
77. O'Malley, B. and D.W. Lazinski, *Roles of carboxyl-terminal and farnesylated residues in the functions of the large hepatitis delta antigen*. J Virol, 2005. **79**(2): p. 1142-53.
78. Otto, J.C. and P.J. Casey, *The hepatitis delta virus large antigen is farnesylated both in vitro and in animal cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(9): p. 4569-72.
79. 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.
80. Huang, C., S.C. Chang, H.C. Yang, C.L. Chien, and M.F. Chang, *Clathrin-mediated post-Golgi membrane trafficking in the morphogenesis of hepatitis delta virus*. J Virol, 2009. **83**(23): p. 12314-24.
81. Huang, C., S.C. Chang, I.C. Yu, Y.G. Tsay, and M.F. Chang, *Large hepatitis delta antigen is a novel clathrin adaptor-like protein*. J Virol, 2007. **81**(11): p. 5985-94.
82. Wang, Y.C., C.R. Huang, M. Chao, and S.J. Lo, *The C-terminal sequence of the large hepatitis delta antigen is variable but retains the ability to bind clathrin*. Virol J, 2009. **6**: p. 31.
83. Bichko, V., H.J. Netter, and J. Taylor, *Introduction of hepatitis delta virus into animal cell lines via cationic liposomes*. J Virol, 1994. **68**(8): p. 5247-52.
84. Polo, J.M., K.S. Jeng, B. Lim, S. Govindarajan, F. Hofman, F. Sangiorgi, and M.M. Lai, *Transgenic mice support replication of hepatitis delta virus RNA in multiple tissues, particularly in skeletal muscle*. J Virol, 1995. **69**(8): p. 4880-7.
85. Chang, J., S.O. Gudima, C. Tarn, X. Nie, and J.M. Taylor, *Development of a novel system to study hepatitis delta virus genome replication*. J Virol, 2005. **79**(13): p. 8182-8.

86. Giersch, K., O.D. Bhadra, T. Volz, L. Allweiss, K. Riecken, B. Fehse, A.W. Lohse, J. Petersen, C. Sureau, S. Urban, M. Dandri, and M. Lutgehetmann, *Hepatitis delta virus persists during liver regeneration and is amplified through cell division both in vitro and in vivo*. Gut, 2019. **68**(1): p. 150-157.
87. Giersch, K., M. Helbig, T. Volz, L. Allweiss, L.V. Mancke, A.W. Lohse, S. Polywka, J.M. Pollok, J. Petersen, J. Taylor, M. Dandri, and M. Lutgehetmann, *Persistent hepatitis D virus mono-infection in humanized mice is efficiently converted by hepatitis B virus to a productive co-infection*. J Hepatol, 2014. **60**(3): p. 538-44.
88. Wille, M., H.J. Netter, M. Littlejohn, L. Yuen, M. Shi, J.S. Eden, M. Klaassen, E.C. Holmes, and A.C. Hurt, *A Divergent Hepatitis D-Like Agent in Birds*. Viruses, 2018. **10**(12).
89. Hetzel, U., L. Szivovicza, T. Smura, B. Prahauer, O. Vapalahti, A. Kipar, and J. Hepojoki, *Identification of a Novel Deltavirus in Boa Constrictors*. mBio, 2019. **10**(2).
90. Chang, W.S., J.H. Pettersson, C. Le Lay, M. Shi, N. Lo, M. Wille, J.S. Eden, and E.C. Holmes, *Novel hepatitis D-like agents in vertebrates and invertebrates*. Virus Evol, 2019. **5**(2): p. vez021.
91. Paraskevopoulou, S., F. Pirzer, N. Goldmann, J. Schmid, V.M. Corman, L.T. Gottula, S. Schroeder, A. Rasche, D. Muth, J.F. Drexler, A.C. Heni, G.J. Eibner, R.A. Page, T.C. Jones, M.A. Mueller, S. Sommer, D. Glebe, and C. Drosten, *Mammalian deltavirus without hepadnavirus coinfection in the neotropical rodent Proechimys semispinosus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(30): p. 17977-17983.
92. Iwamoto, M., Y. Shibata, J. Kawasaki, S. Kojima, Y.T. Li, S. Iwami, M. Muramatsu, H.L. Wu, K. Wada, K. Tomonaga, K. Watashi, and M. Horie, *Identification of novel avian and mammalian deltaviruses provides new insights into deltavirus evolution*. Virus Evol, 2021. **7**(1): p. veab003.
93. Bergner, L.M., R.J. Orton, A. Broos, C. Tello, D.J. Becker, J.E. Carrera, A.H. Patel, R. Biek, and D.G. Streicker, *Diversification of mammalian deltaviruses by host shifting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(3).
94. Perez-Vargas, J., R. Pereira de Oliveira, S. Jacquet, D. Pontier, F.L. Cosset, and N. Freitas, *HDV-Like Viruses*. Viruses, 2021. **13**(7).
95. de la Pena, M., R. Ceprian, J.L. Casey, and A. Cervera, *Hepatitis delta virus-like circular RNAs from diverse metazoans encode conserved hammerhead ribozymes*. Virus Evol, 2021. **7**(1): p. veab016.
96. Szivovicza, L., U. Hetzel, A. Kipar, L. Martinez-Sobrido, O. Vapalahti, and J. Hepojoki, *Snake Deltavirus Utilizes Envelope Proteins of Different Viruses To Generate Infectious Particles*. mBio, 2020. **11**(2).
97. Block, T.M., H.J. Alter, W.T. London, and M. Bray, *A historical perspective on the discovery and elucidation of the hepatitis B virus*. Antiviral Res, 2016. **131**: p. 109-23.
98. Schmid, R., *History of viral hepatitis: a tale of dogmas and misinterpretations*. J Gastroenterol Hepatol, 2001. **16**(7): p. 718-22.
99. McDonald, S., *Acute yellow atrophy*. Edinb Med J, 1908. **15**: p. 208.
100. Anonym, *Homologous Serum Hepatitis*. The Lancet, 1947. **2**(6480): p. 691-692.
101. Alter, H., *Baruch Blumberg (1925-2011)*. Nature, 2011. **473**(7346): p. 155.
102. Blumberg, B.S., H.J. Alter, and S. Visnich, *A "New" Antigen in Leukemia Sera*. JAMA, 1965. **191**: p. 541-8.
103. 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.
104. Kaplan, P.M., R.L. Greenman, J.L. Gerin, R.H. Purcell, and W.S. Robinson, *DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen*. J Virol, 1973. **12**(5): p. 995-1005.
105. 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.
106. 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.
107. Magnius, L., W.S. Mason, J. Taylor, M. Kann, D. Glebe, P. Deny, C. Sureau, H. Norder, and C. Ictv Report, *ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepadnaviridae*. J Gen Virol, 2020. **101**(6): p. 571-572.
108. Kramvis, A., *Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus*. Intervirology, 2014. **57**(3-4): p. 141-50.
109. Velkov, S., J.J. Ott, U. Protzer, and T. Michler, *The Global Hepatitis B Virus Genotype Distribution Approximated from Available Genotyping Data*. Genes (Basel), 2018. **9**(10).
110. Tatematsu, K., Y. Tanaka, F. Kurbanov, F. Sugauchi, S. Mano, T. Maeshiro, T. Nakayoshi, M. Wakuta, Y. Miyakawa, and M. Mizokami, *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.
111. Vaudin, M., A.J. Wolstenholme, K.N. Tsiquaye, A.J. Zuckerman, and T.J. Harrison, *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.
112. Zuckerman, A.J., A. Thornton, C.R. Howard, K.N. Tsiquaye, D.M. Jones, and M.R. Brambell, *Hepatitis B outbreak among chimpanzees at the London Zoo*. Lancet, 1978. **2**(8091): p. 652-4.
113. Grethe, S., J.O. Heckel, W. Rietschel, and F.T. Hufert, *Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates*. J Virol, 2000. **74**(11): p. 5377-81.
114. Warren, K.S., J.L. Heeney, R.A. Swan, Heriyanto, and E.J. Verschoor, *A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (Pongo pygmaeus)*. J Virol, 1999. **73**(9): p. 7860-5.
115. Norder, H., J.W. Ebert, H.A. Fields, I.K. Mushahwar, and L.O. Magnius, *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.

116. Vartanian, J.P., P. Pineau, M. Henry, W.D. Hamilton, M.N. Muller, R.W. Wrangham, and S. Wain-Hobson, *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.
117. Njouom, R., S.A. Mba, E. Nerrienet, Y. Foupouapouognigni, and D. Rousset, *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.
118. Lanford, R.E., D. Chavez, K.M. Brasky, R.B. Burns, 3rd, and R. Rico-Hesse, *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.
119. Barrera, A., B. Guerra, H. Lee, and R.E. Lanford, *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.
120. He, B., Q. Fan, F. Yang, T. Hu, W. Qiu, Y. Feng, Z. Li, Y. Li, F. Zhang, H. Guo, X. Zou, and C. Tu, *Hepatitis virus in long-fingered bats, Myanmar*. Emerg Infect Dis, 2013. **19**(4): p. 638-40.
121. He, B., F. Zhang, L. Xia, T. Hu, G. Chen, W. Qiu, Q. Fan, Y. Feng, H. Guo, and C. Tu, *Identification of a novel Orthohepadnavirus in pomona roundleaf bats in China*. Arch Virol, 2015. **160**(1): p. 335-7.
122. Drexler, J.F., A. Geipel, A. Koenig, V.M. Corman, D. van Riel, L.M. Leijten, C.M. Bremer, A. Rasche, V.M. Cottontail, G.D. Maganga, M. Schlegel, M.A. Mueller, A. Adam, S.M. Klose, A.J. Carneiro, A. Stocker, C.R. Franke, F. Gloza-Rausch, J. Geyer, A. Annan, Y. Adu-Sarkodie, S. Oppong, T. Binger, P. Vallo, M. Tschapka, R.G. Ulrich, W.H. Gerlich, E. Leroy, T. Kuiken, D. Glebe, and C. Drosten, *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.
123. Marion, P.L., L.S. Oshiro, D.C. Regnery, G.H. Scullard, and W.S. Robinson, *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.
124. Testut, P., C.A. Renard, O. Terradillos, L. Vitvitski-Trepo, F. Tekaia, C. Degott, J. Blake, B. Boyer, and M.A. Buendia, *A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska*. J Virol, 1996. **70**(7): p. 4210-9.
125. 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.
126. Aghazadeh, M., M. Shi, V.R. Barrs, A.J. McLuckie, S.A. Lindsay, B. Jameson, B. Hampson, E.C. Holmes, and J.A. Beatty, *A Novel Hepadnavirus Identified in an Immunocompromised Domestic Cat in Australia*. Viruses, 2018. **10**(5).
127. Gogarten, J.F., M. Ulrich, N. Bhuvu, J. Garcia, K. Jain, B. Lee, T. Lohrich, A. Oleynik, E. Couacy-Hymann, T. Fuh Neba, N. Mishra, T. Briese, S. Calvignac-Spencer, W.I. Lipkin, and F.H. Leendertz, *A Novel Orthohepadnavirus Identified in a Dead Maxwell's Duiker (Philantomba maxwellii) in Tai National Park, Cote d'Ivoire*. Viruses, 2019. **11**(3).
128. Nie, F.Y., J.H. Tian, X.D. Lin, B. Yu, J.G. Xing, J.H. Cao, E.C. Holmes, R.Z. Ma, and Y.Z. Zhang, *Discovery of a highly divergent hepadnavirus in shrews from China*. Virology, 2019. **531**: p. 162-170.
129. de Carvalho Dominguez Souza, B.F., A. Koenig, A. Rasche, I. de Oliveira Carneiro, N. Stephan, V.M. Corman, P.L. Roppert, N. Goldmann, R. Kepper, S.F. Mueller, C. Volker, A.J.S. de Souza, M.S. Gomes-Gouvea, A. Moreira-Soto, A. Stocker, M. Nassal, C.R. Franke, J.R. Rebello Pinho, M. Soares, J. Geyer, P. Lemey, C. Drosten, E.M. Netto, D. Glebe, and J.F. Drexler, *A novel hepatitis B virus species discovered in capuchin monkeys sheds new light on the evolution of primate hepadnaviruses*. J Hepatol, 2018. **68**(6): p. 1114-1122.
130. Rasche, A., F. Lehmann, A. Koenig, N. Goldmann, V.M. Corman, A. Moreira-Soto, A. Geipel, D. van Riel, Y.A. Vakulenko, A.L. Sander, H. Niekamp, R. Kepper, M. Schlegel, C. Akoua-Koffi, B. Souza, F. Sahr, A. Olayemi, V. Schulze, R. Petraityte-Burneckiene, A. Kazaks, K.A.A.T. Lowjaga, J. Geyer, T. Kuiken, C. Drosten, A.N. Lukashov, E. Fichet-Calvet, R.G. Ulrich, D. Glebe, and J.F. Drexler, *Highly diversified shrew hepatitis B viruses corroborate ancient origins and divergent infection patterns of mammalian hepadnaviruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(34): p. 17007-17012.
131. Rasche, A., F. Lehmann, N. Goldmann, M. Nagel, A. Moreira-Soto, D. Nobach, I. de Oliveira Carneiro, N. Osterrieder, A.D. Greenwood, E. Steinmann, A.N. Lukashov, G. Schuler, D. Glebe, J.F. Drexler, and H.B.V.C. Equid, *A hepatitis B virus causes chronic infections in equids worldwide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(13).
132. Seitz, S., S. Urban, C. Antoni, and B. Bottcher, *Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions*. EMBO J, 2007. **26**(18): p. 4160-7.
133. Crowther, R.A., N.A. Kiselev, B. Bottcher, J.A. Berriman, G.P. Borisova, V. Ose, and P. Pumpens, *Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy*. Cell, 1994. **77**(6): p. 943-50.
134. 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.
135. Gerin, J.L., E.C. Ford, and R.H. Purcell, *Biochemical characterization of Australia antigen. Evidence for defective particles of hepatitis B virus*. Am J Pathol, 1975. **81**(3): p. 651-68.
136. Chai, N., H.E. Chang, E. Nicolas, Z. Han, M. Jarnik, and J. Taylor, *Properties of subviral particles of hepatitis B virus*. J Virol, 2008. **82**(16): p. 7812-7.
137. Gerlich, W.H. and W.S. Robinson, *Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand*. Cell, 1980. **21**(3): p. 801-9.
138. Wang, G.H. and C. Seeger, *The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis*. Cell, 1992. **71**(4): p. 663-70.
139. Lucifora, J., S. Arzberger, D. Durantel, L. Belloni, M. Strubin, M. Levrero, F. Zoulim, O. Hantz, and U. Protzer, *Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection*. J Hepatol, 2011. **55**(5): p. 996-1003.
140. Singh, P., D. Kairuz, P. Arbuthnot, and K. Bloom, *Silencing hepatitis B virus covalently closed circular DNA: The potential of an epigenetic therapy approach*. World J Gastroenterol, 2021. **27**(23): p. 3182-3207.

141. Xie, Q., L. Chen, X. Shan, X. Shan, J. Tang, F. Zhou, Q. Chen, H. Quan, D. Nie, W. Zhang, A.L. Huang, and N. Tang, *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.
142. Kew, M.C., *Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011. **26 Suppl 1**: p. 144-52.
143. Magnusius, L.O. and A. Espmark, *A new antigen complex co-occurring with Australia antigen*. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*, 1972. **80**(2): p. 335-7.
144. Garcia, P.D., J.H. Ou, W.J. Rutter, and P. Walter, *Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm*. *J Cell Biol*, 1988. **106**(4): p. 1093-104.
145. Revill, P., L. Yuen, R. Walsh, M. Perrault, S. Locarnini, and A. Kramvis, *Bioinformatic analysis of the hepadnavirus e-antigen and its precursor identifies remarkable sequence conservation in all orthohepadnaviruses*. *J Med Virol*, 2010. **82**(1): p. 104-15.
146. Locarnini, S., T. Shaw, J. Dean, D. Colledge, A. Thompson, K. Li, S.M. Lemon, G.G. Lau, and M.R. Beard, *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.
147. Milich, D.R., *Do T cells "see" the hepatitis B core and e antigens differently?* *Gastroenterology*, 1999. **116**(3): p. 765-8.
148. Ganem, D. and H.E. Varmus, *The molecular biology of the hepatitis B viruses*. *Annu Rev Biochem*, 1987. **56**: p. 651-93.
149. Babinet, C., H. Farza, D. Morello, M. Hadchouel, and C. Pourcel, *Specific expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in transgenic mice*. *Science*, 1985. **230**(4730): p. 1160-3.
150. Eble, B.E., D.R. MacRae, V.R. Lingappa, and D. Ganem, *Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen*. *Mol Cell Biol*, 1987. **7**(10): p. 3591-601.
151. Zanetti, A.R., P. Van Damme, and D. Shouval, *The global impact of vaccination against hepatitis B: a historical overview*. *Vaccine*, 2008. **26**(49): p. 6266-73.
152. Werr, M. and R. Prange, *Role for calnexin and N-linked glycosylation in the assembly and secretion of hepatitis B virus middle envelope protein particles*. *J Virol*, 1998. **72**(1): p. 778-82.
153. Julithe, R., G. Abou-Jaoude, and C. Sureau, *Modification of the hepatitis B virus envelope protein glycosylation pattern interferes with secretion of viral particles, infectivity, and susceptibility to neutralizing antibodies*. *J Virol*, 2014. **88**(16): p. 9049-59.
154. Bi, X. and S. Tong, *Impact of immune escape mutations and N-linked glycosylation on the secretion of hepatitis B virus virions and subviral particles: Role of the small envelope protein*. *Virology*, 2018. **518**: p. 358-368.
155. Wang, C.J., S.Y. Sung, D.S. Chen, and P.J. Chen, *N-linked glycosylation of hepatitis B surface antigens is involved but not essential in the assembly of hepatitis delta virus*. *Virology*, 1996. **220**(1): p. 28-36.
156. Eble, B.E., V.R. Lingappa, and D. Ganem, *The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences*. *J Virol*, 1990. **64**(3): p. 1414-9.
157. Schmitt, S., D. Glebe, K. Alving, T.K. Tolle, M. Linder, H. Geyer, D. Linder, J. Peter-Katalinic, W.H. Gerlich, and R. Geyer, *Analysis of the pre-S2 N- and O-linked glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(17): p. 11945-57.
158. Schmitt, S., D. Glebe, T.K. Tolle, G. Lochnit, D. Linder, R. Geyer, and W.H. Gerlich, *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. 2045-2053.
159. Mehta, A., X. Lu, T.M. Block, B.S. Blumberg, and R.A. Dwek, *Hepatitis B virus (HBV) envelope glycoproteins vary drastically in their sensitivity to glycan processing: evidence that alteration of a single N-linked glycosylation site can regulate HBV secretion*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(5): p. 1822-7.
160. Glebe, D. and S. Urban, *Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry*. *World J Gastroenterol*, 2007. **13**(1): p. 22-38.
161. Heermann, K.H., U. Goldmann, W. Schwartz, T. Seyffarth, H. Baumgarten, and W.H. Gerlich, *Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence*. *J Virol*, 1984. **52**(2): p. 396-402.
162. Seitz, S., J. Habjanic, A.K. Schutz, and R. Bartenschlager, *The Hepatitis B Virus Envelope Proteins: Molecular Gymnastics Throughout the Viral Life Cycle*. *Annu Rev Virol*, 2020. **7**(1): p. 263-288.
163. Bruss, V., X. Lu, R. Thomssen, and W.H. Gerlich, *Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein*. *EMBO J*, 1994. **13**(10): p. 2273-9.
164. Gripon, P., J. Le Seyec, S. Rumin, and C. Guguen-Guillouzo, *Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity*. *Virology*, 1995. **213**(2): p. 292-9.
165. Bruss, V., J. Hagelstein, E. Gerhardt, and P.R. Galle, *Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity*. *Virology*, 1996. **218**(2): p. 396-9.
166. Glebe, D., S. Urban, E.V. Knoop, N. Cag, P. Krass, S. Grun, A. Bulavaite, K. Sasnauskas, and W.H. Gerlich, *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.
167. Schulze, A., A. Schieck, Y. Ni, W. Mier, and S. Urban, *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.
168. Le Seyec, J., P. Chouteau, I. Cannie, C. Guguen-Guillouzo, and P. Gripon, *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.

169. 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.
170. 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.
171. Kann, M., B. Sodeik, A. Vlachou, W.H. Gerlich, and A. Helenius, *Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex*. J Cell Biol, 1999. **145**(1): p. 45-55.
172. Schmitz, A., A. Schwarz, M. Foss, L. Zhou, B. Rabe, J. Hoellenriegel, M. Stoeber, N. Pante, and M. Kann, *Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket*. PLoS Pathog, 2010. **6**(1): p. e1000741.
173. Wang, J., H. Huang, Y. Liu, R. Chen, Y. Yan, S. Shi, J. Xi, J. Zou, G. Yu, X. Feng, and F. Lu, *HBV Genome and Life Cycle*. Adv Exp Med Biol, 2020. **1179**: p. 17-37.
174. Kock, 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.
175. Mason, W.S., M.S. Halpern, J.M. England, G. Seal, J. Egan, L. Coates, C. Aldrich, and J. Summers, *Experimental transmission of duck hepatitis B virus*. Virology, 1983. **131**(2): p. 375-84.
176. 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.
177. Wei, L. and A. Ploss, *Core components of DNA lagging strand synthesis machinery are essential for hepatitis B virus cccDNA formation*. Nat Microbiol, 2020. **5**(5): p. 715-726.
178. Bock, C.T., S. Schwinn, S. Locarnini, J. Fyfe, M.P. Manns, C. Trautwein, and H. Zentgraf, *Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome*. J Mol Biol, 2001. **307**(1): p. 183-96.
179. Bock, C.T., P. Schranz, C.H. Schroder, and H. Zentgraf, *Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell*. Virus Genes, 1994. **8**(3): p. 215-29.
180. Newbold, J.E., H. Xin, M. Tencza, G. Sherman, J. Dean, S. Bowden, and S. Locarnini, *The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes*. J Virol, 1995. **69**(6): p. 3350-7.
181. Rall, L.B., D.N. Standing, O. Laub, and W.J. Rutter, *Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II*. Mol Cell Biol, 1983. **3**(10): p. 1766-73.
182. 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.
183. Qiao, L., Q. Wu, X. Lu, Y. Zhou, A. Fernandez-Alvarez, L. Ye, X. Zhang, J. Han, M. Casado, and Q. Liu, *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.
184. Waris, G., K.W. Huh, and A. Siddiqui, *Mitochondrially associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT-3 and NF-kappa B via oxidative stress*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(22): p. 7721-30.
185. Ou, J.H., O. Laub, and W.J. Rutter, *Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(6): p. 1578-82.
186. 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.
187. 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.
188. 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.
189. Bruss, V., *A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation*. J Virol, 1997. **71**(12): p. 9350-7.
190. 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.
191. Jiang, B., K. Himmelsbach, H. Ren, K. Boller, and E. Hildt, *Subviral Hepatitis B Virus Filaments, like Infectious Viral Particles, Are Released via Multivesicular Bodies*. J Virol, 2015. **90**(7): p. 3330-41.
192. Patient, R., C. Hourieux, P.Y. Sizaret, S. Trassard, C. Sureau, and P. Roingard, *Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking*. J Virol, 2007. **81**(8): p. 3842-51.
193. 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.
194. Anwer, M.S. and B. Stieger, *Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: more than solute transporters*. Pflugers Arch, 2014. **466**(1): p. 77-89.
195. Koenig, A., B. Doering, C. Mohr, A. Geipel, J. Geyer, and D. Glebe, *Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na+/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes*. J Hepatol, 2014. **61**(4): p. 867-75.
196. Ni, Y., F.A. Lempp, S. Mehrle, S. Nkongolo, C. Kaufman, M. Falth, J. Stindt, C. Koniger, M. Nassal, R. Kubitz, H. Sultmann, and S. Urban, *Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes*. Gastroenterology, 2014. **146**(4): p. 1070-83.

197. Mueller, S.F., A. Koenig, B. Doering, D. Glebe, and J. Geyer, *Characterisation of the hepatitis B virus cross-species transmission pattern via Na⁺/taurocholate co-transporting polypeptides from 11 New World and Old World primate species*. PLoS One, 2018. **13**(6): p. e0199200.
198. Wang, T.C. and M. Chao, *Molecular cloning and expression of the hepatitis delta virus genotype IIb genome*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **303**(1): p. 357-63.
199. Casey, J.L. and J.L. Gerin, *Genotype-specific complementation of hepatitis delta virus RNA replication by hepatitis delta antigen*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 2806-14.
200. Pyne, M.T., M.A. Mallory, H.B. Xie, Y. Mei, R. Schlaberg, and D.R. Hillyard, *Sequencing of the Hepatitis D Virus RNA WHO International Standard*. J Clin Virol, 2017. **90**: p. 52-56.
201. Bockmann, J.H., M. Grube, V. Hamed, J. von Felden, J. Landahl, M. Wehmeyer, K. Giersch, M.T. Hall, J.M. Murray, M. Dandri, S. Luth, A.W. Lohse, M. Lutgehetmann, and J. Schulze Zur Wiesch, *High rates of cirrhosis and severe clinical events in patients with HBV/HDV co-infection: longitudinal analysis of a German cohort*. BMC Gastroenterol, 2020. **20**(1): p. 24.
202. Nakabayashi, H., K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane, and J. Sato, *Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium*. Cancer Res, 1982. **42**(9): p. 3858-63.
203. Aden, D.P., A. Fogel, S. Plotkin, I. Damjanov, and B.B. Knowles, *Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line*. Nature, 1979. **282**(5739): p. 615-6.
204. Kopec, A.M., P.D. Rivera, M.J. Lacagnina, R. Hanamsagar, and S.D. Bilbo, *Optimized solubilization of TRIzol-precipitated protein permits Western blotting analysis to maximize data available from brain tissue*. J Neurosci Methods, 2017. **280**: p. 64-76.
205. Li, C., A. Wen, B. Shen, J. Lu, Y. Huang, and Y. Chang, *FastCloning: a highly simplified, purification-free, sequence- and ligation-independent PCR cloning method*. BMC Biotechnol, 2011. **11**: p. 92.
206. Kuo, M.Y., J. Goldberg, L. Coates, W. Mason, J. Gerin, and J. Taylor, *Molecular cloning of hepatitis delta virus RNA from an infected woodchuck liver: sequence, structure, and applications*. J Virol, 1988. **62**(6): p. 1855-61.
207. Rinker, F., C.M. Bremer, K. Schroder, S.B. Wiegand, B. Bremer, M.P. Manns, A.R. Kraft, H. Wedemeyer, L. Yang, V. Pavlovic, C. Wat, W.H. Gerlich, D. Glebe, and M. Cornberg, *Quantitation of large, middle and small hepatitis B surface proteins in HBeAg-positive patients treated with peginterferon alfa-2a*. Liver Int, 2020. **40**(2): p. 324-332.
208. Schmid, J., A. Rasche, G. Eibner, L. Jeworowski, R.A. Page, V.M. Corman, C. Drosten, and S. Sommer, *Ecological drivers of Hepacivirus infection in a neotropical rodent inhabiting landscapes with various degrees of human environmental change*. Oecologia, 2018. **188**(1): p. 289-302.
209. Hasegawa, M., H. Kishino, and T. Yano, *Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA*. J Mol Evol, 1985. **22**(2): p. 160-74.
210. Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura, *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms*. Mol Biol Evol, 2018. **35**(6): p. 1547-1549.
211. 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.
212. Seeger, C. and W.S. Mason, *Molecular biology of hepatitis B virus infection*. Virology, 2015. **479-480**: p. 672-86.
213. Ciccaglione, A.R., M. Rapicetta, A. Fabiano, C. Argentini, M. Silvestro, R. Giuseppetti, F. Varano, N. D'Urso, L. Dinolfo, A. Morgando, and et al., *Chronic infection in woodchucks infected by a cloned hepatitis delta virus*. Arch Virol Suppl, 1993. **8**: p. 15-21.
214. Sureau, C., J. Taylor, M. Chao, J.W. Eichberg, and R.E. Lanford, *Cloned hepatitis delta virus cDNA is infectious in the chimpanzee*. J Virol, 1989. **63**(10): p. 4292-7.
215. Zhang, Z., C. Filzmayer, Y. Ni, H. Sultmann, P. Mutz, M.S. Hiet, F.W.R. Vondran, R. Bartenschlager, and S. Urban, *Hepatitis D virus replication is sensed by MDA5 and induces IFN-beta/lambda responses in hepatocytes*. J Hepatol, 2018. **69**(1): p. 25-35.
216. Hsu, S.C., W.J. Syu, I.J. Sheen, H.T. Liu, K.S. Jeng, and J.C. Wu, *Varied assembly and RNA editing efficiencies between genotypes I and II hepatitis D virus and their implications*. Hepatology, 2002. **35**(3): p. 665-72.
217. Wang, W., F.A. Lempp, F. Schlund, L. Walter, C. Decker, Z. Zhang, Y. Ni, and S. Urban, *Assembly and infection efficacy of hepatitis B virus surface protein exchanges in eight hepatitis D virus genotype isolates*. J Hepatol, 2021.
218. Giersch, K., N. Goldmann, L. Hermanussen, L. Hendricks, T. Volz, J.-H. Bockmann, L. Allweiss, A. Lohse, J. Peterson, M. Lutgehetmann, D. Glebe, and M. Dandri, *Cloning and in vivo characterization of a new hepatitis D virus genotype 1 strain from a patient achieving sustained virus response to interferon alpha treatment*. JOURNAL OF HEPATOLOGY, 2021. **75**: p. S702.
219. Sy, B.T., H.M. Nguyen, N.L. Toan, L.H. Song, H.V. Tong, C. Wolboldt, V.Q. Binh, P.G. Kremsner, T.P. Velavan, and C.T. Bock, *Identification of a natural intergenotypic recombinant hepatitis delta virus genotype 1 and 2 in Vietnamese HBsAg-positive patients*. J Viral Hepat, 2015. **22**(1): p. 55-63.
220. Chao, M., T.C. Wang, and S.E. Lee, *Detection of hepatitis delta virus recombinants in cultured cells co-transfected with cloned genotypes I and IIb DNA sequences*. J Virol Methods, 2006. **137**(2): p. 252-8.
221. Wang, T.C. and M. Chao, *RNA recombination of hepatitis delta virus in natural mixed-genotype infection and transfected cultured cells*. J Virol, 2005. **79**(4): p. 2221-9.
222. Wu, J.C., T.Y. Chiang, W.K. Shiue, S.Y. Wang, I.J. Sheen, Y.H. Huang, and W.J. Syu, *Recombination of hepatitis D virus RNA sequences and its implications*. Mol Biol Evol, 1999. **16**(11): p. 1622-32.
223. Hsu, S.C., J.C. Wu, I.J. Sheen, and W.J. Syu, *Interaction and replication activation of genotype I and II hepatitis delta antigens*. J Virol, 2004. **78**(6): p. 2693-700.

224. Hong, S.Y. and P.J. Chen, *Phosphorylation of serine 177 of the small hepatitis delta antigen regulates viral antigenomic RNA replication by interacting with the processive RNA polymerase II*. J Virol, 2010. **84**(3): p. 1430-8.
225. Tseng, C.H., T.S. Cheng, C.Y. Shu, K.S. Jeng, and M.M. Lai, *Modification of small hepatitis delta virus antigen by SUMO protein*. J Virol, 2010. **84**(2): p. 918-27.
226. Huang, W.H., R.T. Mai, and Y.H. Lee, *Transcription factor YY1 and its associated acetyltransferases CBP and p300 interact with hepatitis delta antigens and modulate hepatitis delta virus RNA replication*. J Virol, 2008. **82**(15): p. 7313-24.
227. Mu, J.J., Y.G. Tsay, L.J. Juan, T.F. Fu, W.H. Huang, D.S. Chen, and P.J. Chen, *The small delta antigen of hepatitis delta virus is an acetylated protein and acetylation of lysine 72 may influence its cellular localization and viral RNA synthesis*. Virology, 2004. **319**(1): p. 60-70.
228. Li, Y.J., M.R. Stallcup, and M.M. Lai, *Hepatitis delta virus antigen is methylated at arginine residues, and methylation regulates subcellular localization and RNA replication*. J Virol, 2004. **78**(23): p. 13325-34.
229. Tseng, C.H., K.S. Jeng, and M.M. Lai, *Transcription of subgenomic mRNA of hepatitis delta virus requires a modified hepatitis delta antigen that is distinct from antigenomic RNA synthesis*. J Virol, 2008. **82**(19): p. 9409-16.
230. Chen, P.J., G. Kalpana, J. Goldberg, W. Mason, B. Werner, J. Gerin, and J. Taylor, *Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(22): p. 8774-8.
231. Griffin, B.L., S. Chasovskikh, A. Dritschilo, and J.L. Casey, *Hepatitis delta antigen requires a flexible quasi-double-stranded RNA structure to bind and condense hepatitis delta virus RNA in a ribonucleoprotein complex*. J Virol, 2014. **88**(13): p. 7402-11.
232. Wang, H.W., P.J. Chen, C.Z. Lee, H.L. Wu, and D.S. Chen, *Packaging of hepatitis delta virus RNA via the RNA-binding domain of hepatitis delta antigens: different roles for the small and large delta antigens*. J Virol, 1994. **68**(10): p. 6363-71.
233. Bonino, F., K.H. Heermann, M. Rizzetto, and W.H. Gerlich, *Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope*. J Virol, 1986. **58**(3): p. 945-50.
234. Yan, H., B. Peng, W. He, G. Zhong, Y. Qi, B. Ren, Z. Gao, Z. Jing, M. Song, G. Xu, J. Sui, and W. Li, *Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide*. J Virol, 2013. **87**(14): p. 7977-91.
235. Lempp, F.A., E. Wiedtke, B. Qu, P. Roques, I. Chemin, F.W.R. Vondran, R. Le Grand, D. Grimm, and S. Urban, *Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is the limiting host factor of hepatitis B virus infection in macaque and pig hepatocytes*. Hepatology, 2017. **66**(3): p. 703-716.
236. Meier, A., S. Mehrle, T.S. Weiss, W. Mier, and S. Urban, *Myristoylated PreS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes*. Hepatology, 2013. **58**(1): p. 31-42.
237. Takeuchi, J.S., K. Fukano, M. Iwamoto, S. Tsukuda, R. Suzuki, H. Aizaki, M. Muramatsu, T. Wakita, C. Sureau, and K. Watashi, *A Single Adaptive Mutation in Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide Induced by Hepadnaviruses Determines Virus Species Specificity*. J Virol, 2019. **93**(5).
238. Lanford, R.E., D. Chavez, A. Barrera, and K.M. Brasky, *An infectious clone of woolly monkey hepatitis B virus*. J Virol, 2003. **77**(14): p. 7814-9.
239. Gudima, S., Y. He, N. Chai, V. Bruss, S. Urban, W. Mason, and J. Taylor, *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.
240. Kock, J., M. Nassal, S. MacNelly, T.F. Baumert, H.E. Blum, and F. von Weizsacker, *Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus*. J Virol, 2001. **75**(11): p. 5084-9.

10. Anhang

HuH7-Zellen transfiziert mit S-HDAg
der HDV Genotypen (Gt)

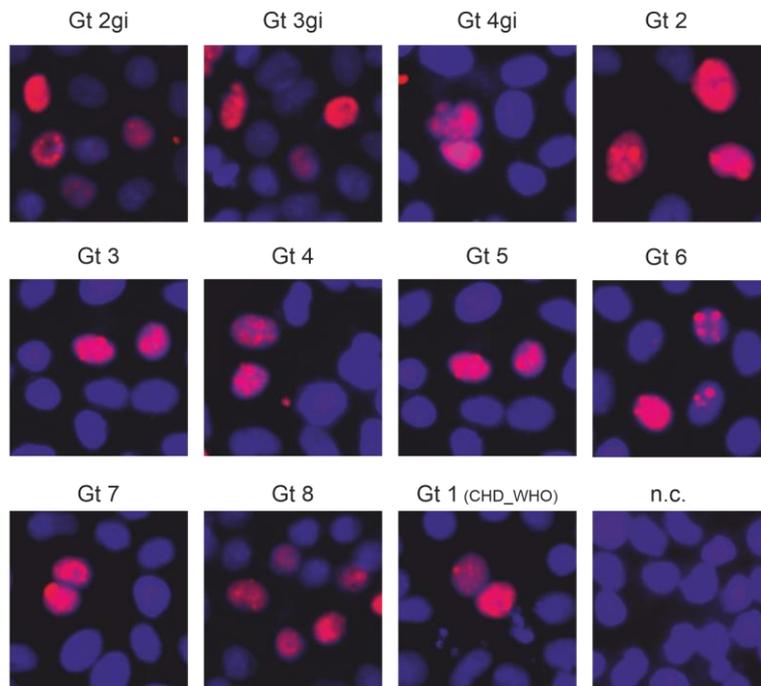


Abbildung 37: S-HDAg-Expression in HuH7-Zellen 4 Tage nach Transfektion der Expressionskonstrukte.

HuH7-Zellen wurden den jeweiligen S-HDAg-Expressionsvektoren transfiziert und das HDAg 4 Tage nach Transfektion mittels anti-HDAg IgGs eines humanen Patientenserums und eines Alexa568 konjugierten anti-human IgG-Antikörpers detektiert. Die Zellkerne wurden parallel mit DAPI gefärbt. CHD_WHO – Sequenz des HDV-RNA WHO Standards [200]

11. Danksagung

12. 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. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Nora T. Goldmann