

Infektiosität und Antigenität von humanen und tierischen Hepatitis-B-Virus-Isolaten in relevanten Zellkultursystemen

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

Felix Lehmann

(M. Sc., Biochemie)

Gießen, Oktober 2022

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:

Apl. Prof. Dr. Elena Evguenieva-Hackenberg
Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
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

Eidesstattliche Erklärung

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 Antiplagiatssoftware 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.

Felix Lehmann

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	XI
Aus der Promotion hervorgegangene Publikationen	XII
1. Zusammenfassung	1
2. Abstract	3
3. Einleitung.....	5
3.1 Das Hepatitis-B-Virus	5
3.1.1 Taxonomie und Epidemiologie der Orthohepadnaviren	6
3.1.2 Genomstruktur und Proteine des Hepatitis-B-Virus.....	9
3.1.3 Die HBV-Serotypen	17
3.1.4 Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus	18
3.1.5 Klinischer Verlauf einer chronischen Hepatitis B (CHB)	22
3.1.6 Behandlung einer chronischen Hepatitis B (CHB).....	24
3.2 Das Hepatitis-Delta-Virus	25
3.2.1 Replikationszyklus des Hepatitis-D-Virus	26
3.3 NTCP als Eintrittsrezeptor des Hepatitis-B-Virus.....	28
3.3.1 Bedeutung des NTCP/Ntcp für den hepadnaviralen Zelleintritt	29
4. Fragestellungen.....	30
5. Materialien	32
5.1 Bakterien	32
5.2 Primäre Zellen & Zelllinien.....	32
5.3 Plasmide.....	33
5.4 Kommerzielle Kits.....	34

5.5	Antikörper	35
5.6	Enzyme.....	36
5.7	Chemikalien, Reagenzien & käufliche Medien.....	37
5.8	Eigens angesetzte Medien, Puffer & Lösungen.....	39
5.9	Antibiotika	41
5.10	Oligonukleotide.....	41
5.11	Molekulargewichts- und Proteinmarker	42
5.12	Myr-PräS1-Peptide	42
5.13	Verbrauchsmaterialien.....	42
5.14	Geräte	43
6.	Methoden	45
6.1	Prokaryoten	45
6.1.1	Transformation	45
6.1.2	Flüssigkultur	45
6.1.3	Plasmidpräparation	45
6.2	Eukaryotische Zellkultur	46
6.2.1	Kultivierung und Passagierung von Hepatomzelllinien.....	46
6.2.2	Aussaat und Kultivierung primärer Hepatozyten	46
6.2.3	Transiente Transfektion.....	46
6.2.4	NBD-Taurocholat-Transportassay.....	47
6.2.5	Myr-PräS1-Peptidbindungsassay.....	47
6.2.6	Produktion pseudotypisierter Deltaviren.....	47
6.2.7	<i>In vitro</i> Infektion mit pseudotypisierten Deltaviren	48
6.2.8	Produktion von rekombinantem HBV	49
6.2.9	<i>In vitro</i> Infektion primärer Pferdehepatozyten mit Orthohepadna- viren	49
6.3	Immunologische Nachweisverfahren.....	50
6.3.1	Qualitative HBeAg-Bestimmung.....	50

6.3.2	HBsAg-Bestimmung	50
6.3.3	Anti-HBs-Bestimmung	51
6.3.4	Immunfluoreszenz	51
6.3.5	SDS-PAGE und Semi-Dry Western Blot	51
6.4	Molekularbiologie	53
6.4.1	Isolierung viraler Nukleinsäuren	53
6.4.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	53
6.5	Klonierungen	55
6.5.1	Klonierung von SHBs-Expressionsplasmiden	55
6.5.2	Klonierung von hepadnaviralen 1.5mer-Plasmiden	57
6.5.3	Klonierung hepadnaviraler HBs-Expressionsplasmide	57
6.6	Bioinformatische Methoden	58
7.	Ergebnisse	59
7.1	Charakterisierung der Antigenität hyperglykosylierter HBV-Escape-varianten	59
7.1.1	Klinische Ausgangslage	60
7.1.2	Gewinnung HBV-spezifischer Genomsequenzen und genotypische Analyse	60
7.1.3	Untersuchung des Glykosylierungsmusters	63
7.1.4	Detektierbarkeit der Virusvarianten durch diagnostische Assays	66
7.1.5	Reaktivität der Virusvarianten mit humanem Anti-HBs	68
7.2	Charakterisierung der Antigenität und Infektiosität des neuartigen Hepadnavirus der Equiden (EqHBV)	71
7.2.1	Analyse des Core-Proteins	72
7.2.2	Analyse des HBeAg und relevanter Bereiche des PräC/Core-ORF ..	77
7.2.3	Analyse der EqHBV-Oberflächenproteine und Reaktivität mit Anti-HBs-Antikörpern	81
7.2.4	Untersuchung der Oberflächenprotein-Rezeptor-Interaktion	86

7.3	Charakterisierung der Antigenität und Infektiosität der neuartigen Hepadnaviren der Spitzmäuse (CSHBV/MSHBV)	92
7.3.1	Analyse des Core-Proteins.....	93
7.3.2	Analyse des HBeAg und relevanter Bereiche des PräC/Core-ORF ..	97
7.3.3	Analyse der Oberflächenproteine und Reaktivität mit Anti-HBs-Antikörpern.....	100
7.3.4	Untersuchung der Oberflächenprotein-Rezeptor-Interaktion.....	105
8.	Diskussion	110
8.1	Charakterisierung der Antigenität hyperglykosylierter HBV-Escapevarianten.....	110
8.2	Charakterisierung der Antigenität und Infektiosität neuartiger Hepadnaviren aus Equiden und Spitzmäusen.....	117
8.2.1	Analyse des HBcAg und HBeAg	118
8.2.2	Analyse des HBsAg	121
8.2.3	Untersuchung der Oberflächenprotein-Rezeptor-Interaktion.....	123
8.3	Ausblick.....	127
9.	Anhang	130
10.	Danksagung	135
11.	Literaturverzeichnis	136

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ADAR1	Adenosine deaminase RNA-specific binding protein 1
AGL	Antigener Loop
ALT	Alanin-Aminotransferase
AS	Aminosäure(n)
ASHV	Arctic ground squirrel Hepatitis-Virus
bp	Basenpaar(e)
C-	Carboxy
ca.	Circa
CAD	Cytosolic anchorage domain
cccDNA	Covalently closed circular Desoxyribonukleinsäure
CHB	Chronische Hepatitis B
CSHBc	Crowned shrew Hepatitis-B-Virus Core-Protein
CSHBV (-A und -B)	Crowned shrew Hepatitis-B-Virus (Genotypen A und B)
CMHBV	Capuchin monkey Hepatitis-B-Virus
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCHBV	Domestic cat Hepatitis-B-Virus
DDB1	Damage-specific DNA binding protein 1
dsDNA	Doppelsträngige lineare Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	Direkter Repeat
DSB	Disulfidbrücke
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor-Rezeptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EqHBV	Equides Hepatitis-B-Virus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	Und andere
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GEq	Genomäquivalent(e)
GPC5	Glypican 5
GSHV	Ground squirrel Hepatitis-Virus
HBc	Hepatitis-B-Virus Core-Protein
HBIG	Hepatitis-B-Immunglobulin-Prophylaxe
HBsAg	Hepatitis B Surface Antigen
HBV (-A)	Hepatitis-B-Virus (Genotyp A)
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDAg	Hepatitis Delta Antigen
HDV	Hepatitis-D-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HGM	Hepatocyte Growth Medium
HHMM	Human Hepatocyte Maintenance Medium
HPM	Human Hepatocyte Plating Medium
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSBHBV	Horseshoe Bat Hepatitis-B-Virus
Hsc70	Heat-shock cognate protein 70
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan(e)
HTM	Human Hepatocyte Thawing Medium
HWM	Human Hepatocyte Washing Medium
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IF	Immunfluoreszenz
IFITM3	Interferon-induced transmembrane protein 3
Ig	Immunglobulin
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
IU	International Unit
kb	Kilobasen
LB	Lysogeny Broth
LFBHBV	Long-fingered Bat Hepatitis-B-Virus
LHBs	Large Hepatitis B virus surface protein
L-HDAg	Large Hepatitis Delta Antigen
m	Milli
M	Molar
MHBs	Middle Hepatitis B virus surface protein
MHR	Große hydrophile Region
min	Minute
MVB	Multivesicular Bodies
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSHBV _{CIV}	Musk shrew Hepatitis-B-Virus
Myr	Myristoyliert
N-	Amino
NA	Nukleo(s/t)idanalagon
NBD-TC	Nitrobenzoxadiazole-Taurocholat
nm	Nanometer
NRE	Negatives regulatorisches Element
nt	Nukleotid(e)
NTCP	(Humanes) Natrium-Taurocholat Cotransportierendes Polypeptid
Ntcp	Nicht humanes Natrium-Taurocholat Cotransportierendes Polypeptid
ORF	Offener Leserahmen
p	Pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBHBV	Pomona Bat Hepatitis-B-Virus
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pegIFN α	Pegyliertes Interferon-alpha
PEH	Primäre Pferdehepatozyten (engl.: <i>primary equine hepatocytes</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pgRNA	Prägenomische Ribonukleinsäure
pH	Pondus hydrogenii

PHH	Primäre humane Hepatozyten
p.i.	Post Infection
PNAS	Proceedings of the National Academy of Sciences
psHDV	Pseudotypisiertes Hepatitis-D-Virus
RBHBV	Roundleaf Bat Hepatitis-B-Virus
rcDNA	Relaxed circular Desoxyribonukleinsäure
RLHBV	Roundleaf Bat Hepatitis-B-Virus
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleopartikel
RT	Reverse Transkriptase
RtHBV	Ringtail Hepatitis-B-Virus
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase -Polymerasekettenreaktion
S/CO	Signal-to-Cut-off-Ratio
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHBs	Small Hepatitis B virus surface protein
S-HDAg	Small Hepatitis Delta Antigen
SLC10	Solute carrier family 10
SMC5/6	Structural maintenance of chromosomes protein 5/6
SVP	Subvirale Partikel
T _A	Annealing-Temperatur
t _E	Elongationszeit
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TFoHBV	Tai Forest Hepatitis-B-Virus
TMBHBV	Tent making Bat Hepatitis-B -Virus
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TP	Terminales Protein
WHO	World Health Organization
WHc	Woodchuck Hepatitis-B-Virus Core-Protein
WHV	Woodchuck Hepatitis-B-Virus
WMHBV	Woolly Monkey Hepatitis-B-Virus
x g	Relative Zentrifugalkraft

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genomaufbau des HBV.	10
Abbildung 2: Topologiemodell der S-Domäne.	11
Abbildung 3: Post-translationale Prozessierung des HBeAg.	14
Abbildung 4: Zusammenfassung des HBV-Replikationszyklus.	21
Abbildung 5: Klinische Phasen einer chronischen Hepatitis-B-Infektion.	23
Abbildung 6: Amplifikation der HBV-DNA des Patientenserums.	61
Abbildung 7: Sequenzvergleich der großen hydrophilen Region (MHR) des SHBs der isolierten HBV- Varianten.	62
Abbildung 8: N-Glykosylierungsmuster der Virusvarianten-Cluster.	64
Abbildung 9: Nachweis der Virusvarianten in diagnostischen Assays.	67
Abbildung 10: Graphik zur Veranschaulichung des kompetitiven Anti-HBs-Assays.	68
Abbildung 11: Reaktivität von Anti-HBs-positiven Seren mit rekombinantem HBsAg der Virusvarianten.	70
Abbildung 12: Sequenzvergleich des gesamten Core-Proteins humaner HBV-Genotypen und EqHBV.	73
Abbildung 13: Klonierungsstrategie zur Erzeugung der EqHBV 1.5mer-Überlängenkonstrukte.	75
Abbildung 14: Immunfluoreszenz von HBV und EqHBV nach Färbung mit polyklonalen Anti-Core- Immunseren.	76
Abbildung 15: Sequenzvergleich des PräC humaner HBV-Genotypen sowie des EqHBV.	78
Abbildung 16: Sequenzvergleich des C-terminalen Core-Bereichs humaner HBV-Genotypen sowie des EqHBV.	79
Abbildung 17: HBeAg-Messung nach Transfektion mit HBV und EqHBV.	81
Abbildung 18: Sequenzvergleich relevanter PräS1/PräS2-Epitope und der gesamten S-Domäne von HBV und EqHBV.	82
Abbildung 19: Immunfluoreszenz von HBV und EqHBV nach Färbung mit monoklonalen Anti-HBs- Antikörpern.	84
Abbildung 20: HBsAg-Messung nach Transfektion mit HBV und EqHBV.	85
Abbildung 21: Sequenzvergleich der N-terminalen PräS(1)-Region der Oberflächenproteine des HBV und EqHBV.	86
Abbildung 22: Funktionalitätsnachweis und Peptidbindung an das NTCP und Esi-1.	87
Abbildung 23: Produktion Eqs- und Hs-pseudotypisierter HDV.	88
Abbildung 24: Infektion von transient NTCP-/Esi-1-exprimierenden HepG2-Zellen mit HDV-Partikeln pseudotypisiert mit HBV- und Eqs-Oberflächenproteinen.	89
Abbildung 25: Infektion von primären humanen Hepatozyten (PHH) und primären Pferdehepatozyten (PEH) mit HDV-Partikeln pseudotypisiert mit HBV- und Eqs-Oberflächenproteinen.	90
Abbildung 26: HBeAg-Messungen nach Infektion von primären Pferdehepatozyten (PEH) mit HBV und EqHBV.	91

<i>Abbildung 27: Sequenzvergleich des gesamten Core-Proteins humaner HBV-Genotypen, MSHBV und CSHBV-Genotypen.....</i>	<i>94</i>
<i>Abbildung 28: Immunfluoreszenz von HBV und MSHBV nach Färbung mit polyklonalen Anti-Core-Immunseren.</i>	<i>96</i>
<i>Abbildung 29: Sequenzvergleich des PräC humaner HBV-Genotypen sowie der Hepadnaviren aus Spitzmäusen (MSHBV und CSHBV).....</i>	<i>97</i>
<i>Abbildung 30: Sequenzvergleich des C-terminalen Core-Bereichs humaner HBV-Genotypen sowie der Hepadnaviren aus Spitzmäusen (MSHBV und CSHBV).....</i>	<i>99</i>
<i>Abbildung 31: HBeAg-Messung nach Transfektion mit HBV und MSHBV.....</i>	<i>100</i>
<i>Abbildung 32: Sequenzvergleich relevanter PräS1/PräS2-Epitope und der gesamten S-Domäne von HBV, MSHBV und CSHBV.</i>	<i>101</i>
<i>Abbildung 33: Immunfluoreszenz von HBV und MSHBV nach Färbung mit Anti-HBs-Antikörpern.....</i>	<i>103</i>
<i>Abbildung 34: HBsAg-Messung nach Transfektion mit HBV und MSHBV.</i>	<i>104</i>
<i>Abbildung 35: Sequenzvergleich der N-terminalen PräS(1)-Region der Oberflächenproteine des HBV, MSHBV und CSHBV.</i>	<i>105</i>
<i>Abbildung 36: Funktionalitätsnachweis und Peptidbindung von NTCP- und Esel-Ntcp-exprimierenden Hepatomzellen.....</i>	<i>107</i>
<i>Abbildung 37: Produktion MSHBs-, CSHBs- und HBs-pseudotypisierter HDV.....</i>	<i>108</i>
<i>Abbildung 38: psHDV-Infektion von NTCP- und Sorex-Ntcp-exprimierenden Hepatomzellen.</i>	<i>109</i>
 <i>Abbildung S1: Sequenzvergleich des amplifizierten (partiellen) SHBs- und Polymerase-ORF.</i>	 <i>130</i>
<i>Abbildung S2: Densitometrische Analyse des intrazellulären SHBs.....</i>	<i>131</i>
<i>Abbildung S3: Zusammenfassung der Genom- und ORF-Längen bestimmter Orthohepadnaviren.</i>	<i>133</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Zusammenfassung aller bekannten Orthohepadnavirusspezies.</i>	<i>7</i>
<i>Tabelle 2: Zusammenfassung der mit HBV-Subgenotypen am häufigsten assoziierten Serotypen.</i>	<i>18</i>
<i>Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Zelllinien und primären Zellen.</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Plasmide.</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 6: Übersicht der verwendeten kommerziell-erhältlichen Kits.</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 7: Verwendete Antikörper.</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 8: Verwendete Enzyme.</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 9: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und käufliche Medien.</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 10: Übersicht der eingesetzten Medien, Puffer, Lösungen</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 11: Verwendete Antibiotika.</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 12: Verwendete Oligonukleotide.</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 13: Verwendete Molekulargewichts- und Proteinmarker.</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 14: Verwendete N-terminal myristoylierte, C-terminal Alexa633-gekoppelte PräS1-Peptide.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 15: Verwendete Verbrauchsmaterialien.</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 16: Verwendete Geräte.</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 17: Zusammensetzung eines diskontinuierlichen 12 %igen SDS-Gels.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabelle 18: Phusion-PCR-Ansatz.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 19: Phusion-PCR-Programm.</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 20: HBV-qPCR-Ansatz.</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 21: PCR-Programm der HBV-qPCR.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 22: DNaseI-Verdau vor HDV-qRT-PCR.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabelle 23: PCR-Programm der HDV-qRT-PCR.</i>	<i>55</i>
<i>Tabelle 24: Durch HBIG-erkannte Hauptepitope des HBsAg.....</i>	<i>115</i>
 <i>Tabelle S1: Originaldaten und daraus berechnete Reaktivitäten von Anti-HBs mit den Virusvarianten.</i>	 <i>132</i>

Aus der Promotion

hervorgegangene Publikationen

Erschienen in peer-reviewed Journals:

(Geordnet nach Relevanz)

1. Rasche A.*, **Lehmann F.***, Goldmann N., Nagel M., Moreira-Soto A., Nobach D., de Oliveira Carneiro I., Osterrieder N., Greendwood A.D., Steinmann E., Lukashev A.N., Schuler G., Glebe D., Drexler J.F. & Equid HBV Consortium (2021). *A hepatitis B virus causes chronic infections in equids worldwide*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 118(13).

**geteilte Erstautorenschaft*

Impact Factor: 12,777

2. Rasche A., **Lehmann F.**, König A., Goldmann N., Corman V.M., Moreira-Soto A., Geipel A., van Riel D., Vakulenko Y.A., Sander A.L., Niekamp H., Kepper R., Schlegel M., Akoua-Koffi C., Souza B.F.C.D., Sahr F., Olayemi A., Schulze V., Petraityte-Burneikiene R., Kazaks A., Lowjaga K.A.A.T., Geyer J., Kuiken T., Drosten C., Lukashev A.N., Fichet-Calvet E., Ulrich R.G., Glebe D., Drexler J.F. (2019). *Highly diversified shrew hepatitis B viruses corroborate ancient origins and divergent infection patterns of mammalian hepadnaviruses*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 116(34).

Impact Factor: 12,777

3. Glebe D., **Lehmann F.**, Goldmann N., Giese A., Hida Y., Gerlich W.H., Ziebuhr J., Slanina H. & Schüttler C.G. (2022). *10 Jahre Nationales Referenzzentrum für Hepatitis-B-Viren und Hepatitis-D-Viren in Gießen: Tätigkeiten und Erfahrungen*. **Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz**, 1-8.

Impact Factor: 1,513

4. Palatini M., Müller S.F., Kirstgen M., Leiting S., **Lehmann F.**, Soppa L., Goldmann N., Müller C., Lowjaga K.A.A.T., Alber J., Ciarimboli G., Ziebuhr J. Glebe D. & Geyer J. (2022). *IFITM3 Interacts with the HBV/HDV Receptor NTCP and Modulates Virus Entry and Infection*. **Viruses**, 14(4), 727.
Impact Factor: 5,818

5. Kirstgen M., Lowjaga K.A.A.T., Müller S.F., Goldmann N., **Lehmann F.**, Alakurtti S., Glebe D., & Geyer J. (2020). *Selective hepatitis B and D virus entry inhibitors from the group of pentacyclic lupane-type betulin-derived triterpenoids*. **Scientific Reports**, 10(1), 1-16.
Impact Factor: 4,996

6. Lowjaga K.A.A.T., Kirstgen M., Müller S.F., Goldmann N., **Lehmann F.**, Glebe D., & Geyer J. (2021). *Long-term trans-inhibition of the hepatitis B and D virus receptor NTCP by tauroolithocholic acid*. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, 320(1).
Impact Factor: 3,710

7. Kirstgen M., Lowjaga K.A.A.T., Müller S.F., Goldmann N., **Lehmann F.**, Glebe D., Baringhaus K.-H. & Geyer J. (2021). *Hepatitis D Virus Entry Inhibitors Based on Repurposing Intestinal Bile Acid Reabsorption Inhibitors*. **Viruses**, 13(4), 666.
Impact Factor: 5,818

8. Palatini M., Müller S.F., Lowjaga K.A.A.T., Noppes S., Alber J., **Lehmann F.**, Goldmann N., Glebe D. & Geyer J. (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*. **Frontiers in Molecular Biosciences**, 8, 602.
Impact Factor: 6,113

9. Kirstgen M., Müller S.F., Lowjaga K.A.A.T., Goldmann N., **Lehmann F.**, Alakurtti S., Yli-Kauhaluoma J., Baringhaus K.-H., Krieg R., Glebe D. & Geyer J. (2021). *Identification of novel HBV/HDV entry inhibitors by pharmacophore-and QSAR-guided virtual screening*. **Viruses**, 13(8), 1489.
Impact Factor: 5,818

10. Zakrzewicz D., Leidolf R., Kunz S., Müller S.F., Neubauer A., Leiting S., Goldmann N., **Lehmann F.**, Glebe D. & Geyer J. (2022). *Tyrosine 146 of the Human Na⁺/Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) Is Essential for Its Hepatitis B Virus (HBV) Receptor Function and HBV Entry into Hepatocytes.* **Viruses**, 14(6), 1259.

Impact Factor: 5,818

1. Zusammenfassung

Schätzungsweise jeder vierte Mensch zeigt serologische Hinweise auf Kontakt mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV), welches spezifisch Hepatozyten infiziert und nur in diesen effizient replizieren kann. Rund 296 Millionen Menschen sind chronisch mit HBV infiziert und die chronische HBV-Infektion ist eine der häufigsten Ursachen für leberassoziierte Todesfälle weltweit. Dem zugrunde liegt eine langfristige, starke immunologische Aktivierung zur Eliminierung HBV-positiver Hepatozyten.

Als Strukturproteine spielen die Oberflächenproteine des HBV (HBsAg) eine zentrale Rolle in dessen Lebenszyklus, insbesondere bei der Sekretion infektiöser Virionen sowie bei der Vermittlung des Zelleintritts über Virus-Rezeptor-Interaktionen.

In chronischen Trägern werden häufig aufgrund immunologischen Drucks Mutationen in antigenen Bereichen des HBsAg selektioniert. Innerhalb dieser Arbeit wurde die Sequenzheterogenität innerhalb der viralen Quasispezies an einem Patientenserum mit zeitgleicher positiver HBV-DNA und hohem Anti-HBs-Titer untersucht. Die Mehrheit der gewonnenen Sequenzen zeigte Mutationen, die zusätzliche N-Glykosylierungsstellen alleine oder in Kombination mit bekannten Immunescape-Mutationen in der großen hydrophilen Region (MHR) des kleinen HBV-Oberflächenproteins beinhalteten. Im besonderem Maße fiel eine zuvor unbeschriebene Sechs-Nukleotidinsertion (6 nt) an Aminosäure 125 auf. Experimentell konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die drei untersuchten, nicht-kanonischen N-Sequons auch N-glykosyliert wurden und doppelt-glykosyliertes SHBs am effizientesten von humanen Hepatomzellen sekretiert werden konnte. Detektierbarkeit subviraler Partikel aus HBsAg der T131N/M133T- und der 6 nt-Variante durch diagnostische HBsAg-Assay war um >90 % gesenkt und auch Reaktivität dieser HBsAg-Varianten mit Anti-HBs aus Seren nach HBV-Impfung bzw. -Genesung um >90 % reduziert.

Die zentrale Rolle der viralen Oberflächenproteine (HBsAg) für Sekretion, Antigenität und Infektiosität von Hepadnaviren wurden in dieser Arbeit auch bei drei neuentdeckten Orthohepadnaviren aus Eseln und Zebras (Familie der

Pferde, *Equidae*, EqHBV) und Spitzmäusen (CSHBV, MSHBV) untersucht. Das HBsAg der neuartigen Orthohepadnaviren zeigte keinerlei Kreuzreaktivität mit einem polyklonalen HBV-Impfstoff-Antiserum und nur bei zwei monoklonalen Anti-HBs-Antikörpern (HB01, H166) konnte eine Kreuzreaktivität mit MSHBV, nicht jedoch mit EqHBV, festgestellt werden. EqHBs- und MSHBs-/CSHBs-pseudotypisierte HDV (psHDV) konnten in menschlichen Zellen produziert werden. Diesen psHDV war es nicht möglich, über das NTCP/Ntcp des Menschen bzw. ihrer Wirtsspezies *in vitro* zu infizieren. Dementgegen konnten Infektionsereignisse von psHDV_{EqHBV-Ze} nach Infektion von primären Pferdehepatozyten nachgewiesen werden. Eine Infektion von primären humanen Hepatozyten war durch psHDV_{EqHBV} nicht möglich. Auf Grundlage der hier präsentierten Daten, scheint die Verwendung des NTCP/Ntcp für den Zelleintritt und ein zoonotisches Potential der neuartigen Orthohepadnaviren aus Equiden und Spitzmäusen demnach sehr unwahrscheinlich.

Außerdem wurde die Konservierung der Antigenität des HBcAg und die Prozessierung des sequentiell-verwandten HBeAg für diese drei neuentdeckten Orthohepadnaviren untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass polyklonale Anti-Core-Antikörper zum Teil eingeschränkte Kreuzreaktivität mit Core-Proteinen der neuartigen tierischen Orthohepadnaviren zeigten. Die Prozessierung und Sekretion des HBeAg, welches für die Etablierung chronischer Infektionen von großer Bedeutung ist, wurde bioinformatisch und experimentell untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass essentielle Prozessierungsmerkmale des HBeAg im EqHBV konserviert waren und dieses auch als sekretiertes Protein im diagnostischen Assay nachweisbar war. Die untersuchten CSHBV- und MSHBV-Isolate hingegen scheinen kein funktionales HBeAg zu kodieren, da wichtige Grundlagen für eine erfolgreiche Prozessierung des HBeAg-Vorläuferpolypeptids fehlten. Die Etablierung von chronischen Verläufen als wesentliches Kennzeichen von hepadnaviralen Infektionen erscheint daher bei Spitzmäusen zumindest fraglich.

2. Abstract

One out of every four people is estimated to show serological signs of contact with the hepatitis B virus (HBV), which can specifically infect and efficiently replicate only in hepatocytes. About 296 million people are chronically infected with HBV and chronic HBV infection is one of the leading global causes of liver-associated death. This pathology is based on a long-term, strong immunological activation in effort to eliminate HBV-positive hepatocytes.

As structural proteins, the surface proteins of HBV (HBsAg) play a central role in its life cycle, i.e. in the secretion of infectious viral particles as well as cell entry mediation via virus-receptor-interactions.

During chronic infection, mutations in antigenic determinants of the HBsAg are frequently selected for under immunological pressure. Within this thesis, the sequence heterogeneity of the viral quasispecies of a patient serum positive for HBV-DNA with simultaneously high anti-HBs was investigated. The majority of extracted sequences contained mutations that introduced additional N-glycosylation motifs either alone or in combination with known escape mutations in the major hydrophilic region (MHR) of the surface proteins. In particular, a previously undescribed six-nucleotide-insertion (6 nt) at amino acid 125 was found. It could be shown within this thesis that all uncanonical N-sequons were in fact N-glycosylated and that double-glycosylated SHBs was most efficiently secreted by human hepatoma cells. Detectability of subviral particles containing HBsAg of the T131N/M133T- and the 6 nt-mutant was reduced by >90 % and reactivity of these variants with anti-HBs from human sera following vaccination or recovery from infection was also reduced by >90 %.

The central role of viral surface proteins (HBsAg) regarding secretion, antigenicity and infectivity of three novel orthohepadnaviruses of equids (EqHBV) and shrews (CSHBV, MSHBV) were also investigated in this thesis. HBsAg of these novel orthohepadnaviruses did not cross-react with a polyclonal HBV-vaccine serum and only two monoclonal anti-HBs-antibodies (HB01 and H166) reacted with MSHBV, but none with EqHBV. EqHBs- and MSHBs-/CSHBs-pseudotyped HDV (psHDV) could be produced in human hepatoma cells. However, these psHDVs were unable to infect via human or host-species

NTCP/Ntcp in vitro. Notably, psHDV_{EqHBV-Ze} could infect primary horse but not primary human hepatocytes. Based on the data presented in this thesis, the use of NTCP/Ntcp for cell entry and a zoonotic potential of these novel hepadnaviruses of equids and shrews seems unlikely.

Furthermore, the antigenic conservation of HBcAg and processing of the sequentially related HBeAg were investigated for these three novel orthohepadnaviruses. It could be shown that polyclonal anti-core-antibodies showed partially restricted cross-reactivity with the novel orthohepadnaviruses' core proteins. Processing and secretion of HBeAg, which is necessary for the establishment of chronic infection in vivo, was examined bioinformatically and experimentally. It could be demonstrated that essential processing features of HBeAg were conserved in EqHBV and secreted HBeAg could be detected in a diagnostic assay. In contrast, the investigated isolates of CSHBV and MSHBV do not seem to encode a functional HBeAg, since important features for processing were lacking in the putative HBeAg-precursor polypeptide. The establishment of chronicity as hallmark of hepadnaviral infection therefore seems questionable in shrews.

3. Einleitung

3.1 Das Hepatitis-B-Virus

Schon zum Ende des 19. Jahrhunderts wurde ein infektiöses Agens als Ursache für mehrere Ausbrüche der Gelbsucht (Ikterus) in Folge großangelegter Kampagnen der Pockenimpfung, die mit menschlicher „Lymphe“ stabilisiert worden war, vermutet [1]. Den ersten serologischen Nachweis der Serum-Hepatitis (auch Hepatitis Typ B genannt) konnte B. S. Blumberg im Jahre 1963 erbringen, als er in Blutproben mehrerer australischer Aborigines ein neues Protein, welches er folglich als *Australia antigen* (AuAg; heute: HBsAg) bezeichnete, entdeckte [2]. Allerdings konnte erst fünf Jahre nach der Entdeckung dieses neuartigen Antigens, erneut durch Blumberg, eine Verbindung zur Hepatitis hergestellt werden [2]. Im Jahre 1970 konnte D. S. Dane dann unter dem Elektronenmikroskop das AuAg nicht nur in Form von kleinen 17-25 nm sphärischen oder filamentösen Partikeln (subviralen Partikeln), sondern auch auf größeren virusartigen 42-nm-Partikeln, mit sichtbarem inneren Kapsid, nachweisen [3]. Im Folgejahr konnte durch J. Almeida gezeigt werden, dass Hepatitis-B-positive Patienten auch Antikörper gegen dieses innere *core antigen* (HBcAg) gebildet hatten (Anti-HBc) [4]. 1973 und 1974 konnten dann schließlich durch W. S. Robinson auch die Polymerase und die virale DNA als Bestandteile der HBV-Virionen nachgewiesen werden [5]. Heutzutage ist bekannt, dass HBV nicht nur über das Blut, sondern auch sexuell übertragen werden kann [6, 7].

Aktuell zeigen geschätzte zwei Milliarden Menschen serologische Hinweise auf einen Kontakt mit dem Hepatitis-B-Virus und rund 296 Millionen Menschen sind chronisch mit HBV infiziert [8, 9]. Eine chronische Hepatitis B (CHB) führt bei 15-40 % der Infizierten zu der Entwicklung von hepatozellulären Karzinomen (engl.: *hepatocellular carcinoma* (HCC)), denen zumeist eine Leberzirrhose vorangeht [10, 11]. CHB führte im Jahre 2013 in Folge dieser Komplikationen zu knapp 1,5 Millionen Todesfällen und virale Hepatitis war insgesamt die siebthäufigste Todesursache weltweit [12].

3.1.1 Taxonomie und Epidemiologie der Orthohepadnaviren

Das Hepatitis-B-Virus ist der Prototyp der Familie der Hepadnaviren (*Hepadnaviridae*). Die Hepadnaviren kennzeichnet ein starker Hepatotropismus sowie ein durch reverse Transkription-replizierendes, partiell-doppelsträngiges, zirkuläres DNA-Genom [13]. Die Hepadnaviren lassen sich auf Grundlage ihrer Wirte in vier Gattungen unterteilen: Meta-/Parahepadnaviren (Fische), Herpetohepadnaviren (Frösche und Reptilien), Avihepadnaviren (Vögel) und Orthohepadnaviren (Säugetiere) [14]. Alle diese Gattungen kodieren für eine Polymerase, das Core und Oberflächenproteine, wohingegen die Expression eines X-Proteins als Alleinstellungsmerkmal der Orthohepadnaviren gilt [15]. Hepadnavirale Gattungen werden zusätzlich in Spezies unterteilt: Hierbei stellen Vollgenomsequenzen eine eigene Art dar, wenn sie sich von allen anderen bekannten Spezies um mehr als 20 % auf Nukleotidebene unterscheiden. Eine Unterscheidung von Genotypen findet ab einer Divergenz von mehr als 7,5 % statt, eine Trennung in Subgenotypen bei einer Nukleotiddifferenz von mehr als 4 % auf Ganzgenomebene [16, 17].

Die Gattung der Orthohepadnaviren besteht bislang aus zwölf Spezies mit strikter Wirtsspezifität [16]. Das menschliche HBV ist global verbreitet und wird in neun Genotypen (HBV-A bis HBV-I) und zahlreiche Subgenotypen unterteilt [17]. HBV-Subgenotyp A1 (HBV-A1) kommt vorrangig in Afrika und Subgenotyp A2 (HBV-A2) in Europa und Nordamerika vor. HBV-B und HBV-C sind beide in der indopazifischen Region verbreitet. HBV-D ist global verbreitet, wobei ein Schwerpunkt in Ländern des Mittelmeerraumes liegt. HBV-E kommt vorrangig im westlichen und zentralen Afrika vor. Die phylogenetisch-divergentesten HBV-Genotypen F und H sind in der neuen Welt verbreitet, wobei HBV-F in Südamerika und HBV-H in Mittelamerika größte Prävalenz zeigen [14]. Der seltene HBV-G wurde erst im Jahre 2000 anerkannt und zeigt keine spezifische geographische Verteilung [18]. Isolate des HBV-G zeigen außerdem eine außergewöhnlich hohe Sequenzidentität von >99 % und wurden bislang nur in Erwachsenen festgestellt [19, 20]. Infektionen mit HBV-I sind größtenteils auf Laos, Vietnam, Indien und Teile Chinas beschränkt [14]. Das einzige Isolat des vorgeschlagenen HBV-J stammt aus Borneo [21].

Einleitung

Neben HBV wurde bereits eine Vielzahl an anderen Orthohepadnavirus-Spezies identifiziert, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind.

Tabelle 1: Zusammenfassung aller bekannten Orthohepadnaviruspezies. In dieser Arbeit untersuchte Spezies sind blau hinterlegt. Abkürzungen entsprechen der ICTV-Nomenklatur.

Ordnung des Wirtstiers	Name	Genotyp	Abkürzung	Wirtstier der Erstbeschreibung	Erstbeschreibung
Primates	Hepatitis-B-Virus	A bis J	HBV-A bis HBV-J	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	1970 [3]
		Schimpanse	HBV-ch	Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	1988 [22]
		Gibbon I bis V	HBV-gib I bis HBV-gib V	Gibbon (<i>Hylobates lar</i>)	1996 [23]
		Orang-Utan	HBV-ou	Orang-Utan (<i>Pongo pygmaeus</i>)	1999 [24]
		Gorilla	HBV-gor	Gorilla (<i>Gorilla gorilla</i>)	2000 [25]
	Woolly Monkey Hepatitis-B-Virus	-	WMHBV	Brauner Wollaffe (<i>Lagotrix lagotricha</i>)	1998 [26]
	Cebus Monkey Hepatitis-B-Virus	-	CMHBV	Gelbbrust-Kapuzineraffe (<i>Sapajus xanthosternos</i>)	2018 [27]
Chiroptera	Horseshoe Bat Hepatitis-B-Virus	-	HSBHBV	Hufeisennasenfledermaus (<i>Rhinolophus alcyone</i>)	2013 [28]
	Roundleaf Bat Hepatitis-B-Virus	-	RLBHBV	Rundblattnasenfledermaus (<i>Hipposideros cf. ruber</i>)	2013 [28]
	Long-fingered Bat Hepatitis-B-Virus	-	LFBHBV	Östliche Bogenfledermaus (<i>Miniopterus fuliginosus</i>)	2013 [28]
	Tent-Making Bat Hepatitis-B-Virus	-	TMBHBV	Gelbohr-Fledermaus (<i>Uroderma bilobatum</i>)	2013 [28]
	Pomona Bat Hepatitis-B-Virus	-	PBHBV	Pomona-Rundblattnasenfledermaus (<i>Hipposideros pomona</i>)	2015 [29]
Rodentia	Woodchuck Hepatitis-Virus	-	WHV	Waldmurmeltier (<i>Marmota monax</i>)	1978 [30]

	Ground Squirrel Hepatitis-Virus	-	GSHV	Kalifornischer Ziesel (<i>Spermophilus beecheyi</i>)	1980 [31]
	Arctic Ground Squirrel Hepatitis-Virus	-	ASHV	Arktischer Ziesel (<i>Spermophilus parryi</i>)	1996 [32]
Carnivora	Domestic Cat Hepatitis-B-Virus	-	DCHBV	Hauskatze (<i>Felis catus</i>)	2018 [33]
	Ringtail Hepatitis-B-Virus	-	RtHBV	Nordamerikanisches Katzenfrett (<i>Bassariscus astutus</i>)	2022 [34]
Artiodactyla	Tai Forest Hepatitis-B-Virus	-	TFoHBV	Maxwell-Ducker (<i>Philantomba maxwellii</i>)	2019 [35]
Insectivora	Musk Shrew Hepatitis-B-Virus	China	MSHBV _{CHN}	Spitzmäuse (<i>Anourosorex squamipes</i> , <i>Crocidura attenuate</i> , <i>Crocidura lasiura</i>)	2019 [36]
		Elfenbein-küste	MSHBV _{CIV}	Afrikanische Riesenspitzmaus (<i>Crocidura olivieri</i>)	2019 [37]
	Crowned Shrew Hepatitis-B-Virus	A & B	CSHBV-A & CSHBV-B	Waldspitzmaus (<i>Sorex araneus</i>) & Schabrackenspitzmaus (<i>Sorex coronatus</i>)	2019 [37]
Perissodactyla	Equid Hepatitis-B-Virus	-	EqHBV	Esel (<i>Equus asinus</i>) & Zebra (<i>Equus quagga</i>)	2021 [38]

In der Ordnung *Primates* wurden neben den menschlichen HBV-Genotypen außerdem Orthohepadnaviren in Altweltmenschenaffen identifiziert. Da die Divergenz zwischen HBV aus Menschen und HBV aus Menschenaffen zwischen 10-15 % beträgt, werden letztere nicht als eigene phylogenetische Spezies, sondern lediglich als weitere Genotypen des HBV gezählt [14]. Diese nicht-menschlichen HBV-Genotypen wurden bislang in Schimpansen, Gorillas, Gibbons und Orang-Utans identifiziert. Obwohl eine Übertragung von menschlichem HBV auf diese Menschenaffen möglich ist [39-41], konnte bislang keine solche artübergreifende natürliche Übertragung vom Tier auf den Menschen nachgewiesen werden [42]. Außerdem konnten Hepadnaviren in

zwei Affenspezies der Neuwelt gefunden werden: Das WMHBV (engl.: *woolly monkey hepatitis B virus*) des Wollaffen, sowie das CMHBV (engl.: *cebus monkey hepatitis B virus*) des Kapuzineraffen. Das WMHBV wurde erstmals 1998 in Wollaffen eines Zoos nachgewiesen und zeigte eine Nukleotiddifferenz von rund 22 % zu HBV [26]. Zwanzig Jahre später wurde dann das zweite Neuweltaffenvirus CMHBV entdeckt, welches eine Divergenz von 20,4 % zu HBV aufwies [27].

Auch in der Ordnung *Chiroptera* (Fledertiere) wurden bereits mehrere hepadnavirale Spezies identifiziert. Hierzu zählen HSBHBV (engl.: *horseshoe bat hepatitis B virus*), RLBHBV (engl.: *roundleaf bat hepatitis B virus*), PBHBV (engl.: *pomona bat hepatitis B virus*) und das LFBHBV (engl.: *long-fingered bat hepatitis B virus*), die alle aus Fledermausspezies der Alten Welt isoliert wurden. TMBHBV (engl.: *tent-making bat hepatitis B virus*) stellt bislang das einzige Hepadnavirus aus einer Neuweltfledermausspezies dar [28, 29].

Zudem wurden Orthohepadnaviren in Neuweltnagetieren der Ordnung *Rodentia* (engl.: *woodchuck hepatitis virus* (WHV), *ground squirrel hepatitis virus* (GSHV) und *arctic ground squirrel hepatitis virus* (ASHV)) [30-32], sowie in Hauskatzen (engl.: *domestic cat hepatitis B virus* (DCHBV); Ordnung *Carnivora*) [33], dem nordamerikanischen Katzenfrett (engl.: *ringtail hepatitis B virus* (RtHBV), Ordnung *Carnivora*) [34], einem Ducker (engl.: *Tai forest hepatitis B virus* (TFoHBV); Ordnung *Artiodactyla*) [35] und Spitzmäusen (engl.: *musk shrew hepatitis B virus* (MSHBV_{CHN}); Ordnung *Insectivora*) [36] nachgewiesen.

3.1.2 Genomstruktur und Proteine des Hepatitis-B-Virus

Da sich die Genome aller bisher entdeckten Hepadnaviren nur sehr gering in ihrem Aufbau unterscheiden, werden auch alle kodierten Proteine analog zum HBV angenommen. Eine Zusammenfassung der Länge aller (vorhergesagten) orthohepadnaviralen Proteine ist im Anhang dargestellt (Abbildung S3). Aufgrund dieser hohen Similarität wird im Folgenden die Genomstruktur des HBV repräsentativ für alle Orthohepadnaviren dargestellt.

Das HBV-Genom liegt als eine entwundene, zirkuläre, aber nicht kovalent geschlossene, rund 3,2 kb-große DNA (engl.: *relaxed circular DNA* (rcDNA)) im Viruspartikel vor [13]. Diese rcDNA ist kovalent mit der viruseigenen Polymerase verknüpft und besteht aus einem vollständigen Minusstrang sowie einem unvollständigen Plusstrang mit variabler Länge. Nach Infektion einer Leberzelle wird die rcDNA über mehrere Schritte (siehe Abschnitt 3.1.4) zu kovalent-geschlossener zirkulärer DNA (engl.: *covalently-closed circular DNA* (cccDNA)) modifiziert, von der die Expression aller viralen Proteine über mehrere regulatorische Elemente gesteuert wird [13]. Eine Übersicht des HBV-Genoms (cccDNA) ist in Abbildung 1 dargestellt.

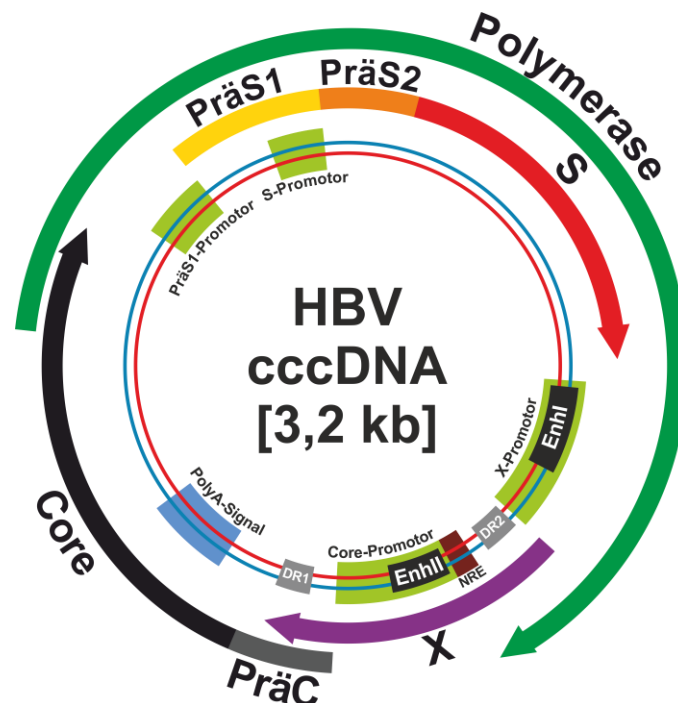


Abbildung 1: Genomaufbau des HBV. Neben den ORF für die Polymerase (dunkelgrün) und das X-Protein (lila), sind der S-ORF (PräS1 (gelb), PräS2 (orange), S (rot)) und der Core-ORF (PräC (dunkelgrau), Core (schwarz)) dargestellt. Regulatorische Elemente sind farblich dargestellt: Promotor (hellgrün), Enhancer (Schwarz), direkte Repeats (Grau), das negative regulatorische Element (NRE; braun) und das gemeinsame PolyA-Signal aller mRNAs (blau).

Neben den vier Promotoren (PräS, S, X, C), denen die Transkription der sieben viralen Proteine unterliegt, finden sich im HBV-Genom zwei Enhancer (EnhI und EnhII): Während EnhI die transkriptionelle Aktivität der C- und X-Promotoren stimuliert, verstärkt EnhII die Transkription über den X-Promotor sowie beide HBs-Promotoren [43, 44]. Das negative regulatorische Element (NRE) hingegen unterdrückt teilweise die C-Promotoraktivität [43]. Zusätzlich enthält das HBV-Genom zwei direkte Repeats (engl.: *direct repeat* (DR1/DR2)). DR1

fungiert als Reinitiationsstelle der Minusstrangsynthese während der Replikation (siehe Abschnitt 3.1.4), wohingegen DR2 der Plusstrangsynthese dient [45].

3.1.2.1 Die Oberflächenproteine (HBs)

HBV kodiert für drei Oberflächenproteine (HBs), die C-terminal redundant sind. Das kleine Oberflächenprotein (engl.: *small hepatitis B virus surface protein* (SHBs)) besteht aus 226 AS, wird von einer 2,1 kb-mRNA kodiert und ist in allen drei Oberflächenproteinen enthalten [46]. Da bisher keine Kristallstruktur des SHBs gelöst werden konnte, wurde ein topologisches Modell mit vier Transmembrandomänen (TMD I-IV) vorgeschlagen [47], welches in Abbildung 2 dargestellt ist.

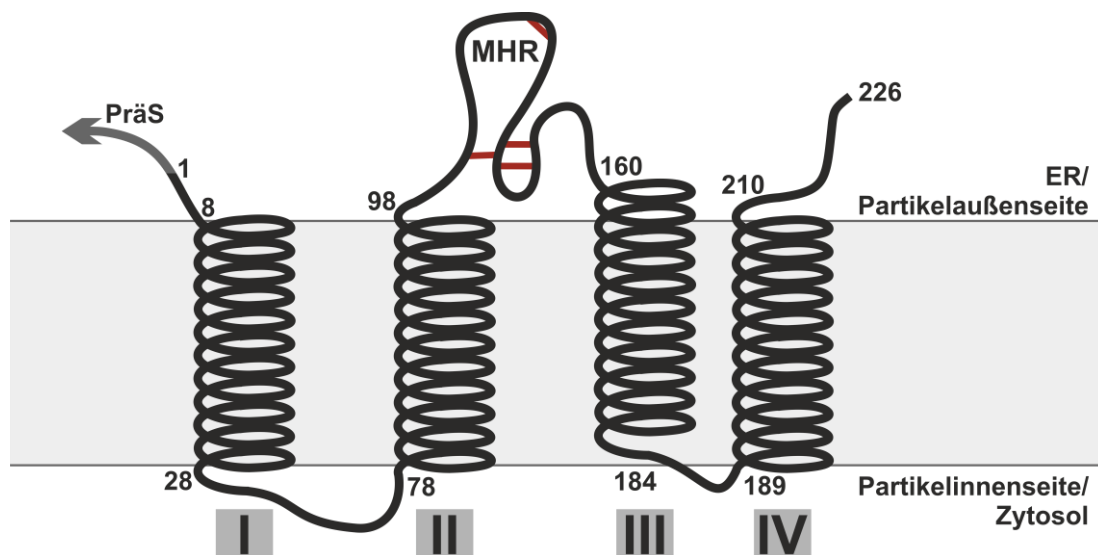


Abbildung 2: Topologiemodell der S-Domäne. Der N-Terminus der S-Domäne liegt auf der Partikelaußenseite (entspricht ER-Lumen). Der ersten Transmembrandomäne (TMD I; AS 8-28) folgt eine zytosolische Schleife (Partikelinnenseite). Hinter der TMD II (AS 78-98) liegt die große hydrophile Region (engl.: *major hydrophilic region* (MHR); AS 99-169), die teilweise mit der TMD III überlappt (AS 160-184), dessen N-terminaler Teil (ungleich der anderen TMD) hin zu der Partikelaußenseite verschoben ist. Eine kurze zytosolische Schleife (AS 185-188) verbindet TMD III und TMD IV (AS 189-210). Der C-terminale Teil der S-Domäne (AS 211-226) liegt auf der Partikelaußenseite. Disulfidbrücken sind in rot dargestellt.

Zwischen TMD II und TMD II befindet sich die sogenannte große hydrophile Region (engl.: *major hydrophilic region* (MHR)), welche die AS 99-169 umfasst und auf der Partikelaußenseite lokalisiert ist [48]. Die MHR beinhaltet unter anderen die strukturell-komplexe „a“-Determinante (AS 124-147) (siehe auch Abschnitt 3.1.3) [46], das Hauptziel neutralisierender Anti-HBs-Antikörper nach Impfung und Infektion [46, 49]. Die infektionsrelevante Konfiguration [50] der

„a“-Determinante besteht aus mehreren Schleifen, die durch Disulfidbrücken von acht Cysteinresten (C107, C121, C124, C137, C138, C139, C147, C149) stabilisiert werden [51, 52]. Die S-Domäne besitzt außerdem eine fakultative N-Glykosylierungsstelle an N146, die zu den zwei Glykoformen p24 (unglykosyliert) und gp27 (einfach-glykosyliert) des SHBs führt, welche zu gleichen Teilen sekretiert werden [53]. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass HBs-Mutanten ohne N-Glykosylierungsstelle an N146 in gleichem Maße wie Wildtyp-SHBs sekretiert werden konnten und im HDV-Modell auf primären humanen Hepatozyten infektiös waren [50, 54].

Auch das mittlere Oberflächenprotein (engl.: *middle hepatitis B virus surface protein* (MHBs)) wird über die S-Promotor-gesteuerte 2,1 kb-große mRNA exprimiert. Hierbei spielt jedoch die Transkriptioninitiationsstelle eine wichtige Rolle: Manche S-mRNAs beinhalten das MHBs-Startcodon und erlauben somit die Translation von MHBs, wobei andere dieses nicht enthalten und daher nur SHBs-Translation erlauben [55]. MHBs besitzt zusätzlich zur S-Domäne weitere 55 AS, die PräS2-Domäne genannt werden. MHBs ist immer an Aminosäure N4 der PräS2-Domäne N-glykosyliert [56]. Für die korrekte Faltung benötigt MHBs das Chaperone Calnexin, welches selektiv an dessen N-Glykosylierung an N4 bindet [54]. Aufgrund der partiellen N-Glykosylierung der S-Domäne zeigen sich zwei MHBs-Spezies (gp33 und ggp36). Außerdem ist MHBs bei manchen HBV-Genotypen zusätzlich O-glykosyliert [56, 57]. Welche Funktion MHBs im viralen Replikationszyklus einnimmt, ist weiterhin umstritten: Obwohl MHBs und seine N-Glykosylierungsstelle in den meisten Orthohepadnaviren konserviert ist, konnten Studien zeigen, dass MHBs für Replikation, Sekretion und Infektiosität per se nicht notwendig ist [58, 59]. Trotzdem scheint glykosyliertes MHBs die Sekretion von viralen Partikeln positiv zu beeinflussen [60].

Das große Oberflächenprotein (engl.: *large hepatitis B virus surface protein* (LHBs); p39 und gp42) wird über eine eigene 2,4 kb-große mRNA unter Kontrolle des PräS1-Promotors exprimiert [61]. Es besitzt neben der S- und PräS2- auch die PräS1-Domäne (108, 109 oder 118 AS) [17]. LHBs auf Viruspartikeln zeigt zwei Ausrichtungen: Bei ungefähr der Hälfte aller LHBs-Moleküle befindet sich die PräS1-PräS2-Domäne im Partikelinneren (entspricht Zytosol) und die andere Hälfte auf der Partikelaußenseite (entspricht ER-/Golgi-

Lumen). Für diese duale Topologie ist die *Cytosolic Anchorage Domain* (CAD; AS 70-94) des LHBs verantwortlich, welche durch Bindung an Hsc70 (engl.: *Heat shock cognate protein 70*) eine co-translationale Translokation in das ER-Lumen verhindert [54]. Erst nach Sekretion der Virionen kommt es in einem langsamen Prozess zur PräS-Translokation [62]. Beide Konformationen haben distinkte Funktionen: Die N-terminale Region des „externen“ PräS1 ist essentiell für die spezifische Bindung von Viruspartikeln an die Wirtszellmembran [63]. Hierbei spielen insbesondere die hochkonservierte essentielle Bindedomäne (AS 9-15) sowie zwei, aneinander angrenzende akzessorische Domänen (AS 28-48) eine wichtige Rolle [64]. Außerdem ist LHBs am N-terminalen Glycin (G2) post-translational mit einer Myristinsäure verknüpft, welche für Bindung und Infektiosität des HBV notwendig ist [65, 66]. Der Übergang der PräS1- zur PräS2-Domäne des „internen“ LHBs (AS 103-127) bildet die Nukleokapsidbindestelle und ist für die Verpackung von reifen Viruskapsiden wichtig [67].

Experimentell dienen myristoylierte PräS1-Peptide der AS 2-48 zur Untersuchung der Virus-Wirtsspezifität [68], sowie als Zelleintrittsinhibitoren bei HBV-/HDV-Infektionen [64]. Seit kurzem kommt ein solches Peptid (genannt Bulevirtid) als Inhibitor bei HDV-Infektionen klinisch zur Anwendung [69].

Die drei Oberflächenproteine befinden sich auf infektiösen Viruspartikeln und nicht-infektiösen subviralen Partikeln zu unterschiedlichen Anteilen: Auf Virionen ist ein 1:1:4-Verhältnis (LHBs:MHbS:SHBs) zu finden, wobei LHBs rund 17 % ausmacht. Im Gegensatz dazu weisen subvirale Partikel substantiell weniger LHBs auf (10 % in Filamenten und <1 % in Sphären) [70].

3.1.2.2 Das Core-Protein (HBc)

Das Core-Strukturprotein (HBc) wird über die prägenomische RNA (pgRNA) translatiert und besteht genotypabhängig aus 183 oder 185 AS (siehe Abschnitt 3.1.2.6) [46, 71]. Die N-terminalen 144 AS bilden hierbei die Assemblierungsdomäne, wohingegen die C-terminale, argininreiche Domäne (C-terminale 34/36 AS) für die Bindung an die pgRNA essentiell ist [72, 73]. Nach Translation bilden sich zunächst Core-Dimere über einen konservierten Cysteinrest (C61) [74], welche sich anschließend zu Core-Partikeln mit T=3- oder T=4-Symmetrie (90 bzw. 120 Dimere) zusammenfinden [75]. Während der Reifung der Kapside

(Fortschreiten der reversen Transkription) kommt es zu dynamischer Dephosphorylierung an sechs Serin- und einem Threoninrest (S155, T160, S162, S170, S176, S178) innerhalb der C-terminalen Domäne [76].

Mehrere konservierte Anti-HBc-gerichtete B-Zell-Epitope konnten bisher mittels monoklonaler Antikörper bestimmt werden: Hierbei spielen insbesondere die „immundominante Schleife“ (engl.: *immunodominant loop*) der AS 74-84 und ein konformationelles Epitop (AS20-22/25-29/126-132) eine Rolle [77]. Antikörper gegen das Core-Protein (Anti-HBc-IgM/-IgG) sind nicht-neutralisierend, dienen aber als diagnostische Marker einer HBV-Infektion [78].

3.1.2.3 Das e-Antigen (HBeAg)

Das sekretierte HBeAg wird über eine eigene, vom C-Promotor kontrollierte PräC-mRNA translatiert. Das Translationsprodukt dieser mRNA (p25) besteht aus dem 29-AS-langen PräC-Peptid gefolgt von der gesamten Core-Proteinsequenz [46]. Dieses HBeAg-Vorläuferpolypeptid durchläuft zwei post-translationale Prozessierungsschritte zum reifen HBeAg, die in Abbildung 3 dargestellt sind.

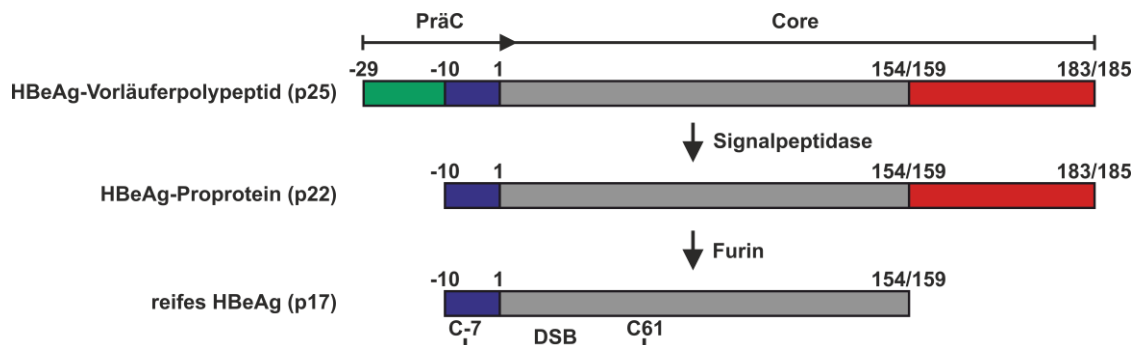


Abbildung 3: Post-translationale Prozessierung des HBeAg. Das HBeAg-Vorläuferpolypeptid (p25) wird nach der Translation aufgrund eines Signalpeptids innerhalb der AS -29 bis -10 der PräC-Sequenz (grün) in das endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert. Im ER wird diese Signalsequenz durch die Signalpeptidase abgetrennt und das entstehende HBeAg-Proprotein (p22) wird weiter in den Golgi-Apparat transportiert. Dort wird durch die Propeptinkonvertase Furin die argininreiche C-terminale Domäne (rot) abgetrennt. Hierbei schneidet Furin in HBV-A aufgrund einer Dipeptidinsertion und dadurch veränderter Schnittstellen präferenziell nach R159 und bei allen anderen Genotypen nach R154. Das daraus entstehende reife HBeAg wird sekretiert. Reifes HBeAg enthält eine Disulfidbrücke (DSB) zwischen C-7 (PräC) und C61 (Core), welche eine analoge Dimerisierung des HBc durch C61-C61-DSB verhindert.

Die N-terminalen 19 AS bilden ein Signalpeptid, welches das HBeAg-Vorläuferpolypeptid (p25) zum ER lokalisiert. Dort werden diese AS durch die Signalpeptidase abgetrennt und es verbleiben 10 AS der PräC-Sequenz im

Proprotein p22 [79]. Anschließend wird die argininreiche C-terminale Domäne im Golgi-Apparat durch Furin abgetrennt, wodurch das reife HBeAg (p17) entsteht. Die kanonische Furinschnittstelle befindet sich nach R154 [80], wobei HBV-A eine Sonderrolle einnimmt: Durch eine Dipeptidinsertion wird die kanonische Schnittstelle in HBV-A geschwächt und eine spätere Schnittstelle nach R159 bevorzugt verwendet [81]. Im Gegensatz zum Core-Protein bildet HBeAg keine kovalent-gebundenen Homodimere, da ein konservierter Cysteinrest des verbleibenden PräC-Bereichs (C-7) anstelle der inter- eine intramolekulare Disulfidbrücke mit C61 eingeht [82]. Zusätzlich inhibiert ein hydrophobes Tripeptid (WLW) im verbleibenden PräC des HBeAg die Partikelbildung [83]. Reifes HBeAg wird schließlich sekretiert und ist im Serum Infizierter als Dimer nachweisbar [84], wo es als Marker für den Verlauf einer chronischen Infektion verwendet wird (siehe Abschnitt 3.1.5). Obwohl das HBeAg nicht essentiell für die HBV-Replikation ist, spielt es eine zentrale Rolle bei dessen viraler Persistenz [78, 85]. So konnte im humanisierten Mausmodell gezeigt werden, dass HBeAg HBV-positiver Muttertiere in den Nachkommen die Differenzierung bestimmter Makrophagen zu einem Anti-inflammatorischen Phänotyp induzierte und damit eine robuste HBV-spezifische Immunantwort der Nachkommen durch zytotoxische T-Zellen ausblieb [86].

Antikörper gegen das HBe (Anti-HBe) sind ein entscheidender klinischer Marker im Verlauf einer chronischen Hepatitis B (siehe Abschnitt 3.1.5). Trotz des hohen Sequenzüberlapps mit dem Core-Protein, präsentiert HBeAg von HBc-unterscheidbare B-Zellepitope und es besteht nur wenig Kreuzreaktivität von Anti-HBe-Antikörpern gegen HBc [77, 78, 87].

3.1.2.4 Die Polymerase

Die Polymerase (842-845 AS) wird über die pgRNA mittels *ribosomal leaky scanning*-Mechanismus translatiert [46]. Sie besteht aus drei funktionalen Domänen: Dem Terminalen Protein (TP), der reversen Transkriptase (RT), sowie der RNase H [88]. Hierbei sind TP und RT durch eine nicht-essentielle Spacer-Region getrennt, die auf Nukleotidebene mit der PräS-Region überlappt [89]. Während die reverse Transkriptase und die RNase H hohe Ähnlichkeit zu homologen Domänen der Retroviren aufweisen, findet sich das terminale Protein nur bei den Hepadnaviren [90, 91]. Das TP ist essentiell für die Initiation der reversen Transkription, indem es über einen Tyrosinrest als Proteinprimer

fungiert [13, 92]. Anschließende RNA-abhängige DNA-Synthese wird durch das katalytische Zentrum der RT bestehend aus einem hochkonservierten YMDD-Motiv vollzogen [88], die RNase H baut dabei die Template-RNA räumlich versetzt ab [13].

3.1.2.5 Das X-Protein (HBx)

Das 154-AS-lange X-Protein (HBx) ist als transkriptioneller Aktivator episomaler DNA für die HBV-Replikation essentiell [93]. In vitro konnte gezeigt werden, dass HBx-defiziente HBV-Partikel keine Infektion etablieren konnten [94]. Der molekulare Hintergrund dieser essentiellen Funktion des HBx war allerdings lange nicht bekannt: Im Jahre 2018 konnte schließlich in zwei unabhängigen Studien gezeigt werden, dass HBx über seine Interaktion mit der E3-Ubiquitin-Ligase DDB1 (engl.: *DNA damage-binding protein 1*) den SMC5/6-Komplex (engl.: *structural maintenance of chromosomes protein 5/6*) spezifisch abbauen lässt [95, 96]. In Abwesenheit von HBx sorgt jener für eine vollständige transkriptionelle Inaktivierung der cccDNA. Die Bindung an DDB1 erfolgt über ein alpha-helikales Motiv (H-Box), das auch in anderen viralen Proteinen funktionell-, aber nicht sequentiell-hochkonserviert ist [97]. Dieser provirale Mechanismus des HBx ist zudem in allen Orthohepadnaviren konserviert [98]. HBx spielt außerdem bei der Entstehung von HCC eine Rolle [99].

3.1.2.6 Genetische Besonderheiten der HBV-Genotypen

Die Genomlänge mancher HBV-Genotypen unterscheidet sich aufgrund bestimmter Insertionen/Deletionen: HBV-D besitzt das kleinste Genom mit 3182 nt. Genotypen B, C, F, H, I (3215 nt) besitzen zusätzliche 33 nt am 5'-Ende der PräS1-Region, welche LHBs um 11 AS N-terminal verlängern. Bisher konnte nur ein benachteiligender Effekt dieser Insertion gezeigt werden: Die Erzeugung eines verkürzten (HBV-D-ähnlichen) LHBs der HBV-B und HBV-C durch Deletionen führte in vitro zu einer verbesserten Replikation und Infektiosität der resultierenden Viren [100].

An ähnlicher Stelle im PräS1 besitzt der HBV-E (3212 nt) zusätzliche 30 nt. Auch für diese Sequenz konnte bisher nur gezeigt werden, dass sie einen negativen Effekt auf LHBs-Produktion und Sekretion hat [101].

Eine verwandte 30 nt-Sequenz findet sich auch in HBV-G (3248 nt), wobei dieser außerdem eine einzigartige 36 nt-lange Insertion im 5'-Bereich des Core-

ORF besitzt. Diese Insertion hat in vitro eine wesentlich verstärkte HBc-Expression zur Folge, die für eine effiziente Replikation des HBV-G notwendig ist [102]. Außerdem besitzt Genotyp G immer zwei Nonsense-Mutationen in der PräC-Region (Q-28* und W-1*), welche die Synthese des HBeAg verhindern [85]. Da HBeAg für die Chronifizierung von HBV insbesondere bei vertikaler Übertragung notwendig ist [85, 86], wird HBV-G fast ausschließlich in Koinfektion mit einem HBeAg-positiven Genotyp nachgewiesen [103].

HBV-A (3221 nt) besitzt wie HBV-B/-C/-F/-H/-I (s.o.) eine 33 nt-Sequenz im PräS1 und zusätzlich eine 6 nt-Insertion am 3'-Ende des Core-ORF. Diese verändert zwei konservierte, sich überlappende Furin-Schnittstellen im HBeAg. Daraus resultiert die Sekretion von zwei HBeAg-Spezies verschiedener Länge, die auch im Serum Infizierter nachgewiesen werden können [81].

Außerdem treten Rekombinanten aus verschiedenen HBV-Genotypen häufig auf bzw. sind als eigenständige (Sub-)Genotypen anerkannt [46]. So entstanden Subgenotypen HBV-B2 bis HBV-B4 aus Rekombination von HBV-B mit HBV-C [104] und das Isolat des HBV-J wahrscheinlich aus HBV-C und HBV-gib [105]. Der HBV-Genotyp I ist eine Vierfach-Rekombinante aus HBV-A/-C/-G und einem unbekannten Genotyp [17, 106-108].

3.1.3 Die HBV-Serotypen

Bereits kurz nach Entdeckung des HBsAg war bekannt, dass sich Anti-HBs-Antikörper infizierter Personen gegen bestimmte Hauptepitope richteten, die nicht allen HBV-Isolaten gemein waren. Obwohl deren molekulare Grundlage noch nicht geklärt war, konnte HBV trotzdem über Antikörper-Antigen-Reaktionen in neun spezifische Serotypen (ursprünglich: Subtypen) klassifiziert werden [109], die unterschiedliche globale Verteilung aufwiesen [110]. Die Hauptdeterminante „a“ findet sich in allen HBV-Isolaten. Zusätzlich zu „a“ kann zwischen der „y“- und der „d“-Determinante sowie der „w“- und der „r“-Determinante unterschieden werden [111, 112]. Später wurde die „q“-Determinante beschrieben, die nur in Serotyp adr vorkommt [113]. Heutzutage wird eine solche Serotypisierung fast ausschließlich über Sequenzierungen der antigenen Schleife (engl.: *antigenic loop* (AGL)) mit gleichzeitiger Genotypisierung durchgeführt, da die Determinanten-bestimmenden

Aminosäuren bekannt sind [114]. Bestimmte Genotypen sind häufiger mit Serotypen assoziiert, welche in Tabelle 2 zusammengefasst sind.

Tabelle 2: Zusammenfassung der mit HBV-Subgenotypen am häufigsten assoziierten Serotypen. Tabelle angepasst basierend auf Locarnini 2013 [105].

Genotyp	Subgenotyp	Assoziierte(r) Serotyp(en)
HBV-A	HBV-A1	adw2, adw1
	HBV-A2	adw2, adw1
HBV-B	HBV-B1	adw2
	HBV-B2	adw2, adw3
	HBV-B3	adw2, ayw1
	HBV-B4	ayw1, adw2
HBV-C	HBV-C1	adrq+, ayr, adw2, ayw1
	HBV-C2	adrq+, ayr
	HBV-C3	adrq-, adrq+
HBV-D	HBV-D1	ayw2, adw1, ayw1
	HBV-D2	ayw3, ayw1
	HBV-D3	ayw3, ayw2, ayw4
	HBV-D4	ayw2, ayw3
HBV-E	noch keine Subgenotypen beschrieben	ayw4, ayw2
HBV-F	HBV-F1 bis HBV-F4	adw4, ayw4
HBV-G	noch keine Subgenotypen beschrieben	adw2
HBV-H	noch keine Subgenotypen beschrieben	adw4
HBV-I	HBV-I1/-I2	adw2

Eine konventionelle HBV-Impfung aus Hefe-exprimiertem SHBs des Serotyps *adw2* (HBV-Subgenotyp A2) ist seit 1982 erhältlich [115] und bis heute weltweit verbreitet. Die Impfung induziert in Abhängigkeit vom Status des Immunsystems bei >90 % der Geimpften eine schützende Anti-HBs-Immunantwort [116, 117], die bis zu 30 Jahre anhalten kann [118].

3.1.4 Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus

Der erste Schritt des HBV-Eintritts in humane Hepatozyten erfolgt über eine niederaffine Bindung der S-Domäne mit dem zelloberflächenständigen Glypikan 5 (GPC5) und anderen Heparansulfatproteoglykanen (HSPG) [119]. Anschließend findet eine hochspezifische Interaktion der N-terminalen Domäne

des PräS1 (siehe Abschnitt 3.1.2.1) mit dem Gallensäuretransporter NTCP (engl.: *Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide*) statt [120], welche durch eine Komplexierung des NTCP mit EGFR (engl.: *epidermal growth factor receptor*) die Clathrin-abhängige Endozytose einleitet [121-123]. Nach Freisetzung des Nukleokapsids wird dieses aufgrund eines Kernlokalisationssignals des HBc über Mikrotubuli zum Zellkern transportiert [124, 125]. Die enthaltene rcDNA wird nach Disassemblierung des Nukleokapsids in den Zellkern entlassen [126]. Die partiell-doppelsträngige rcDNA wird dort durch (mindestens) fünf Wirtsfaktoren durch Entfernen der kovalent-gebundenen Polymerase, des Plusstrand-RNA-Oligomers, Vervollständigung des Plusstrangs und Schließen der offenen DNA-Enden zur replikativen cccDNA komplementiert [127]. Die cccDNA liegt im Zellkern episomal als sogenanntes „Minichromosom“ vor und ist mit Histonen verpackt [128-130]. Da die cccDNA keinen Replikationsursprung besitzt, wird sie bei Zellteilung nicht amplifiziert [13]. Aufgrund ihrer Chromatin-ähnlichen Struktur unterliegt die cccDNA zudem epigenetischen Einflüssen. Hierbei spielt HBx eine besondere Rolle: In vitro konnte gezeigt werden, dass HBx die transkriptionelle Inaktivierung der cccDNA durch den SMC5/6-Komplex verhindert, indem es diesen Komplex indirekt für proteasomalen Abbau markiert [95, 96]. Auf Grundlage der cccDNA werden von der zelleigenen RNA-Polymerase II fünf mRNA-Spezies transkribiert: die 3,5 kb prägenomische RNA (pgRNA), die 3,5 kb PräC-mRNA, die 2,4 kb PräS1-mRNA, die 2,1 kb S-mRNA und die 0,7 kb X-mRNA [61]. Die reifen HBV mRNAs besitzen 5'-Cap und 3'-PolyA, sind aber vorrangig ungespliced [43, 46]. Die Expression des HBx mittels X-mRNA scheint bereits sehr früh stattzufinden, sodass die transaktivierende Funktion des HBx maximal genutzt werden kann [131]. Aus der PräC-mRNA wird zunächst ein PräC-Vorläuferpolypeptid synthetisiert, welches über Prozessierungsschritte zum sekretierten HBeAg reift (siehe Abschnitt 3.1.2.3). Die drei Oberflächenproteine (LHBs, MHBs und SHBs; siehe Abschnitt 3.1.2.1) werden über die 2,4 kb und 2,1 kb subgenomischen mRNAs kodiert und kotranslational in die ER-Membran eingebracht [13, 132]. Sie können anschließend in Form von infektiösen Virionen oder nicht-infektiösen subviralen Partikeln sekretiert werden. Letztere können je nach HBs-Verhältnis (siehe Abschnitt 3.1.2.1) 20 nm-große sphärische oder filamentöse Morphologie

annehmen [13]. Die Sekretion der Sphären geschieht über den konstitutiven sekretorischen Weg, während Filamente (wie Virionen) über *multivesicular bodies* (MVB) exozytiert werden [133]. Subvirale Partikel werden in einem Überschuss von mehr als 1.000:1 zu Virionen sekretiert und fungieren vorrangig als Köder zur Immunkomplexierung von Anti-HBs-Antikörpern [134]. Die übergenomlange pgRNA ist 5'- und 3'-redundant [135] und dient als Translationsgrundlage für HBc und virale Polymerase, sowie als Template für die Generation von rcDNA via reverser Transkription [46]. Die Synthese der viralen Polymerase erfolgt über einen ineffizienten *ribosomal leaky scanning*-Mechanismus bzw. translationale Terminations-Reinitiation [136-138]. Da für die Assemblierung von Nukleokapsiden nur ein einziges Polymerase-Molekül aber 180-240 Core-Proteine benötigt werden, scheint diese stark bevorzugte Translation des Core-Proteins gegenüber der Polymerase als schlüssig [46]. Nach Synthese der Polymerase bindet diese (bevorzugt) in *cis* an eine 5'-gelegene Stem-Loop-Struktur der pgRNA, genannt Epsilon (ϵ) [139-141]. Die Polymerase- ϵ -Interaktion induziert die Verpackung der pgRNA in unreife Nukleokapside über die phosphorylierte C-terminale argininreiche Domäne des HBc [73, 76], innerhalb welcher die reverse Transkription beginnt. Epsilon dient zunächst als Template für die Synthese eines kurzen DNA-Oligonukleotids, das durch Proteinpriming des Tyrosins an Position 63 der TP-Domäne der Polymerase katalysiert wird [142, 143]. Anschließend transferiert die Polymerase samt Oligonukleotid zu einer komplementären Sequenz innerhalb des DR1 am 3'-Ende der pgRNA, wo die RNA-abhängige DNA-Synthese des Minusstrangs beginnt [144, 145]. Zeitgleich zur Synthese der Minusstrang-DNA wird in einem Abstand von rund 18 nt die Template-pgRNA durch die RNase H-Domäne der Polymerase abgebaut [146]. Nach vollständiger Synthese des Minusstrangs (in Übergenomlänge) verbleiben 18 nt der pgRNA, welche nach Transfer der Polymerase zum 5'-gelegenen DR2 des Minusstrangs als RNA-Primer für die Synthese des Plusstrangs verwendet werden [146]. Der Plusstrang ist unvollständig und besitzt variable Länge. Dieses Phänomen wird mit der schwankenden Menge an freien dNTPs erklärt, welche nach Assemblierung des unreifen Nukleokapsids darin eingeschlossen sind [135, 147]. Außerdem verbleibt die Polymerase in rund 10 % der Nukleokapside nach Minusstrangsynthese am DR1, wodurch nach Plusstrangsynthese

doppelsträngige lineare HBV-DNA (dsDNA) entsteht, welche ins Wirtsgenom integrieren kann [146]. Nach Synthese des Plusstrangs liegt nun rcDNA in den Nukleokapsiden vor, welche eine Änderung des Phosphorylierungszustandes der Nukleokapside induziert [76, 148, 149]. Diese reifen Nukleokapside werden anschließend mit den Oberflächenproteinen am ER verpackt und über MVB sekretiert [150, 151]. Die HBs-HBc-Interaktion wird über AS 103-127 des „internen“ LHBs (siehe Abschnitt 3.1.2.1) und der wenig-charakterisierten Matrix-Bindedomäne des HBc vermittelt [67, 152]. Eine Zusammenfassung des Replikationszyklus ist in Abbildung 4 dargestellt.

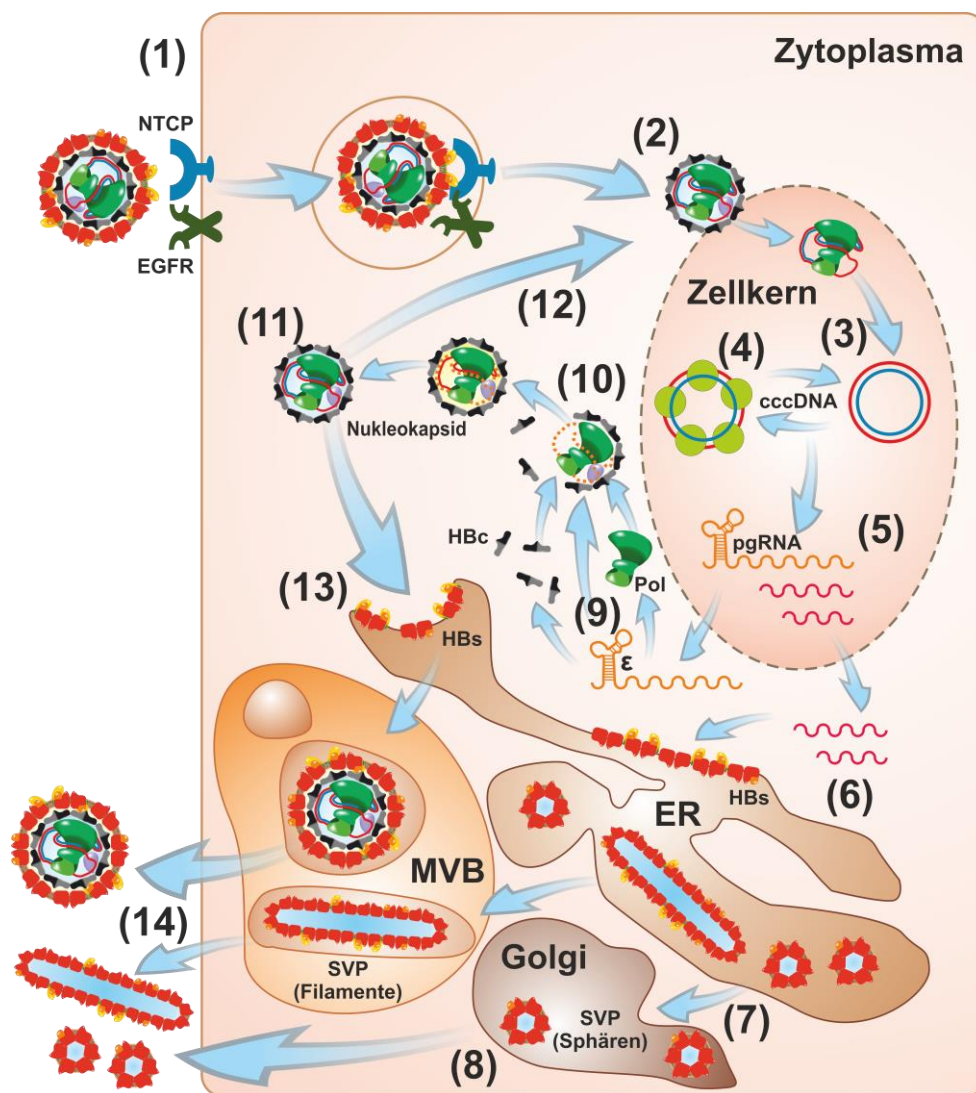


Abbildung 4: Zusammenfassung des HBV-Replikationszyklus. HBV heftet sich zunächst über HSPGs an die Zelloberfläche von Hepatozyten an. Eine hochaffine Bindung an das NTCP leitet die Endozytose unter Einfluss des epidermal growth factor-Rezeptors (EGFR) ein (1). Nach Transport des Nukleokapsids an den Zellkern, wird dieses disassembliert und die rcDNA in den Zellkern freigegeben (2). Die Vervollständigung der rcDNA zu cccDNA erfolgt über Wirtsfaktoren (3). Die cccDNA liegt episomal im Zellkern vor und ist u.a. mit Histonen zu einem „Minichromosom“ verpackt (4). Die cccDNA dient zur

Transkription aller viralen mRNAs (5). Die PräC-mRNA und die subgenomischen mRNAs (PräS1, S und X) werden im Zytoplasma translatiert (6). Die Synthese der Oberflächenproteine (HBs) geht mit einer kotranslationalen Einlagerung ins endoplasmatische Retikulum (ER) einher. Überschüssiges HBs bildet subvirale Partikel (SVP) in Form von Sphären und Filamenten. Sphärische SVP werden erst ins Golgi-Netzwerk transportiert (7) und schließlich über den konstitutiven Sekretionsweg ausgeschleust (8). Aus der prägenomischen RNA (pgRNA) werden das Core-Protein (HBc) und die virale Polymerase translatiert (9). Bindung der Polymerase an das Epsilon-Signal (ϵ) der pgRNA induziert die Verpackung des Pol-pgRNA-Komplexes mit HBc-Dimeren zu unreifen Nukleokapsiden (10). Innerhalb dieser Nukleokapside findet die reverse Transkription der pgRNA zu rcDNA statt (11). Die nun reifen Nukleokapside werden entweder zurück zum Zellkern transportiert, um den cccDNA-Pool aufrecht zu erhalten (12) oder am ER mit HBs verpackt (13). Die Sekretion von Virionen sowie filamentösen SVP erfolgt über multivesicular bodies (MVB). [Verändert nach Glebe & Bremer [13]. Erlaubnis zur veränderten Wiederverwendung durch Thieme Medical Publishers erteilt.]

3.1.5 Klinischer Verlauf einer chronischen Hepatitis B (CHB)

Infektionen mit HBV können akut oder chronisch verlaufen: Der Nachweis einer aktiven Replikation von HBV in einem Zeitraum von weniger als sechs Monaten wird als akut oder selbst-limitierend bezeichnet, wohingegen man bei längerer Infektion von einem chronischen Verlauf spricht. Die Chronifizierungsrate des HBV ist mit dem Alter der Infektion invers korreliert. So liegt sie bei Neugeborenen bei >90 %, bei Kindern zwischen einem und fünf Jahren bei 30 % und bei Erwachsenen nur noch bei rund 5 % [153]. Die chronische HBV-Infektion kann in fünf serologisch-differenzierte Phasen unterschieden werden [154], welche auch in Abbildung 5 dargestellt sind.

- (1) HBeAg-positive chronische HBV-Infektion: Diese Phase ist durch hohen Serumgehalt an HBV-DNA und HBsAg und HBeAg-Positivität gekennzeichnet. Serummarker der Lebergesundheit wie die Menge an Alaninaminotransferase (ALT) sind in der Regel nicht erhöht und Leberschäden sind minimal [61]. Zudem ist die HBV-Sequenzvariabilität gering, meist ist nur eine Hauptspezies nachweisbar [155]. Diese Phase kann bei Infektion im jungen Alter zwischen 20-30 Jahre andauern [156].
- (2) HBeAg-positive chronische Hepatitis B (CHB): Diese früher als *immune clearance*-bezeichnete Phase ist generell mit einem aktivierten antiviralen Immunstatus assoziiert und wird u.a. durch fluktuierende, jedoch dauerhaft erhöhte ALT-Level charakterisiert. Auch HBV-DNA-Level schwanken aufgrund schubweiser antiviraler Immunaktivität. HBsAg-Werte sind weiterhin hoch. Das Ende dieser Phase wird durch eine Serokonversion von

HBeAg zu Anti-HBe markiert [61]. Aufgrund fehlender Immunkontrolle bei und nach Anti-HBe-Serokonversion zeichnet sich diese Phase außerdem durch ein hohes Maß an Quasispeziesdivergenz aus und Immunescapevarianten sind häufig [157-159].

- (3) HBeAg-negative chronische HBV-Infektion: Nach erfolgter Serokonversion zu Anti-HBe ist HBV-DNA im Serum sehr niedrig oder sogar nicht-nachweisbar, HBsAg-Level gering und ALT-Level normalisieren sich [61]. Diese Phase kann bis zum Lebensende bestehen.
- (4) HBeAg-negative CHB: Eine Reaktivierung der CHB kann spontan oder durch Immunsuppression erfolgen. Diese Phase ist ähnlich der *immune clearance*-Phase durch schwankende Level an HBV-DNA und ALT gekennzeichnet. HBsAg-Mengen sind erneut erhöht und es kann zu einer Rekonversion zu HBeAg-Positivität kommen [61]. In dieser Phase ist die Variabilität der Quasispezies sehr hoch, insbesondere HBsAg-Mutanten sind charakteristisch [160].
- (5) HBsAg-negative Phase/Okkulte HBV-Infektion: In dieser Phase sind bei bis zu 20 % aller Patienten alle HBV-spezifischen Serummarker negativ und ALT-Level sind auf normalem Niveau [154]. Bei okkultem HBV-Status kann HBV-DNA im Serum in Abwesenheit von HBsAg in geringem Maße nachweisbar sein [161, 162].

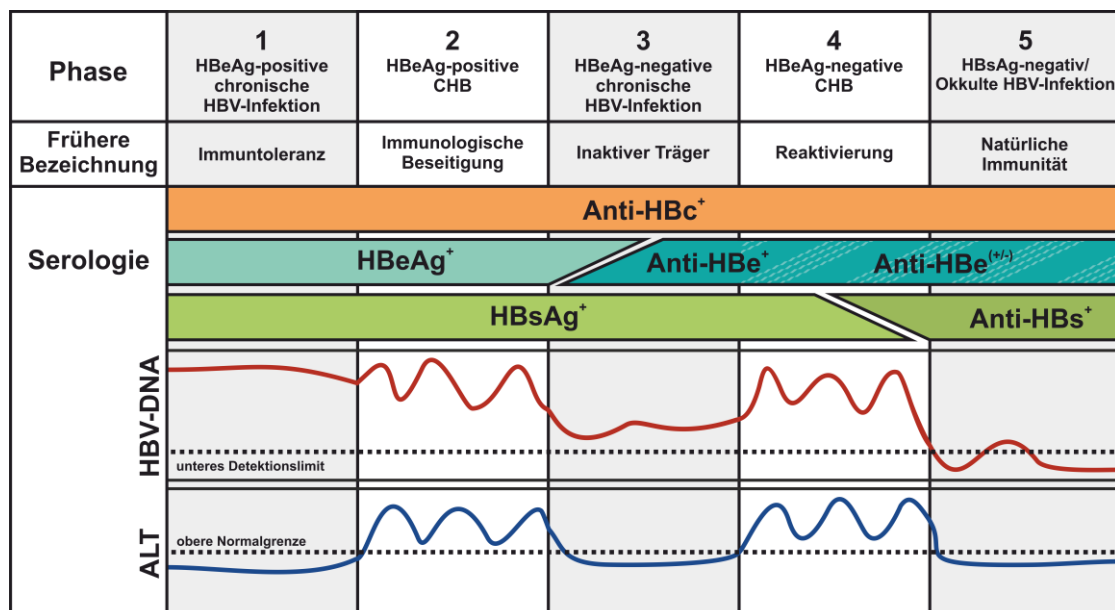


Abbildung 5: Klinische Phasen einer chronischen Hepatitis-B-Infektion. Nach Etablierung einer chronischen Hepatitis (CHB) beginnt die HBeAg-positive chronische HBV-Infektion (1), die durch hohe Level an HBV-DNA und HBsAg im Serum sowie HBeAg-Positivität charakterisiert ist. Lebermarker im Serum wie Alaninaminotransferase (ALT) sind in dieser Phase nicht erhöht. Nach Jahren bis zu

Jahrzehnten kommt es zu einer starken Aktivierung der antiviralen Immunantwort und die HBeAg-positive CHB-Phase (früher immunologische Beseitigung) beginnt (2). Diese Phase ist besonders durch fluktuierende Level an HBV-DNA und ALT geprägt. Den Übergang von dieser Phase zur HBeAg-negativen chronischen HBV-Infektion (3) bestimmt maßgeblich die Serokonversion von HBeAg zu Anti-HBe. Diese Phase zeichnet sich außerdem durch sehr geringe oder nicht-nachweisbare Serum-HBV-DNA, normalisierte ALT-Level und HBsAg-Positivität aus. In manchen Fällen kommt es zu spontaner oder durch Immunsuppression-hervorgerufener Reaktivierung (HBeAg-negative CHB) (4), welche durch erhöhte HBsAg-Level, sowie erneut fluktuierende ALT- und HBV-DNA-Level charakterisiert ist. In einer letzten Phase (HBsAg-negative, „ausgeheilte“ Infektion) (5) kommt es zu Serokonversion von HBsAg zu Anti-HBs und HBV-DNA ist gar nicht bzw. in geringem Maße (okkulte HBV) nachweisbar und ALT-Level sind normal [154].

Da die HBV-Quasispezies nach Anti-HBe-Serokonversion insbesondere bei Reaktivierung z.B. nach Immunsuppression stark divergieren kann, treten Mutationen in der S-Domäne der Oberflächenproteine, die der humoralen Immunantwort ausweichen (Immunescape), vermehrt auf [163]. Hierzu zählen u.a. die Austausch T131I, K141I und die am häufigsten beschriebene G145R [164], welche auch horizontal übertragen werden kann [165, 166]. Da diese Mutanten heterolog zu den bereits vorhandenen Anti-HBs-Antikörpern sind, kommt es bei bis zu 20-30 % chronischer Patienten zu einer zeitgleichen Nachweisbarkeit von HBsAg und Anti-HBs [167, 168]. Longitudinale Studien konnten außerdem eine signifikante Korrelation zwischen HBsAg-/Anti-HBs-Koexistenz und dem Auftreten von HCC zeigen [169-171].

Mit einer sehr geringen Rate von bis zu 1 % pro Jahr kann es bei chronischer Hepatitis B auch spontan zu einem Verlust des HBsAg und zur Anti-HBs-Serokonversion im Serum kommen [172]. Während bei Anti-HBe-Serokonversion HBV-DNA meist auf niedrigem Level weiterhin nachweisbar ist (inaktive Träger), so ist Anti-HBs-Serokonversion mit vollständiger HBV-DNA-Negativität im Serum verbunden [46]. Eine solche (dauerhafte) Abwesenheit von nachweislichem HBsAg wird auch als funktionale Heilung (*functional cure*) bezeichnet bzw. therapeutisch angestrebt [173].

3.1.6 Behandlung einer chronischen Hepatitis B (CHB)

Zur Behandlung der CHB werden Nukleo(s/t)idanaloga (NA) und/oder PEGyliertes Interferon- α (pegIFN α) eingesetzt, die jeweils Vor- und Nachteile besitzen. So zeigte das erste jemals für CHB zugelassene NA Lamivudine eine

kumulative Resistenzrate von mehr als 70 % nach 5-6 Jahren [174]. Dementgegen zeigen die aktuellen Erstlinientherapeutika, Entecavir und Tenofovir (bzw. dessen Prodrugs), ein wesentlich besseres Resistenz- und Nebenwirkungsprofil [175]. NAs können zwar die aktive virale HBV-Replikation sehr stark oder sogar vollständig unterbinden [176], müssen aber meist lebenslang eingenommen werden, da sie nur sehr geringe Auswirkung auf Serokonversionsraten haben: In einer Meta-Analyse, die Daten von mehr als 40.000 CHB-Patienten verglich, konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit pegIFN α häufiger zu erwünschtem HBsAg-Verlust (*functional cure*) führte (1,8 %) als solche mit Entecavir oder Lamivudine (0,8 % bzw. 0,65 %) [172]. Zudem ist die Anwendung von pegIFN α zeitlich begrenzt und es besteht keine Gefahr der Resistenzbildung, sie verursacht aber stärkere Nebenwirkungen als NAs [177].

3.2 Das Hepatitis-Delta-Virus

Im Jahre 1977 konnte erstmals ein neuartiges Antigen und dagegen reaktive Antikörper im Blut von HBsAg-positiven HBV-Trägern nachgewiesen werden, welches als Deltaantigen bezeichnet wurde [178]. Wenige Jahre später konnte dann in Affenexperimenten gezeigt werden, dass es sich nicht wie zunächst vermutet um einen weiteren HBV-Marker handelte, sondern dieses Antigen einem eigenständigen Erreger, dem Hepatitis-D-Virus (HDV), zugehörig war [179, 180].

Heutzutage sind schätzungsweise rund 5 % aller Patienten mit chronischer Hepatitis-B-Infektion zusätzlich mit dem HDV infiziert, wobei manche Studien von einer weitaus höheren Prävalenz ausgehen [9, 181, 182]. Eine simultane Infektion mit HBV und HDV führt in nur rund 2 % aller Fälle zu einer HDV-Chronifizierung [183], wohingegen Superinfektionen einer bestehenden HBV-Infektion mit HDV zu mehr als 80 % chronisch verlaufen [184]. Die chronische Hepatitis-D-Infektion gilt als schwerwiegendste und am schnellsten fortschreitende Form der viralen Hepatitis. So entwickeln mehr als 70 % der chronischen HDV-Patienten innerhalb von 5-10 Jahren Leberzirrhose [185]. Auch das Leberkrebsrisiko ist in HBV/HDV-Koinfektionen signifikant höher als bei HBV-Monoinfektion [186, 187].

Die Behandlungsmöglichkeiten einer chronischen HDV-Infektion sind limitiert. Neben dem seit 2020 in Europa zugelassenem Eintrittsinhibitor Bulevirtid (auch: Hepcludex), findet vorrangig Therapie mit pegIFN α statt. Die Monotherapie mit pegIFN α zeigt allerdings nur begrenzte Wirksamkeit (25-40 % der Behandelten zeigen Senkung der HDV-RNA-Levels) [188, 189] und ist zudem mit hohen Nebenwirkungen verbunden [177]. Eine Kombinationstherapie aus Bulevirtid und pegIFN α zeigte in einer Phase II-Studie eine Reduktion der Serums-HDV-RNA unter die Nachweisgrenze bei 80-87 % der Behandelten nach 48 Wochen, wobei bereits 24 Wochen nach Therapieende nur noch 6,7-53,3 % HDV-RNA-negativ waren [190].

HDV wird heutzutage in acht Genotypen (HDV-1 bis HDV-8) unterteilt, die sich in >20 % ihrer Vollgenomnukleotidsequenz unterscheiden und ungleich geographisch prävalent sind [191, 192]. HDV-1 ist der häufigste HDV-Genotyp und weltweit verbreitet. HDV-2 und HDV-4 kommen vorrangig in Asien vor, wohingegen HDV-3 spezifisch für Südamerika ist. Die verbleibenden Genotypen HDV-5 bis HDV-8 sind in Afrika am prävalentesten [191].

3.2.1 Replikationszyklus des Hepatitis-D-Virus

Das Hepatitis-D-Virus (HDV) ist, bezogen auf seine Genomgröße, mit rund 1,7 kb das kleinste bekannte, humanpathogene RNA-Virus [180, 193]. Das zirkuläre Negativstrang-RNA-Genom liegt aufgrund des hohen GC-Gehalts des Genoms von >70 % als quasi-doppelsträngig vor [194, 195]. HDV kodiert für nur ein Protein, das Hepatitis-D-Antigen (HDAg), und ist deshalb für seine Replikation von Wirtszellfaktoren abhängig. Außerdem bedarf es klinisch einer HBV-Koinfektion, da HDV die Oberflächenproteine (HBs) des HBV zur Umhüllung seiner eigenen Virionen verwendet und somit als Satellitenvirus gilt. Da HDV experimentell auch in verschiedensten nicht-Leber-Zelllinien replizieren kann [196], wird der Lebertropismus des HDV demnach entscheidend durch die Oberflächenproteine des HBV bestimmt.

Die sphärischen HDV-Virionen haben eine Größe von 36-43 nm [197]. Das Ribonukleoprotein im Inneren der Virionen besteht aus dem Negativstrang-RNA-Genom sowie bis zu 200 HDAg-Molekülen [193]. Hierbei werden die zwei Isoformen, das 24 kDa-schwere, kleine HDAg (engl.: *small hepatitis-D-antigen*

(S-HDAg)) und das um 19/20 AS-längere, große HDAg (engl.: *large hepatitis-D-antigen* (L-HDAg)), unterschieden [185].

Da der Zelleintritt über die HBV-Oberflächenproteine vermittelt wird, unterscheidet sich dieser Prozess bei HDV nicht vom Zelleintritt des HBV (siehe Abschnitt 3.1.4). Nach erfolgter Endozytose und Entpackung des HDV-Virions wird das Ribonukleoprotein aufgrund eines Kernlokalisationssignals im S-HDAg in den Zellkern transportiert [198]. Dort beginnt die *rolling circle*-Replikation, bei der zunächst antigenomische HDV-Multimere durch eine wirtseigene (eigentlich) DNA-abhängige RNA-Polymerase erzeugt werden [199-201]. Diese Multimere werden dann über ein viruseigenes Ribozym autokatalytisch in Monomere gespalten [202], die sich schließlich über einen noch unklaren Mechanismus zirkularisieren. Die Synthese neuer genomischer RNA auf Grundlage der antigenomischen-RNA folgt einem ähnlichen Mechanismus [201, 203].

Die Expression des HDAg erfolgt über die Synthese einer 0,8 kb-großen mRNA durch die RNA-Polymerase II unter Verwendung der genomischen RNA als Template [204]. Zu Beginn des Replikationszyklus kodiert diese mRNA nur für das S-HDAg, welches die virale Replikation positiv verstärkt [205]. Später wird durch einen Editierungsschritt ein Teil der antigenomischen RNA-Kopien durch die wirtseigene RNA-abhängige Adenosin-Deaminase 1 (engl.: *cellular adenosine deaminase acting on RNA 1* (ADAR1)) modifiziert, wodurch im weiteren Replikationsverlauf mRNA synthetisiert wird, welche für L-HDAg kodiert [206]. Konkret wird durch ADAR1 der Adeninrest des Amber-Stoppcodon (UAG) innerhalb der S-HDAg-kodierenden Sequenz auf der antigenomischen RNA zu Inosin deaminiert, welches eine „Fehlerkennung“ als Guanin in der anschließenden genomischen-RNA-Synthese zur Folge hat und so im weiteren Replikationsverlauf aus dem Stoppcodon der mRNA ein Tryptophan-Codon wird. Diese Änderung erzeugt ein um 19/20 AS-längeres L-HDAg, welches für die Virusassemblierung notwendig ist [207]. Innerhalb dieser Verlängerung des L-HDAg befindet sich außerdem ein konserviertes Farnesylierungsmotiv am C211 [208]. S-HDAg und L-HDAg bilden Oktamere, die durch die bereits beschriebene Kernlokalisationssequenz des S-HDAg nach der Translation im Zytoplasma in den Zellkern wandern, um dort mit der genomischen HDV-RNA Ribonukleoproteine zu bilden [209, 210]. Aufgrund des

Kernexportsignals im L-HDAg [211] werden die RNP aus dem Zellkern ins Zytoplasma gebracht. Die Farnesylierung des L-HDAg über ein Cxxx-Motiv verankert das RNP am ER [201] und ermöglicht so eine Interaktion mit dem SHBs (AS 196-201) [212]. HBs-umhüllte Virionen werden dann wahrscheinlich über einen Weg ähnlich zu den subviralen HBV-Partikeln sekretiert [213]. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch HBsAg aus Wirts-Genom-integrierten HBV-Genomen (siehe Abschnitt 3.1.4) die Sekretion von HDV *in vitro* ermöglichte [214].

3.3 NTCP als Eintrittsrezeptor des Hepatitis-B-Virus

Die Solute Carrier Familie 10 (SLC10) beinhaltet sieben Natrium-Gallensalz-Kotransporter, zu denen auch das NTCP (SLC10A1) gehört. Gallensäuren fungieren generell als Emulgatoren von Nahrungsfetten und tragen so zu deren Resorption und Verdauung bei [215], wobei die physiologische Hauptfunktion des NTCP die Aufnahme von konjugierten Gallensalzen aus dem Blut in Leberzellen ist [216].

Die Funktion des NTCP als spezifischer Eintrittsrezeptor für das Hepatitis-B-Virus (und Hepatitis-D-Virus) konnte erst mehr als 60 Jahre nach Entdeckung des HBV identifiziert werden. Obwohl bereits seit den 1980ern bekannt war, dass der N-terminale Bereich der PräS1-Domäne für eine hochaffine Bindung des HBV an die Zelloberfläche von Leberzellen verantwortlich war [63, 217], konnte erst 2012 durch die Arbeitsgruppe um Wenhui Li die zentrale Rolle des NTCP im HBV-Zelleintritt entschlüsselt werden [120]. Dieser Durchbruch ermöglichte auch maßgeblich die Etablierung neuer Zellkultursysteme für die *in vitro*-Charakterisierung des hepadnaviralen Lebenszyklus.

Doch trotz seiner essentiellen Rolle scheint NTCP nicht der einzig notwendige Zelloberflächenrezeptor für HBV-Suszeptibilität zu sein. Es konnten bereits mehrere Proteine als Kofaktoren im HBV-Zelleintritt entdeckt und charakterisiert werden. So wurde der EGFR (engl.: *epidermal growth factor receptor*) als ein solcher Korezeptor identifiziert, der durch direkte Bindung an NTCP die Endozytose des HBV entscheidend bedingt [123, 218]. Zudem konnte IFITM3

(engl.: *interferon-induced transmembrane protein 3*), ein Restriktionsfaktor beim Zelleintritt anderer Viren [219] als positiver Kofaktor für HBV-/HDV-Eintritt festgestellt werden, wobei der zugrundeliegende Mechanismus noch unbekannt ist [220].

3.3.1 Bedeutung des NTCP/Ntcp für den hepadnaviralen Zelleintritt

Zur Unterscheidung des humanen von den tierischen SCL10A1-Proteinen besteht konventionell das humane NTCP vollständig aus Großbuchstaben, wohingegen bei dessen tierischen Orthologen nur der Anfangsbuchstabe großgeschrieben wird (Ntcp).

Für das Modell-Avihepadnavirus der Ente (DHBV) konnte bereits Jahrzehnte vor dem menschlichen Rezeptor NTCP der Eintrittsrezeptor Carboxypeptidase D identifiziert werden [221]. Die Avihepadnaviren infizieren Hepatozyten demnach grundsätzlich nicht über das Ntcp, obwohl diese homologe Proteine besitzen [222].

Für die Orthohepadnaviren ist folgendes bekannt: Es konnte bereits gezeigt werden, dass nicht nur NTCP den HBV-Zelleintritt ermöglichen kann. So ist eine Infektion mit HBV über das Ntcp zweier Menschenaffenspezies (Sumatra-Orang-Utan (*P. abelii*) und gemeiner Schimpanse (*P. troglodytes*)) sowie über das Ntcp des Murmeltiers (*M. monax*) ohne Mutagenese in Ntcp-überexprimierenden Humanhepatomzellen möglich [68, 223]. Außerdem war nur eine Aminosäure (R158) innerhalb des Ntcp verschiedener Altweltaffenspezies für eine fehlende Suszeptibilität für HBV verantwortlich [68].

Andersherum konnte bisher für das Fledermaushepadnavirus TMBHBV und die beiden Neuweltaffenhepadnaviren WMHBV und CMHBV ein Zelleintritt über das humane NTCP im psHDV-Modell und ein damit einhergehendes zoonotisches Potential nachgewiesen werden [27, 28]. Für das CMHBV konnte zusätzlich gezeigt werden, dass dieses auch das Ntcp einer Wirts-Kapuzineraffenspezies (*S. apella*) zum Zelleintritt nutzen kann [27]. Ob andere Orthohepadnaviren das spezieeigene Ntcp zum Zelleintritt verwenden, ist weitestgehend ungeklärt.

4. Fragestellungen

Die Oberflächenproteine (HBsAg) des HBV spielen eine entscheidende Rolle bei der Sekretion viraler Partikel und der Virus-Rezeptor-Interaktion des HBV und HDV. Mutationen innerhalb des HBsAg können deshalb maßgeblichen Einfluss auf diese wichtigen Prozesse während der Replikationszyklen dieser beiden Viren haben. Auch die Untersuchung der HBsAg-Homologe neuartiger tierischer Orthohepadnaviren ist für den Menschen aufgrund eines möglichen zoonotischen Potentials durch Umgehung eines bestehenden Anti-HBs-Impfschutzes von großer Bedeutung. In dieser Arbeit sollten deshalb relevante Isolate des HBV und dreier tierischer Orthohepadnaviren aus Equiden und Spitzmäusen unter anderem bezüglich ihrer Oberflächenproteine charakterisiert werden.

- A. Eine Vielzahl an Viren zeichnet sich durch hohe Mutationsraten aus. Auch HBV ist, insbesondere bei chronischen Infektionen, anfällig für Mutationen. Im Rahmen des nationalen Referenzzentrums für Hepatitis-B-Viren und Hepatitis-D-Viren in Zusammenarbeit mit Dr. Schlevogt der Medizinischen Klinik B des Universitätsklinikums Münster sollte in dieser Arbeit ein HBV-positives Patientenserum mit Verdacht auf Immun- und/oder diagnostischem Escape näher untersucht werden. Hierbei sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

Weist die Primärsequenz des viralen Oberflächenproteins (HBsAg) bereits beschriebene und/oder neue Mutationen auf, die die Antigenität und Nachweisbarkeit beeinflussen könnten?

Kann das HBsAg der Virusvarianten in Zellkultur exprimiert und nachgewiesen werden?

Sind diese HBsAg-Isolate mit in-vitro-diagnostischen Assays detektierbar?

Reagiert das mutierte HBsAg mit Antikörpern nach Impfung bzw. Genesung? Wäre ein Impfschutz gegen diese Virusvarianten gegeben bzw. eine Übertragung trotz Impfschutz möglich?

B. Zoonotische Übertragungen von Viren durch Tiere auf den Menschen beinhalten ein enormes pathogenes Potential, insbesondere wenn solche zoonotischen Viren bestehenden Impfschutz umgehen können. Ob und in welchem Ausmaß Zoonosen auftreten, ist von vielen Faktoren wie zellulären Restriktionsfaktoren aber auch essentiellen, vom Virus benötigten Wirtsfaktoren abhängig. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Felix Drexler am Institut für Virologie der Charité Berlin wurden neuartige Hepadnaviren in Spitzmäusen und Equiden detektiert, die in dieser Arbeit charakterisiert werden sollten. Es ergaben sich folgende Fragestellungen:

Wie unterscheiden sich die viralen Oberflächenproteine (HBsAg) der neuartigen Hepadnaviren zum HBV des Menschen?

Besteht eine Kreuzreaktivität mit heterologen Antikörpern, die sich gegen die viralen Oberflächenproteine (HBsAg) richten? Wenn ja, wäre ein Schutz gegen diese tierischen Viren durch die HBV-Standardimpfung gegeben?

Vermitteln die Oberflächenproteine dieser Viren eine Infektion menschlicher und tierischer Zellen und sind sie dabei auf die Verwendung des NTCP/Ntcp angewiesen?

Besteht eine Kreuzreaktivität mit heterologen Antikörpern, die sich gegen das Strukturprotein HBcAg richten? Sind immundominante Antikörperepitope zwischen den humanen und tierischen Core-Proteinen konserviert?

Besitzen diese tierischen Hepadnaviren ein HBeAg? Wird dieses HBeAg analog zu dem menschlichen HBeAg intrazellulär prozessiert und ist im in-vitro-diagnostischen Assay nachweisbar?

5. Materialien

Alle Angaben zu Herstellern werden im folgenden Format gelistet:

Name des Herstellers (Standort, Land im ITU-Buchstabencode)

5.1 Bakterien

Zur Plasmidamplifikation sowie bei den verwendeten Klonierungsmethoden wurden chemisch-kompetente *Escherichia Coli*-Zellen nach Angaben des Herstellers verwendet.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.

Name	Stamm	Genotyp	Hersteller
Stellar competent cells	HST08	F ⁻ , endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ(lacZYA-argF) U169, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), ΔmcrA, λ ⁻	Takara Bio (Saint-Germain-en-Laye, F)

5.2 Primäre Zellen & Zelllinien

In dieser Arbeit wurden humane Zelllinien verwendet. Alle verwendeten Zelllinien sind immortalisiert und adhärent wachsend. Zusätzlich wurden kryopräservierte, primäre Hepatozyten verwendet.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Zelllinien und primären Zellen.

Name	Herkunft	Anmerkungen
Zelllinien		
HepG2 tet-on Advanced	Hepatoma [224]; Takara Bio (Saint-Germain-en-Laye, F)	Enthalten ein Tetrazyklin-induzierbares Transaktivatorsystem; Selektion über Geneticin; Kat.No.: 631150
HepG2 tet-on-NTCP (HepG2-NTCP)	Basierend auf HepG2 tet-on Advanced	Stabile Transfektion eines NTCP-Expressionsplasmids unter tet-on-Promotor; Selektion über Geneticin (s.o.) und Puromycin (pZFN-tight-hNTCP)
HepG2 tet-on-3091	Basierend auf HepG2 tet-on Advanced	Stabile Transfektion eines HBV-D3 1.5mer-Plasmids unter tet-on-Promotor; Selektion über Geneticin (s.o.) und Puromycin
HuH7	Hepatoma [225]	

Primärzellen		
Primäre humane Hepatozyten (PHH)	Primacyt (Schwerin, D)	Chargen: HH190917; BHuf16029-P
Primäre Pferdehepatozyten (PEH)	Primacyt (Schwerin, D)	Charge: EH151217-2

5.3 Plasmide

Im Zuge dieser Arbeit wurden Expressionsplasmide viraler und zellulärer Proteine verwendet.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Plasmide.

Name	Vektor	Insert	Anmerkungen (Quelle)
NTCP/Ntcp-Expressionsplasmide			
pcDNA5/FRT/TO_NTCP-FLAG	pcDNA5/FRT/TO	NTCP-FLAG	AG Geyer
pcDNA3.1(+)_SorexNtcp	pcDNA3.1(+)	<i>Sorex araneus</i> (Waldspitzmaus) Ntcp-FLAG	AG Glebe [37]
pcDNA3.1(+)_EselNtcp	pcDNA3.1(+)	<i>Equus asinus</i> (Hausesel) Ntcp-FLAG	AG Glebe [38]
Hepadnavirale subgenomische Expressionsplasmide			
3091_LHBs_3091EnhPREPolyA	pcDNA3.1(+)	HBsAg des HBV-D3 unter endogenen Regulatoren	AG Glebe
Sorex_GF2139_natProm_LHBs_PolyA	pcDNA3.1(+)	HBsAg des CSHBV-A [MK345465] unter endogenen Regulatoren	AG Glebe [37]
Sorex_K1263_natProm_LHBs_PolyA	pcDNA3.1(+)	HBsAg des CSHBV-B [MK345467] unter endogenen Regulatoren	AG Glebe [37]
Crocidura_natProm_LHBs_PolyA	pcDNA3.1(+)	HBsAg des MSHBV [MK345462] unter endogenen Regulatoren	AG Glebe [37]
Esel_LHBs_Hygro	pCH9-200	HBsAg des EqHBV [MT134309] unter HBV-Regulatoren	AG Glebe [38]
Zebra_LHBs_3091EnhPREPolyA	pcDNA3.1(+)	HBsAg des EqHBV-Ze [MT134319] unter HBV-Regulatoren	AG Glebe [38]
6xHIS-FLAG-3091_SHBs_WT	pcDNA3.1(+)	FLAG-SHBs des HBV-D3 (AS 1-226)	AG Glebe
6xHIS-FLAG-3091_SHBs_aa100-226_Cluster-1	pcDNA3.1(+)	FLAG-SHBs des HBV-D3 (AS 1-99) + Patientencluster 1 (AS 100-226)	AG Glebe; diese Arbeit
6xHIS-FLAG-3091_SHBs_aa100-226_Cluster-2	pcDNA3.1(+)	FLAG-SHBs des HBV-D3 (AS 1-99) + Patientencluster 2 (AS 100-226)	AG Glebe, diese Arbeit
6xHIS-FLAG-3091_SHBs_aa100-226_Cluster-3	pcDNA3.1(+)	FLAG-SHBs des HBV-D3 (AS 1-99) + Patientencluster 3 (AS 100-226)	AG Glebe, diese Arbeit

6xHIS-FLAG-3091_SHBs_aa100-226_Cluster-4	pcDNA3.1(+)	FLAG-SHBs des HBV-D3 (AS 1-99) + Patientencluster 4 (AS 100-226)	AG Glebe, diese Arbeit
Hepadnavirale Überlängensplasmide			
HBV-3091_1.5mer	pcDNA3.1(+)	1.5-faches Überlängengenom des humanen HBV-D3 unter endogenen Regulatoren	AG Glebe
HBV-A2_1.5mer	pcDNA3.1(+)	1.5-faches Überlängengenom des humanen HBV-A2 unter endogenen Regulatoren	AG Glebe
HBV-G_1.5mer	pcDNA3.1(+)	1.5-faches Überlängengenom des humanen HBV-G unter endogenen Regulatoren	AG Glebe
MSHBV_1.5mer	pcDNA3.1(+)	1.5-faches Überlängengenom des MSHBV [MK345462] unter endogenen Regulatoren	AG Glebe; diese Arbeit
EqHBV_Esel_1.5mer	pcDNA3.1(+)	1.5-faches Überlängengenom des EqHBV aus einem Esel [MT134309] unter endogenen Regulatoren	AG Glebe; diese Arbeit [38]
EqHBV_Zebra_1.5mer	pcDNA3.1(+)	1.5-faches Überlängengenom des EqHBV aus einem Zebra [MT134319] unter endogenen Regulatoren	AG Glebe; diese Arbeit [38]
Andere			
pSVL(D3)	pSVL	Genomisches Trimer des HDV-I	J. Taylor [205]
pcDNA3.1(+) (leer)	pcDNA3.1(+)	-	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)

Genannte Arbeitsgruppen:

AG Glebe am Institut für medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen

AG Geyer am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Justus-Liebig-Universität Gießen

5.4 Kommerzielle Kits

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten kommerziell-erhältlichen Kits.

Name	Verwendung	Hersteller
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Isolation viraler DNA/RNA aus Zellkulturüberständen und Serum	Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim, D)
InFusion HD Cloning Kit	Klonierung	Takara Bio (Saint-Germain-en-Laye, F)
Monarch DNA Gel Extraction Kit	DNA-Isolation nach Gelelektrophorese	New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main, D)
Monarch PCR & DNA Cleanup Kit	DNA-Isolation nach PCR	New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main, D)
Monarch Plasmid Miniprep Kit	Plasmid-DNA-Isolation aus bakterieller Flüssigkultur	New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main, D)

Plasmid Plus Midi Kit	Plasmid-DNA-Isolation aus bakterieller Flüssigkultur	Qiagen (Hilden, D)
-----------------------	--	--------------------

5.5 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper.

Monoklonale Antikörper					
Name	Epitop/Antigen	Spezies	Bezug	WB	IF
MA18/7	PräS1, D ²⁰ PAF ²³ [226]	Maus	AG Glebe	-	1:200
Q19/10	PräS2, N-terminale Glykosylierung [227]	Maus	AG Glebe	-	1:200
C20/02	Konformationelles Epitop der S-Domäne [228]	Maus	AG Glebe	-	1:200
1-9C1	S-Domäne [229]	Maus	AG Glebe	-	1:200
HB01	S-Domäne, G ¹¹⁹ PCRTCTT ¹²⁶ [230]	Maus	AG Glebe	-	1:200
H166	S-Domäne, C ¹²¹ RTC ¹²⁴ [231]	Maus	Abbott GmbH (Wiesbaden, D)	-	1:200
Anti-Tubulin	Kükenhirn-Mikrotubuli	Maus	Merck KGaA (Sigma-Aldrich) (Darmstadt, D); Kat.No.: T9026	1:1.000	-
Polyklonale Primärantikörper					
Name	Immunisierung	Spezies	Bezug	WB	IF
Rabbit 4A	HBVaxPro-Impfung	Kaninchen	AG Glebe	-	1:200
DAKO Anti-HBc	HBc (<i>E.coli</i>)	Kaninchen	DAKO Agilent (Santa Clara, USA); Kat.No.: B0586	-	1:200
SY6964	HBc (<i>E.coli</i>)	Kaninchen	AG Glebe	-	1:200
SYC953	HBc (<i>E. coli</i>)	Meerschweinchen	AG Glebe	-	1:200
0974	Core-Protein des CSHBV (CSHBc)	Kaninchen	AG Ulrich	-	1:200
2833	Core-Protein des WHV (WHc)	Kaninchen	AG Ulrich	-	1:200
Anti-HDV	Natürliche HDV-Infektion	Mensch	AG Glebe	-	1:200
Anti-FLAG	FLAG (DYKDDDDK)	Kaninchen	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA); Kat.No.: F7425	1:800	-

Sekundärantikörper					
Name	Immunisierung	Spezies	Bezug	WB	IF
Anti-Maus-IgG-Ax488	-	Ziege	ThermoFisher Scientific (Invitrogen) (Waltham, USA); Kat.No.: A11029	-	1:400
Anti-Kaninchen-IgG-Ax488	-	Ziege	ThermoFisher Scientific (Invitrogen) (Waltham, USA); Kat.No.: A11034	-	1:400
Anti-Kaninchen-IgG-Ax594	-	Ziege	ThermoFisher Scientific (Invitrogen) (Waltham, USA); Kat.No.: A32740	-	1:400
Anti-Meerschweinchen-IgG-Ax568	-	Ziege	ThermoFisher Scientific (Invitrogen) (Waltham, USA); Kat.No.: A11075	-	1:400
Anti-Human-IgG-568	-	Ziege	ThermoFisher Scientific (Invitrogen) (Waltham, USA); Kat.No.: A21090	-	1:400
Anti-Kaninchen-HRP	-	Ziege	Cell Signaling Technology (Leiden, HOL)	1:2.000	-
Maus-IgG-BP-HRP	-	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, USA); Kat.No.: sc-516102	1:2.000	-

Genannte Arbeitsgruppen:

AG Glebe am Institut für medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen

AG Ulrich am Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger (INNT), Friedrich-Löffler-Institut, Greifswald

5.6 Enzyme

Tabelle 8: Verwendete Enzyme.

Name	Funktion	Hersteller
BamHI	DNA-Restriktion für Klonierung	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA); Kat.No.: FD0054
DNaseI	DNA-Verdau (HDV-qRT-PCR)	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA); Kat.No.: EN0521
DpnI	Verdau plasmidischer DNA für Klonierung	New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main, D); Kat.No.: R0176
MluI	DNA-Restriktion für Klonierung	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA); Kat.No.: FD0564
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	DNA-Amplifikation für Klonierung	New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main, D); Kat.No.: M0530
PNGase F	Entfernung von N-Glykosylierungen	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA); Kat.No.: A39245
Takyon No Rox Probe 2x Master Mix dTTP Blue	HBV-qPCR	Eurogentec (Seraing, BEL); Kat.No.: UF-NPMT-B0701

TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix	HDV-qRT-PCR	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA); Kat.No.: 4444432
-------------------------------------	-------------	--

5.7 Chemikalien, Reagenzien & käufliche Medien

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und käufliche Medien.

Name	Funktion	Hersteller
Agarose	Agarosegelelektrophorese	Biozym Scientific, (Oldendorf, D)
Albumin Fraktion V	HGM	Merck KGaA (Sigma-Aldrich) (Darmstadt, D)
Ammoniumpersulfat (APS)	SDS-PAGE	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, D)
Amphotericin B (Fungizone)	Antimykotikum	Kohlpharma GmbH (Merzig, D)
Bacto-Agar	LB-Agar	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Bacto-Hefe-Extrakt	LB-Medium	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Bacto-Trypton	LB-Medium	BD Biosciences (Heidelberg, D)
β -Mercaptoethanol	Reduktionsmittel	Promega GmbH (Walldorf, D)
Caspofungin	Antimykotikum	MSD Sharp & Dohme GmbH (Haar, D)
Clarity Max Western ECL Substrate	Luminol/Enhancer für Western Blot-Entwicklung	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, D); Kat.No.: 1705062
Dexamethason	HGM	Merck KGaA (Sigma-Aldrich) (Darmstadt, D)
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Zellkernfarbstoff	ThermoFisher Scientific (Waltham USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Zellkultur	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, D)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	PBS	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, D)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Zellkultur	ThermoFisher Scientific (Gibco) (Waltham USA)
DMEM ohne Phenolrot	Zellkultur	ThermoFisher Scientific (Gibco) (Waltham USA)
Essigsäure (CH_3COOH)	Coomassie-Entfärber	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, D)
Ethanol (>99,8 %)	Lösungsmittel	Merck KGaA (Sigma-Aldrich) (Darmstadt, D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Chelator	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, D)
Fötales Kalberserum (FKS)	Zellkultur	ThermoFisher Scientific (Gibco) (Waltham USA)
FuGENE HD	Transfektion	Promega GmbH (Walldorf, D)
Glycerin	-	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, D)
Glycin	SDS-PAGE	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, D)

Halt Protease Inhibitor Cocktail	Proteaseinhibitor	ThermoFisher Scientific (Waltham USA); Kat.No.: 78429
HEPES (N-2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Zellkultur	ThermoFisher Scientific (Gibco) (Waltham USA)
HHMM Basalmedium	Primärzellkultur	Primacyt (Schwerin, D)
Hoechst 33342	Zellkernfarbstoff (membranpermeabel)	ThermoFisher Scientific (Waltham USA)
HPM Cryo – Hepatocyte Plating Medium	Primärzellkultur	Primacyt (Schwerin, D)
HTM – Hepatocyte Thawing Medium	Primärzellkultur	Primacyt (Schwerin, D)
HWM – Hepatocyte Washing Medium	Primärzellkultur	Primacyt (Schwerin, D)
Isopropanol	Western Blot	Merck KGaA (Sigma-Aldrich) (Darmstadt, D)
ITS Mix (Insulin-Transferrin-Selenium)	HGM	ThermoFisher Scientific (Gibco) (Waltham USA)
Kaliumchlorid (KCl)	Puffer	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, D)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Puffer	Merck KGaA (Sigma-Aldrich) (Darmstadt, D)
Laemmli Sample Buffer (4x)	Probenvorbereitung für SDS-PAGE	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, D); Kat.No.: 1610747
L-Glutamin	Zellkultur	ThermoFisher Scientific (Gibco) (Waltham USA)
Magermilchpulver	Western Blot	Saliter (Obergünzburg, D)
Methanol	Western Blot	Merck KGaA (Sigma-Aldrich) (Darmstadt, D)
Natriumchlorid (NaCl)	Puffer	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, D)
Natriumpyruvat (100 mM)	Zellkultur	ThermoFisher Scientific (Gibco) (Waltham USA)
Nitrobenzoxadiazol-Taurocholat (NBD-TC)	Fluoreszierendes NTCP-/Ntcp-Substrat	AG Geyer
Nonidet P-40 (NP-40)	Puffer	Calbiochem-Novabiochem Corp. (La Jolla, USA)
Opti-MEM (Reduced Serum Media)	Transfektion	ThermoFisher Scientific (Gibco) (Waltham USA)
Paraformaldehyd	Zellfixierung	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, D)
Polyethylenglykol (PEG) (40 %)	Zellkultur	Merck KGaA (Sigma-Aldrich) (Darmstadt, D)
ROTIPHORESE Gel 30 (37,5:1)	(Bis-)Acrylamidlösung für SDS-PAGE-Gele	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, D); Kat.No.: 3029.1
SDS (Natriumdodecylsulfat)	SDS-PAGE; Puffer	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, D)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	SDS-PAGE	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, D)
TRIS	Puffer	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, D)

Triton X-100	Detergenz	Merck KGaA (Sigma-Aldrich) (Darmstadt, D)
Trypsin-EDTA	Zellkultur	ThermoFisher Scientific (Gibco) (Waltham USA)
Tween-20	Detergenz	Merck KGaA (Sigma-Aldrich) (Darmstadt, D)
William's E Medium, no phenol red	Zellkultur	ThermoFisher Scientific (Gibco) (Waltham USA)
XtremeGeneHP	Transfektion	Merck KGaA (Sigma-Aldrich) (Darmstadt, D)

5.8 Eigens angesetzte Medien, Puffer & Lösungen

Tabelle 10: Übersicht der eingesetzten Medien, Puffer, Lösungen inklusiver ihrer Zusammensetzung.

Name	Zusammensetzung
Prokaryote Zellkultur	
LB-Medium	1 % Bacto-Trypton (w/v) 0,5 % Bacto-Hefeextrakt (w/v) 1 % NaCl (w/v)
LB-Agar	LB-Medium 1,5 % Bacto-Agar (w/v)
TAE-Puffer (50x)	2 M TRIS-Base 1 M Essigsäure 0.05 M EDTA pH8,0
Eukaryote Zellkultur	
PBS (50x)	1,37 M NaCl 27 mM KCl 80 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄
DMEM-Vollmedium	DMEM 10 % FKS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
HDV-Produktionsmedium	Williams' Medium E, ohne Phenolrot 2 % FKS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 10 mM HEPES
Posttransfektions-Haltemedium	Williams' Medium E, ohne Phenolrot 2 % FKS

	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 10 mM HEPES 1 mM Natriumpyruvat (+2 % DMSO bei 1.5mer-Plasmiden)
Hepatocyte Growth Medium (HGM)	Williams' Medium E, ohne Phenolrot 0,2 % Albumin Fraktion V 1x Insulin-Transferrin-Selenium 2 mM L-Glutamin 10 nM Dexamethason 1 mM Natriumpyruvat 0,1 mg/ml Gentamycin 10 mM HEPES 50 µg/ml Caspofungin (frisch zugeben)
HHMM-Haltemedium	HHMM Basalmedium Primacyt-Zusätze für HHMM 1,5 % DMSO Caspofungin/Fungizone
Western Blot	
OPT-Lysispuffer [232]	20 mM EDTA 140 mM NaCl 5 % SDS (w/v) 100 mM TRIS pH8,0 1x Halt Protease Inhibitor Cocktail (frisch zugeben)
10x SDS-Laufpuffer	0,25 M TRIS pH8,3 1,92 M Glycin 1 % SDS (w/v)
10x Transferpuffer	450 mM TRIS pH8,3 390 mM Glycin 5 mM EDTA
10x TBS (pH 7,6)	200 mM TRIS-Base 1,5 M NaCl
TBS-T	1x TBS 0,1 % Tween-20 (v/v)
WB-Block-Lösung	1x TBS 5 % Magermilchpulver
Immunfluoreszenz	
Fixierungs-/Permabilisierungslösung	3,8 % Paraformaldehyd 0,2 % Triton X-100
IF-Block-Lösung	1x PBS

	10 % FKS
--	----------

5.9 Antibiotika

Tabelle 11: Verwendete Antibiotika.

Name	Funktion	Hersteller
Carbenicillin-Dinatriumsalz	Selektionsantibiotikum (100 µg/ml f.c.)	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, D); Kat.No.: 6344.2
Doxzyklin-Hyclate	Induktionsantibiotikum (6 µg/ml f.c.)	Merck KGaA (Sigma-Aldrich) (Darmstadt, D); Kat.No.: D5207
Geneticin (G418) (100mg/ml)	Selektionsantibiotikum (200 µg/ml f.c.)	InvivoGen (San Diego, USA); Kat.No.: ant-gn-1
Gentamycinsulfat (50 mg/ml)	HGM-Zusatz (0,1 mg/ml f.c.)	ThermoFisher Scientific (Gibco) (Waltham, USA); Kat.No.: 15750-045
Penicillin / Streptomycin (100x)	Universelle Antibiotika in Zellkulturmedium (1x f.c.)	ThermoFisher Scientific (Gibco) (Waltham, USA); Kat.No.: 15140-122
Puromycin-Dyhydrochlorid	Selektionsantibiotikum (1 µg/ml f.c.)	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, D); Kat.No.: 0240.4

5.10 Oligonukleotide

Tabelle 12: Verwendete Oligonukleotide. Alle Oligonukleotide wurden von Integrated DNA technologies (IDT; Leuven, BEL) synthetisiert.

Name	Sequenz (5' zu 3')	Verwendung
cdbs1	CAA CCT CTT GTC CTC CAA CTT GT	HBV-qPCR sense-Primer
cdbs2	AAC CTC CTG TCC TCC AAC TTG	HBV-qPCR sense-Primer
cdbs3	CAA CCT GTT GTC CTC CAA TTT GT	HBV-qPCR sense-Primer
cdba	GAT GAG GCA TAG CAG CAG GAT	HBV-qPCR antisense-Primer
cdq380	FAM-ATC GCT GGA TGT GTC TGC GGC GTT-BMN-Q535	HBV-qPCR Sonde
HDV-F	TGG CTC TCC CTT AGC CAT CCG	HDV-qRT-PCR sense-Primer
HDV-R	TTC CTC TTC GGG TCG GCA TG	HDV-qRT-PCR antisense-Primer
HDV-P	FAM-CTC CTW CGG ATG CCC AGG TCG GAC -BHQ1	HDV-qRT-PCR Sonde
S6s	TGG ATG TGT CTG CGG C	Amplifikation des SHBs-Fragments aus Serum
S6as	CKT TGA CAD ACT TTC CAA TCA ATA G	Amplifikation des SHBs-Fragments aus Serum
pcDNA3.1+ _S6-Overhang_fwd	CTA TTG ATT GGA AAG TTT GTC AAA Gct gca gat atc cag cac agt g	Amplifikation des pcDNA3.1(+) (Backbone) für Klonierung von S6-Sequenzierplasmiden

pcDNA3.1+_S6-Overhang_rev	GCC GCA GAC ACA TCC Act gga cta gtg gat ccg agc tc	Amplifikation des pcDNA3.1(+) (Backbone) für Klonierung von S6-Sequenzierplasmiden
SHBs-only_insert_fwd	GAG AAC ATC ACA TCA GGA TTC	Amplifikation des SHBs-Fragments (Insert) für Klonierung
SHBs-only_insert_rev	TTA AAT GTA TAC CCA AAG ACA AAA G	Amplifikation des SHBs-Fragments (Insert) für Klonierung
pcDNA3-1_SHBs-only_overhang_fwd	CTT TTG TCT TTG GGT ATA CAT TTA A	Amplifikation des pcDNA3.1(+) (Backbone) für Klonierung
pcDNA3-1_SHBs-only_overhang_rev	GAA TCC TGA TGT GAT GTT CTC	Amplifikation des pcDNA3.1(+) (Backbone) für Klonierung
CMV-F	GCA AAT GGG CGG TAG GCG T	Sequenzierung
pcDNA3.1-R	TAG AAG GCA CAG TCG AGG CT	Sequenzierung

5.11 Molekulargewichts- und Proteinmarker

Tabelle 13: Verwendete Molekulargewichts- und Proteinmarker.

Name	Funktion	Hersteller
Color Prestained Protein Standard (Broad Range)	Protein-Größenmarker	New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main, D); Kat.No.: P7719
Quick-Load 1 kb DNA Ladder	DNA-Größenmarker	New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main, D); Kat.No.: N0468

5.12 Myr-PräS1-Peptide

Tabelle 14: Verwendete N-terminal myristoylierte, C-terminal Alexa633-gekoppelte PräS1-Peptide (AS 2-48). Zusätzlich besitzen die Peptide einen Strep-Tag mit SA-Linker (kursiv). Alle Peptide wurden von Bio-Synthesis, Inc. (Lewisville, USA) generiert.

Name	Sequenz
EqHBV-Do-2-48myr-Alexa633 (EqHBV-Do)	GQNQSVNPPL GFLPVHSIDT SGGGGWDHSI QKDPWPQAKL PSPGNWG SA <i>WSHPQFEK</i>
HBV-2-48myr-Alexa633	GQNLSTSNPL GFFPDHQLDP AFRANTANPD WDFNPKNKDTW PDANKVG SA <i>WSHPQFEK</i>
SMHBV-CRO-2-48myr-Alexa633 (MSHBV)	GNFVDIM GSQAVGT SYGAAEGETFNP LADLGYLFSK INPHQPLENY SA <i>WSHPQFEK</i>
SMHBV-GF21-2-48myr-Alexa633 (CSHBV-A)	GNNWSPGANY GSMDSTPPGV ETLNWLQKL HPAKEDWTLT PQVGTNA SA <i>WSHPQFEK</i>

5.13 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 15: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Name	Hersteller
------	------------

Bakterienschalen	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Einweg-Plastikpipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Glasgefäße (Kolben, Zylinder, Bechergläser etc.)	Schott AG (Mainz, D)
Immobilon-P PVDF-Membran	Merck KGaA (Sigma-Aldrich) (Darmstadt, D)
LightCycler 480 Multiwell Plate 96, white	Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim, D)
MicroAmp Optical Adhesive Film (qPCR-Folie)	ThermoFisher Scientific (Applied Biosystems) (Waltham USA)
Multiwellplatten (6-, 12-, 24-, 48-, 96-well)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, D)
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym Scientific (Oldendorf, D)
Pipettenspitzen (ungestopft)	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, D)
Pipettenspitzen (gestopft)	Nerbe plus GmbH & Co. KG (Winsen/Luhe, D)
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2,0 ml)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, D)
Vivaspin 20 (300,000 MWCO)	Sartorius (Göttingen, D)
Zellkulturschalen 100 mm / 145 mm	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)

5.14 Geräte

Tabelle 16: Verwendete Geräte.

Name	Funktion	Hersteller
Prokaryote Zellkultur		
G24-Inkubator	Prokaryotische Zellkultur	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Vortemp 56	Transformation	Labnet International (Edison, USA)
Bakterieninkubator		Memmert (Schwabach, D)
Eukaryote Zellkultur		
CO ₂ Inkubator MCO-19AIC	Eukaryotische Zellkultur	Panasonic Healthcare/ pHcbi/ PHC Europe B.V. (Etten-Leur, HOL)
Herasafe KS	Eukaryotische Zellkultur	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, D)
DMI6000 B (Inverses Fluoreszenzmikroskop)	Fluoreszenzmikroskopie	Leica (Wetzlar, D)
SDS-PAGE und Western Blot		
EV 231	Stromquelle	Consort (Turnhout, BEL)
Mini-PROTEAN Tetra Cell-Set	SDS-PAGE	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, D); Kat.No.: 1658004
FastBlot B33	Elektroblotting	Biometra (Göttingen, D)
ChemoCam Imager ECL	Western Blot-Dokumentation	Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen, D)

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)		
MiniAmp Thermal Cycler	PCR-Cycler	ThermoFisher Scientific (Applied Biosystems) (Waltham USA); Kat.No.: A37834
LightCycler 480 II	qPCR-Cycler	Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim, D)
Sonstige		
R-939	Mikrowelle	Sharp (Köln, D)
Reagiergefäß-Heizblock	-	JLU-Werkstatt-Eigenbau
Tischzentrifuge 5417C	-	Eppendorf (Hamburg, D)
Elektrophorese-Kammer (MINI / MIDI)	Agarosegelelektrophorese	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, D)
ELGA Purelab Chorus	Reinstwasseranlage	Veolia (Celle, D)
PicoDrop	Photometer	Biozym Scientific (Edison, USA)
VF2	Vortexer	Janke & Kunkel (Staufen, D)
IKAMAG RET	Magnetheizrührer	IKA (Staufen, D)

6. Methoden

6.1 Prokaryoten

6.1.1 Transformation

Um plasmidische DNA zu amplifizieren, wurden 50 µl chemisch-kompetente *E. coli* (Stellar) auf Eis aufgetaut und mit 1 µl des zu transformierenden Plasmids für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 Sekunden auf 42°C erhitzt (Hitzeschock) und für zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Den Zellen wurden 450 µl vorgewärmtes LB-Medium hinzugefügt und die Lösung für eine Stunde bei 37°C schüttelnd (200 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (2 min, 4.000 rpm) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl LB-Medium resuspendiert, auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.1.2 Flüssigkultur

Für Midi-Plasmidpräparationen wurden 50 ml antibiotikahaltiges LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit einer bakteriellen Einzelkolonie angeimpft. Der Kolben wurde anschließend über Nacht bei 37°C schüttelnd (200 rpm) inkubiert.

Für Mini-Plasmidpräparationen wurden 5 ml antibiotikahaltiges LB-Medium in einem Reagenzglas mit einer bakteriellen Einzelkolonie angeimpft. Das Reagenzglas wurde anschließend über Nacht bei 37°C schüttelnd (200 rpm) inkubiert.

6.1.3 Plasmidpräparation

Plasmid-DNA aus Erlenmeyerkolben (50 ml) wurde mit dem Plasmid Plus Midi-Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde in 200 µl UltraPure DNase-/RNase-freiem Wasser eluiert und die DNA-Konzentration am Picodrop gemessen.

Plasmid-DNA aus Reagenzgläsern (5 ml) wurde mit dem Monarch Plasmid Miniprep-Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde in 50 µl UltraPure DNase-/RNase-freiem Wasser eluiert und die DNA-Konzentration am Picodrop gemessen.

6.2 Eukaryotische Zellkultur

6.2.1 Kultivierung und Passagierung von Hepatomzelllinien

Die humanen Hepatomzelllinien HepG2 und HuH7 wurden im Zellkulturinkubator bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in DMEM-Vollmedium kultiviert. Die Zellen wurden mindestens zweimal die Woche passagiert. Hierfür wurde das Kulturmedium aspiriert und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-PBS bedeckt und für 5-10 min bei 37°C inkubiert. Nachdem die abgelösten Zellen in DMEM-Vollmedium resuspendiert wurden, wurde ein Teil der Lösung auf eine neue, kollagenisierte Zellkulturplatte übertragen und mit DMEM-Vollmedium vollständig bedeckt.

6.2.2 Aussaat und Kultivierung primärer Hepatozyten

Primäre humane und primäre Pferdehepatozyten wurden von der Fa. Primacyt bezogen und nach Herstellerangaben bei empfohlener Zelldichte in kollagenisierte 24-Wellplatten ausgesät. Acht Stunden nach Aussaat wurde das HPM-Cryo-Medium aspiriert und die Zellen mit vorgewärmten HHMM gewaschen und anschließend mit 300 µl HHMM-Haltemedium (Tabelle 10) bedeckt. Die Kultivierung mit täglichem Medienwechsel erfolgte (soweit nicht anders angegeben) in HHMM-Haltemedium.

6.2.3 Transiente Transfektion

Mindestens einen Tag vor Transfektion wurden die Zellen in den jeweiligen Zellkulturschalen mit DMEM-Vollmedium so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 80-90 % erreichten. Je nach Zelltyp wurde XtremeGeneHP (HepG2) oder FugeneHD (HuH7) für die Transfektion verwendet. Hierfür wurden 250 ng Plasmid-DNA pro cm² Kulturfläche in OptiMEM verdünnt (5 min, RT) und anschließend mit dem Transfektionsreagenz in einem Verhältnis von 3:1 (Reagenz:DNA) gemischt (15 min, RT). In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit DMEM-Vollmedium bedeckt. Nach der Inkubationszeit wurde der Transfektionsmix tropfenweise auf die Zellen verteilt, die gesamte Platte mehrmals geschwenkt und dann über Nacht im Inkubator inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium

aspiriert, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit entsprechendem Folgemedium bedeckt.

6.2.4 NBD-Taurocholat-Transportassay

Um die Oberflächenexpression und Funktionalität des Gallensäuretransporters NTCP/Ntcp vor Infektion zu überprüfen, wurde 48 h nach Transfektion ein Transportassay mit fluoreszenzmarkiertem Taurocholat (4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole-Taurocholat; NBD-TC) durchgeführt. Hierfür wurde das Kulturmedium aspiriert und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit vorgewärmten DMEM ohne Phenolrot unter Zugabe von NBD-TC (5 μ M f.c.) und Hoechst 33342 (zur Zellkernfärbung; 0,5 μ g/ml f.c.) bedeckt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit reinem DMEM ohne Phenolrot gewaschen und mit DMEM ohne Phenolrot bedeckt. Eine qualitative Analyse der Gallensäureimports wurde am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

6.2.5 Myr-PräS1-Peptidbindungsassay

Die spezifische Bindung der PräS1-Domäne verschiedener Orthohepadnaviren an NTCP/Ntcp wurde mittels fluoreszenzmarkierter, N-terminal myristoylierter Peptide der Aminosäuren 2 bis 48 der PräS1-Domäne (Myr-PräS1-Peptide; Tabelle 14) untersucht. Hierzu wurde zunächst das Kulturmedium aspiriert und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Peptide (100 nM f.c.) und der Zellkernfarbstoff Hoechst 33342 (0,5 μ g/ml f.c.) wurden in vorgewärmten DMEM ohne Phenolrot verdünnt und die Zellen damit bedeckt. Nach 15 min bei 37°C wurden die Zellen dreimal mit DMEM ohne Phenolrot gewaschen und abschließend mit DMEM ohne Phenolrot bedeckt. Eine qualitative Untersuchung der Bindspezifität wurde am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

6.2.6 Produktion pseudotypisierter Deltaviren

Zur Produktion rekombinanter, pseudotypisierter Hepatitis-D-Viren (psHDV) wurden je drei 10cm-Kulturschalen mit HuH7 ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit zwei Expressionsplasmiden kotransfiziert (siehe Abschnitt 6.2.3): Ein Plasmid kodiert ein replikationsfähiges HDV-cDNA-Genom (10 μ g DNA/Platte), während das zweite Plasmid hepadnavirale Oberflächenproteine unter endogenen oder HBV-spezifischen Regulatoren beinhaltet (5 μ g

DNA/Platte). Am Folgetag wurden die Zellen auf 150 mm-Zellkulturschalen umgesetzt und mit Produktionsmedium (Tabelle 10) bedeckt. Ein weiterer Medienwechsel erfolgte an Tag 3 nach Transfektion. Hierbei wurde das Medium vollständig verworfen und die Zellen erneut mit Produktionsmedium bedeckt. Anschließend wurde alle 3 Tage ein Medienwechsel durchgeführt, das Medium dabei gesammelt und die Überstände aller Tage gepoolt. Die Zellen wurden spätestens nach 15 Tagen verworfen. Die HDV-haltigen Überstände wurden mit Vivaspin Zentrifugalkonzentratoren nach Herstellerangaben ($3.000 \times g$, 4°C) eingengt. Der Gehalt an HDV-RNA in den Konzentraten wurde in einer quantitativen RT-PCR bestimmt (siehe Abschnitt 6.4.2.3).

6.2.7 *In vitro* Infektion mit pseudotypisierten Deltaviren

Die pseudotypisierten Hepatitis-Delta-Viren (psHDV) wurden verwendet, um zu untersuchen, ob orthohepadnavirale Oberflächenproteine den Zelleintritt vermitteln können.

Hierfür wurden HepG2-Zellen verwendet, die zwei Tage zuvor mit NTCP-/Ntcp-Expressionsplasmiden auf 24-Wellplatten transfiziert worden waren. Der Medienwechsel am Folgetag der Transfektion erfolgte mit HGM + 2 % DMSO. Am Tag der Infektion wurden die Zellen mit 1×10^8 HDV-Genomäquivalenten in 500 μl Infektionsmedium (Tabelle 10) pro Well infiziert. Am Tag 1 p.i. wurden die Zellen zweimal mit reinem HGM gewaschen und anschließend unter regelmäßigen Medienwechseln mit HGM + 2 % DMSO bis Tag 11 kultiviert und dann mit 3,8 % Paraformaldehyd (PFA) für die Immunfluoreszenz fixiert (30 min, RT).

Außerdem wurden kryopräservierte primäre humane und Pferdehepatozyten (Tabelle 4) mit psHDV infiziert. Acht Stunden nach Aussaat wurde das HPM-Cryo-Medium aspiriert und durch HHMM-Haltemedium (Tabelle 10) ersetzt. Am Tag nach Aussaat wurden die Zellen mit 1×10^8 Genomäquivalenten psHDV in 500 μl HHMM-Infektionsmedium (HHMM-Haltemedium + 4 % PEG) pro Well infiziert. Ab Tag 1 p.i. wurde das Medium täglich bis Tag 11 p.i. durch HHMM-Haltemedium ersetzt und anschließend für die Immunfluoreszenz mit 3,8 % PFA fixiert (30 min, RT).

6.2.8 Produktion von rekombinantem HBV

Für die Produktion von rekombinantem Hepatitis B Virus wurde eine stabile Zelllinie verwendet (HeG2 tet-on Advanced-3091). Diese HepG2-tet-on-Linie wurde stabil mit einem 1.1mer-Überlängenkonstrukt des HBV Subgenotyp D3 unter Tetrazyklin-induzierbarem Promotor transfiziert. Nach Zugabe von 10 µg/ml f.c. Doxyzyklin in das Produktionsmedium (Tabelle 10) wurden die Zellen für mehrere Wochen unter regelmäßiger Zugabe neuen Doxyzyklins kultiviert und die Überstände gesammelt. Nach Verwerfen der Zellen wurden die gepoolten Überstände mittels Vivaspin Zentrifugalkonzentratoren eingengt und der Gehalt an HBV-Genomen mit einer quantitativen PCR (siehe Abschnitt 6.4.2.2) bestimmt.

6.2.9 *In vitro* Infektion primärer Pferdehepatozyten mit Orthohepadnaviren

Kryopräservierte primäre Pferdehepatozyten (PEH) wurden, wie in Abschnitt 6.2.2 beschrieben, ausgesät. Acht Stunden nach Aussaat wurde das HPM-Cryo-Medium aspiriert und durch HHMM-Haltemedium (Tabelle 10) ersetzt. Am Tag nach Aussaat wurden die Zellen mit 1×10^5 HBV-Kopien (Abschnitt 6.2.8) oder mit EqHBV-haltigen Esel- und Zebraseren (6.8×10^5 - 1.0×10^6 Kopien) in 500 µl HHMM-Infektionsmedium (HHMM-Haltemedium + 4 % PEG) pro Well infiziert. Ab Tag 1 p.i. wurde das Medium täglich bis Tag 11 p.i. durch HHMM-Haltemedium ersetzt, wobei das Medium jeden zweiten Tag gesammelt und bei -20°C gelagert wurden. Sekretiertes HBeAg aus etablierter Infektion konnte in den unverdünnten Überständen mit dem HBeAg-Assay (Abbott Architect; Abschnitt 6.3.1) nachgewiesen werden. Teilweise sollte eine HBV-Infektion durch polyklonale Antikörper aus Seren inhibiert werden. Hierzu wurden die HBV-haltige Infektionslösung mit gleichen Volumina eines Kaninchenserums nach konventioneller HBV-Impfung (HBVaxPro) oder eines EqHBV-Antikörper-positiven Eselserums für 30 min bei 37°C präinkubiert.

6.3 Immunologische Nachweisverfahren

6.3.1 Qualitative HBeAg-Bestimmung

Sekretiertes HBeAg nach Transfektion oder Infektion wurde mit dem vollautomatisierten HBeAg-Assay des Abbott Architect bestimmt. Hierfür wurden 150 µl Zellkulturüberstand unverdünnt oder in PBS verdünnt eingesetzt.

6.3.2 HBsAg-Bestimmung

Zur Messung des HBsAg wurden vier verschiedene diagnostische Assays verwendet.

6.3.2.1 Quantitatives HBsAg (Architect)

Standardmäßig wurde das quantitative HBsAg-Assay des Abbott Architect zur Bestimmung der HBsAg-Konzentration in Zellkulturüberständen verwendet. Hierfür wurden 150 µl Gesamtvolumen der Überstände nach Transfektion unverdünnt oder in PBS verdünnt in das vollautomatisierte Assay eingesetzt.

6.3.2.2 Qualitatives HBsAg (Liaison)

Der qualitative HBsAg-Assay des DiaSorin Liaison wurde verwendet, um eine Nachweisbarkeit der HBs-Escape-Varianten zu untersuchen. Hierfür wurden 400 µl Gesamtvolumen (Zellkulturüberstände verdünnt in Williams' E Medium + 2 % FKS) in das Assay eingesetzt.

6.3.2.3 HBsAg-Bestätigungstest (Architect)

Der Architect HBsAg-Bestätigungstest wurde zum Nachweis der HBs-Escape-Varianten verwendet. Es wurden 300 µl Gesamtvolumen (Zellkulturüberstand verdünnt in Williams' E Medium + 2 % FKS) direkt in das Assay eingesetzt.

6.3.2.4 HBsAg-Bestätigungstest (Liaison)

Der Liaison HBsAg-Bestätigungstest wurde zum Nachweis der HBs-Escape-Varianten verwendet. Für den Test wurden je 330 µl Gesamtvolumen Zellkulturüberstände (Verdünnung in Williams' E Medium + 2 % FKS) mit 33 µl Verdünnungslösung oder 33 µl Anti-HBs (beides Teil des DiaSorin-Kits) für 1 bei RT präinkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Lösungen direkt in das Liaison-Assay eingesetzt. Die Auswertung der erhaltenen Rohdaten erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

6.3.3 Anti-HBs-Bestimmung

Die Konzentration an Anti-HBs von Immunseren wurde mit dem vollautomatisierten Anti-HBs-Assay des Abbott Architect gemessen. Hierfür wurden 150 µl Serum unverdünnt oder 1:100 in PBS verdünnt eingesetzt.

Das Anti-HBs-Assay wurde zudem in einer kompetitiven Variante genutzt. Hierfür wurden gleiche Mengen subviraler Partikel mit HBsAg (entsprachen 10 IU/ml f.c. des Referenz-HBsAg) mit Humanseren (50 IU/l f.c.) gemischt, mit PBS auf 150 µl Gesamtvolumen eingestellt und für 1 h bei 37°C rotierend inkubiert. Die Lösung wurde im Anschluss direkt in das Anti-HBs-Assay eingesetzt.

6.3.4 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz wurde sowohl für Kreuzreaktivitätsstudien von Anti-HBc-/Anti-HBs-Antikörpern mit Core- und Oberflächenproteinen neuartiger Hepadnaviren nach Transfektion als auch für den Nachweis des HDAg nach psHDV-Infektion verwendet.

Nach den im Ergebnisteil angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit 3,8 % PFA und 0,2 % Triton X-100 fixiert und permeabilisiert (30 min, RT). Anschließend wurden die Zellen mit Blocklösung (Tabelle 3) inkubiert, um unspezifische Antikörperreaktionen zu minimieren. Nach einer Inkubation mit angegebenen Primärantikörpern in PBS (Tabelle 7) für eine Stunde bei 37°C wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern in PBS (Tabelle 7) für 30 min bei 37°C gefärbt. Zeitgleich wurden die Zellkerne mit dem Farbstoff DAPI sichtbar gemacht. Zwischen dem Blockschritt und dem Erstantikörper als auch zwischen Erst- und Zweitantikörper wurden die Zellen jeweils viermal mit PBS gewaschen. Die Auswertung wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

6.3.5 SDS-PAGE und Semi-Dry Western Blot

Um die HBsAg-Varianten und dessen Glykoformen nachzuweisen und semi-quantitativ zu bestimmen, wurde eine SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Hierfür wurden HepG2-Zellen 4 Tage nach Transfektion mit subgenomischen HBs-Expressionskonstrukten mit OPT-Lysisbuffer (Tabelle 10; [232]) lysiert und über

Nacht bei 50°C schüttelnd (200 rpm) inkubiert. Am Folgetag wurden die Lysate entweder bei -20°C gelagert oder direkt für die SDS-PAGE vorbereitet. Hierzu wurden die Lysate mit 4xSDS-Probenbuffer + β -Mercaptoethanol (10 % f.c.) gemischt, für 5 min bei 95°C denaturiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit 1xSDS-Laufpuffer vertikal getrennt. Nach einer 15-minütigen Einlaufphase bei 100 V, wurde die Spannung auf 150-175 V erhöht.

Tabelle 17: Zusammensetzung eines diskontinuierlichen 12 %igen SDS-Gels. Alle Angaben in μ l.

Trenngel	ddH ₂ O	SDS [10 %]	1,5 M Tris-Cl (pH8,7)	Acrylamid/Bisacrylamid (75,5:1)	TEMED	APS (10 %)
12 %	3350	100	2500	4000	10	100
Sammelgel	ddH ₂ O	SDS [10 %]	0,5 M Tris-Cl (pH6,8)	Acrylamid/Bisacrylamid (75,5:1)	TEMED	APS (10 %)
4 %	1590	25	630	330	10	100

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde zunächst 10 min in reinem Methanol aktiviert. Anschließend wurden alle Blottingbestandteile nach kurzer Inkubation in 1xTransferpuffer wie folgt geschichtet: zwei Whatman-Papiere (Grade 3MM Chr), PVDF-Membran, SDS-Gel, zwei Whatman-Papiere. Nach 60 min bei 2,5 mA/cm² Stromstärke wurde die Membran kurz in TBS-T gewaschen und anschließend in TBS-T mit 5 % Magermilchpulver für eine Stunde bei RT unter Schwenken geblockt. Die Erstantikörper (Tabelle 7) wurden in TBS-T mit 1 % Magermilchpulver verdünnt und die Membran darin über Nacht bei 4°C schwenkend inkubiert. Nach dreimaligem, fünf-minütigem Waschen mit TBS-T wurde die Membran in der Sekundärantikörperlösung (Tabelle 7) für zwei Stunden bei RT inkubiert. Aufgrund der Kopplung der Sekundärantikörper an die Meerrettich-Peroxidase (engl.: *horseradish peroxidase* (HRP)), konnten gewünschte Proteine indirekt über eine Enzym-Substrat-Reaktion der HRP nachgewiesen werden. Hierzu wurde die Membran mit Clarity Max Western ECL (engl.: *enhanced chemiluminescence*)-Substrat nach Herstellerangaben inkubiert und Proteine über einen ECL-Imager visualisiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit der Software Image Studio Lite.

6.4 Molekularbiologie

6.4.1 Isolierung viraler Nukleinsäuren

Bevor virale Nukleinsäuren (HBV-DNA und HDV-RNA) durch PCR amplifiziert werden konnten, mussten diese aus den entsprechenden viralen Partikeln isoliert werden. Hierfür wurden zum einen virushaltige Zellkulturkonzentrate als auch humanes Serum verwendet. In beiden Fällen wurde das High Pure Viral Nucleic Acid-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Elution erfolgte in 50 µl Ultrapure DNase-/RNase-freiem Wasser. Die gereinigten Nukleinsäuren wurden bei -80°C gelagert.

6.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in dieser Arbeit verwendet, um Klonierungen als auch Virusquantifizierungen durchzuführen.

6.4.2.1 Phusion-PCR

Die Phusion-PCR wurde in dieser Arbeit zur Amplifikation von Sequenzbereichen für Klonierungen verwendet. Die jeweiligen verwendeten Primer, Annealing-Temperaturen und Extension-Zeiten sind in den entsprechenden Klonierungsschritten aufgeführt. Es wurde standardmäßig folgender PCR-Mix angesetzt:

Tabelle 18: Phusion-PCR-Ansatz.

5 µl dNTPs [25 mM]
1 µl forward Primer [0,2 mM f.c.]
1 µl reverse Primer [0,2 mM f.c.]
10 µl 5x HF-Puffer
0,5 µl Phusion DNA-Polymerase
32,5 µl Ultrapure Wasser
Zuletzt: 1 µl eluierte HBV-DNA bzw. 10 ng Plasmid-DNA

Die PCR Ansätze wurden folgendem PCR-Programm unterzogen:

Tabelle 19: Phusion-PCR-Programm.

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [mm:ss]	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	03:00	1x
Denaturierung	98	00:10	<u>18x</u>

Annealing	<u>variabel</u> [T _A]	00:30	
Extension	72	<u>variabel</u> [t _E]	
Finale Extension	72	05:00	1x
Abkühlen	16	01:00	1x

6.4.2.2 Quantitative HBV-PCR

Zur Quantifizierung von HBV-Partikeln in Zellkulturkonzentraten wurde eine quantitative HBV-spezifische PCR (qPCR) durchgeführt [233]. Als Quantifizierungsstandard diente HBV-DNA aus rekombinant-produziertem HBV (Abschnitt 6.2.8). In einer 96-Well-PCR-Platte wurde folgender Mix vereint:

Tabelle 20: HBV-qPCR-Ansatz.

1,2 µl cdb _s 1+2+3 Mix [10 pmol/µl]
1,2 µl cdb _a [10 pmol/µl]
0,8 µl cdq380 [10 pmol/µl]
10 µl 2x Takyon No Rox Probe Master Mix dTTP Blue
4,8 µl Wasser
Zuletzt: 2 µl eluierte HBV-DNA

Nach Verschließen der Platte mit PCR-Folie und kurzer Zentrifugation wurde folgendes PCR-Programm durchgeführt:

Tabelle 21: PCR-Programm der HBV-qPCR. Diese Two-Step-PCR basiert auf einer Publikation von Drosten et al. [233].

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [mm:ss]	Zyklen	Quantifizierung
Initiale Denaturierung	95	03:00	1x	-
Denaturierung	95	00:10	45x	-
Annealing/ Extension	60	00:40		Single
Abkühlen	40	00:30	1x	-

6.4.2.3 Quantitative HDV-RT-PCR

Zur Quantifizierung von HDV-Partikeln in Zellkulturkonzentraten aus psHDV-Produktionen wurde eine quantitative HDV-spezifische reverse Transkriptase-

PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Hierfür wurde HDV-RNA aus den Konzentraten mit dem High Pure Viral Nucleic Acid-Kit nach Herstellerangaben isoliert. Elution erfolgte in 50 µl Ultrapure DNase-/RNase-freiem Wasser. Vor der PCR wurden zunächst mögliche HDV-Plasmidrückstände mittels DNaseI-Verdau entfernt: Auf einer 96-Well-PCR-Platte wurden gemischt:

Tabelle 22: DNaseI-Verdau vor HDV-qRT-PCR.

2 µl DNaseI
0,9 µl DNaseI-Puffer
1,1 µl Wasser
Zuletzt: 5 µl eluierte HDV-RNA

Die Platte wurde mit einer hitzebeständigen PCR-Folie verschlossen, kurz zentrifugiert und für 1 h bei 37°C (Verdau) gefolgt von 1 min bei 95°C (DNase-Inaktivierung) im LightCycler 480 II inkubiert. Jedem Well wurde anschließend folgender PCR-Mix hinzugefügt: 5 µl TaqMan FastVirus 1-Step-Mastermix, 1 µl HDV-F [500 nm f.c.], 1 µl HDV-R [500 nm f.c.], 0,5 µl HDV-P [250 nm f.c.] und 3,5 µl Wasser. Nach Verschließen der Platte mit PCR-Folie wurde folgendes PCR-Programm durchgeführt:

Tabelle 23: PCR-Programm der HDV-qRT-PCR. Die PCR besteht aus einer reversen Transkription gefolgt von einer Touchdown-PCR. Quantifizierung fand in jedem Zyklus der Amplifikation nach der Elongationsphase statt (blau hinterlegt).

Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [mm:ss]	Temperaturänderungsrate [°C/s]	Temperaturänderung /Zyklus [°C]
Reverse Transkription				
1x	53	05:00	4,4	
Initiale Denaturierung/Inaktivierung der RT				
1x	95	00:20	4,4	
Amplifikation				
45x	95	00:20	4,4	
	64 bis 60	00:30	2,2	0,5
	72	00:10	4,4	

Als Quantifizierungsstandard diente *in vitro* transkribierte HDV-RNA.

6.5 Klonierungen

6.5.1 Klonierung von SHBs-Expressionsplasmiden

Zur phänotypischen Analyse von HBs-Escapevarianten, wurden HBs-Sequenzen amplifiziert und in pcDNA3.1(+) kloniert.

Aufgrund der geringen Viruslast des untersuchten Serums wurde zunächst eine Ultrazentrifugation durchgeführt. Hierfür wurden 9ml Serum auf ein Sucrosekissen (1 ml 10 % Sucrose/TNE + 2 ml 15 % Sucrose/TNE) gegeben und in einem SW41-Rotor bei 25,000 rpm für 16 h bei 4°C zentrifugiert. Das Ausschwingen des Rotors nach dem Lauf erfolgte ohne Bremse. Das entstandene Pellet wurde in 200 µl TNE resuspendiert und HBV-DNA daraus isoliert (Abschnitt 6.4.1).

Zuerst wurden reine Sequenzierplasmide kloniert. Hierfür wurde aus Serum isolierte HBV-DNA (Abschnitt 6.4.1) mittels Phusion-PCR amplifiziert (siehe Abschnitt 6.4.2.1; Primer: S6s, S6as, $T_A = 60^\circ\text{C}$, $t_E = 20\text{ s}$). Der Vektor pcDNA3.1(+) wurde über Phusion-PCR linearisiert und Überhänge zum S6-PCR-Produkt angehängen (Abschnitt 6.4.2.1; Primer: pcDNA3.1+_S6-Overhang_fwd, pcDNA3.1+_S6-Overhang_rev, $T_A = 67^\circ\text{C}$, $t_E = 2\text{ min}$). Zur Klonierung wurde die FastCloning-Methode verwendet [234]. Nach den beiden PCRs für Insert und Vektor wurden je 10 µl miteinander gemischt und 1 µl DpnI zum Verdau der Template-DNA hinzugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl in *E. coli* Stellar transformiert (siehe Abschnitt 6.1.1). Einzelklone wurden für Plasmidpräparationen angeimpft, Plasmid-DNA gereinigt und Sanger-sequenziert (LGC Genomics).

Im folgenden Schritt wurden SHBs-Teilsequenzen (AS 100-226) ausgewählter Isolate in ein 6xHis-FLAG-SHBs-Expressionsplasmid umklont, das bereits die gesamte SHBs-Sequenz des Referenzisolats HBV-D3 enthielt. Hierfür wurden Insert und Vektor mittels Phusion-PCR amplifiziert (siehe Abschnitt 6.4.2.1), wodurch beidseitig 21 bp-Überhänge entstanden. Die Insert-PCR wurde mit folgenden Bedingungen durchgeführt: Primer (SHBs-only_insert_fwd, SHBs-only_insert_rev), $T_A = 59^\circ\text{C}$, $t_E = 20\text{ s}$. Der Vektor wurde wie folgt amplifiziert: Primer (pcDNA3-1_SHBs-only_overhang_fwd, pcDNA3-1_SHBs-only_overhang_rev), $T_A = 62^\circ\text{C}$, $t_E = 2\text{ min}$. Rekombination, Transformation, Plasmidpräparation sowie Sequenzierung wurden wie für die Sequenzierplasmide beschrieben durchgeführt.

Die finalen Expressionsplasmide kodierten für (chimäres) SHBs mit N-terminalem 6xHis- und FLAG-Tag unter konstitutivem CMV-Promotor mit 3'-

gelegenen BGH-poly-Adenylierungssignal. Das SHBs besteht aus AS 1-99 des Referenzgenoms HBV-D3 und AS 100-226 des jeweiligen Isolats.

6.5.2 Klonierung von hepadnaviralen 1.5mer-Plasmiden

Klone des HBV und anderer Hepadnaviren müssen aufgrund des zirkulären Genoms als Überlänge in Plasmiden vorliegen, um replikationsfähig zu sein. In dieser Arbeit wurden 1.5mer-Überlängenkonstrukte kloniert, da diese vollständig unter der Kontrolle endogener viraler Regulatoren stehen. Hierzu wurden zwei DNA-Fragmente (dsDNA; „gBlock“) entsprechend der 1.5-fachen zu klonierenden Hepadnavirus-Sequenz (HBV, EqHBV-Do, EqHBV-Ze, MSHBV) bei Integrated DNA Technologies (IDT) synthetisieren lassen. Diese DNA-Fragmente enthielten außerdem 5'- und 3'-hinzugefügte 18bp-Überhänge zum pcDNA3.1(+)-Vektor. Für die Klonierung wurde zunächst der Vektor pcDNA3.1(+) mittels Restriktionsverdau (BamHI, MluI) nach Herstellerangaben verdaut, sodass der CMV-Promotor entfernt wurde und das Plasmid linear vorlag, und dann mit dem Monarch PCR & DNA Cleanup-Kit nach Herstellerangaben gereinigt. Der Vektor wurde anschließend mit den DNA-Fragmenten mittels InFusion-Kit wie folgt rekombiniert: 50-100 ng Vektor wurden in einem molaren Verhältnis von 3:3:1 (Fragment1: Fragment2: Vektor) gemischt, mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt und für 15 min bei 50°C inkubiert. 2,5 µl des Ansatzes wurden in *E. coli* Stellar transformiert (Abschnitt 6.1.1) und am Folgetag Klone für Mini-Präparationen angeimpft (Abschnitt 6.1.2). Gereinigte Plasmid-DNA wurde mittels Sanger-Sequenzierung (LGC Genomics) auf korrekte Insertion geprüft.

6.5.3 Klonierung hepadnaviraler HBs-Expressionsplasmide

Expressionsplasmide, die die Oberflächenproteine der Hepadnaviren HBV, EqHBV, MSHBV und CSHBV unter der Kontrolle eigener oder HBV-endogener Promotoren und regulatorischen Elementen exprimieren, wurden zur Klonierung bei BioCat in Auftrag gegeben. Korrekte Sequenzidentität wurde nach Plasmidpräparation mittels Sanger-Sequenzierung (LGC Genomics) bestätigt. Alle HBs-Expressionsplasmide enthalten den vom HBs-ORF 5'-gelegenen PräS-Promotor sowie 3'-gelegene Enh I/II, das PRE und die abschließende kanonische Poly-Adenylierungsstelle.

6.6 Bioinformatische Methoden

Für Sequenzvergleiche wurde das Programm UGene (Version 39) verwendet. Alignments wurden mit dem darin enthaltenen MUSCLE-Algorithmus erstellt. Auf Grundlage der Alignments wurden Similaritätsmatrizes (unter Einbezug von *sequence gaps*) mit UGene erstellt und als HTML-Datei exportiert.

Die angeglichenen Sequenzen und der Sequenzconsensus wurden aus UGene exportiert und mittels BioEdit (Version 7.2.5) graphisch dargestellt.

Für die Analyse der Signalpeptidschnittstelle wurde das Online-Prediction-Tool PrediSi [235] verwendet. Die gesamte PräC-Sequenz wurde für die Analyse eingegeben.

Für die Untersuchung der Furinschnittstellen des HBeAg-Propeptids wurden zwei Programme verwendet: ProP und PiTou. ProP ist eine Online-Vorhersagesoftware [236], PiTou hingegen wird über Command-Line verwendet [237]. Zur Analyse der Furinschnittstellen wurde das gesamte Core-Protein eingesetzt.

Die Berechnung der Signifikanz erfolgte durch Graphpad Prism (Version 9.3.0) mittels des in den Abbildungen angegebenen Tests.

Die densitometrische Auswertung von Western Blots erfolgte mit der Software Image Studio Lite (Version 5.2, LI-COR).

7. Ergebnisse

Im Zuge dieser Arbeit sollten das humane Hepatitis-B-Virus und andere, neu entdeckte, nicht-menschliche Orthohepadnaviren hinsichtlich der Antigenität und Infektiosität ihrer Oberflächenproteine (HBsAg) untersucht werden. Außerdem sollte die Konservierung essentieller hepadnaviraler Charakteristika anhand des Strukturproteins HBcAg und des sekretierten HBeAg zweier divergenter tierischer Orthohepadnaviren bioinformatisch und experimentell analysiert werden.

7.1 Charakterisierung der Antigenität hyperglykosylierter HBV-Escapevarianten

Unter der Leitung von Prof. Dr. Glebe (Leiter des Nationalen Referenzzentrums für Hepatitis-B-Viren und Hepatitis-D-Viren am Institut für Medizinische Virologie der Universität Gießen; Direktor: Prof. Dr. Ziebuhr) in Zusammenarbeit mit Dr. Schlevogt (Medizinische Klinik B des Universitätsklinikums Münster; Direktor Prof. Dr. Dr. Trebicka) wurde im Rahmen des Nationalen Referenzzentrums für Hepatitis-B-Viren und Hepatitis-D-Viren ein Patientenserum mit auffälliger serologischer Konstellation untersucht: Der HBV-DNA positive Patient wurde positiv für Anti-HBs bei uneindeutigem HBsAg-Status getestet (siehe 7.1.1). Hierbei konnten in dieser Arbeit mehrere Virusvarianten, die zusätzliche Glykosylierungsmotive und bekannte Immunescape-Mutationen in der antigenen Determinante des kleinen Oberflächenproteins (SHBs) enthielten, experimentell nachgewiesen sowie geno- und phänotypisch analysiert werden.

In dieser Arbeit wurde dafür HBV-DNA aus dem Serum des Patienten isoliert, sequenziert und subgenomische Expressionsplasmide repräsentativer Virusisolate kloniert. Durch Expression des SHBs in humanen Hepatomzellen konnten Glykosylierungsmuster, Sekretionsverhalten, HBsAg-Nachweisbarkeit in diagnostischen Assays und Reaktivität mit Anti-HBs-positiven Seren dieser Virusvarianten charakterisiert werden.

7.1.1 Klinische Ausgangslage

Es handelte sich um einen 52-jährigen Mann aus Albanien, bei dem im Alter von 23 Jahren eine chronische HBV-Infektion diagnostiziert worden war. Alle Leberfunktionstests waren, mit Ausnahme eines erhöhten Bilirubin-Wertes (2,4 mg/dl; Normalbereich <1,2 mg/dl) aufgrund eines Gilbert-Syndroms, unauffällig. Eine aktuelle Leberbiopsie zeigte eine Fibrose (F2-Ishak-Score) mit gleichzeitiger milder Steatohepatitis.

HBV-DNA konnte trotz heterogenem HBsAg-Ergebnis (positiv im qualitativen Assay, aber negativ im quantitativen Assay) an drei Zeitpunkten über einen Zeitraum von 14 Monaten nachgewiesen werden (64-397 IU/ml). Zeitgleich waren hohe Konzentrationen an Anti-HBs vorhanden (151-235 IU/l). Serokonversion von HBeAg zu Anti-HBe war zu allen Zeitpunkten stabil und es konnte keine HDV-Koinfektion festgestellt werden. Diese Markerkonstellation ließ eine mögliche „falsche“ okkulte HBV-Infektion (nachweisbare *hohe* HBV-DNA-Menge bei HBsAg-Negativität) vermuten.

7.1.2 Gewinnung HBV-spezifischer Genomsequenzen und genotypische Analyse

Da Escapemutationen im Bereich der antigenen Schleife des kleinen HBV-Oberflächenproteins neben anderen Auslöser für einen (falsch-)okkulten HBV-Phänotyp sein können [161, 162], sollte HBV-DNA aus dem Patientenserum isoliert und der Bereich der großen hydrophilen Region (MHR) mittels PCR (High-Fidelity Polymerase) amplifiziert und anschließend sequenziert werden.

Aufgrund der geringen Viruslast wurde das Serum zunächst über ein Sucrosekissen ultrazentrifugiert, um die darin enthaltenen HBV-Partikel zu pelletieren und dadurch anzureichern (Abschnitt 6.5.1). Das Pellet wurde in TNE resuspendiert und anschließend virale DNA mit einem kommerziellen Kit extrahiert. Da weiterhin geringe Mengen an HBV-DNA zu erwarten waren, wurde eine *nested* PCR durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden zwei PCRs hintereinander durchgeführt, wobei die erste (äußere) als Voramplifikation dient und das gewünschte PCR-Produkt auf Grundlage dieser äußeren PCR mittels weiter innen liegender Primer amplifiziert wird (innere PCR). Nach der zweiten (inneren) PCR konnten DNA-Amplifikate nachgewiesen werden (Abbildung 6 links), von denen das kleinste Produkt die zu erwartende Größe (~600 bp)

Ergebnisse

besaß. Diese DNA-Bande wurde nach Agarosegelelektrophorese aus dem Gel isoliert und Sanger-sequenziert (Abbildung 6 rechts). Zusätzlich wurden zwei höhermolekulare, unspezifische Banden (~800 bp und ~2.000 bp) festgestellt.

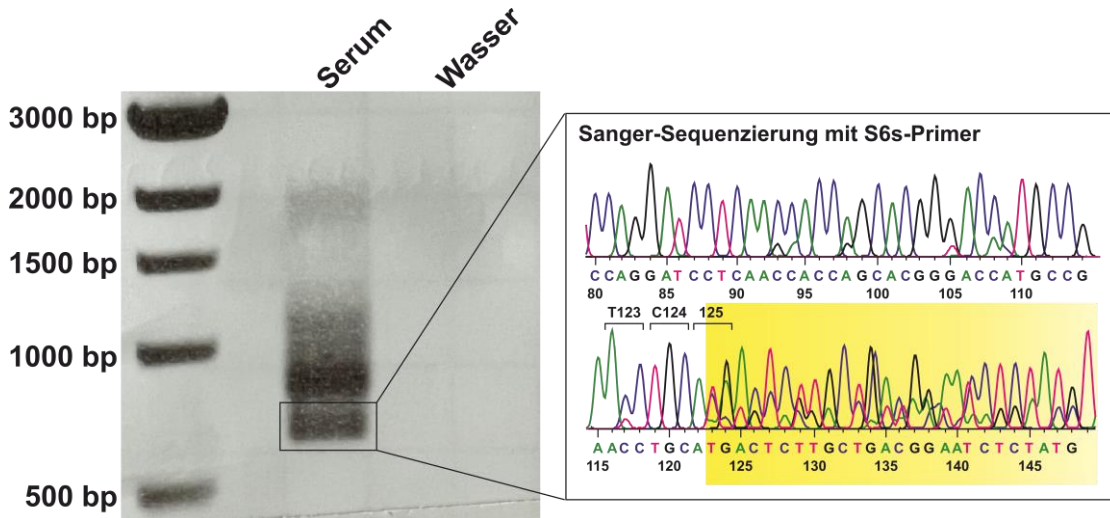


Abbildung 6: Amplifikation der HBV-DNA des Patientenserums. Links: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel nach Gelelektrophorese der nested HBV-PCR-Ansätze. Die aus dem Gel ausgeschnittene und anschließend sequenzierte Bande ist mit einem Kasten markiert. Rechts: Sanger-Sequenzierung des spezifischen HBV-Amplikats nach nested PCR. Der Bereich hoher Heterogenität der Sequenzierung nach dem Codon-Triplet für Aminosäure C124 des SHBs ist gelb markiert.

Die Sanger-Sequenzierung zeigt ein geringes Maß an Heterogenität im 5'-Bereich des Amplifikats. Ab Nukleotid 123 (korrespondierend mit AS 125 des SHBs) des sequenzierten Bereichs zeigten sich hingegen vermehrt stark überlappende Sequenzierungsmuster. Eine Mutationsanalyse auf Basis der direkten Sequenzierung erwies sich daher als nicht durchführbar. Deshalb wurde das PCR-Produkt via FastCloning-Rekombination in den pcDNA3.1(+)-Vektor kloniert und am Folgetag Einzelklone in Flüssigkultur für eine Plasmidisolation vermehrt. Auf Grundlage der Sequenzierung von zwölf der daraus entstandenen Klone ergaben sich vier Sequenzcluster: Ein HBV des Subgenotyp D3, jedoch mit ungewöhnlichem Serotyp ayw4 (Cluster 1) und drei verwandte Virusvarianten (Cluster 2-4) (Abbildung 7).

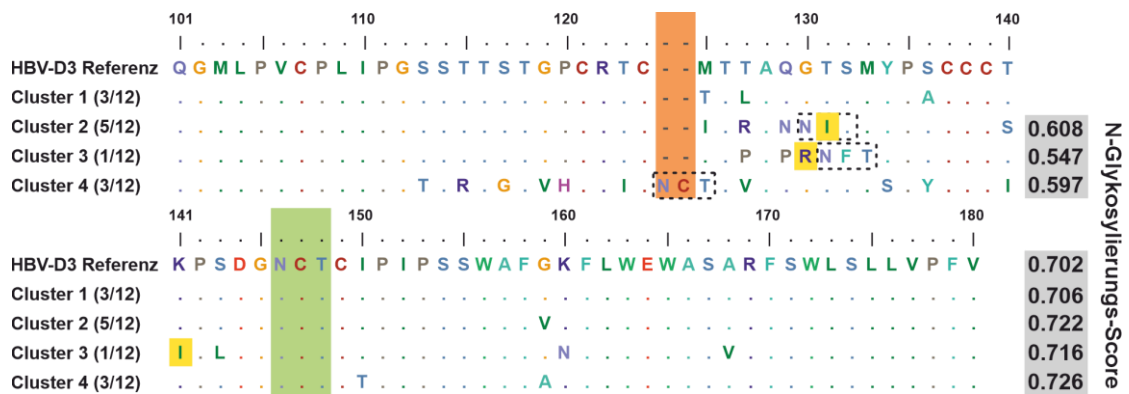


Abbildung 7: Sequenzvergleich der großen hydrophilen Region (MHR) des SHBs der isolierten HBV-Varianten. Das Sequenzalignment wurde mit dem MUSCLE-Algorithmus in UGENE erstellt. Die kanonische N-Glykosylierungssequenz an N146 ist grün hinterlegt. Bekannte Immunescape-Mutationen sind gelb dargestellt. Die 2-AS-Insertion des Clusters 4 ist orange gezeigt. Zusätzliche Glykosylierungsmotive sind mit gestrichelten Kästen angezeigt. Rechts ist der Score der N-Glykosylierung-Vorhersagesoftware NetNGlyc angegeben. Dieser Score kann einen Wert zwischen 0 (sehr unwahrscheinlich) und 1 (sehr wahrscheinlich) annehmen. Je höher der Score, desto größer ist das Konfidenzniveau einer tatsächlichen N-Glykosylierung.

Nur drei der zwölf HBV-Isolate zeigten eine Sequenz des Cluster 1. Fünf Klone (Cluster 2) hatten eine G130N-Mutation, die ein potientes N-Glykosylierungsmotiv (N¹³⁰I^{S132}) einführt, in Kombination mit einer T131I-Mutation. Ein Isolat (Cluster 3) zeigte eine T131N/M133T-Doppelmutation (N-Glykosylierungsmotiv) sowie die Escapemutationen G130R und K141I. Die drei verbliebenen Klone (Cluster 4) besaßen eine zuvor unbeschriebene 6 nt-Insertion zwischen AS 124 und 125 (C¹²⁴NCT¹²⁵), die eine zusätzliche mögliche N-Glykosylierungsstelle erzeugte.

Zur bioinformatischen Analyse der Wahrscheinlichkeit einer N-Glykosylierung wurde die Vorhersagesoftware NetNGlyc verwendet. Der ausgegebene Score kann einen Wert zwischen 0 (sehr unwahrscheinlich) und 1 (sehr wahrscheinlich) annehmen. Der NetNGlyc-Score ist bei allen betrachteten Isolaten für die kanonische N-Glykosylierungsstelle sehr ähnlich (0.702-0.726). Bei den drei Clustern mit neuen N-Glykosylierungsmotiven sind diese Werte niedriger, aber dennoch wird eine N-Glykosylierung als wahrscheinlich angenommen (0.547-0.608).

Die Analyse des Polymerase-ORF, der mit dem S-ORF vollständig überlappt, zeigte keine Mutationen, die eine vorzeitige Terminierung des Polymeraseproteins herbeiführen oder das katalytische YMDD-Motiv verändern (Abbildung S1 (Anhang)).

7.1.3 Untersuchung des Glykosylierungsmusters

Nach der genotypischen Analyse wurde je ein repräsentatives Isolat der vier Sequenzcluster in ein SHBs-Expressionsplasmid, das N-terminal einen FLAG-Tag besaß, subkloniert (Abbildung 8A). Mittels dieser Vektoren sollte nun das N-Glykosylierungsmuster der Virusvarianten intra- und extrazellulär untersucht werden. Hierfür wurden HepG2-Zellen mit den generierten Plasmiden transfiziert und Überstände nach vier Tagen gesammelt, sowie die Zellen lysiert. Proteine in Überständen bzw. Zelllysaten wurden anschließend mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Das SHBs konnte abschließend mit einem Anti-FLAG-Antikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper über ECL nachgewiesen werden (Abbildung 8B und C). Als Positivkontrolle wurde das SHBs-Expressionsplasmid eines HBV-D3-Referenzgenoms („R“; Serotyp ayw3) verwendet. Als Negativkontrolle diente der leere pcDNA3.1(+)-Vektor („NC“).

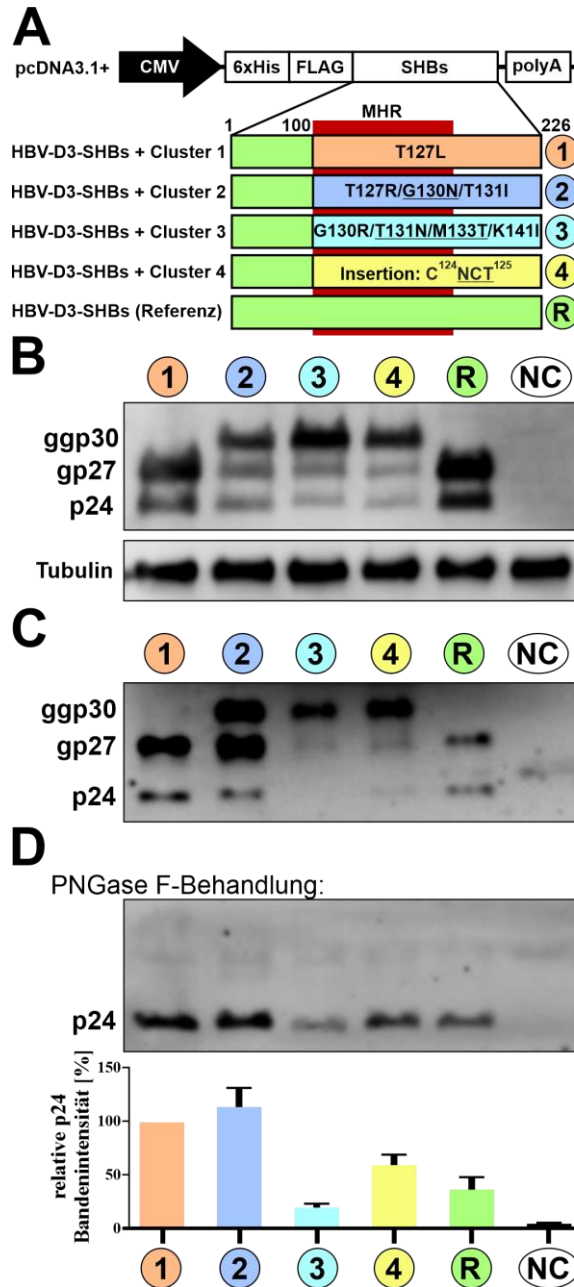


Abbildung 8: N-Glykosylierungsmuster der Virusvarianten-Cluster. (A) Darstellung des Aufbaus der FLAG-SHBs-Expressionskonstrukte. Die relevanten Mutationen der antigenen Determinante sind farblich dargestellt. Western Blot von Zelllysaten (B) bzw. Zellkulturüberständen (C) nach Transfektion mit FLAG-SHBs-Expressionsplasmiden. HepG2-Zellen wurden mit FLAG-SHBs-Expressionsplasmiden transfiziert und vier Tage nach Transfektion wurden Überstände gesammelt bzw. die Zellen lysiert. Zum SHBs-Nachweis wurde ein Anti-FLAG-Antikörper verwendet. Tubulin diente als Ladekontrolle. Die Benennungen der verwendeten Konstrukte korrespondieren mit Abbildungsteil A. Eine densitometrische Analyse der Zelllysate aus (B) sind in Abbildung S2 (Anhang) dargestellt. (D) Western Blot identischer Überstände zu Abbildungsteil (C), jedoch nach PNGase F-Behandlung zur spezifischen Entfernung von N-Glykosylierungen. Darunter densitometrische Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten. Hierfür wurde von allen Werten der Bandenintensitäten das unspezifische Hintergrundsignal abgezogen. Die relativen Bandenintensitäten wurden anhand dieser hintergrundkorrigierten Werte berechnet. R – HBV-D3-SHBs-Referenz; NC – Negativkontrolle (Zellen transfiziert mit leerem pcDNA3.1(+)).

Intrazellulär zeigten sowohl Cluster 1 als auch die Positivkontrolle („R“) zwei SHBs-spezifische Banden, die dem unglykosylierten p24 und dem einfach-N-glykosylierten gp27 (AS N146) zugeordnet werden konnten. Für Cluster 2-4 zeigte sich zusätzlich zu p24 und gp27 eine dritte Bande bei einem Molekulargewicht von rund 30 kDa (gpp 30) (Abbildung 8B). Diese zusätzliche Bande konnte auch in den Zellkulturüberständen nach Transfektion mit Cluster 2-4 nachgewiesen werden (Abbildung 8C). Um zu zeigen, dass die Verschiebung des Molekulargewichts tatsächlich durch eine zusätzliche N-Glykosylierung hervorgerufen wurde, wurden die Zellkulturüberstände transfizierter Zellen mit PNGase F behandelt. Die Amidase PNGase F entfernt spezifisch Oligosaccharide von N-glykosylierten Proteinen. Nach PNGase F-Behandlung zeigte sich bei allen Clustern sowie der Positivkontrolle nur noch eine einzige spezifische Bande (Abbildung 8D), die dem unglykosylierten p24 zugeordnet werden konnte.

Intrazellulär konnte bei der Referenz und dem Cluster 1 eine etwas höhere Menge an gp27 im Vergleich zu p24 nachgewiesen werden (Abbildung S2A (Anhang)). Extrazellulär ist auch bei Cluster 1 die gp27-Bande stärker ausgeprägt, wohingegen die p24- und gp27-Banden der Referenz eher ähnliche Intensität aufweisen. Auffällig ist, dass insgesamt weniger SHBs durch die Referenz als durch das Cluster 1-SHBs sekretiert wurde (Vergleich Abbildung 8B und C). Bei den drei hyperglykosylierten Varianten konnten intrazellulär am meisten SHBs des Cluster 3 und ähnliche Mengen der Cluster 2 und 4 nachgewiesen werden (Abbildung S2A (Anhang)), wobei die ggp30-Bande bei allen die höchste Intensität besaß (Abbildung S2B (Anhang)). Die beiden niedrigeren Banden (p24 und gp27) waren weniger stark als ggp30, aber zueinander ähnlich intensiv ausgeprägt (Abbildung S2B (Anhang)). Extrazellulär zeigten sich große Unterschiede zwischen den Clustern mit zusätzlicher Glykosylierungsstelle: Während Cluster 2 vergleichbare Mengen an p24 und gp27 im Vergleich zu Cluster 1 sekretierte, konnte auch eine große Menge an ggp30 im Überstand nachgewiesen werden (Abbildung 8C). Cluster 3 zeigte dahingegen wesentlich geringere totale Mengen an sekretiertem SHBs, wobei hier die ggp30-Bande am stärksten, die gp27 nur noch schwach und die p24-Bande gar nicht mehr nachweisbar war. Das Sekretionsverhalten von

Cluster 4 war ähnlich zu Cluster 3, wobei bei Cluster 4 auch geringe Mengen an p24 im Überstand detektiert werden konnten.

Durch Deglykosylierung konnten alle Glykoformen des SHBs zu einer einzigen Bande im Western Blot vereint werden (Abbildung 8D). Dies ermöglichte eine genauere densitometrische Analyse. Die Quantifizierung der resultierenden p24-Bande konnte zeigen, dass Cluster 1 und 2 ähnliche totale Mengen an SHBs sekretierten (100 % zu 114 %), wohingegen durch die Referenz (R) geringere Mengen sekretiert wurden (37 %). Cluster 3 zeigte eine deutliche Reduktion in der SHBs-Sekretion (20,5 %), und auch Cluster 4 sekretierte vergleichsweise wenig SHBs (60,2 %). Die densitometrische Quantifizierung diente im Anschluss zur Angleichung der HBsAg-Konzentration für die Experimente bezüglich der Nachweisbarkeit durch diagnostische HBsAg-Assays (Abbildung 9) und Reaktivität mit Anti-HBs-Antikörpern (Abbildung 11).

7.1.4 Detektierbarkeit der Virusvarianten durch diagnostische Assays

Da diagnostische HBsAg-Nachweissysteme primär auf Antikörperreaktionen mit der antigenen Determinante des HBsAg basieren, sollte untersucht werden, ob die hyperglykosylierten Virusvarianten durch gängige HBsAg-Assays nachgewiesen werden können.

Hierfür wurden HepG2-Zellen mit den bereits beschriebenen FLAG-SHBs-Expressionsplasmiden transfiziert und der Zellkulturüberstand nach vier Tagen gesammelt. Die Menge an sekretiertem SHBs wurde mittels Western Blot (Anti-FLAG) nach vollständiger Deglykosylierung durch PNGase F quantifiziert (Abbildung 8D) und anschließend unbehandeltes HBsAg durch Verdünnung mit Zellkulturmedium auf eine gleiche Konzentration eingestellt, um Vergleichbarkeit zwischen den SHBs-Varianten zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben in zwei diagnostischen HBsAg-Assays sowie zwei HBsAg-Bestätigungstests des Abbott Architects und DiaSorin Liaisons getestet (Abbildung 9).

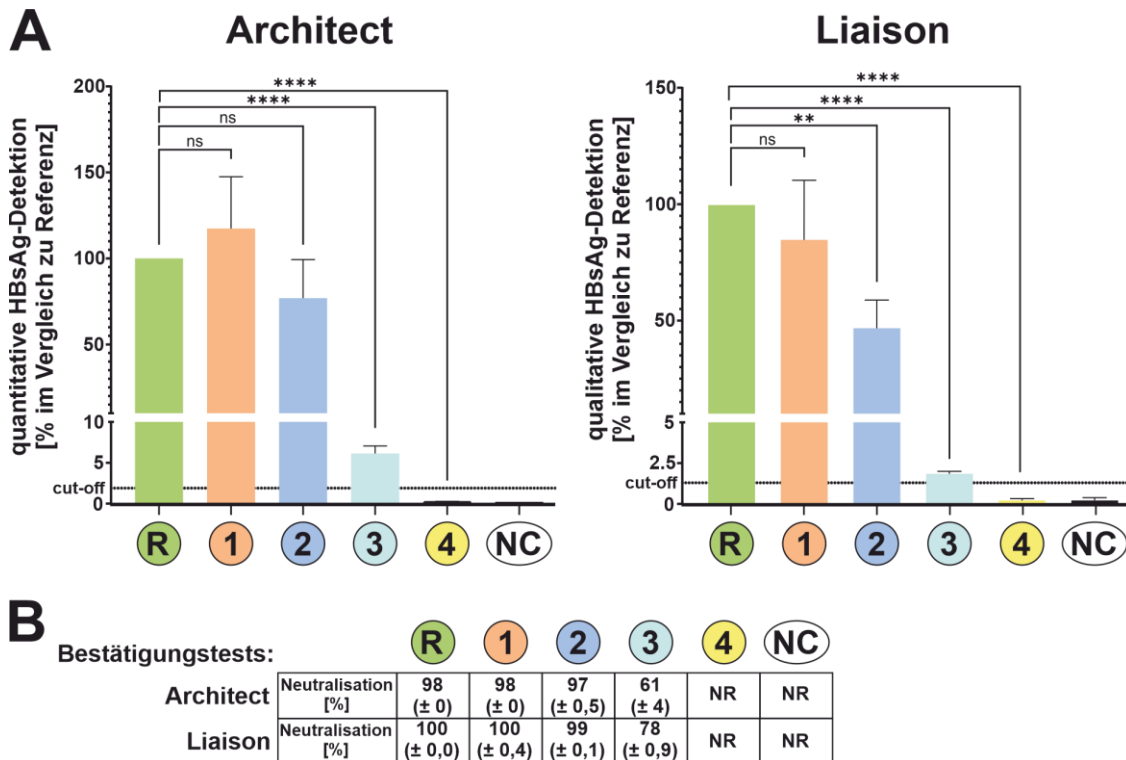


Abbildung 9: Nachweis der Virusvarianten in diagnostischen Assays. HepG2-Zellen wurden mit FLAG-SHBs-Expressionsplasmiden transfiziert und Zellkulturüberstände nach vier Tagen gesammelt. HBsAg-Mengen wurden mittels Western Blot quantifiziert (Abbildung 8D) und gleiche Mengen HBsAg aller Isolate wurden in das jeweilige Testsystem eingesetzt. (A) HBsAg-Nachweis mit dem quantitativen HBsAg-Assay des Abbott Architects (links) und dem qualitativen HBsAg-Assay des DiaSorin Liaisons (rechts). (B) HBsAg-Nachweis durch HBsAg-Bestätigungstests des Abbott Architects und des DiaSorin Liaisons. Die Daten beider Abbildungsteile stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Zur Berechnung der Signifikanz wurde ein gepaarter t-Test (integriert in GraphPad Prism Version 9.3.0) durchgeführt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ galt als statistisch signifikant. R – HBV-D3-SHBs-Referenz; NC – Negativkontrolle (Zellen transfiziert mit leerem pcDNA3.1(+)); NR – nicht-reaktiv.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Erkennung zwischen der Referenz (HBV-D3; „R“) und dem Cluster 1 in beiden HBsAg-Assays festgestellt werden (Abbildung 9A), allerdings konnte Cluster 1 durch das Architect Assay (17,4 % Steigerung zu Referenz „R“) besser als durch den Liaison-Test (15 % Reduktion zu Referenz „R“) detektiert werden. Cluster 2 hingegen zeigte ein geringeres Signal in beiden Assays (Architect: 23,1 %, Liaison: 52,9 % Reduktion), wobei der Unterschied nur im Liaison-Test signifikant war. Deutliche Reduktion der Nachweisbarkeit konnte beim Cluster 3 beobachtet werden: Hier war die Erkennung um 93,7 % im Architect und um 98,1 % im Liaison schlechter. Am Auffälligsten war ein völliger Verlust der Detektierbarkeit von Cluster 4 SHBs (Architect: 99,9 %, Liaison: 99,7 % Reduktion) (Abbildung 9A).

Während beide HBsAg-Bestätigungstests Cluster 1 bis 3 als richtig-positiv erkennen konnten, wurde Cluster 4 falsch-negativ bewertet (nicht-reaktiv; NR) (Abbildung 9B). Es ist außerdem anzumerken, dass sich bei Cluster 3 in den Bestätigungstests eine reduzierte Neutralisationskapazität zeigte (Architect: 61 %, Liaison: 78 %).

7.1.5 Reaktivität der Virusvarianten mit humanem Anti-HBs

Da sich neutralisierende Antikörper vorrangig gegen die „a“-Determinante der Oberflächenproteine von HBV richten [46, 49], sollte untersucht werden, ob Anti-HBs-Antikörper aus humanen Seren an die hyperglykosylierten Escapevarianten binden können. Hierfür wurden humane Seren nach erfolgreicher Impfung, nach Genesung einer akuten HBV-Infektion und solche negativ für HBV-spezifische serologische Marker (naiv) verwendet.

Zunächst wurden HBsAg-haltige Überstände wie in Abschnitt 7.1.4 beschrieben auf gleiche HBs-Konzentrationen angeglichen (entsprach 10 IU/ml HBsAg der HBV-D3-Referenz) und mit Anti-HBs (50 IU/l) präinkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben in den Anti-HBs-Assay des Abbott Architect eingesetzt. Diesem experimentellen Aufbau lagen folgende Annahmen zugrunde, die in Abbildung 10 dargestellt sind:

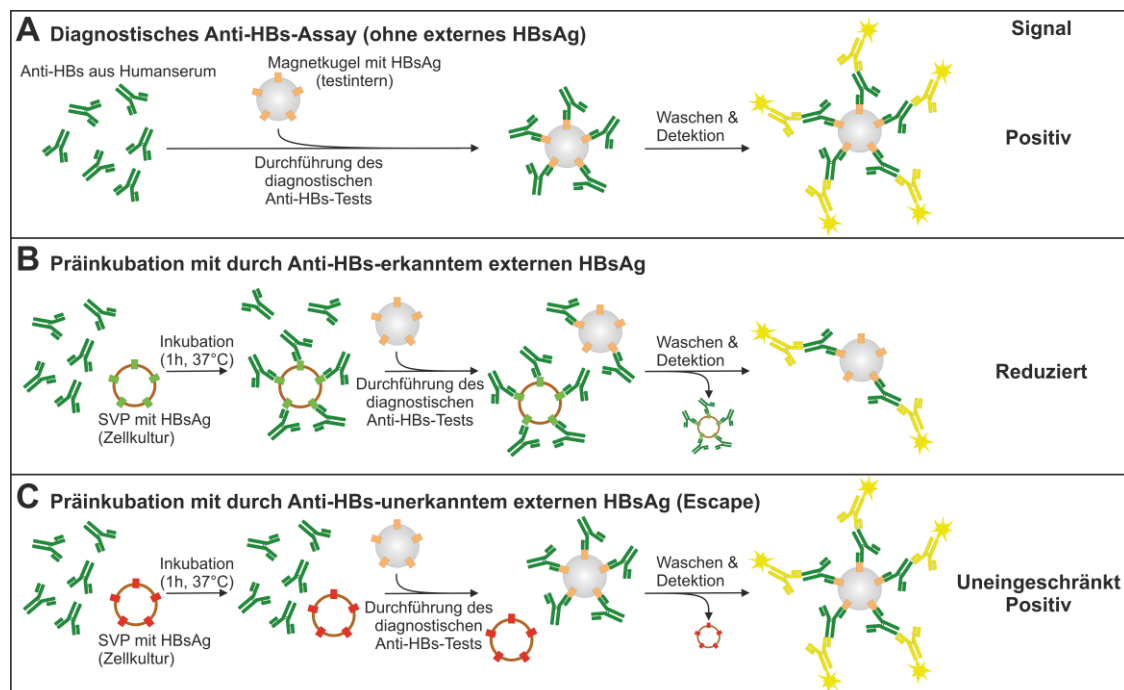


Abbildung 10: Graphik zur Veranschaulichung des kompetitiven Anti-HBs-Assays. (A) In dem Anti-HBs-Assay (Architect) werden Humanseren (mit Anti-HBs-IgG) mit auf Magnetkugeln-immobilisiertem HBsAg inkubiert und über einen Sekundärantikörper detektiert. (B) Bei einer Präinkubation von Anti-HBs-

Antikörpern mit sekretierten subviralen Partikeln (SVP) aus HBsAg der zu untersuchenden Varianten, das von Anti-HBs gebunden werden kann, werden diese Antikörper bereits teilweise gesättigt. Wird nach der Präinkubation das Anti-HBs-Assay durchgeführt, ist nun weniger Anti-HBs-IgG nachweisbar und das detektierte Signal ist reduziert. Indirekt lässt sich daraus schließen, dass das untersuchte HBsAg mit dem Anti-HBs reagieren konnte. (C) Findet bei der Präinkubation (aufgrund von z.B. Escape) keine Bindung zwischen externem HBsAg und Anti-HBs statt, so wird im nachfolgenden Assay ein uneingeschränkt positives Signal gemessen. Indirekt kann also die Bindungsunfähigkeit von Anti-HBs an externes Varianten-HBsAg nachgewiesen werden.

Der Anti-HBs-Assay basiert auf einer Antikörper-Reaktion mit auf Magnetkugeln-immobilisiertem HBsAg. Daher können nur ungebundene („freie“) Anti-HBs-Antikörper durch den Test nachgewiesen werden. Sofern Anti-HBs-Antikörper aus den Seren während der Präinkubation an das rekombinante HBsAg in den Zellkulturüberständen binden konnten, so sind diese im dann durchgeführten Anti-HBs-Assay bereits immunkomplexiert und können nicht mehr nachgewiesen werden. Folglich wäre die gemessene Menge an „freiem“ Anti-HBs reduziert. Im Gegensatz wird keine Reduktion in der Anti-HBs-Menge festgestellt, wenn keine Bindung von Anti-HBs an rekombinantes HBsAg während der Präinkubation stattgefunden hat.

Die Ergebnisse des kompetitiven Anti-HBs-Assay sind in Abbildung 11 dargestellt (Originaldaten siehe Tabelle S1 (Anhang)).

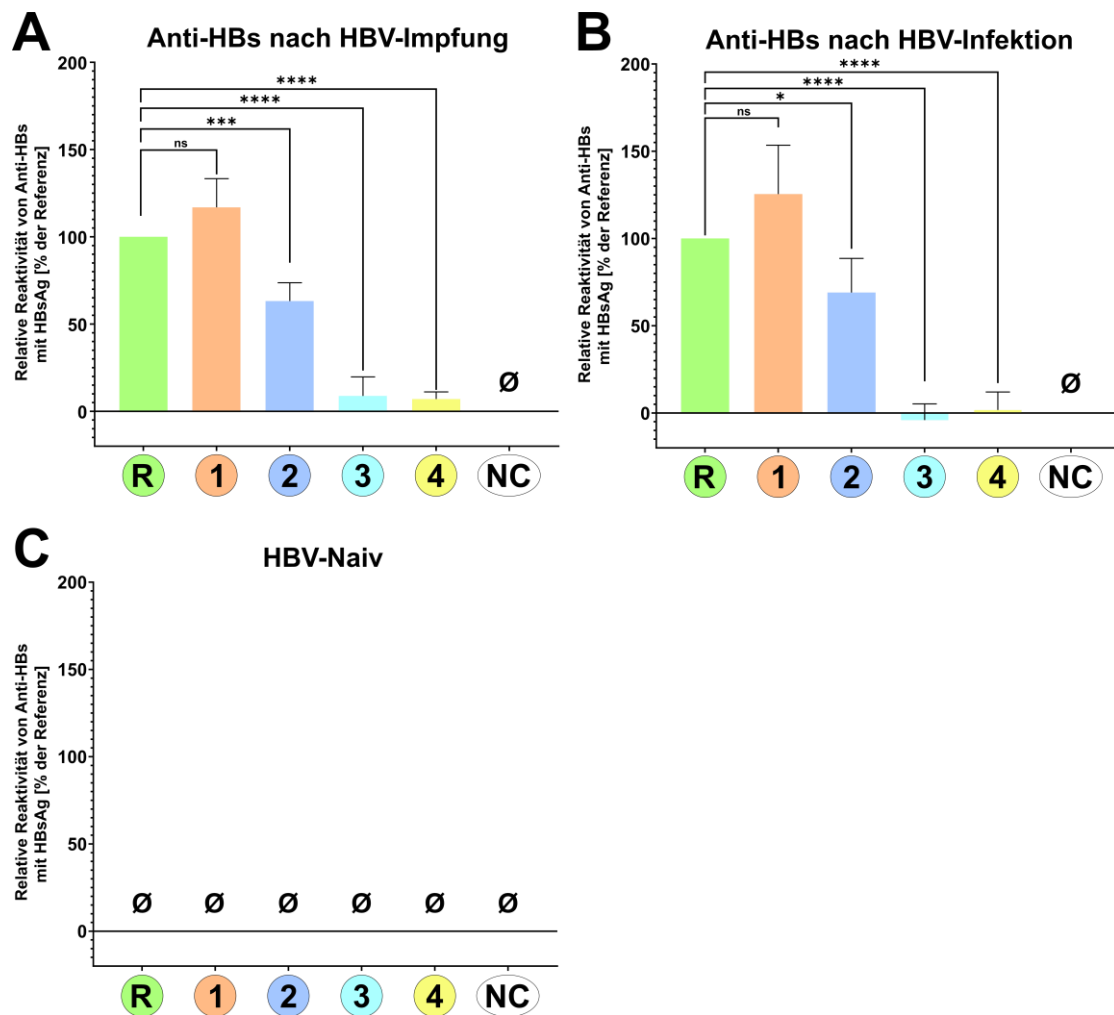


Abbildung 11: Reaktivität von Anti-HBs-positiven Seren mit rekombinantem HBsAg der Virusvarianten. Auf Grundlage der Western Blot-Quantifizierung (Abbildung 8D) wurde HBsAg in Zellkulturüberständen nach Transfektion mittels Verdünnung auf gleiche Levels angeglichen (entsprach 10 IU/ml HBsAg des Referenzkonstrukts „R“) und mit Anti-HBs-haltigen Seren (50 IU/l f.c.) für eine Stunde bei 37°C präinkubiert und anschließend in den Abbott Architect Anti-HBs-Assay eingesetzt. Auf Grundlage der Rohdaten (Tabelle S1 (Anhang)) konnten relative Reaktivitäten zum HBV-D3-Referenz-HBsAg in Prozent (%) errechnet werden. Zur Präinkubation wurden Seren nach Impfung (A), nach Genesung (B) oder (als Negativkontrolle) HBV-naive (C) verwendet. Zur Berechnung der Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test (integriert in GraphPad Prism) durchgeführt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ galt als statistisch signifikant. R – HBV-D3-SHBs-Referenz; NC – Negativkontrolle (Zellen transfiziert mit leerem pcDNA3.1(+)).

Nach Inkubation des rekombinanten HBsAg der Virusvarianten mit Anti-HBs aus Impfsereen (Abbildung 11A) konnte eine leicht erhöhte Bindung an Cluster 1-HBsAg im Vergleich zum Referenz-HBsAg („R“) beobachtet werden (117 % relative Reaktivität). Bei allen drei anderen Clustern konnte eine signifikante Reduktion der Bindungsfähigkeit nachgewiesen werden. Cluster 2 zeigte eine Reduzierung um 37 % im Vergleich zur Referenz. Anti-HBs-Antikörper aus der HBV-Impfung reagierten fast gar nicht mit HBsAg der Cluster 3 und 4 (91 % bzw. 93 % Reduktion der Bindung).

Auch bei Seren nach Genesung (Abbildung 11B) konnte eine etwas stärkere Bindung an das Cluster 1-HBsAg verglichen mit der Referenz festgestellt werden (125 %), wobei auch hier keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Ähnlich zu den Impfseren, konnte auch eine Bindungsreduktion um 31 % von Anti-HBs-Antikörpern von genesenen Patienten an Cluster 2-SHBs nachgewiesen werden. Cluster 3-HBsAg konnte gar nicht und Cluster 4-HBsAg erneut nur kaum von Anti-HBs aus Konvaleszenzseren erkannt werden (100 % bzw. 98 % Bindungsreduktion).

Es konnte kein Anti-HBs (0 IU/l) nach Inkubation von HBsAg mit HBV-naiven Seren (Abbildung 11C) nachgewiesen werden.

7.2 Charakterisierung der Antigenität und Infektiosität des neuartigen Hepadnavirus der Equiden (EqHBV)

Unter der Leitung von Prof. Dr. Drexler (Arbeitsgruppe Virusepidemiologie am Institut für Virologie an der Charité Berlin; Direktor: Prof. Dr. Drosten) in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Glebe (Leiter des Nationalen Referenzzentrums für Hepatitis-B-Viren und Hepatitis-D-Viren am Institut für medizinische Virologie der Universität Gießen; Direktor: Prof. Dr. Ziebuhr) konnte in einer internationalen Studie eine neue hepadnavirale Spezies in Serum und Organen von Hauseseeln (*Equus asinus*) und freilebenden Zebras (*Equus quagga*) identifiziert werden, welche als Hepatitis-B-Virus der Equiden (EqHBV) bezeichnet wurde [38]. Mehrere Gesamtgenomsequenzen, die öffentlich zugänglich gemacht wurden, konnten durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Drexler ermittelt werden (GenBank-Zugriffsnummern: MT134279, MT134282-MT134284, MT134294, MT134306-MT134321). Bei Sequenzunterschieden von >20 % auf Ganzgenomebene werden Orthohepadnaviren einer neuen Spezies zugeordnet [16]. Aufgrund der hohen Sequenzdivergenz zu anderen bekannten Hepadnaviren (≥ 30.4 %) stellt das EqHBV eine eigene Spezies der Orthohepadnaviren dar.

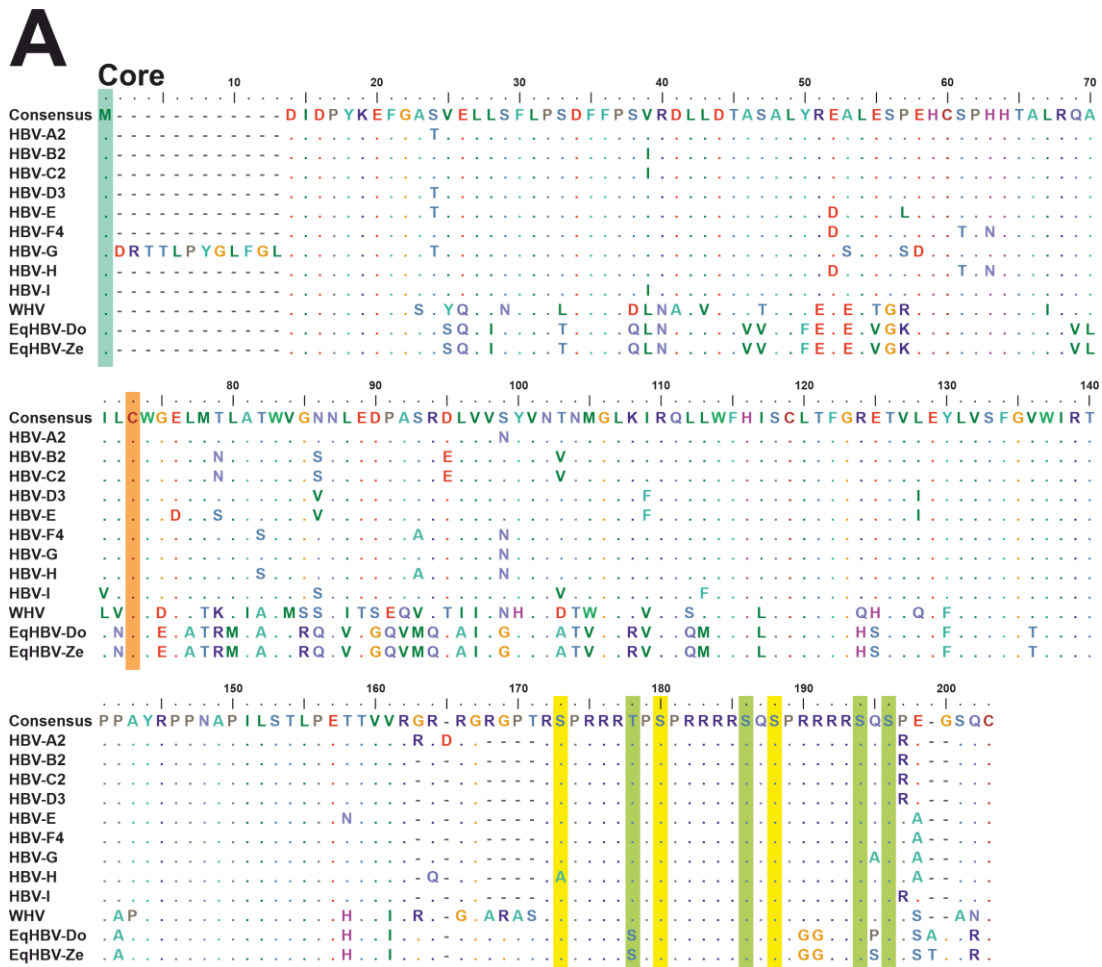
Eine Zusammenfassung der wahrscheinlichen EqHBV-ORFs ist in Abbildung S3 (Anhang) dargestellt. Das EqHBV-Genom umfasst 3131 nt und ist damit kleiner als die Genome aller (bekannten) humanen HBV-Genotypen (3182-3248 nt), aber ähnlich groß wie andere Orthohepadnaviren (3089-3368 nt). Das EqHBV besitzt eine PräC-Sequenz (28 AS) gefolgt von einer Core-Sequenz (190 AS), die ähnliche Längen zu anderen Orthohepadnaviren haben (28-30 AS und 182-195 AS). Der Polymerase-ORF der Orthohepadnaviren umfasst 812-899 AS, wobei der EqHBV für 823 AS kodiert. Auch die Länge des X-ORF des EqHBV (141 AS) entspricht der anderer Orthohepadnaviren (131-155 AS). Das vermutete S-Protein des EqHBV besitzt 227 AS und ist damit anderen Orthohepadnaviren ähnlich (222-228 AS). In der PräS-Sequenz zeigt sich allerdings eine Besonderheit: Es ist kein PräS2-Startcodon vorhanden, über das ein MHBs exprimiert werden könnte. Der gesamte PräS-Bereich (140 AS) ist insgesamt auch kürzer als der anderer Orthohepadnaviren (142-221 AS).

In dieser Arbeit sollten Überlängengenomsequenzen von EqHBV-Isolaten aus jeweils einem Esel und einem Zebra kloniert und verwendet werden, um die Expression und Antikörperreaktivität des Core-Proteins (HBc), des HBeAg sowie der Oberflächenproteine (HBs) genauer zu untersuchen. Außerdem wurden die Oberflächenproteine verwendet, um die mögliche Virus-Rezeptor-Interaktion zu charakterisieren.

7.2.1 Analyse des Core-Proteins

Im folgenden Abschnitt wurde das Core-Protein (HBc) des EqHBV hinsichtlich Sequenzkonservierung und Expression untersucht. Zunächst wurde ein Alignment des Core-ORF des HBV, EqHBV und WHV angefertigt und analysiert (Abbildung 12).

Ergebnisse



B

Core	HBV-A2	HBV-B2	HBV-C1	HBV-D3	HBV-E	HBV-F4	HBV-G	HBV-H	HBV-I	WHV	EqHBV-Do	EqHBV-Ze
HBV-A2	100%	95%	95%	96%	93%	95%	89%	93%	95%	69%	66%	66%
HBV-B2	95%	100%	100%	96%	93%	93%	87%	93%	98%	70%	67%	67%
HBV-C1	95%	100%	100%	96%	93%	94%	87%	92%	98%	71%	67%	67%
HBV-D3	96%	96%	96%	100%	96%	94%	88%	93%	96%	69%	67%	67%
HBV-E	93%	93%	93%	96%	100%	94%	88%	92%	93%	69%	67%	67%
HBV-F4	95%	93%	94%	94%	94%	100%	89%	99%	94%	70%	67%	67%
HBV-G	89%	87%	87%	88%	88%	89%	100%	87%	87%	64%	61%	61%
HBV-H	93%	93%	92%	93%	92%	99%	87%	100%	92%	68%	66%	66%
HBV-I	95%	98%	98%	96%	93%	94%	87%	92%	100%	70%	67%	67%
WHV	69%	70%	71%	69%	69%	70%	64%	68%	70%	100%	70%	70%
EqHBV-Do	66%	67%	67%	67%	67%	67%	61%	66%	67%	70%	100%	99%
EqHBV-Ze	66%	67%	67%	67%	67%	67%	61%	66%	67%	70%	99%	100%

Abbildung 12: Sequenzvergleich des gesamten Core-Proteins humaner HBV-Genotypen und Eqs. (A) Das Sequenzalignment wurde mit dem MUSCLE-Algorithmus in UGENE erstellt. Das für die HBc-Dimerisierung des humanen HBV notwendige Cystein [74] ist orange hinterlegt. Die drei essentiellen Phosphorylierungsstellen sind in gelb, die vier weiteren in grün dargestellt [76]. (B) Distanzmatrix des MUSCLE-Alignments der Core-Proteinsequenzen. Die Ähnlichkeit zwischen zwei Core-Sequenzen ist in Prozent (%) Similarität angegeben. Die Similarität ist außerdem farblich untergliedert: 100 % (weiß), 91-99 % (rot), 71-90 % (orange), 51-70 % (grün). HBV-Sequenzen entstammen der NRZ-Datenbank (unpubliziert). HBV-A2 – HBV-Subgenotyp A2; EqsHBV-Do – Isolat des Equiden Hepatitis-B-Virus aus einem Esel (GenBank-Zugriffsnummer: MT134309); EqsHBV-Ze – Isolat des Equiden Hepatitis-B-Virus aus einem Zebra (GenBank-Zugriffsnummer: MT134319); WHV – Woodchuck Hepatitisvirus (GenBank-Zugriffsnummer: AY628096).

Es zeigt sich eine hohe Sequenzsimilarität auf Aminosäureebene innerhalb der HBV-Genotypen (87-100 %). Den größten intergenotypischen Unterschied weist HBV-G auf, der aufgrund einer N-terminalen 12-Aminosäureinsertion zustande kommt (87-89 % Similarität zu anderen HBV-Genotypen). Das HBc des EqHBV besitzt eine Sequenzsimilarität von 61-67 % mit den HBV-Genotypen und 70 % mit dem Nagetierhepadnavirus WHV. Das Core-Protein der beiden EqHBV-Isolate unterscheidet sich in nur zwei C-terminal gelegenen Aminosäuren (99 % Sequenzsimilarität) (Abbildung 12A).

Das hochkonservierte C61 des HBV (orange), welches eine intermolekulare Disulfidbindung bei der Kapsidbildung eingeht [74], ist im EqHBV erhalten. Außerdem befinden sich im HBc sieben konservierte Serin-/Threoninreste (gelb/grün), die während der Reifung der Kapside dynamisch (de-)phosphoryliert werden können [76]. Die drei essentiellen SP-Phosphomotive (gelb) sind auch in EqHBV erhalten. Die vier restlichen Phosphorylierungsstellen (grün) sind bis auf einen T160S-Austausch konserviert (Abbildung 12A).

Um das EqHBV im Folgenden auch experimentell charakterisieren zu können, wurden zunächst zwei Isolate des EqHBV, EqHBV-Do (Genbank-Zugriffsnummer: MT134309) und EqHBV-Ze (Genbank-Zugriffsnummer: MT134319), mittels Rekombination als 1.5mer-Überlangenkonstrukte in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+) kloniert. Das Vorgehen bei der Klonierung ist in Abbildung 13 dargestellt.

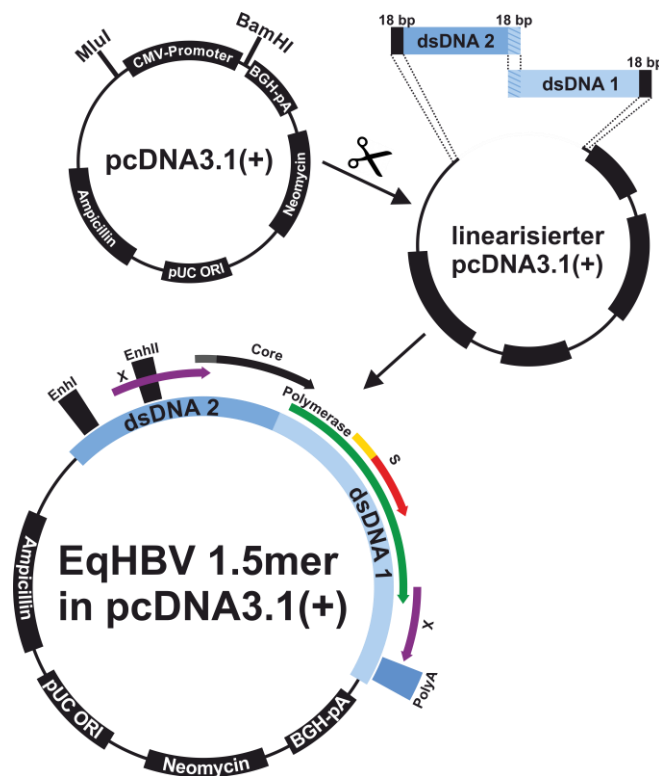


Abbildung 13: Klonierungsstrategie zur Erzeugung der EqsHBV 1.5mer-Überlängenkonstrukte. Zunächst wurde pcDNA3.1(+) mit den Restriktionsenzymen MluI und BamHI verdaut, um pcDNA3.1(+) zu linearisieren und zeitgleich den CMV-Promotor zu entfernen. Anschließend wurde mittels InFusion-Rekombination aus dem linearisierten Vektor und zwei synthetisch-hergestellten DNA-Fragmenten (dsDNA), die zusammen eine 1,5-fache Überlänge des EqsHBV kodierten und an den jeweiligen 5'- und 3'-Enden komplementäre 18 Basenpaare (bp) zum Vektor bzw. zu einander besaßen, das gewünschte 1.5mer-Überlängenkonstrukt generiert. Nach Transformation des Rekombinationsansatzes wurden am Folgetag Einzelkolonien für DNA-Präparation angeimpft und gereinigte DNA auf korrekte Insertion Sanger-sequenziert.

Die korrekte Insertion der jeweils beiden synthetischen DNA-Fragmente in den linearisierten pcDNA3.1(+)-Vektor konnte mittels Sanger-Sequenzierung authentifiziert werden.

Um die Konservierung wichtiger HBc-Epitope zwischen EqsHBV und anderen Hepadnaviren nun experimentell zu untersuchen, wurden HepG2-Zellen mit den neuklonierten 1.5mer-Überlängenkonstrukten von HBV und EqsHBV transfiziert. Die Expression viraler Proteine geschah demnach unter Verwendung endogener Regulatoren. Fünf Tage nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit verschiedenen polyklonalen Anti-Core-Antikörpern und fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern für die Immunfluoreszenz gefärbt (Abbildung 14). Aufgrund der fast vollständigen HBc-Sequenzidentität (Abbildung 12B) der beiden EqsHBV-Isolate wurde in den folgenden

Experimenten nur das aus einem Esel stammende Isolat (EqHBV-Do) verwendet.

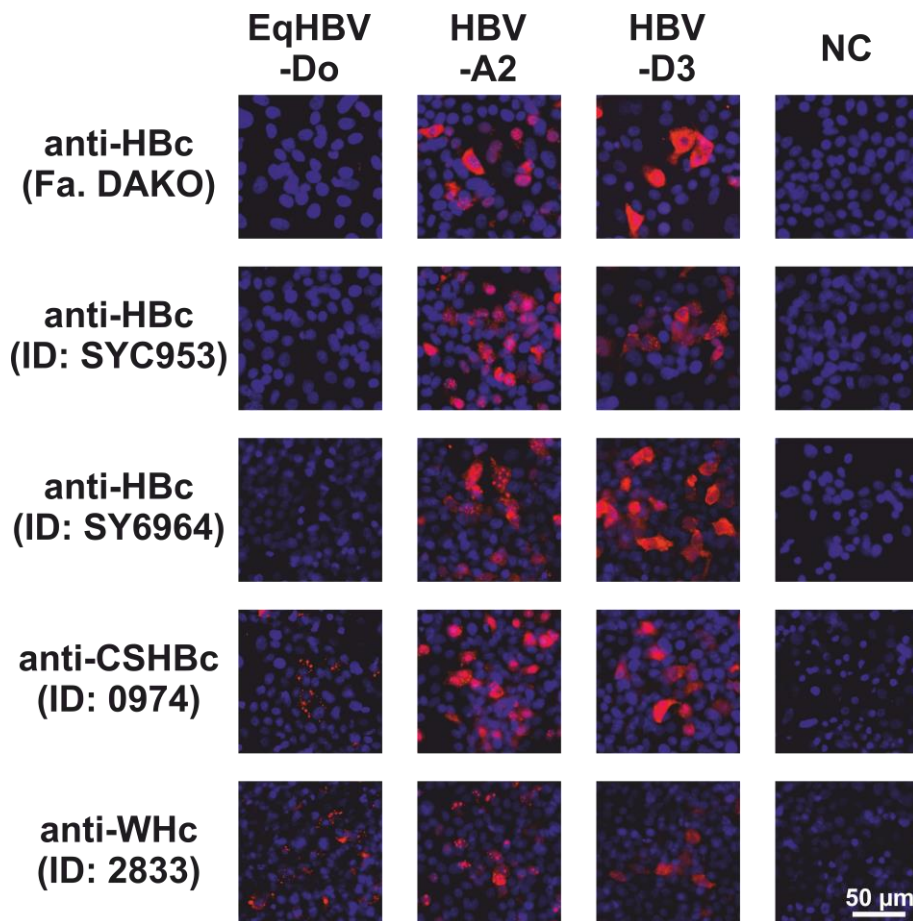


Abbildung 14: Immunfluoreszenz von HBV und EqHBV nach Färbung mit polyklonalen Anti-Core-Immunsereen. HepG2-Zellen wurden mit Überlängkonstrukten von HBV bzw. EqHBV transfiziert, für fünf Tage kultiviert und schließlich fixiert, permeabilisiert und geblockt. Zellen wurden anschließend mit verschiedenen Anti-Core-Antikörpern inkubiert und mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (rot) für die Immunfluoreszenzauswertung gefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Die Immunisierung erfolgte mit dem Core-Protein des HBV (Anti-HBc), des CSHBV (Anti-CSHBc) bzw. des WHV (Anti-WHc). HBV-A2 – HBV-Subgenotyp A2; EqHBV-Do – Isolat des Equiden Hepatitis-B-Virus aus einem Esel; NC – Negativkontrolle (mit leerem pcDNA3.1(+)-transfizierte Zellen).

Alle Anti-HBc-Antiseren (DAKO, SYC953, SY6964) reagierten mit beiden verwendeten humanen HBV-Isolaten (HBV-A2 und HBV-D3). Der kommerziell erhältliche polyklonale Anti-HBc-Antikörper (DAKO) reagierte nicht mit dem EqHBc (Core-Protein des EqHBV). Auch bei den polyklonalen Seren eines HBc-immunisierten Meerschweinchens (SYC953) und eines HBc-immunisierten Kaninchens (SY6964) konnte keine Bindung an das EqHBc beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte das EqHBc durch Kaninchenseren, die mit CSHBc (Core-Protein des CSHBV; 0974) und des WHc (Core-Protein des WHV; 2833)

immunisiert worden waren, nachgewiesen werden. Diese Seren (Anti-CSHBc und Anti-WHc) reagierten außerdem mit beiden verwendeten humanen HBV-Genotypen (HBV-A2 und HBV-D3). Die Färbung des menschlichen HBc ist hierbei aber deutlich stärker als die des EqHBc ausgeprägt. Die EqHBV-Färbung ist sehr punktuell, wohingegen die des humanen HBc das gesamte Zytoplasma anfärbte.

7.2.2 Analyse des HBeAg und relevanter Bereiche des PräC/Core-ORF

HBeAg spielt eine zentrale Rolle bei der Chronifizierung des humanen HBV und stellt zudem einen wichtigen diagnostischen Marker im Verlauf chronischer Hepatitis-B-Infektionen dar [78]. In diesem Abschnitt wurde der PräC/Core-Bereich, der für erfolgreiche Reifung des HBeAg notwendig ist, des EqHBV auf Konservierung zum humanem HBV hin analysiert und die Expression des HBeAg experimentell untersucht.

Da das PräC/Core-Vorläuferpolypeptid des humanen HBV zwei Prozessierungsschritte durchläuft, bevor es als ausgereiftes HBeAg sekretiert werden kann, sollten zunächst die relevanten Primärsequenzen des EqHBV mit denen der humanen HBV-Genotypen verglichen werden. Der erste Prozessierungsschritt des HBeAg-Vorläufers des menschlichen HBV ist das Entfernen des Signalpeptids (AS -29 bis -11). Die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins eines Signalpeptids im EqHBV-PräC wurde mittels einer Signalpeptid-Vorhersagesoftware (PrediSi) untersucht (Abbildung 15). Das verwendete Programm PrediSi gibt sowohl Wahrscheinlichkeit als auch Schnittstelle des Signalpeptids an. Der PrediSi-Score wird von 0 (sehr unwahrscheinlich) bis 1 (sehr wahrscheinlich) angegeben.

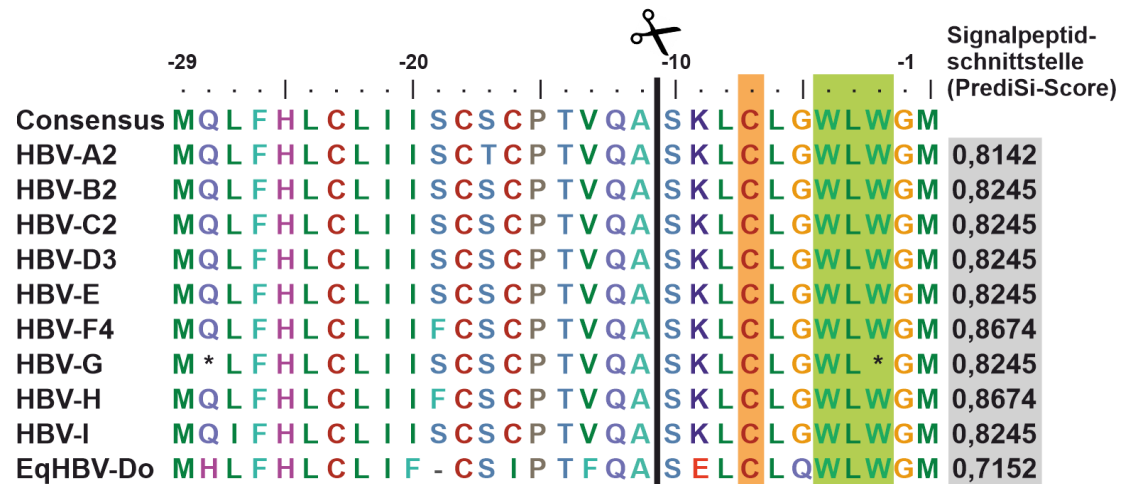


Abbildung 15: Sequenzvergleich des PräC humaner HBV-Genotypen sowie des EqHBV. Das konservierte Cystein innerhalb des N-terminalen PräC-Dekamers ist orange hinterlegt und das konservierte hydrophobe WLW-Motiv ist grün hinterlegt [85]. Rechts ist der Vorhersage-Score der Signalpeptid-Vorhersagesoftware PrediSi angegeben. Dieser Score kann einen Wert zwischen 0 (sehr unwahrscheinlich) und 1 (sehr wahrscheinlich) annehmen. Je höher der Score, desto größer ist das Konfidenzniveau einer tatsächlichen Spaltung. Zusätzlich gibt das Programm PrediSi die vorhergesagte Spaltstelle an (symbolisch mit einer Schere dargestellt). HBV-G stellt eine Besonderheit dar: Aufgrund zweier Stoppcodons (*) im PräC wird dieses nicht translatiert und kein HBeAg produziert. HBV-Sequenzen entstammen der NRZ-Datenbank (unpubliziert). HBV-A2 – HBV-Subgenotyp A2; EqHBV-Do – Isolat des Equiden Hepatitis-B-Virus aus einem Esel (GenBank-Zugriffsnummer: MT134309); * – Stoppcodon.

Die PräC-Sequenz ist im menschlichen HBV hochkonserviert und unterscheidet sich nur an einer Position innerhalb aller hier betrachteten HBeAg-positiven HBV-Genotypen (S-19F bei HBV-F und HBV-H). Eine generelle Ausnahme stellt HBV-G dar, der zwei Stoppcodons (*) an Positionen -28/-2 aufweist (Abbildung 15) und daher kein HBeAg produziert. Keine solchen Stoppcodons, die die Expression des PräC/Core-Polypeptids verhindern würden, sind im PräC des EqHBV zu finden.

Für alle humanen HBV-Genotypen wurde ein Signalpeptid detektiert (Score: 0,8142-0,8674) und auch die Schnittstelle korrekt vorhergesagt (nach AS -11) [85]. Auch bei EqHBV wurde ein Signalpeptid identifiziert (Score: 0,7152) und die Schnittstelle analog zu HBV nach AS -11 angegeben.

Nach Entfernen der Signalpeptidsequenz (AS -29 bis -11), bleiben 10 Aminosäuren des PräC-Peptids zurück, die im humanen HBV hochkonserviert sind (SKLCLGWLWG). Insbesondere das Cystein an Position -7 spielt eine wichtige Rolle, indem es intermolekulare Homodimerisierung (wie bei HBc) durch eine intramolekulare Disulfidbindung verhindert [82]. Auch im EqHBV ist dieser Cysteinrest konserviert. Das hydrophobe Tripeptid WLW (AS -4 bis -2)

Ergebnisse

ist außerdem hochkonserviert, da es die Partikelbildung unterbindet [83]. Auch dieses WLW-Motiv ist im EqHBV erhalten. Insgesamt sind allerdings zwei Aminosäureaustausche in dieser Region des EqHBV verglichen mit HBV vorhanden (K-9E und G-5Q).

Im zweiten Schritt der Reifung des HBeAg wird die argininreiche C-terminale Domäne, die im HBc zur Bindung an die pgRNA notwendig ist, durch Furin abgetrennt [80, 81]. Auch zur Analyse möglicher Furin-Schnittstellen im EqHBV-PräC-Propeptid wurden zwei bioinformatische Vorhersagesoftware verwendet (Abbildung 16). Das verwendete Programm ProP gibt die Wahrscheinlichkeit einer Furin-Schnittstelle auf einer Skala von 0 (sehr unwahrscheinlich) bis 1 (sehr wahrscheinlich) an. Pitou differenziert von <0 (unwahrscheinlich) und >0 (wahrscheinlich), wobei höhere Werte auch höhere Wahrscheinlichkeiten angeben.

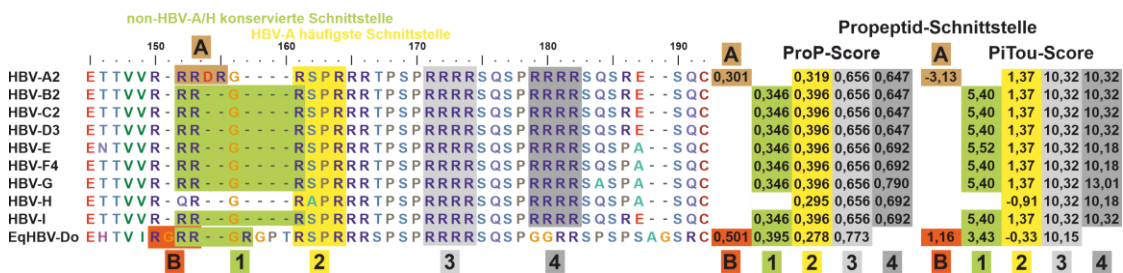


Abbildung 16: Sequenzvergleich des C-terminalen Core-Bereichs humaner HBV-Genotypen sowie des EqHBV. Das Alignment wurde mittels MUSCLE in UGENE erstellt. Alle möglichen Furinspaltstellen wurden farbig hinterlegt. Die in den meisten HBV-Genotypen konservierten Motive 1 (grün; RRGR), 2 (gelb; R(S/A)PR), 3 (hellgrau; RRRR) sowie 4 (dunkelgrau; RRRR) sind farbig dargestellt. Zusätzlich sind das für HBV-A charakteristische, veränderte N-terminale Motiv (A; braun; RRDR) und das zusätzliche Motiv des EqHBV (B; orange; RGRR) markiert. Rechts ist der Vorhersage-Score zweier Furinspaltstellenvorhersageprogramme (ProP und PiTou) angegeben. Bei ProP kann dieser Score einen Wert zwischen 0 (sehr unwahrscheinlich) und 1 (sehr wahrscheinlich) annehmen. Bei PiTou kann dieser Score Werte zwischen <0 (unwahrscheinlich) und >0 (wahrscheinlich) annehmen. Für beide Programme gilt: Je höher der Score, desto größer ist das Konfidenzniveau einer tatsächlichen Spaltung. Die Scores sind jeweils in der Farbe der dazugehörigen möglichen Spaltstelle hinterlegt. HBV-Sequenzen entstammen der NRZ-Datenbank (unpubliziert). HBV-A2 – HBV-Subgenotyp A2; EqHBV-Do – Isolat des Equiden Hepatitis-B-Virus aus einem Esel (GenBank-Zugriffsnummer: MT134309).

Bei allen HBV-Genotypen (mit Ausnahme HBV-A und HBV-H) können vier konservierte Furin-Spaltstelle festgestellt werden (RRGR (grün), RSPR (gelb), RRRR (hellgrau), RRRR (dunkelgrau)), wobei die ersten beiden Motive überlappen. Experimentell belegt ist die ausschließliche Verwendung der ersten Spaltstelle (1; RRGR). Durch einen Austausch von Arginin durch Glutamin

existiert dieses erste Spaltungsmotiv bei HBV-H nicht mehr (QRGR) und das zweite Motiv unterscheidet sich (2; RAPR). Außerdem spielt HBV-A eine Sonderrolle: Hier findet sich eine Dipeptidinsertion (DR), die die zwei überlappenden Furinspaltstellen trennt (RRDR (A; braun) und RSPR (2; gelb)).

Die non-A/H-Genotypen von HBV zeigen Vorhersage-Scores für die experimentell bestätigte [81] Furinschnittstelle (1; RRGR) von 0,346 (ProP) und 5,40-5,52 (PiTou). Auch das zweite Motiv (R(S/A)PR) wird bei diesen Genotypen durch ProP als ähnlich wahrscheinlich angegeben (Score: 0,396), wohingegen PiTou die Verwendung als unwahrscheinlicher einschätzt (Score: 1,37). Die Spaltung des zweiten Motivs in HBV-H (RAPR) wird durch ProP als unwahrscheinlicher als bei den anderen HBV-Genotypen eingeschätzt (Score: 0,295 vs. 0,396) und durch PiTou sogar deutlich niedriger (Score: -0,91 vs. 1,37). Dass das besondere erste Motiv des HBV-A (A; RRDR) als Furinspaltstelle dient, wird durch PiTou als sehr unwahrscheinlich eingeschätzt (Score: -3,13), wohingegen die experimentell-belegte bevorzugte Schnittstelle am zweiten Motiv (RSPR) [80, 81] als wahrscheinlich vorhergesagt wird (Score: 1,37).

Die Spaltung der beiden C-terminalen Motive (3; RRRR bzw. 4; RRRR) wird durch beide Programme bei allen HBV-Genotypen als sehr wahrscheinlich eingeschätzt (ProP: 0,656 bzw. 0,647-0,790; PiTou: 10,32 bzw. 10,18-13,01).

Die C-terminale Core-Sequenz des EqHBV weist vier mögliche Furinschnittstellen auf: ein in HBV nicht vorkommendes RGRR-Motiv (B; orange), das mit dem ersten Motiv im HBV (RRGR) überlappt, sowie die beiden auch im HBV-konservierten Motive 2 (RSPR) und 3 (RRRR).

Das zusätzliche N-terminale Motiv (B; RGRR) innerhalb der EqHBV-Sequenz wird durch ProP als sehr wahrscheinlich (0,501) und PiTou als mäßig wahrscheinlich (1,16) eingestuft. Eine Furinspaltstelle im Motiv 1 (RRGR) wird durch beide Programme als wahrscheinlich dargestellt (ProP: 0,395 und Pitou: 3,43). Die Verwendung des dritten Motivs (RRRR) ist ähnlich zu HBV als wahrscheinlichste Schnittstelle vorhergesagt (ProP: 0,773 bzw. PiTou: 10,15).

Nach der bioinformatischen Analyse sollte auch experimentell untersucht werden, ob reifes HBeAg des EqHBV sekretiert werden kann und Antikörper-

Epitope, die in der Diagnostik des menschlichen HBV Anwendung finden, auch im EqHBV konserviert sind. Hierzu wurden HepG2-Zellen mit Überlängengenomen von HBV und EqHBV transfiziert. Fünf Tage nach Transfektion wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und im qualitativen Abbott Architect HBeAg-Assay gemessen (Abbildung 17).

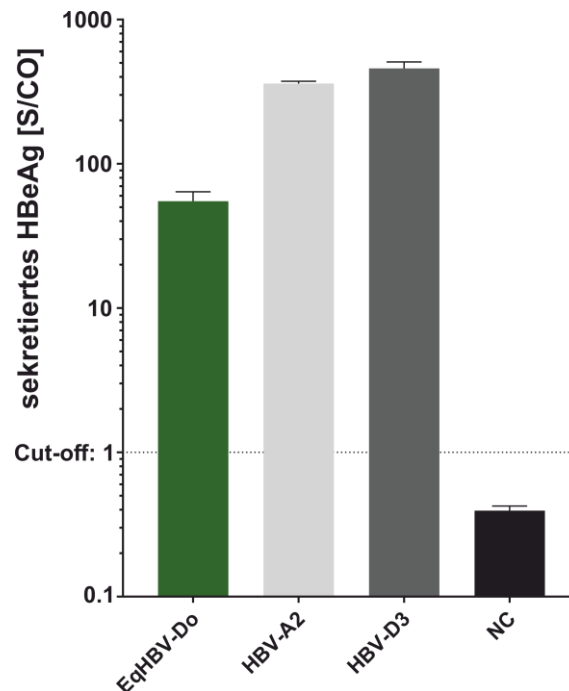


Abbildung 17: HBeAg-Messung nach Transfektion mit HBV und EqHBV. HepG2-Zellen wurden mit Überlängenkonstrukten von HBV und EqHBV transfiziert und für fünf Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und unverdünnt in den qualitativen HBeAg-Assay des Abbott Architects eingesetzt. S/CO – Signal-to-Cut-off-Ratio. HBV-A2 – HBV-Subgenotyp A2; EqHBV-Do – Isolat des Equiden Hepatitis-B-Virus aus einem Esel; NC – Negativkontrolle (mit leerem pcDNA3.1(+)-transfizierte Zellen).

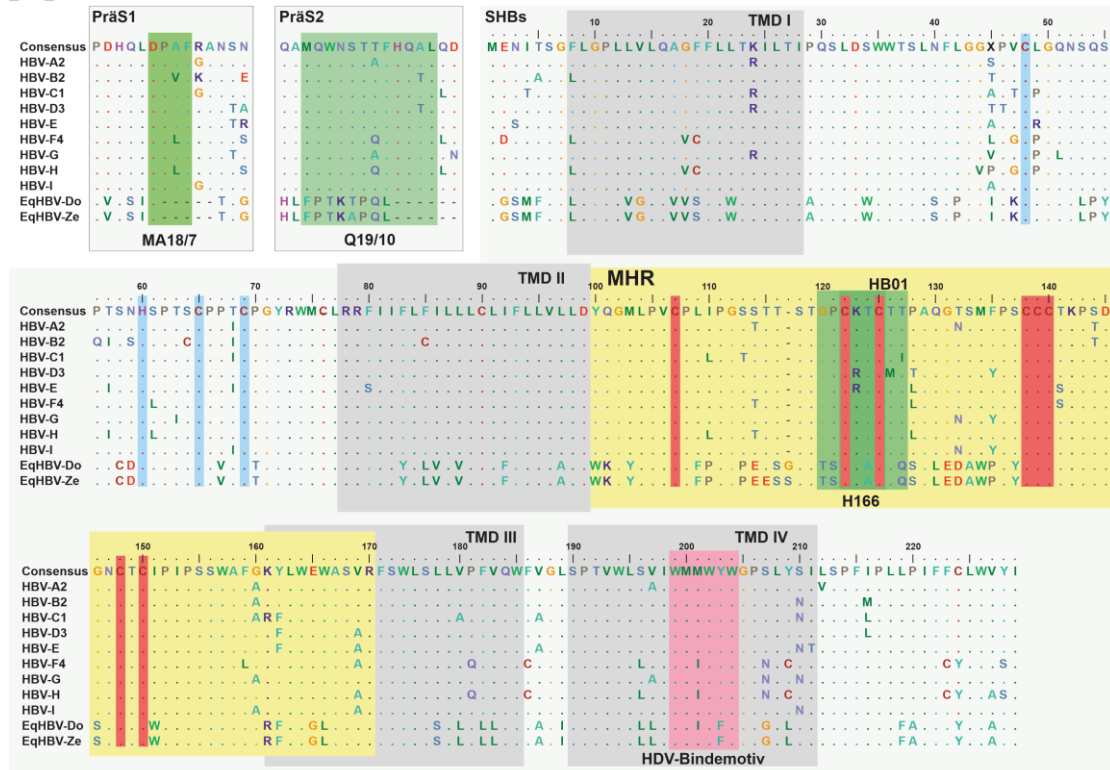
Beide verwendeten HBV-Genotypen wurden durch den Assay erkannt und hohe Mengen an HBeAg wurden sekretiert (HBV-A2: 360,05 S/CO und HBV-D3: 458,55 S/CO). Trotz der bestehenden Sequenzunterschiede konnte auch das HBeAg des EqHBV nachgewiesen werden, jedoch zu einem etwas geringeren Maße (EqHBV-Do: 55,10 S/CO).

7.2.3 Analyse der EqHBV-Oberflächenproteine und Reaktivität mit Anti-HBs-Antikörpern

Die Oberflächenproteine der Hepadnaviren vermitteln den spezifischen Zelleintritt in Hepatozyten und sind Bestandteil aller Impfstoffe gegen HBV. Mutationen in den antigenen Determinanten des kleinen Oberflächenproteins können zu Impfdurchbrüchen führen [238].

Wie auch für HBc wurde zunächst eine Analyse der HBs-Primärsequenzen von HBV und EqHBV vorgenommen (Abbildung 18).

A



B

SHBs	HBV-A2	HBV-B2	HBV-C1	HBV-D3	HBV-E	HBV-F4	HBV-G	HBV-H	HBV-I	EqHBV-Do	EqHBV-Ze
HBV-A2	100%	93%	92%	93%	91%	87%	95%	87%	96%	65%	65%
HBV-B2	93%	100%	91%	91%	91%	86%	92%	86%	94%	65%	65%
HBV-C1	92%	91%	100%	91%	92%	85%	92%	86%	93%	67%	67%
HBV-D3	93%	91%	91%	100%	93%	87%	93%	87%	94%	65%	65%
HBV-E	91%	91%	92%	93%	100%	88%	91%	87%	94%	65%	65%
HBV-F4	87%	86%	85%	87%	88%	100%	88%	96%	89%	66%	65%
HBV-G	95%	92%	92%	93%	91%	88%	100%	87%	96%	65%	65%
HBV-H	87%	86%	86%	87%	87%	96%	87%	100%	88%	67%	66%
HBV-I	96%	94%	93%	94%	94%	89%	96%	88%	100%	66%	66%
EqHBV-Do	65%	65%	67%	65%	65%	66%	65%	67%	66%	100%	99%
EqHBV-Ze	65%	65%	67%	65%	65%	65%	65%	66%	66%	99%	100%

Abbildung 18: Sequenzvergleich relevanter PräS1/PräS2-Epitope und der gesamten S-Domäne von HBV und EqHBV. (A) Das Sequenzalignment wurde mit dem MUSCLE-Algorithmus in UGENE erstellt. Antikörperepitope (MA18/7, Q19/10, HB01, H166) sind in Grüntönen hinterlegt [226, 227, 230, 239]. Die vorgeschlagenen Transmembrandomänen (TMD) I-IV (siehe Abbildung 2; [47]) sind dunkelgrau hinterlegt. Acht strukturgebende Cysteinreste der MHR (engl.: major hydrophilic region; gelb) sind rot hervorgehoben [51]. Weitere konservierte, sekretionsrelevante Cysteine und ein Histidin zwischen TMD I und II sind in blau dargestellt [51]. Das Motiv, mit dem die S-Domäne mit dem HDAg interagiert (HDV-Bindemotiv), ist in rosa dargestellt [212]. (B) Distanzmatrix des MUSCLE-Alignments der SHBs-Proteinsequenzen. Die Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen ist in Prozent (%) Similarität angegeben. Die Similarität ist außerdem farblich untergliedert: 100 % (weiß), 91-99 % (rot), 71-90 % (orange), 51-70 % (grün). HBV-Sequenzen entstammen der NRZ-Datenbank (unpubliziert). HBV-A2 – HBV-Subgenotyp A2; EqHBV-Do

– Isolat des Equiden Hepatitis-B-Virus aus einem Esel (GenBank-Zugriffsnummer: MT134309); EqHBV-Ze – Isolat des Equiden Hepatitis-B-Virus aus einem Zebra (GenBank-Zugriffsnummer: MT134319).

Die acht Cysteinreste (Abbildung 18A; rote Kästen), die die strukturelle Integrität der HBV Oberflächenproteine durch intra-/intermolekulare Disulfidbrücken gewährleisten [51], sind auch im EqHBV konserviert. Außerdem sind keine Austausche bei den sekretionsrelevanten Cystein-/Histidinresten (blau; [51]) vorhanden. Es konnten keine weiteren möglichen N-Glykosylierungsstellen im kleinen EqHBV-Oberflächenprotein neben dem kanonischen N-Glykosylierungssequon an N146 festgestellt werden. Weder das MA18/7- noch das Q19/10-Epitop (grün hinterlegt) sind in EqHBV konserviert. Das HB01-Epitop (GPC(K/R)TCTT) unterscheidet sich zu der EqHBV-Sequenz in vier Aminosäuren (TSCKACTQ; konservierte AS unterstrichen). Das H166-Epitop (C(K/R)TC), das mit dem HB01-Epitop überlappt, ist im EqHBV ebenfalls leicht verändert (CKAC; identische AS unterstrichen).

Die Distanzmatrix zeigt, dass die S-Domäne innerhalb der HBV-Genotypen relativ konserviert ist (86-96 % Similarität). HBV-Genotypen F und H sind am divergentesten zu den anderen Genotypen (85-88 %), doch zueinander ähnlich (96 % Similarität). Das Alignment des S-ORF zeigt eine hohe Divergenz zwischen EqHBV und HBV (65-67 % Similarität). Die beiden EqHBV-Isolate aus Esel und Zebra unterscheiden sich dagegen zueinander in nur drei Aminosäuren (99 % Similarität).

Nun sollte auch experimentell untersucht werden, ob wichtige HBs-Antikörperepitope des humanen HBV im EqHBV konserviert sind. Dafür wurden HepG2-Zellen mit Überlängenkonstrukten des HBV und zweier EqHBV-Isolate (aus Esel und Zebra; Abbildung 13) transfiziert. Nach fünf Tagen wurden die Zellen fixiert und für die Immunfluoreszenz vorbereitet. Hierbei wurden verschiedene monoklonale Anti-HBs-Antikörper und fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper verwendet (Abbildung 19).

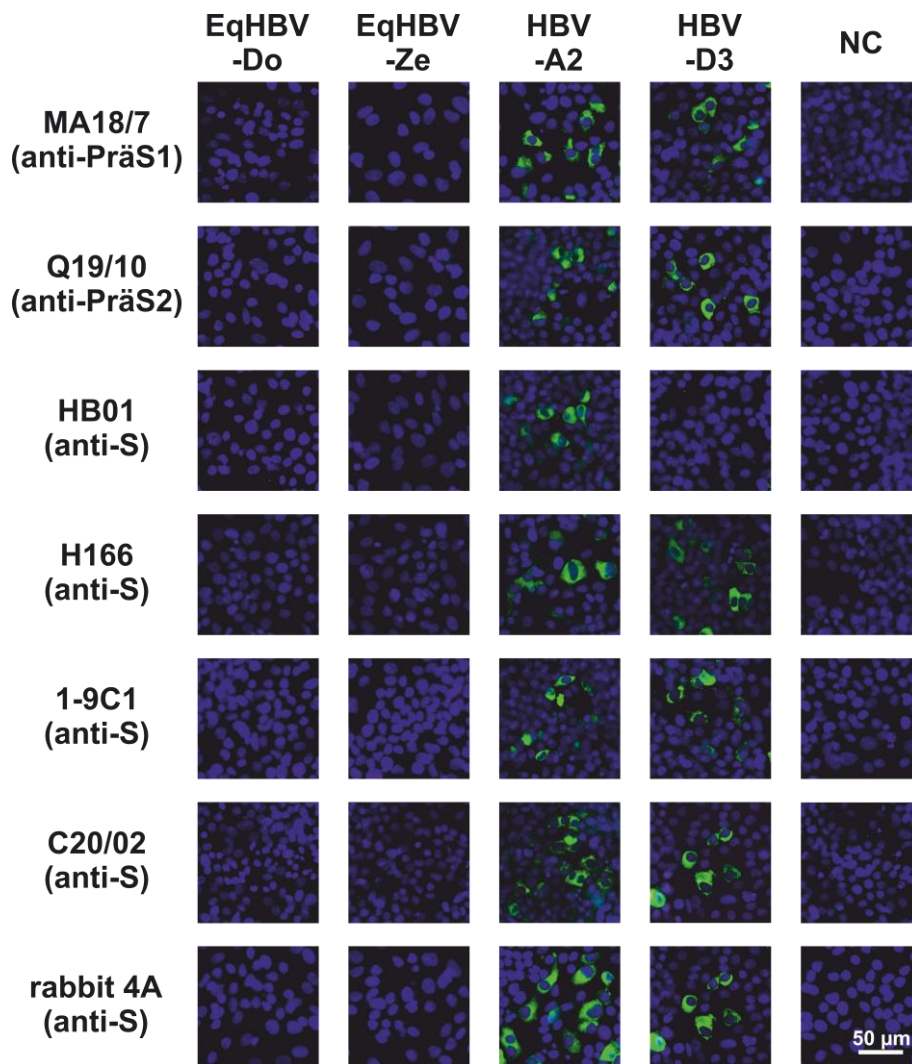


Abbildung 19: Immunfluoreszenz von HBV und EqHBV nach Färbung mit monoklonalen Anti-HBs-Antikörpern. HepG2-Zellen wurden mit Überlängenkonstrukten von HBV bzw. EqHBV transfiziert, für fünf Tage kultiviert und schließlich fixiert, permeabilisiert und geblockt. Zellen wurden anschließend mit verschiedenen Anti-HBs-Antikörpern inkubiert und mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (grün) für die Immunfluoreszenzauswertung gefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Die monoklonalen Antikörper MA18/7, Q19/10, HB01, 1-9C1 und C20/02 stammen aus Maushybridomazellen. Der monoklonale Mausantikörper H166 war dagegen kommerziell erhältlich. Außerdem wurde das polyklonale Antiserum eines Kaninchens nach Immunisierung mit dem konventionellen Impfstoff HBVaxPro verwendet („rabbit 4A“). HBV-A2 – HBV-Subgenotyp A2; EqHBV-Do – Isolat des Equiden Hepatitis-B-Virus aus einem Esel; EqHBV-Ze – Isolat des Equiden Hepatitis-B-Virus aus einem Zebra; NC – Negativkontrolle (mit leerem pcDNA3.1(+)-transfizierte Zellen).

Der PräS1-spezifische Antikörper MA18/7 reagierte mit beiden HBV-Genotypen (HBV-A2, HBV-D3), jedoch nicht mit den beiden EqHBV-Isolaten. Auch der Anti-PräS2-monoklonale Antikörper Q19/10 zeigte keine Bindung an die Oberflächenproteine des EqHBV. Der monoklonale Anti-S-Antikörper HB01 reagierte nur mit HBV-A2, aber weder mit HBV-D3 noch EqHBV-Do/-Ze. Der kommerziell-erhältliche H166 (Anti-S) reagierte mit beiden HBV-Konstrukten,

aber mit keinem der EqHBV-Isolaten. Der monoklonale 1-9C1-Antikörper erkannte HBV-D3 und mit geringerer Stärke auch HBV-A2. Es konnte keine Reaktivität des 1-9C1 mit EqHBV-Do/-Ze nachgewiesen werden. Während der konformationelle Antikörper C20/02 die Oberflächenproteine von HBV binden konnte, wurde bei den beiden EqHBV-Isolaten keine Bindung beobachtet. Außerdem konnte lediglich das HBsAg des HBV-A2/-D3, nicht aber des EqHBV-Do/-Ze, durch das polyklonale Serum eines Kaninchens nach Immunisierung mit einer konventionellen HBV-Impfung („rabbit 4A“) nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den mono-/polyklonalen Antikörpern sollte untersucht werden, ob die sekretierten Oberflächenproteine des EqHBV diagnostisch nachgewiesen werden können. Hierzu wurden Zellkulturüberstände von transient transfizierten HepG2-Zellen von Tag 1-5 nach Transfektion gesammelt und im quantitativen Architect HBsAg-Assay gemessen (Abbildung 20).

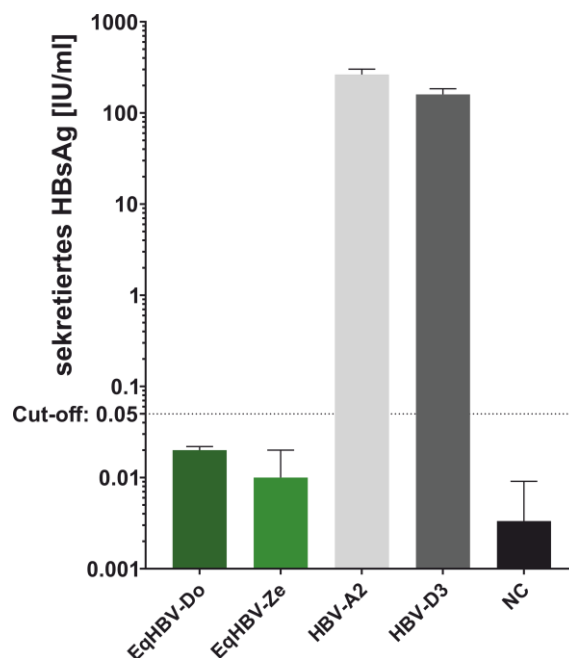


Abbildung 20: HBsAg-Messung nach Transfektion mit HBV und EqHBV. HepG2-Zellen wurden mit Überlängenkonstrukten von HBV und EqHBV transfiziert und für fünf Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und unverdünnt in den quantitativen HBsAg-Assay des Abbott Architects eingesetzt. IU – international unit(s); HBV-A2 – HBV-Subgenotyp A2; EqHBV-Do – Isolat des Equiden Hepatitis-B-Virus aus einem Esel; EqHBV-Ze – Isolat des Equiden Hepatitis-B-Virus aus einem Zebra; NC – Negativkontrolle (mit leerem pcDNA3.1(+)-transfizierte Zellen).

Beide HBV-Genotypen sekretierten eine hohe Menge an HBsAg (HBV-A2: 257,5 IU/ml und HBV-D3: 155,7 IU/ml). Bei beiden Isolaten des EqHBV konnte kein HBsAg im Überstand nachgewiesen werden (untere Nachweisgrenze: 0,05 IU/ml).

7.2.4 Untersuchung der Oberflächenprotein-Rezeptor-Interaktion

Im folgenden Abschnitt wurden die Oberflächenproteine des neuartigen Hepadnavirus der Equiden auf ihre Interaktion mit NTCP/Ntcp und der virale Eintrittsmechanismus untersucht.

Nach einer niederspezifischen Bindung der S-Domäne der HBV-Oberflächenproteine an die Zelloberfläche findet eine hochaffine Interaktion der PräS1-Domäne mit dem NTCP statt, die die Internalisierung initiiert [120]. Für diese Interaktion sind zum einen zwei Sequenzbereiche innerhalb des PräS1 wichtig: Eine essentielle und hochkonservierte Bindedomäne (AS 9-15) und zwei variabelere, einander angrenzende akzessorische Domänen (AS 28-48), die die Bindung und Infektion verstärken [64]. Zudem ist eine Myristoylierung des Glycin an Position 2 für eine HBV-Infektion notwendig [65, 66]. Zunächst wurde deshalb eine vergleichende Analyse der N-terminalen PräS-Region von HBV und E_qHBV durchgeführt (Abbildung 21).

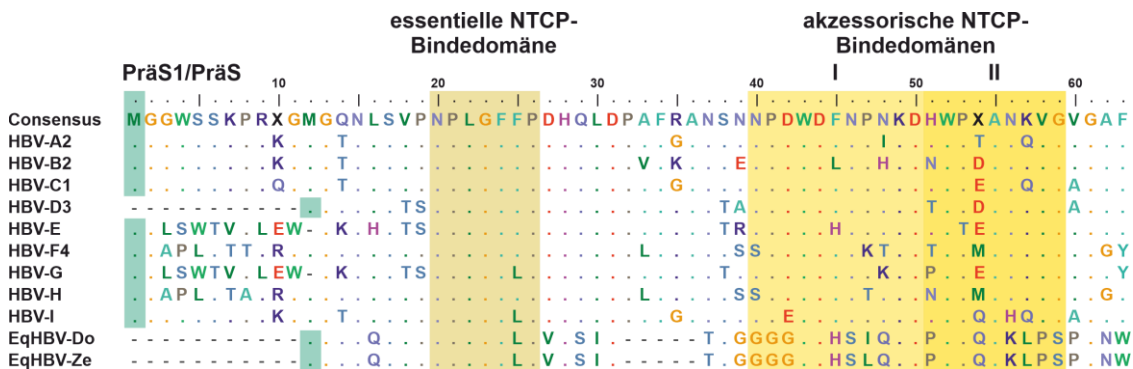


Abbildung 21: Sequenzvergleich der N-terminalen PräS(1)-Region der Oberflächenproteine des HBV und EqHBV. Das Alignment wurde mittels MUSCLE in UGENE erstellt. Das Startcodon des PräS1/PräS-Bereichs ist türkis hinterlegt. Aminosäurereste, die die Interaktion mit NTCP/Ntcp vermitteln, sind gelb hervorgehoben [64]. HBV-Sequenzen entstammen der NRZ-Datenbank (unpubliziert). HBV-A2 – HBV-Subgenotyp A2; EqHBV-Do – Isolat des Equiden Hepatitis-B-Virus aus einem Esel (GenBank-Zugriffsnummer: MT134309). EqHBV-Ze – Isolat des Equiden Hepatitis-B-Virus aus einem Zebra (GenBank-Zugriffsnummer: MT134319).

Die akzessorischen Domänen, die auch innerhalb der HBV-Genotypen eine höhere Variabilität zeigen, unterscheiden sich stark zwischen HBV und EqHBV. Die essentielle NTCP-Bindedomäne des PräS1 (AS 9-15: NPLGF(F/L)P) hingegen ist auch im EqHBV vollständig konserviert. Auch ein Glycin an Position 2 der PräS-Domäne, das für die essentielle Myristoylierung verwendet werden könnte, ist im EqHBV vorhanden.

Die Fähigkeit der EqHBV-Oberflächenproteine, an NTCP/Ntcp zu binden und eine Infektion zu vermitteln, sollte deshalb untersucht werden. Da der HBV-Zelleintritt durch die Bindung der PräS1-Domäne an das NTCP initiiert wird, wurden HepG2-Zellen transient mit NTCP/Ntcp transfiziert und Peptidbindungsassays durchgeführt. Um sicherzustellen, dass NTCP bzw. das Esel-Ntcp-Ortholog an der Zelloberfläche vorhanden und funktional waren, wurden zudem Transportexperimente mit fluoreszenzmarkiertem Taurocholat (NBD-TC) durchgeführt (Abbildung 22). Die Funktionalität des NTCP als auch des Esel-Ntcp konnte durch intrazelluläres NBD-TC aufgrund von NTCP-/Ntcp-Import bestätigt werden. Als zusätzliche Kontrolle dienten die HepG2-NTCP, die den humanen NTCP stabil exprimieren.

Für den experimentellen Nachweis der Interaktion zwischen hepadnaviralen Oberflächenproteinen und NTCP/Ntcp wurden synthetische N-terminal-myristoylierte und C-terminal-fluoreszenzmarkierte Peptide der AS 2-48 der PräS1-Domäne (Myr-PräS1-Peptide) verwendet, die eine PräS1-Bindung an das NTCP/Ntcp fluoreszenzmikroskopisch sichtbar machten. Das humane Peptid konnte sowohl an das humane NTCP (transiente und stabile Expression) als auch an das Esel-Ntcp binden, wohingegen umgekehrt keine Bindung des EqHBV-Peptids an humanes NTCP/Esel-Ntcp nachweisbar war (Abbildung 22).

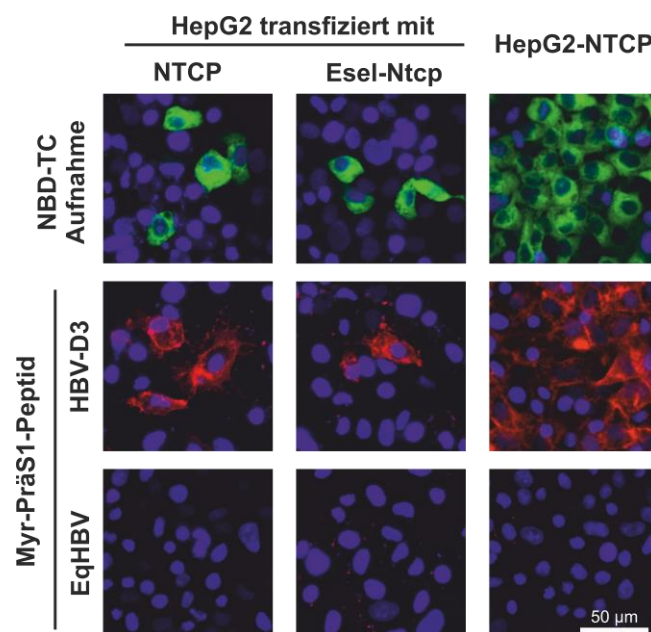


Abbildung 22: Funktionalitätsnachweis und Peptidbindung an das NTCP und Esel-Ntcp. HepG2-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten des humanen NTCP bzw. des Esel-Ntcp-Orthologs transfiziert. Zusätzlich wurden stabil-NTCP-überexprimierende Zellen (HepG2-NTCP) verwendet. Zwei Tage nach transients Transfektion wurden die Zellen für 15 min mit 5 µM des NBD-markierten Taurocholat (NBD-

TC; grün) oder in einem parallelen Versuch mit 100 nM eines synthetischen, fluoreszenzmarkierten und myristoylierten PräS1-Peptids (Myr-PräS1-Peptid; rot) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Zellen mikroskopisch untersucht. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt (blau).

Da der Zelleintritt des neuartigen Hepadnavirus möglicherweise auch durch eine andere Region der Oberflächenproteine vermittelt werden könnte, wurden Experimente mit pseudotypisierten Hepatitis-Delta-Viren (psHDV) durchgeführt. Eine Umhüllung von deltaviralen Genomen mit diversen hepadnaviralen Oberflächenproteinen ermöglicht die Untersuchung der Rezeptorspezifität neuartiger Hepadnaviren unabhängig von der hepadnaviralen Replikation. Für eine solche Umhüllung ist ein tryptophanreiches Motiv innerhalb des SHBs notwendig, welches in EqHBV konserviert ist (Abbildung 18A und Abbildung 23A) [212].

Zunächst wurden EqHBs- und HBs-pseudotypisierte HDV mittels transients Kotransfektion eines subgenomischen HBs-Expressionsplasmids und eines HDV-Plasmids in HuH7-Zellen erzeugt (siehe auch Abschnitt 6.2.6). Hierfür wurden Zellkulturüberstände nach Transfektion für bis zu zwei Wochen gesammelt und über Ultrafiltration eingengt. Die Menge an HDV-RNA in den Konzentraten wurde anschließend über eine HDV-spezifische quantitative RT-PCR bestimmt (Abbildung 23).

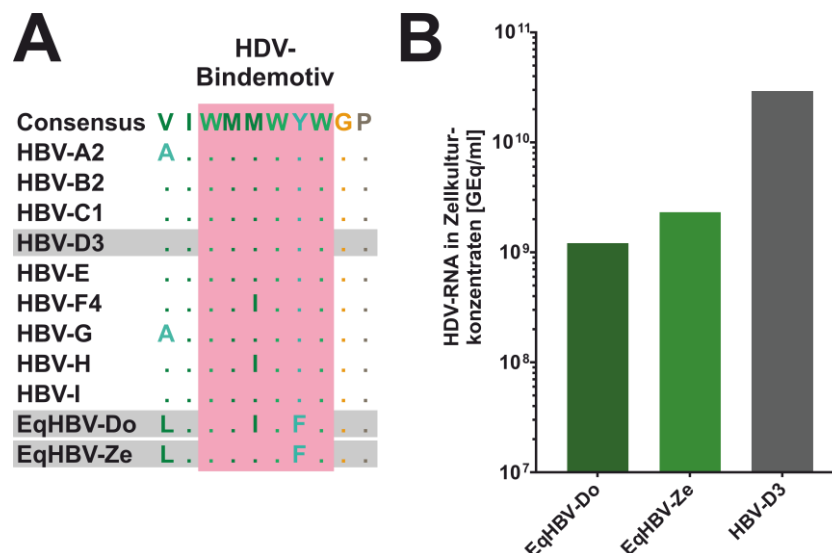


Abbildung 23: Produktion EqHBs- und HBs-pseudotypisierter HDV. (A) Aminosäurevergleich des essentiellen tryptophanreichen HDV-Bindemotivs innerhalb der S-Domäne der HBV-Genotypen und der EqHBV-Isolate aus Esel (EqHBV-Do) und Zebra (EqHBV-Ze) [212]. (B) Quantitativer Nachweis sekretierter psHDV-RNA in Zellkulturüberständen nach Ultrafiltration ermittelt über qRT-PCR. HuH7-Zellen wurden transient mit HDV- und EqHBs- bzw. HBs-Expressionsplasmiden kotransfiziert. Überstände nach Transfektion wurden für bis zu zwei Wochen gesammelt und schließlich über

Ergebnisse

Ultrafiltration eingeengt. HDV-RNA aus Viruspartikeln dieser Konzentrate wurde gereinigt und in eine HDV-spezifische quantitative RT-PCR eingesetzt.

Das tryptophanreiche Interaktionsmotiv zwischen den Oberflächenproteinen und dem HDV-Deltaantigen (HBV: WM(M/I)WYW) ist in einer abgewandelten Form (WM(M/I)WEW) im EqHBV erhalten. Humanes HDV konnte durch die Oberflächenproteine des EqHBV verpackt und sekretiert werden (psHDV_{EqHBV-Do}: $1,22 \times 10^9$ GEq/ml bzw. psHDV_{EqHBV-Ze}: $2,32 \times 10^9$ GEq/ml), wenn auch um eine Log₁₀-Stufe geringer als durch humanes HBsAg sekretiert wurde (psHDV_{HBV-D3}: $2,94 \times 10^{10}$ GEq/ml).

Anschließend wurden transient NTCP-/Esel-Ntcp-überexprimierende HepG2-Zellen mit diesen psHDV infiziert und neu-exprimiertes HDAg nach Infektion mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abbildung 24).

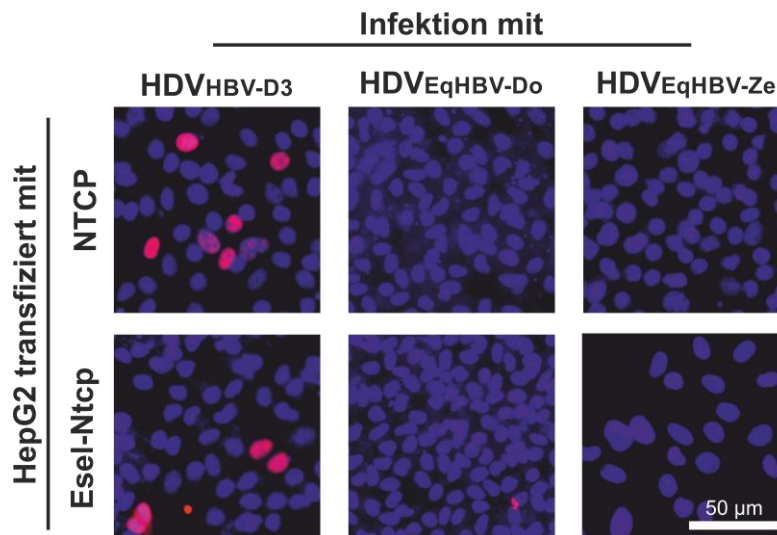


Abbildung 24: Infektion von transient NTCP-/Esel-Ntcp-exprimierenden HepG2-Zellen mit HDV-Partikeln pseudotypisiert mit HBV- und EqHBV-Oberflächenproteinen. HepG2-Zellen wurden in 24-Wellplatten mit humanem NTCP- bzw. Esel-Ntcp-kodierenden Plasmiden transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit 1×10^8 Genomäquivalenten pseudotypisiertem HDV (psHDV_{HBV}, psHDV_{EqHBV-Do}, psHDV_{EqHBV-Ze}) für 24 h inkubiert. Elf Tage nach Infektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, geblockt und das nach erfolgreicher HDV-Infektion neu-produzierte HDAg (rot) mittels eines Anti-HDV-positiven Humanserums und entsprechendem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzanalyse vorbereitet. DAPI wurde für die Zellkernfärbung verwendet (blau). psHDV_{HBV} – pseudotypisiertes HDV mit Oberflächenproteinen des HBV-D3; EqHBV-Do – Isolat des Equiden Hepatitis-B-Virus aus einem Esel. EqHBV-Ze – Isolat des Equiden Hepatitis-B-Virus aus einem Zebra. [Geändert nach Rasche et al. (2021) [38]. Erlaubnis zur geänderten Wiederverwendung durch PNAS erteilt. PNAS ist nicht verantwortlich für die Korrektheit der Übersetzung.]

Während psHDV_{HBV} (ähnlich den Peptidbindungsassays, Abbildung 22) sowohl NTCP als auch Esel-Ntcp für die Infektion nutzen konnte, konnte keine Infektion

über NTCP/Esel-Ntcp durch psHDV_{EqHBV-Do} noch psHDV_{EqHBV-Ze} vermittelt werden.

Da EqHBV möglicherweise nicht das NTCP/Ntcp als Eintrittsrezeptor nutzt oder ein weiterer Spezies-spezifischer Korezeptor für eine erfolgreiche Infektion in humanen HepG2-Zellen fehlte, wurden zusätzlich primäre humane und primäre Pferdehepatozyten mit psHDV infiziert und auch hier das neu-produzierte HDAg nach Infektion in der Immunfluoreszenz gefärbt (Abbildung 25).

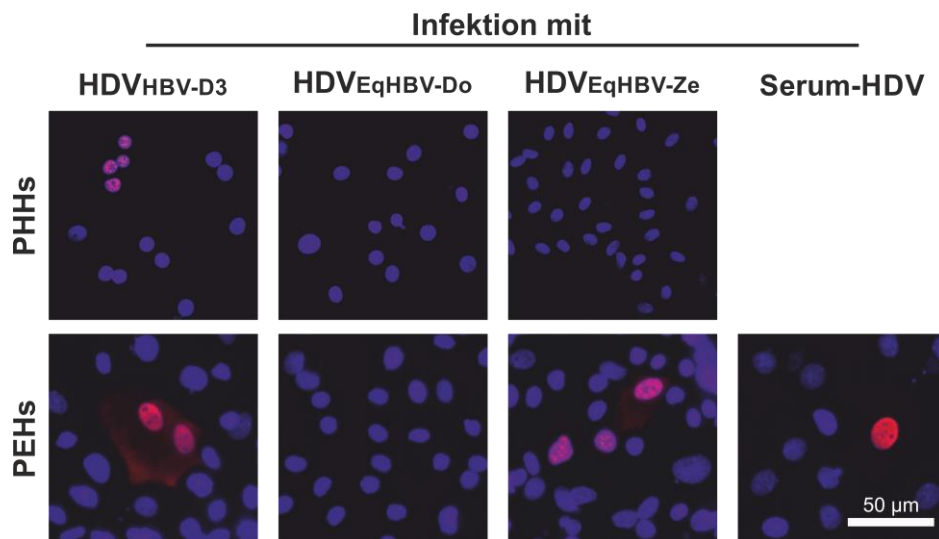


Abbildung 25: Infektion von primären humanen Hepatozyten (PHH) und primären Pferdehepatozyten (PEH) mit HDV-Partikeln pseudotypisiert mit HBV- und EqHBV-Oberflächenproteinen. Primäre humane Hepatozyten (PHH) bzw. primäre Pferdehepatozyten (PEH) wurden in 24-Wellplatten ausgesät. Zwei Tage nach Aussaat wurden die Zellen mit 1×10^8 Genomäquivalenten pseudotypisiertem HDV (psHDV_{HBV}, psHDV_{EqHBV-Do}, psHDV_{EqHBV-Ze}) für 24 h infiziert. Elf Tage nach Infektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, geblockt und das nach erfolgreicher HDV-Infektion neu-produzierte HDAg (rot) mittels eines Anti-HDV-positiven Humanserums und entsprechendem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzanalyse vorbereitet. DAPI wurde für die Zellkernfärbung verwendet (blau). psHDV_{HBV} – pseudotypisiertes HDV mit Oberflächenproteinen des HBV; EqHBV-Do – Isolat des Equiden Hepatitis-B-Virus aus einem Esel. EqHBV-Ze – Isolat des Equiden Hepatitis-B-Virus aus einem Zebra. [Geändert nach Rasche et al. (2021) [38]. Erlaubnis zur geänderten Wiederverwendung durch PNAS erteilt. PNAS ist nicht verantwortlich für die Korrektheit der Übersetzung.]

Lediglich psHDV_{HBV} konnte PHHs infizieren, wobei keine Infektion von PHHs durch psHDV_{EqHBV-Do} oder psHDV_{EqHBV-Ze} nachgewiesen werden konnte. In PEHs konnten dagegen Infektionsereignisse durch psHDV_{EqHBV-Ze} nicht aber durch psHDV_{EqHBV-Do} beobachtet werden. Daneben konnten ebenfalls Infektionen von PEHs durch HBV-Oberflächenproteine vermittelt werden (psHDV_{HBV}). Die primären Pferdehepatozyten wurden zusätzlich mit einem

HDV-positiven Patientenserum infiziert und auch hier konnten HDV-positive Zellen nachgewiesen werden.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass HBV-Oberflächenproteine eine Infektion von PEHs vermitteln können, wurden PEHs außerdem mit HBV infiziert. Die Zellkulturüberstände der infizierten Zellen wurden täglich gewechselt und jeden zweiten Tag gesammelt. Aus gesammelten Überständen wurde das nach erfolgreicher Infektion sekretierte HBeAg mittels diagnostischem Assay gemessen (Abbildung 26A). Ein gradueller Anstieg des sekretierten HBeAg von Tag 3 bis Tag 9 nach Infektion, an dem ein Plateau erreicht wird, konnte beobachtet werden.

Schließlich wurden PEHs mit EqHBV-positiven Seren aus je zwei Eseln und Zebras infiziert (Abbildung 26B). Auch hier wurden die Überstände nach Infektion gesammelt und HBeAg gemessen, da equines HBeAg (wie in Abbildung 17 gezeigt) durch den Architect-Assay detektiert werden konnte.

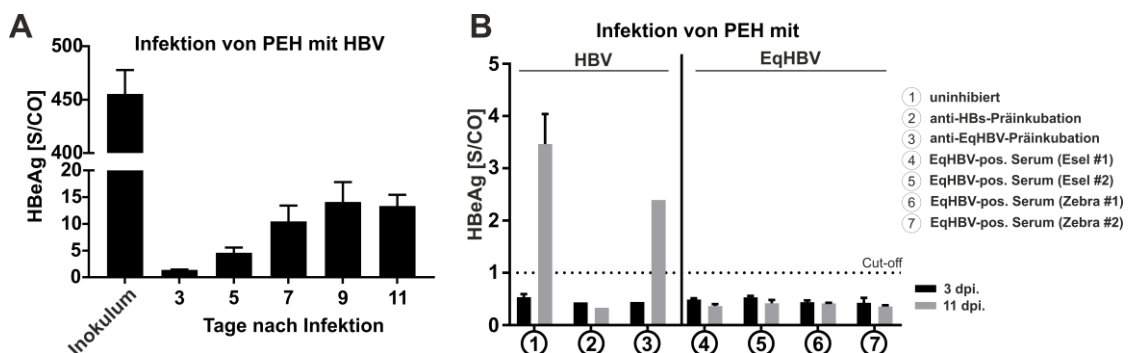


Abbildung 26: HBeAg-Messungen nach Infektion von primären Pferdehepatozyten (PEH) mit HBV und EqHBV. Primäre Pferdehepatozyten (PEH) wurden in 24-Wellplatten ausgesät und zwei Tage nach Aussaat infiziert. Überstände nach Infektion wurden täglich gewechselt und jeden zweiten Tag von 1 bis Tag 11 gesammelt. HBeAg-Gehalt wurde mittels Abbott Architect bestimmt. (A) Zeitabhängige HBeAg-Sekretion nach HBV-Infektion. Es wurden 1×10^5 HBV-Kopien/Well für die Infektion eingesetzt. Daten entsprechen zwei unabhängigen Experimenten. (B) Sekretiertes HBeAg an Tag 3 und 11 nach Infektion mit HBV und EqHBV. Für die HBV-Infektion wurden 1×10^5 HBV-Kopien/Well eingesetzt. In zwei Ansätzen wurde HBV vor Infektion zusätzlich für 30 Minuten mit Immunseren präinkubiert (Anti-HBs- bzw. Anti-EqHBV-Präinkubation), um eine mögliche Antikörperinhibition der HBV-Infektion zu untersuchen. PEH wurden außerdem mit EqHBV-positiven Seren (6.8×10^5 - 1.0×10^6 Kopien/Well) aus je zwei Eseln und Zebras infiziert. [Geändert aus Rasche et al. (2021) [38]. Erlaubnis zur geänderten Wiederverwendung durch PNAS erteilt. PNAS ist nicht verantwortlich für die Korrektheit der Übersetzung.]

Es konnten keine Infektionen von PEHs durch EqHBV aus Esel- bzw. Zebraseren nachgewiesen werden. Außerdem wurden PEHs mit HBV infiziert, das zuvor mit Anti-HBs bzw. Anti-EqHBV-positiven Seren präinkubiert wurde.

Hier konnte beobachtet werden, dass Anti-HBs, aber nicht Antikörper gegen E_qHBV, eine Infektion durch HBV verhindern konnten.

7.3 Charakterisierung der Antigenität und Infektiosität der neuartigen Hepadnaviren der Spitzmäuse (CSHBV/MSHBV)

Unter der Leitung von Prof. Dr. Drexler (Arbeitsgruppe Virusepidemiologie am Institut für Virologie der Charité Berlin; Direktor: Prof. Dr. Drosten) in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Glebe (Leiter des Nationalen Referenzzentrums für Hepatitis-B-Viren und Hepatitis-D-Viren am Institut für medizinische Virologie der Universität Gießen; Direktor: Prof. Dr. Ziebuhr) konnten in einer internationalen Studie zwei neue hepadnavirale Spezies in Lebergeweben verschiedener Spitzmäuse (Gattungen *Sorex* und *Crocidura*) identifiziert werden, welche aufgrund ihrer Wirtstiere als Musk Shrew Hepatitis-B-Virus der Elfenbeinküste (MSHBV_{CIV}; im Folgenden zur besseren Lesbarkeit als MSHBV bezeichnet) bzw. Crowned Shrew Hepatitis-B-Virus (CSHBV) bezeichnet wurden [37]. Zehn Gesamtgenomsequenzen, die öffentlich zugänglich gemacht wurden, konnten durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Drexler ermittelt werden (GenBank-Zugriffsnummern: MK345460-MK345467, MK345470, MK345474, und MK345475). Bei Sequenzunterschieden von >20 % auf Ganzgenomebene werden Orthohepadnaviren einer neuen Spezies zugeordnet [16]. Aufgrund der hohen Sequenzdivergenz zu anderen bekannten Hepadnaviren (≥39 %) stellen MSHBV und CSHBV zwei eigene Spezies der Orthohepadnaviren dar. Innerhalb der charakterisierten CSHBV-Sequenzen wurden zwei Gruppen festgestellt, die sich zueinander in 11,6-12,0 % unterschieden, und analog zum HBV-Genotypenabrenzungskriterium von >8 % Nukleotiddivergenz [17] als zwei eigenständige Genotypen betrachtet wurden (CSHBV-A und CSHBV-B).

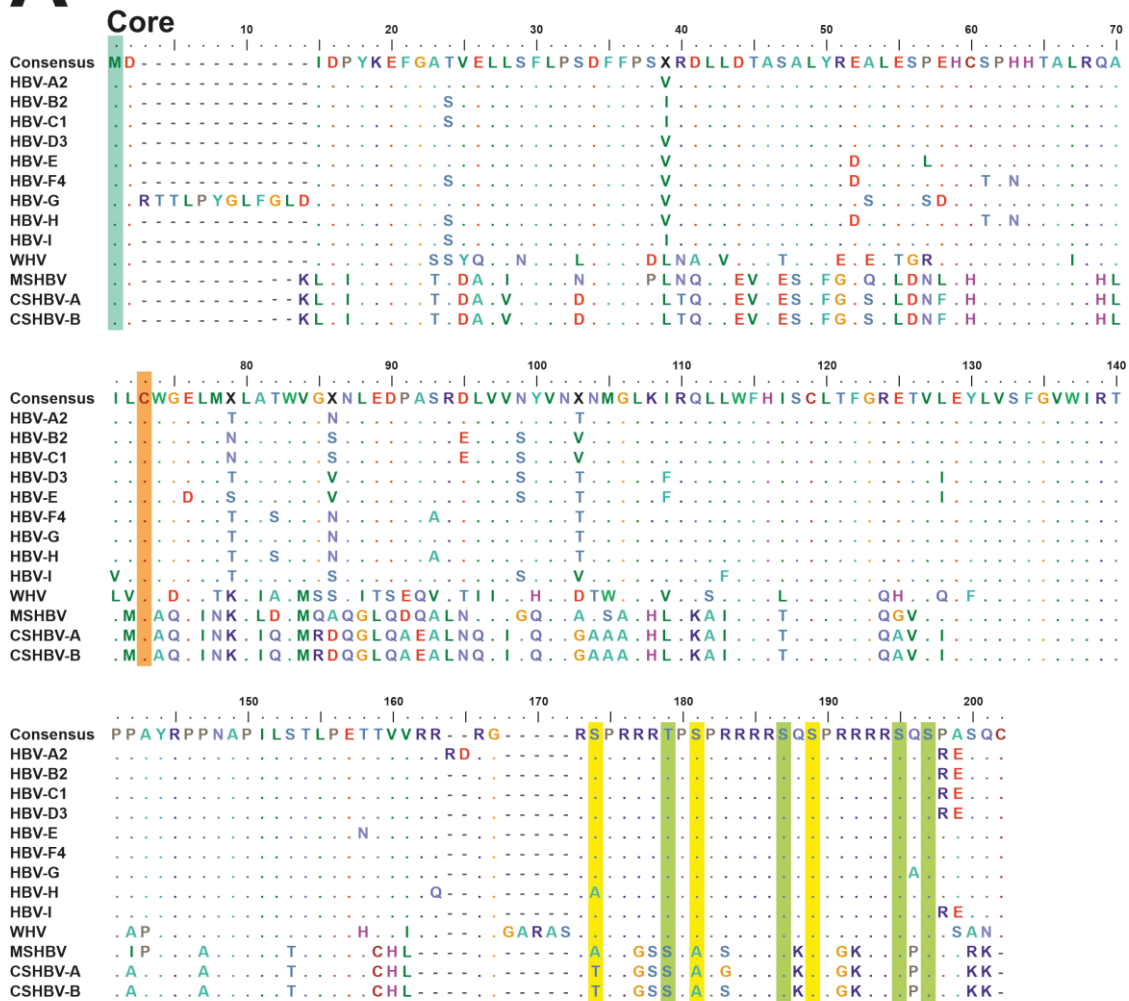
Eine Zusammenfassung der wahrscheinlichen CSHBV- und MSHBV-ORFs ist in Abbildung S3 (Anhang) dargestellt. Die Genome der beiden CSHBV-Genotypen (3089 nt) sind die kürzesten unter den Orthohepadnaviren (3131-3368 nt). Das MSHBV-Genom hingegen zeigt ähnliche Länge (3172 nt). Der Polymerase-ORF des CSHBV (A: 812 AS; B: 823 AS) ist kürzer als der des

MSHBV (835 AS), insgesamt aber von vergleichbarer Länge zu anderen Orthohepadnaviren (827-899 AS). Auch die X-ORFs von MSHBV (141 AS) und CSHBV (A: 131 AS; B: 135 AS) ähneln denen der restlichen Orthohepadnaviren (135-155 AS). Das S-Protein des CSHBV und MSHBV besteht aus jeweils 225 AS und liegt damit im Rahmen der anderen Spezies (222-228 AS). Der PräS-Bereich der beiden Spitzmaushepadnaviren ist allerdings außergewöhnlich. Sowohl CSHBV als auch MSHBV besitzen mögliche PräS2-Startcodons, die für die Expression eines MHBs verwendet werden könnten. Der PräS2-Bereich des CSHBV entspräche dann rund 65 AS, vergleichbar mit anderen Orthohepadnaviren (47-60 AS), im Gegensatz zu dem deutlich längeren MSHBV-PräS2 (104 AS). Der theoretische PräS1-Bereich ist sowohl bei CSHBV (77 AS) als auch bei MSHBV (66 AS) wesentlich kürzer als der anderer Orthohepadnaviren (104-174 AS). Die Core-Sequenz von CSHBV/MSHBV ist mit 181 AS ähnlich den anderen (182-195 AS), doch im PräC zeigen sich bedeutende Unterschiede: Beide CSHBV-Genotypen besitzen kein PräC-Startcodon 5'-terminal des Core-Startcodons. Das MSHBV hingegen enthält ein PräC-Startcodon, aber ähnlich dem HBV-G zudem ein Stoppcodon an Position -2 innerhalb der PräC-Sequenz.

In dieser Arbeit sollte die Überlängengenomsequenz eines MSHBV-Isolates kloniert werden, um die Expression und Antikörperreaktivität des Core-Proteins (HBc), des HBeAg sowie der Oberflächenproteine (HBs) genauer zu untersuchen. Außerdem wurden die Oberflächenproteine des MSHBV, CSHBV-A und CSHBV-B verwendet, um die Virus-Rezeptor-Interaktion zu charakterisieren.

7.3.1 Analyse des Core-Proteins

Das Core-Protein als Grundbaustein der Core-Partikel ist für den hepadnaviralen Replikationszyklus essentiell. Im folgenden Abschnitt wurden die Core-Proteine (HBc) der Spitzmaushepadnaviren hinsichtlich Sequenzkonservierung und anschließend das MSHBV auch experimentell untersucht. Zunächst wurde ein Alignment des Core-ORF des HBV, MSHBV, CSHBV und WHV angefertigt und analysiert (Abbildung 27).

A**B**

Core	HBV-A2	HBV-B2	HBV-C1	HBV-D3	HBV-E	HBV-F4	HBV-G	HBV-H	HBV-I	WHV	MSHBV	CSHBV-A	CSHBV-B
HBV-A2	100%	95%	95%	96%	93%	95%	89%	93%	95%	69%	57%	55%	55%
HBV-B2	95%	100%	100%	96%	93%	93%	87%	93%	98%	70%	57%	56%	56%
HBV-C1	95%	100%	100%	96%	93%	94%	87%	92%	98%	71%	57%	56%	56%
HBV-D3	96%	96%	96%	100%	96%	94%	88%	93%	96%	69%	57%	57%	57%
HBV-E	93%	93%	93%	96%	100%	94%	88%	92%	93%	69%	56%	56%	56%
HBV-F4	95%	93%	94%	94%	94%	100%	89%	99%	94%	70%	57%	56%	56%
HBV-G	89%	87%	87%	88%	88%	89%	100%	87%	87%	64%	53%	53%	53%
HBV-H	93%	93%	92%	93%	92%	99%	87%	100%	92%	68%	58%	57%	57%
HBV-I	95%	98%	98%	96%	93%	94%	87%	92%	100%	70%	56%	55%	55%
WHV	69%	70%	71%	69%	69%	70%	64%	68%	70%	100%	53%	53%	53%
MSHBV	57%	57%	57%	57%	56%	57%	53%	58%	56%	53%	100%	87%	88%
CSHBV-A	55%	56%	56%	57%	56%	56%	53%	57%	55%	53%	87%	100%	100%
CSHBV-B	55%	56%	56%	57%	56%	56%	53%	57%	55%	53%	88%	100%	100%

Abbildung 27: Sequenzvergleich des gesamten Core-Proteins humaner HBV-Genotypen, MSHBV und CSHBV-Genotypen. (A) Das Sequenzalignment wurde mit dem MUSCLE-Algorithmus in UGENE erstellt. Das für die HBc-Dimerisierung des humanen HBV notwendige Cystein [74] ist orange hinterlegt. Die drei essentiellen Phosphorylierungsstellen sind in gelb, die vier weiteren in grün dargestellt [76]. (B) Distanzmatrix des MUSCLE-Alignments der Core-Proteinsequenzen. Die Ähnlichkeit zwischen zwei Core-Sequenzen ist in Prozent (%) Similarität angegeben. Die Similarität ist außerdem farblich untergliedert: 100 % (weiß), 91-99 % (rot), 71-90 % (orange), 51-70 % (grün). HBV-Sequenzen entstammen der NRZ-

Datenbank (unpubliziert). HBV-A2 – HBV-Subgenotyp A2; Musk Shrew Hepatitis B Virus (GenBank-Zugriffsnummer: MK345462); CSHBV-A/-B – Crowned Shrew Hepatitis-B-Virus Genotyp A (GenBank-Zugriffsnummer: MK345465) bzw. Genotyp B (GenBank-Zugriffsnummer: MK345467).

Eine detaillierte Beschreibung der HBV-Genotypen wurde bereits in Abschnitt 7.2.1 durchgeführt. Die Core-Proteine der Spitzmaushepadnaviren unterscheiden sich stark zu HBV (53-58 % Similarität) und WHV (53 % Similarität). Die beiden CSHBV-Genotypen sind auf Proteinebene zu 100 % ähnlich und unterscheiden sich zu MSHBV in 12-13 %.

Das für die Kapsidbildung essentielle Cystein an Position 61 des humanen HBc [74] ist auch in CSHBV und MSHBV konserviert. Außerdem befinden sich im HBc sieben konservierte Serin-/Threoninreste (Abbildung 27A, grün/gelb), die während der Reifung der Kapside dynamisch (de-)phosphoryliert werden können [76]. Nur eines der drei essentiellen SP-Phosphomotive (gelb) ist auch in MSHBV erhalten (S170). Die anderen beiden Serine sind durch Alanin ausgetauscht (S155A, S162A). Der S170-Rest ist auch in den beiden CSHBV-Genotypen konserviert. Ähnlich zu MSHBV besitzt auch CSHBV einen S162A-Austausch. Es findet sich außerdem ein S155T-Austausch bei CSHBV. Von den vier restlichen Phosphorylierungsstellen (grün) sind drei sowohl in MSHBV als auch CSHBV konserviert (S168, S176, S178). Die vierte Stelle weist einen T160S-Austausch bei MSHBV und CSHBV auf.

Analog zu der Klonierung der EqHBV 1.5mer-Konstrukte, wurden für das MSHBV-Isolat (Genbank-Zugriffsnummer: MK345462) ein Überlängenkonstrukt in pcDNA3.1(+) generiert (Abbildung 13). Mit diesem Plasmid sollte experimentell untersucht werden, ob polyklonale Antikörper gegen verschiedene hepadnavirale Core-Proteine auch mit MSHBV kreuzreagieren. Hierzu wurden HepG2-Zellen transient mit Überlängenkonstrukten von HBV und MSHBV transfiziert. Eine Expression viraler Proteine erfolgt hierbei unter endogenen Regulatoren. Fünf Tage nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit polyklonalen tierischen Anti-Core-Antisera und anschließenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern für die Immunfluoreszenz vorbereitet (Abbildung 28).

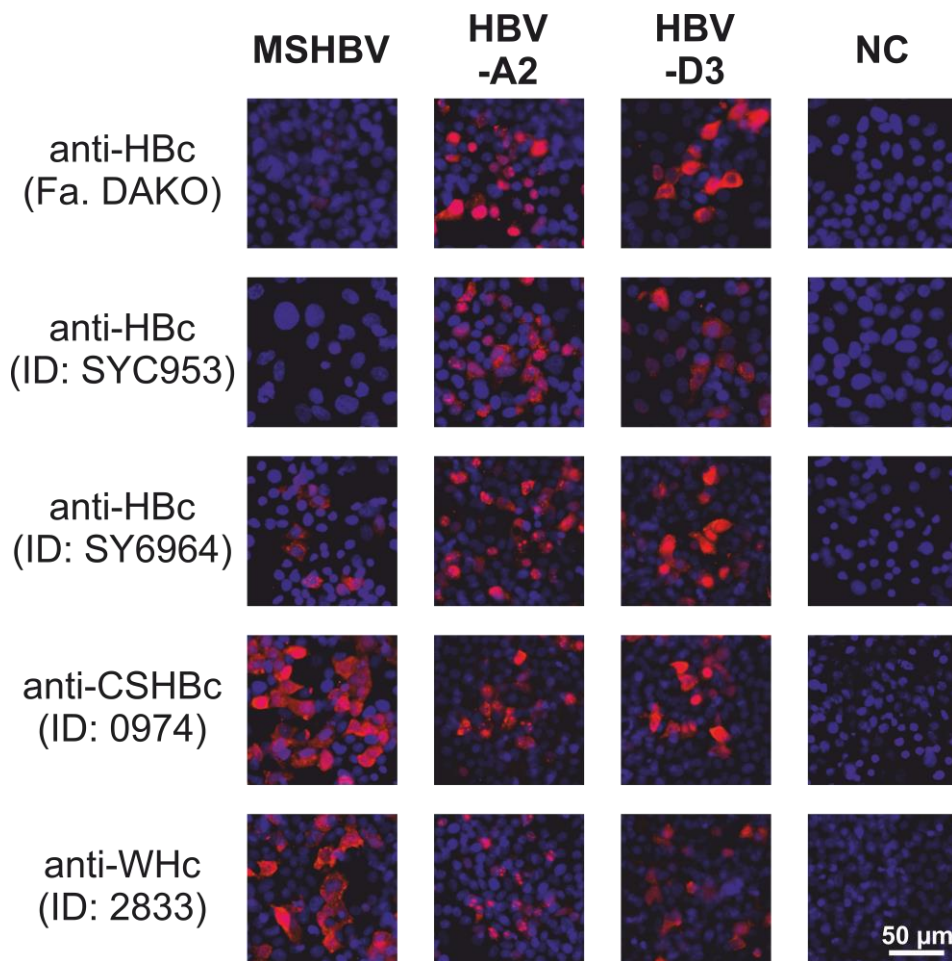


Abbildung 28: Immunfluoreszenz von HBV und MSHBV nach Färbung mit polyklonalen Anti-Core-Immunsereen. HepG2-Zellen wurden mit Überlängkonstrukten von HBV bzw. MSHBV transfiziert, für fünf Tage kultiviert und schließlich fixiert, permeabilisiert und geblockt. Zellen wurden anschließend mit verschiedenen Anti-Core-Antikörpern inkubiert und mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (rot) für die Immunfluoreszenzauswertung gefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Die Immunisierung erfolgte mit dem Core-Protein des HBV (Anti-HBc), des CSHBV (Anti-CSHBc) bzw. des WHV (Anti-WHc). HBV-A2 – HBV-Subgenotyp A2; Musk Shrew Hepatitis B Virus; NC – Negativkontrolle (mit leerem pcDNA3.1(+)-transfizierte Zellen).

Alle drei Anti-HBc-Antiseren (DAKO, SYC953, SY6964) reagierten mit den beiden humanen HBV-Genotypen (HBV-A2 und HBV-D3). Eine ähnlich starke Färbung des MSHBc (Core-Protein des MSHBV) konnte auch bei dem Kaninchenserum SY6964 beobachtet werden. Ein sehr schwaches, aber dennoch positives Signal wurde beim DAKO-Serum mit MSHBV festgestellt. Das Impfs Serum eines Meerschweinchens (SYC953) kreuzreagierte nicht mit dem MSHBc. Das Kaninchenserum, das mit CSHBc immunisiert wurde (0974), reagierte stark mit MSHBc. Auch eine Bindung an das humane HBc (HBV-A2, HBV-D3) konnte beobachtet werden, wenn auch zu einem geringeren Maße als

bei MSHBc. Auch das Anti-WHc-Immunserum (2833) reagierte stark mit MSHBc und deutlich schwächer mit humanem HBc.

7.3.2 Analyse des HBeAg und relevanter Bereiche des PräC/Core-ORF

HBeAg spielt eine zentrale Rolle bei der Chronifizierung des humanen HBV und stellt zudem einen wichtigen diagnostischen Marker im Verlauf chronischer Hepatitis-B-Infektionen dar [78]. Da das PräC-Polypeptid zwei Prozessierungsschritte durchlaufen muss, bevor es als reifes HBeAg sekretiert werden kann, sollten zunächst Alignments der dafür wichtigen Sequenzbereiche von HBV, MSHBV und CSHBV verglichen und mit Hilfe verschiedener bioinformatischer Programme analysiert werden.

Nach Translation und Translokation in das ER wird in einem ersten Prozessierungsschritt das N-terminale Signalpeptid durch die Signalpeptidase entfernt [79]. Die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins eines Signalpeptids im MSHBV- und CSHBV-PräC wurde mittels einer Signalpeptid-Vorhersagesoftware untersucht (Abbildung 29). Das verwendete Programm PrediSi gibt sowohl Wahrscheinlichkeit als auch Schnittstelle des Signalpeptids an. Der PrediSi-Score wird von 0 (sehr unwahrscheinlich) bis 1 (sehr wahrscheinlich) angegeben.

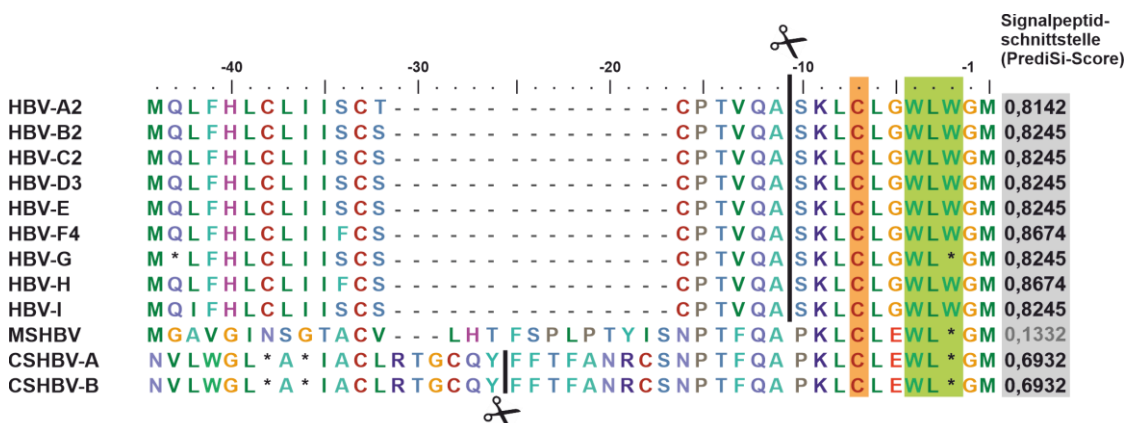


Abbildung 29: Sequenzvergleich des PräC humaner HBV-Genotypen sowie der Hepadnaviren aus Spitzmäusen (MSHBV und CSHBV). Das Alignment wurde mittels MUSCLE in UGENE durchgeführt. Das konservierte Cystein innerhalb des N-terminalen PräC-Dekamers ist orange hinterlegt und das konservierte hydrophobe WLW-Motiv ist grün dargestellt [85]. Rechts ist der Vorhersage-Score der Signalpeptid-Vorhersagesoftware PrediSi angegeben. Dieser Score kann einen Wert zwischen 0 (sehr unwahrscheinlich) und 1 (sehr wahrscheinlich) annehmen. Je höher der Score, desto größer ist das Konfidenzniveau einer tatsächlichen Spaltung. Zusätzlich gibt das Programm PrediSi die vorhergesagte Spaltstelle an (symbolisch mit einer Schere dargestellt). HBV-Sequenzen entstammen der NRZ-

*Datenbank (unpubliziert). HBV-A2 – HBV-Subgenotyp A2; MSHBV – Musk Shrew Hepatitis-B-Virus (GenBank-Zugriffsnummer: MK345462); CSHBV-A/-B – Crowned Shrew Hepatitis-B-Virus Genotyp A (GenBank-Zugriffsnummer: MK345465) bzw. Genotyp B (GenBank-Zugriffsnummer: MK345467); * – Stoppcodon.*

Eine detaillierte Beschreibung der humanen HBV-Genotypen wurde bereits in Abschnitt 7.2.2 durchgeführt. Alle drei Spitzmaushepadnavirussequenzen unterscheiden sich stark in ihrem PräC-Bereich zu den humanen HBV-Genotypen. Die CSHBV-Genotypen sind zueinander identisch, unterscheiden sich aber auch stark zu der MSHBV-Sequenz. Im putativen PräC-Bereich der CSHBV-Genotypen findet sich kein potentiell Startcodon. Auffällig ist außerdem ein Stoppcodon an Position -2 vor dem Core-Startcodon sowohl bei MSHBV als auch bei CSHBV-A/-B. Dieses Stoppcodon liegt an derselben Stelle wie beim humanen HBV-G und ersetzt ein ansonsten hochkonserviertes Tryptophan innerhalb des hydrophoben WLW-Motivs. Der im humanen HBV konservierte Cysteinrest an Position -7, der eine Multimerisierung wie beim Core-Protein verhindert [82], ist auch in den Spitzmaushepadnaviren erhalten.

Die Signalpeptidschnittstelle befindet sich bei humanem HBV zwischen Aminosäuren -11 und -10 der PräC-Sequenz und wurde in allen HBV-Genotypen korrekt vorhergesagt (PrediSi-Score: 0,8142-0,8674). In dem möglichen PräC-Bereich des MSHBV wurde kein Signalpeptid detektiert (Score: 0,1332) und demnach auch keine Schnittstelle angegeben. Die Sequenz, die dem Core-Gen der beiden CSHBV-Genotypen vorangeht, zeigt eine Schnittstelle hinter einem Tyrosin an Position -26 (Score: 0,6932). Bei CSHBV ist allerdings kein Startcodon vorhanden, von dem eine PräC-Translation ausgehen könnte.

In einem zweiten Prozessierungsschritt wird die argininreiche C-terminale Domäne, die im HBc für die Bindung an pgRNA nötig ist, durch die Endopeptidase Furin entfernt [80, 81]. Furin erkennt basische RxxR-Sequenzen und schneidet hinter dem zweiten Argininrest. Um die möglichen Propeptidschnittstellen zu untersuchen, wurden die Primärsequenzen mit zwei Propeptidase-Vorhersagesoftware (ProP und PiTou) untersucht (Abbildung 30). ProP liefert eine Wahrscheinlichkeit für eine Furin-Schnittstelle zwischen 0 (sehr unwahrscheinlich) und 1 (sehr wahrscheinlich). Auch PiTou ergibt eine solche Wahrscheinlichkeit, die Werte von <0 (Schnittstelle unwahrscheinlich)

Ergebnisse

oder >0 (Schnittstelle wahrscheinlich) annehmen kann, wobei ein höherer Wert auch eine höhere Wahrscheinlichkeit angibt.

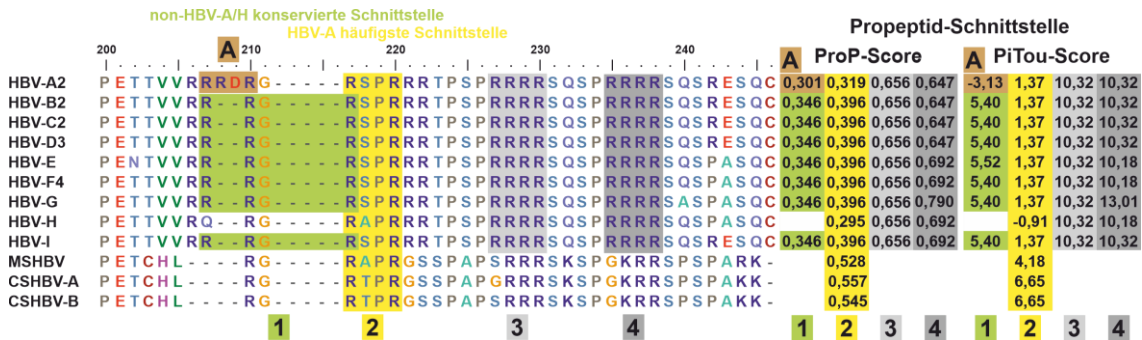


Abbildung 30: Sequenzvergleich des C-terminalen Core-Bereichs humaner HBV-Genotypen sowie der Hepadnaviren aus Spitzmäusen (MSHBV und CSHBV). Das Alignment wurde mittels MUSCLE in UGENE durchgeführt. Alle möglichen Furinspaltstellen wurden farblich hinterlegt. Die in den meisten HBV-Genotypen konservierten Motive 1 (grün; RRGR), 2 (gelb; R(S/A)PR), 3 (hellgrau; RRRR) sowie 4 (dunkelgrau; RRRR) sind dargestellt. Zusätzlich ist das für HBV-A charakteristische veränderte N-terminale Motiv (A; braun; RRDR) markiert. Rechts ist der Vorhersage-Score zweier Furinspaltstellen-Vorhersageprogramme (ProP und PiTou) angegeben. Bei ProP kann dieser Score einen Wert zwischen 0 (sehr unwahrscheinlich) und 1 (sehr wahrscheinlich) annehmen. Bei PiTou kann dieser Score Werte zwischen <0 (unwahrscheinlich) und >0 (wahrscheinlich) annehmen. Für beide Programme gilt: Je höher der Score, desto größer ist das Konfidenzniveau einer tatsächlichen Spaltung. Die Scores sind jeweils in der Farbe der dazugehörigen möglichen Spaltstelle hinterlegt. HBV-Sequenzen entstammen der NRZ-Datenbank (unpubliziert). HBV-A2 – HBV-Subgenotyp A2; MSHBV – Musk Shrew Hepatitis-B-Virus (GenBank-Zugriffsnummer: MK345462); CSHBV-A/B – Crowned Shrew Hepatitis-B-Virus Genotyp A (GenBank-Zugriffsnummer: MK345465) bzw. Genotyp B (GenBank-Zugriffsnummer: MK345467).

Eine detaillierte Beschreibung der HBV-Spaltstellen wurde bereits in Abschnitt 7.2.2 dargestellt. In den Spitzmaushepadnaviren ist nur eine einzige Furinschnittstelle vorhanden, die dem zweiten Motiv des HBV ähnelt (R(A/T)PR). Die Verwendung des einzigen Motivs im MSHBV und CSHBV ist durch beide Vorhersageprogramme als wahrscheinlich angegeben (ProP: 0,528-0,557 bzw. PiTou: 4,18-6,65).

Nach der bioinformatischen Analyse sollte auch experimentell untersucht werden, ob reifes HBeAg des MSHBV sekretiert werden kann und Antikörper-Epitope, die in der Diagnostik des menschlichen HBV Anwendung finden, auch im MSHBV konserviert sind. Hierzu wurden HepG2-Zellen mit Überlängengenomen von HBV und MSHBV transfiziert. Fünf Tage nach Transfektion wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und im qualitativen Abbott Architect HBeAg-Assay gemessen (Abbildung 31).

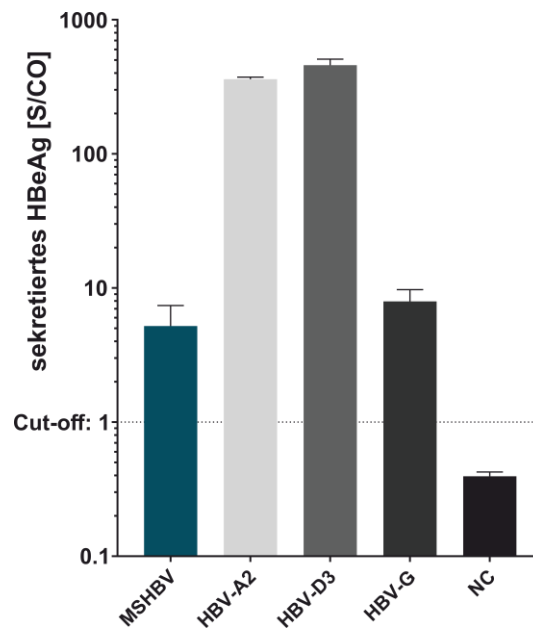


Abbildung 31: HBeAg-Messung nach Transfektion mit HBV und MSHBV. HepG2-Zellen wurden mit Überlängenkonstrukten von HBV und MSHBV transfiziert und für fünf Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und unverdünnt in den qualitative HBeAg-Assay des Abbott Architects eingesetzt. S/CO – Signal-to-Cut-off-Ratio. HBV-A2 – HBV-Subgenotyp A2; MSHBV – Musk Shrew Hepatitis-B-Virus; NC – Negativkontrolle (mit leerem pcDNA3.1(+)-transifizierte Zellen).

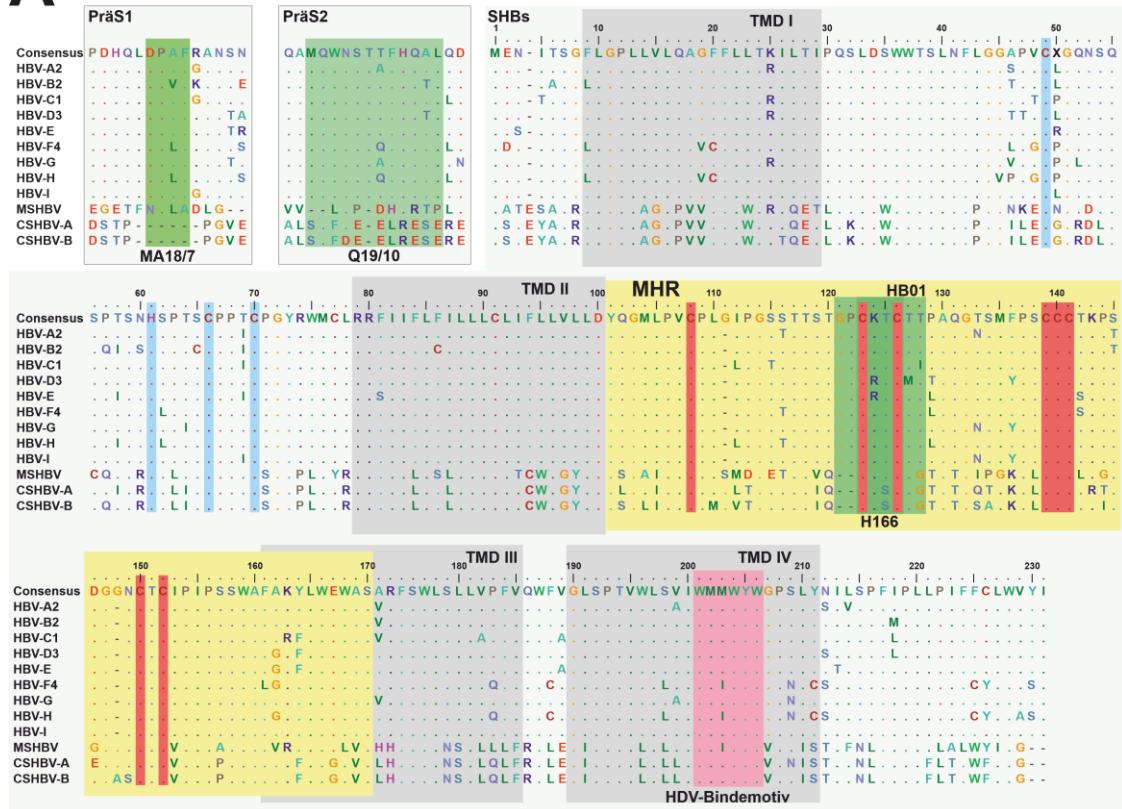
Sowohl HBV-A2 als auch HBV-D3 wurden durch den diagnostischen Assay erkannt und hohe Mengen an HBeAg nach Transfektion sekretiert (HBV-A2: 360,05 S/CO und HBV-D3: 458,55 S/CO). Es wurden auch sehr geringe positive Signale bei HBV-G und MSHBV detektiert (7,9 S/CO bzw. 5,2 S/CO; Cut-Off: 1,0 S/CO).

7.3.3 Analyse der Oberflächenproteine und Reaktivität mit Anti-HBs-Antikörpern

Die Oberflächenproteine der Hepadnaviren vermitteln den spezifischen Zelleintritt in Hepatozyten und sind Bestandteil aller Impfstoffe gegen HBV. Mutationen in den antigenen Determinanten der Oberflächenproteine können zu Impfdurchbrüchen führen [238].

Zunächst wurden die Oberflächenprotein-Primärsequenzen von MSHBV und CSHBV mit denen der humanen Genotypen mittels Sequenzvergleich analysiert (Abbildung 32).

A



B

SHBs	HBV-A2	HBV-B2	HBV-C1	HBV-D3	HBV-E	HBV-F4	HBV-G	HBV-H	HBV-I	MSHBV	CSHBV-A	CSHBV-B
HBV-A2	100%	93%	92%	93%	91%	87%	95%	87%	96%	55%	56%	56%
HBV-B2	93%	100%	91%	91%	91%	86%	92%	87%	94%	53%	56%	55%
HBV-C1	92%	91%	100%	91%	92%	85%	92%	86%	93%	54%	57%	56%
HBV-D3	93%	91%	91%	100%	93%	87%	93%	87%	94%	54%	57%	57%
HBV-E	91%	91%	92%	93%	100%	88%	91%	87%	94%	52%	56%	55%
HBV-F4	87%	86%	85%	87%	88%	100%	88%	96%	89%	55%	56%	55%
HBV-G	95%	92%	92%	93%	91%	88%	100%	87%	96%	53%	58%	57%
HBV-H	87%	87%	86%	87%	87%	96%	87%	100%	88%	54%	57%	55%
HBV-I	96%	94%	93%	94%	94%	89%	96%	88%	100%	54%	57%	57%
MSHBV	55%	53%	54%	54%	52%	55%	53%	54%	54%	100%	77%	78%
CSHBV-A	56%	56%	57%	57%	56%	56%	58%	57%	57%	77%	100%	93%
CSHBV-B	56%	55%	56%	57%	55%	55%	57%	55%	57%	78%	93%	100%

Abbildung 32: Sequenzvergleich relevanter PräS1/PräS2-Epitope und der gesamten S-Domäne von HBV, MSHBV und CSHBV. (A) Das Sequenzalignment wurde mit dem MUSCLE-Algorithmus in UGENE erstellt. Antikörperepitope (MA18/7, Q19/10, HB01, H166) sind in Grüntönen hinterlegt [226, 227, 230, 239]. Die vorgeschlagenen Transmembrandomänen (TMD) I-IV (siehe Abbildung 2; [47]) sind dunkelgrau hinterlegt. Acht strukturebende Cysteinreste der MHR (engl.: major hydrophilic region; gelb) sind rot hervorgehoben [51]. Weitere konservierte, sekretionsrelevante Cysteine und ein Histidin zwischen TMD I und II sind in blau dargestellt [51]. Das Motiv, mit dem die S-Domäne mit dem Deltaantigen interagiert (HDV-Bindemotiv), ist in rosa dargestellt [212]. (B) Distanzmatrix des MUSCLE-Alignments der SHBs-Proteinsequenzen. Die Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen ist in Prozent (%) Similarität angegeben. Die Similarität ist außerdem farblich untergliedert: 100 % (weiß), 91-99 % (rot), 71-90 % (orange), 51-70 % (grün). HBV-Sequenzen entstammen der NRZ-Datenbank (unpubliziert). HBV-A2 – HBV-Subgenotyp A2; MSHBV – Musk Shrew Hepatitis-B-Virus (GenBank-Zugriffsnummer: MK345462); CSHBV-A/B –

Crowned Shrew Hepatitis-B-Virus Genotyp A (GenBank-Zugriffsnummer: MK345465) bzw. Genotyp B (GenBank-Zugriffsnummer: MK345467).

Innerhalb der S-Domäne der HBV-Oberflächenproteine sind acht Cysteine hochkonserviert (rot), die für die konformationelle Integrität der Oberflächenproteine essentiell sind [51]. Auch in MSHBV und den beiden CSHBV-Genotypen sind diese Cysteinreste konserviert. Für die Sekretion des HBs sind außerdem drei Cystein- und ein Histidinrest essentiell (blau) [51], welche auch in MSHBV und CSHBV konserviert sind. Das HDV-Bindemotiv innerhalb der S-Domäne der Oberflächenproteine (WM(M/I)WYW) ist in den humanen HBV-Genotypen stark konserviert und auch in MSHBV und CSHBV erhalten. Es konnten keine weiteren möglichen N-Glykosylierungsstellen im kleinen MSHBV-/CSHBV-Oberflächenprotein neben dem kanonischen N-Glykosylierungssequon an N146 festgestellt werden. Weder das MA18/7- noch das Q19/10-Epitop sind in den Spitzmaushepadnaviren enthalten. Im Gegensatz dazu zeigen die überlappenden Epitope der monoklonalen Antikörper HB01 und H166 nur einen Austausch im CSHBV (GP/CKSC/TT) und sind in MSHBV vollständig konserviert (GP/CKTC/TT).

Die Beschreibung der Similarität der HBV-Genotypen wurde bereits detailliert in Abschnitt 7.2.3 ausgeführt. Die SHBs-Proteinsequenzen der Spitzmaushepadnaviren unterscheiden sich stark zum humanen HBV (52-58 % Similarität). Das SHBs des MSHBV und der CSHBV-Genotypen ähneln sich untereinander mehr (77-78 % Similarität). Die beiden CSHBV-Genotypen divergieren in einem vergleichbaren Maße (93 % Similarität) wie die humanen HBV-Genotypen zueinander.

Anschließend an die bioinformatische Analyse sollte untersucht werden, ob monoklonale Anti-HBs-Antikörper und ein polyklonales Impferum auch gegen die MSHBV-Oberflächenproteine reaktiv sind. Dafür wurden HepG2-Zellen transient mit Überlängenkonstrukten von HBV und MSHBV transfiziert, fünf Tage kultiviert und dann fixiert, permeabilisiert und geblockt. Für eine fluoreszenzmikroskopische Analyse wurden die Zellen mit Anti-HBs-Antikörpern und korrespondierenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt (Abbildung 33).

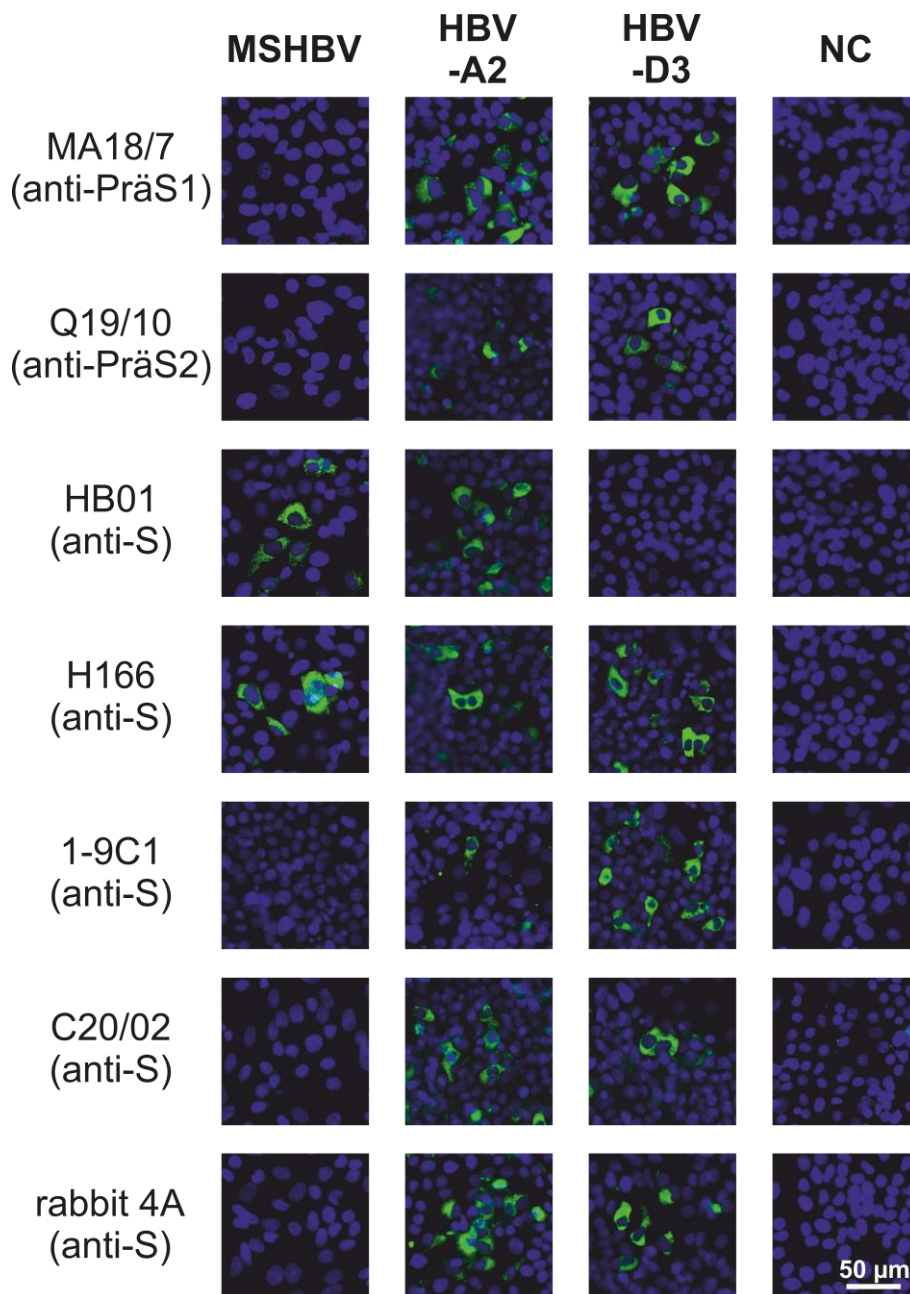


Abbildung 33: Immunfluoreszenz von HBV und MSHBV nach Färbung mit Anti-HBs-Antikörpern. HepG2-Zellen wurden mit Überlänggenkonstrukten von HBV bzw. MSHBV transfiziert, für fünf Tage kultiviert und schließlich fixiert, permeabilisiert und geblockt. Zellen wurden anschließend mit verschiedenen Anti-HBs-Antikörpern inkubiert und mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (grün) für die Immunfluoreszenzauswertung gefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Die monoklonalen Antikörper MA18/7, Q19/10, HB01, 1-9C1 und C20/02 stammen aus Maushybridomazellen. Der monoklonale Mausantikörper H166 war kommerziell erhältlich. Außerdem wurde das polyklonale Antiserum eines Kaninchens nach Immunisierung mit dem konventionellen Impfstoff HBVaxPro verwendet („rabbit 4A“). HBV-A2 – HBV-Subgenotyp A2; MSHBV – Musk Shrew Hepatitis-B-Virus; NC – Negativkontrolle (mit leerem pcDNA3.1(+)-transfizierte Zellen).

Der monoklonale MA18/7-Antikörper erkennt ein Epitop innerhalb der PräS1-Domäne, die nur in LHBs vorkommt. MA18/7 konnte beide HBV-Isolate (HBV-A2, HBV-D3) binden, er erkannte jedoch nicht die Oberflächenproteine von

MSHBV. Auch Q19/10 (Anti-PräS2) reagierte sowohl mit HBV-A2 als auch mit HBV-D3, aber nicht mit MSHBV. Der Anti-S-Antikörper HB01 reagierte mit HBV-A2, aber nicht mit dem Isolat des HBV-D3. Auch bei MSHBV-transfizierten Zellen konnte eine Bindung des HB01 beobachtet werden. Der kommerzielle (mit HB01 überlappende) H166-Antikörper erkannte MSHBV, HBV-A2 und HBV-D3. Der monoklonale 1-9C1-Antikörper reagierte sowohl mit HBV-A2 als auch mit HBV-D3, wobei schwächere Reaktivität bei HBV-A2 als bei HBV-D3 beobachtet werden konnten, jedoch nicht mit MSHBV. Es konnte auch keine Bindung an MSHBV-Oberflächenproteine mit dem konformationellen C20/02-Antikörper beobachtet werden. Dieser erkannte dahingegen sowohl HBV-A2 als auch HBV-D3. Auch das Serum eines Kaninchens, das mit einem konventionellen HBV-Impfstoff immunisiert wurde, reagierte mit beiden HBV-Konstrukten (HBV-A2, HBV-D3), aber nicht mit MSHBV.

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die Oberflächenproteine des MSHBV durch den antikörperbasierten diagnostischen quantitativen HBsAg-Assay des Abbott Architects erkannt werden können. Hierzu wurden HepG2-Zellen mit Überlängenkonstrukten des HBV und MSHBV transfiziert, die Zellkulturüberstände nach fünf Tage geerntet und unverdünnt in den Assay eingesetzt (Abbildung 34).

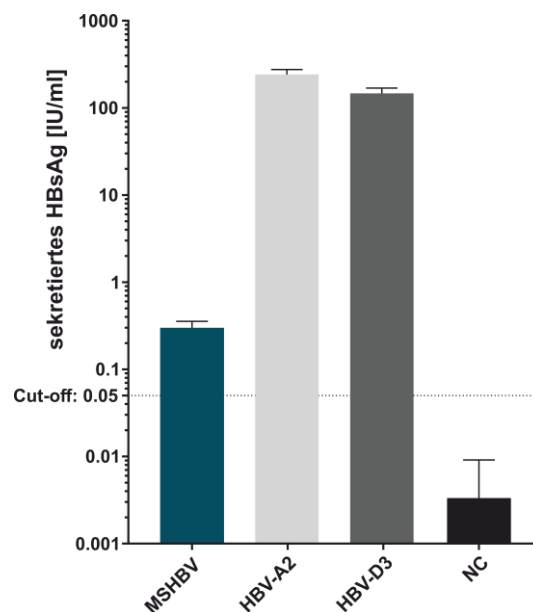


Abbildung 34: HBsAg-Messung nach Transfektion mit HBV und MSHBV. HepG2-Zellen wurden mit Überlängenkonstrukten von HBV und MSHBV transfiziert und für fünf Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und unverdünnt in den quantitativen HBsAg-Assay des Abbott Architects eingesetzt. IU – international unit(s); HBV-A2 – HBV-Subgenotyp A2; MSHBV – Musk Shrew Hepatitis-B-Virus; NC – Negativkontrolle (mit leerem pcDNA3.1(+)-transfizierte Zellen).

Sowohl HBV-A2 als auch HBV-D3 sekretierten eine hohe Menge an HBsAg (257,5 IU/ml bzw. 155,7 IU/ml). Daneben konnte ebenfalls HBsAg in den Überständen nach Transfektion mit MSHBV detektiert werden, jedoch in einer weitaus niedrigeren Konzentration (0,3 IU/ml; Cut-off: 0,05 IU/ml).

7.3.4 Untersuchung der Oberflächenprotein-Rezeptor-Interaktion

Im folgenden Abschnitt wurden die Oberflächenproteine des MSHBV und CSHBV auf ihre Interaktion mit NTCP/Ntcp sowie der virale Eintrittsmechanismus untersucht.

Der Zelleintritt von HBV wird maßgeblich durch eine hochaffine Interaktion zwischen NTCP und der PräS1-Domäne vermittelt [120]. Für diese Bindung sind zum einen zwei Sequenzbereiche des PräS1 wichtig: Eine essentielle und hochkonservierte Bindedomäne (AS 9-15) und zwei variablere, einander angrenzende akzessorische Domänen (AS 28-48), die die Bindung und Infektion verstärken [64]. Zudem ist eine Myristoylierung des Glycin an Position 2 für eine HBV-Infektion notwendig [65, 66]. Zunächst wurde deshalb eine vergleichende Analyse der N-terminalen PräS-Region von HBV, MSHBV und CSHBV durchgeführt (Abbildung 35).

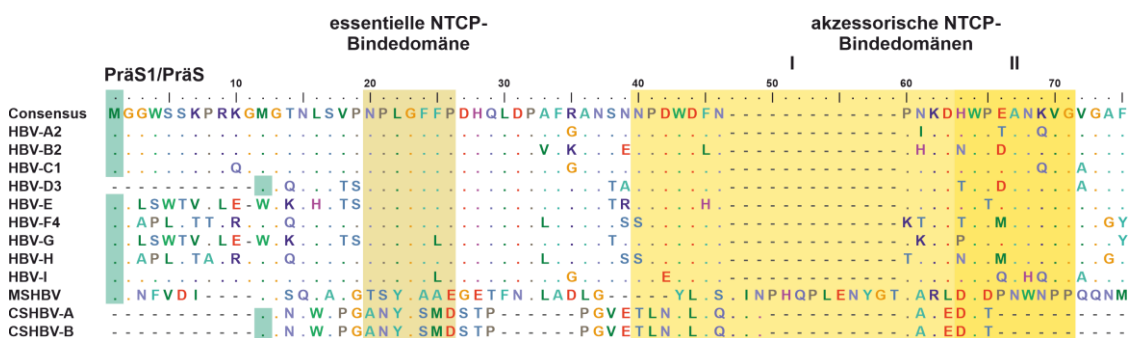


Abbildung 35: Sequenzvergleich der N-terminalen PräS(1)-Region der Oberflächenproteine des HBV, MSHBV und CSHBV. Für das Alignment wurde der MUSCLE-Algorithmus in UGENE verwendet. Das Startcodon des PräS1/PräS-Bereichs ist türkis hinterlegt. Aminosäurereste, die die Interaktion mit NTCP/Ntcp vermitteln, sind gelb hervorgehoben [64]. HBV-Sequenzen entstammen der NRZ-Datenbank (unpubliziert). HBV-A2 – HBV-Subgenotyp A2; MSHBV – Musk Shrew Hepatitis-B-Virus (GenBank-Zugriffsnummer: MK345462); CSHBV-A/B – Crowned Shrew Hepatitis-B-Virus Genotyp A (GenBank-Zugriffsnummer: MK345465) bzw. Genotyp B (GenBank-Zugriffsnummer: MK345467).

Der NTCP/Ntcp-interagierende Bereich des MSHBV und CSHBV zeigt kaum Ähnlichkeiten zu den Sequenzen der humanen HBV-Genotypen. Auch die

PräS1-Bereiche der beiden Spitzmaushepadnavirenspezies MSHBV und CSHBV unterscheiden sich stark zueinander. Die beiden CSHBV-Genotypen sind hingegen identisch.

Die essentielle Domäne (HBV: NPLGGFP) ist nicht in den Spitzmausviren erhalten (MSHBV: TSYGAAE bzw. CSHBV: ANYGSMD). Die akzessorischen Domänen, die auch zwischen den HBV-Genotypen relativ variabel sind, unterscheiden sich auch stark zu den Spitzmaushepadnaviren. Insbesondere das MSHBV besitzt eine 12-AS-Insertion inmitten dieser Domäne. An Position 2 der PräS-Domäne findet sich bei beiden Spitzmaushepadnaviruspezies ein Glycinrest, der myristoyliert werden könnte.

Da das NTCP/Ntcp durch seine Interaktion mit der PräS1-Domäne des großen HBV-Oberflächenproteins den Zelleintritt von HBV vermittelt, sollte zunächst die Funktionalität des Sorex-Ntcp in menschlichen Hepatomzellen überprüft werden. Hierfür wurden HepG2-Zellen mit NTCP- bzw. Sorex-Ntcp-kodierenden Plasmiden transfiziert und die Transporterfunktion mittels NBD-Taurocholat-Importassay zwei Tage nach Transfektion analysiert (Abbildung 36). Da sowohl NTCP als auch der Sorex-Ntcp den Transport von NBD-TC vermitteln, wurden in vergleichbaren Experimenten Peptidbindungsassays mit fluoreszenzmarkierten Myr-PräS1-Peptiden durchgeführt. Dieser Assay diente als experimenteller Nachweis einer Interaktion zwischen NTCP/Ntcp und der PräS1-Domäne der hepadnaviralen Oberflächenproteine. Hier konnte gezeigt werden, dass das HBV-PräS1-Peptid sowohl das humane NTCP als auch das Sorex-Ntcp binden kann. Die beiden Peptide der Spitzmausviren (MSHBV und CSHBV-A) interagierten weder mit NTCP noch mit Sorex-Ntcp.

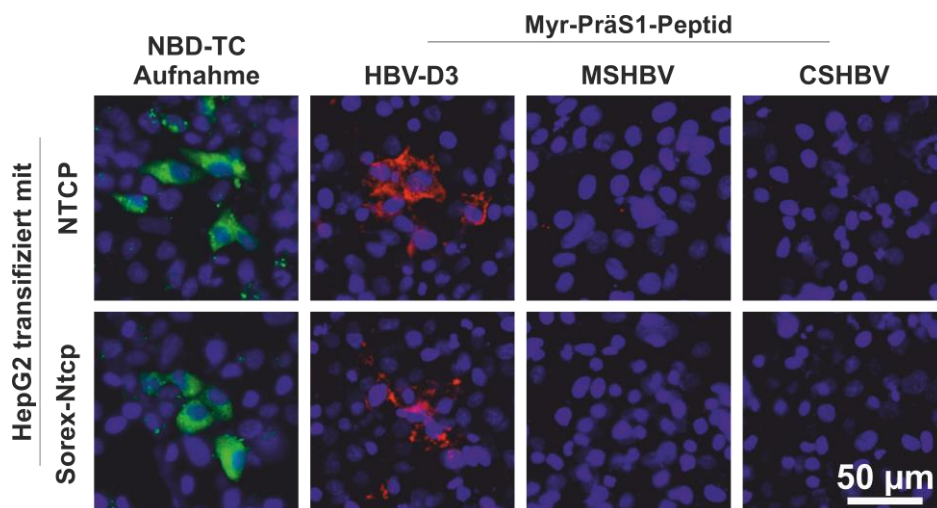


Abbildung 36: Funktionalitätsnachweis und Peptidbindung von NTCP- und Esel-Ntcp-exprimierenden Hepatomzellen. HepG2-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden des humanen NTCP bzw. des Sorex-Ntcp-Orthologs transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen für 15 min mit 5 μ M des NBD-markierten Taurocholat (NBD-TC; grün) oder 100 nM eines synthetischen, fluoreszenzmarkierten und myristoylierten PräS1-Peptids (Myr-PräS1-Peptid; rot) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Zellen mikroskopisch untersucht. Die Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt. HBV-D3 – Isolat des HBV-Subgenotyp D3; MSHBV – Musk Shrew Hepatitis-B-Virus; CSHBV – Crowned Shrew Hepatitis-B-Virus.

Da möglicherweise auch andere Regionen der Oberflächenproteine neben der N-terminalen PräS-Domäne den Zelleintritt der Hepdnaviren aus Spitzmäusen vermitteln könnten, wurden zusätzlich zu den Peptidbindungsassays auch Infektionsexperimente mit pseudotypisierten Deltaviren durchgeführt. Eine Umhüllung von deltaviralen Genomen mit hepadnaviralen Oberflächenproteinen ermöglicht dabei die Untersuchung der Rezeptorspezifität neuartiger Hepadnaviren unabhängig von der hepadnaviralen Replikation. Für eine solche Umhüllung ist ein tryptophanreiches Motiv innerhalb des SHBs notwendig, welches in MSHBV und CSHBV konserviert ist (Abbildung 32A und Abbildung 37A; [212]).

Zunächst wurden CSHBs-, MSHBs- und HBs-pseudotypisierte HDV mittels transienter Kotransfektion eines subgenomischen HBs-Expressionsplasmids und eines HDV-Plasmids in HuH7-Zellen erzeugt (siehe auch Abschnitt 6.2.6). Hierbei wurden Zellkulturüberstände nach Transfektion für bis zu zwei Wochen gesammelt und über Ultrafiltration eingeeengt. Die Virusmenge in den Konzentraten wurde anschließend über eine HDV-spezifische quantitative RT-PCR gemessen (Abbildung 37).

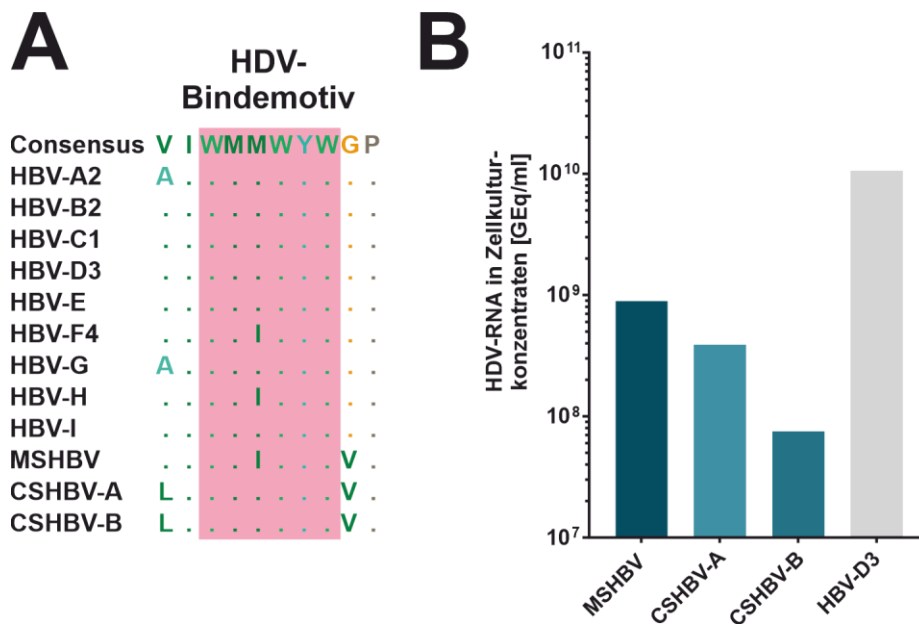


Abbildung 37: Produktion MSHBs-, CSHBs- und HBs-pseudotypisierter HDV. (A) Sequenzvergleich des für die Umhüllung von HDV mit Oberflächenproteinen essentiellen tryptophanreichen Motivs [212]. (B) psHDV-RNA-Konzentration in Zellkulturüberständen nach Ultrafiltration ermittelt über qRT-PCR. HuH7-Zellen wurden transient mit HDV- und MSHBs-, CSHBs- bzw. HBs-Expressionsplasmiden kotransfiziert. Überstände nach Transfektion wurden für bis zu zwei Wochen gesammelt und schließlich über Ultrafiltration eingengt. HDV-RNA aus Viruspartikeln dieser Konzentrate wurde gereinigt und in eine HDV-spezifische quantitative RT-PCR eingesetzt.

Das tryptophanreiche Motiv (HBV: WM(M/I)WYW), welches eine Interaktion zwischen den Oberflächenproteinen und dem HDAg ermöglicht, ist in den Spitzmaushepadnaviren vollständig konserviert. Humanes HDV konnte durch die Oberflächenproteine des CSHBV und MSHBV verpackt und sekretiert werden (psHDV_{MSHBV}: $8,95 \times 10^8$ GEq/ml; psHDV_{CSHBV-A}: $3,92 \times 10^8$ GEq/ml; psHDV_{CSHBV-B}: $7,55 \times 10^7$ GEq/ml). Dabei lag die sekretierte HDV-Konzentration um eine Log₁₀-Stufe niedriger als bei humanen HBV (psHDV_{HBV-D3}: $1,06 \times 10^{10}$ GEq/ml).

Für die Infektion wurden HepG2-Zellen mit dem jeweiligen NTCP/Ntcp transfiziert und zwei Tage nach Transfektion mit den zuvor mit Oberflächenproteinen von HBV, MSHBV bzw. CSHBV-A/-B pseudotypisierten HDV infiziert. Neun Tage nach Infektion wurden die Zellen fixiert und eine Immunfluoreszenz gegen das nach erfolgreicher Infektion produzierte HDAg angefertigt (Abbildung 38).

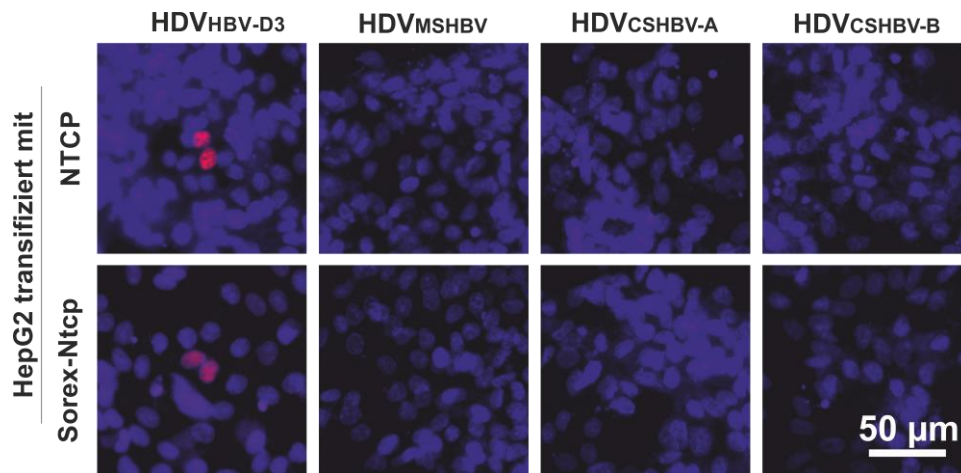


Abbildung 38: *psHDV*-Infektion von NTCP- und Sorex-Ntcp-exprimierenden Hepatomzellen. HepG2-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden des humanen NTCP bzw. des Sorex-Ntcp-Orthologs transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion mit NTCP/Sorex-Ntcp wurden die Zellen mit 1×10^8 Genomäquivalenten pseudotypisiertem HDV (*psHDV*_{HBV}, *psHDV*_{EqHBV-Do}, *psHDV*_{EqHBV-Ze}) für 24 h infiziert. Neun Tage nach Infektion wurden die Zellen fixiert und das nach erfolgreicher HDV-Infektion neu-produzierte HDAg (rot) mittels eines Anti-HDV-positiven Humanserums und entsprechendem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzanalyse vorbereitet. DAPI wurde für die Zellkernfärbung verwendet (blau). *psHDV*_{HBV} – pseudotypisiertes HDV mit Oberflächenproteinen des HBV-D3; MSHBV – Musk Shrew Hepatitis-B-Virus; CSHBV-A/-B – Crowned Shrew Hepatitis-B-Virus Genotyp A bzw. Genotyp B.

Analog zu den Peptidbindungsassays konnten die Oberflächenproteine des HBV dem HDV_{HBV} sowohl den Zelleintritt über NTCP als auch über das Sorex-Ntcp vermitteln. Dagegen konnten keine Infektionseignisse mit den Spitzmaus-Oberflächenproteinen-umhüllten HDV (HDV_{MSHBV}, HDV_{CSHBV-A}, HDV_{CSHBV-B}) beobachtet werden.

8. Diskussion

8.1 Charakterisierung der Antigenität hyperglykosylierter HBV-Escapevarianten

Diagnostische und Immunescapevarianten des HBV stellen ein zunehmendes Problem in der globalen Eindämmung von HBV dar. Einzelne Mutationen in den antigenen Bereichen des HBV-Oberflächenproteins können bereits ausreichen, um sich der Erkennung durch diagnostische und/oder Impfstoff-generierte Antikörper zu entziehen (Escape) [164]. Da N-Glykosylierungen eine der wichtigsten post-translationalen Modifikationen in humanen Zellen sind, nutzen insbesondere Viren häufig N-Glykosylierungen als Mittel des Immunescape [53, 151, 240]. In dieser Arbeit wurden deshalb simultan aufgetretene klinische HBV-Varianten, die zusätzliche N-Glykosylierungsmotive trugen, genauer untersucht. Die präsentierten Ergebnisse (Abschnitt 7.1) sollen im Folgenden bezüglich der Ursache für Immun- und diagnostischen Escape diskutiert werden. Außerdem soll insbesondere der mögliche Einfluss dieser Escapemutationen auf die virale Replikation und ihre klinische Relevanz im Vergleich zu Ergebnissen der Literatur erörtert werden.

Die direkte Sequenzierung eines HBV-S-spezifischen PCR-Amplifikats (Abbildung 6) zeigte eine wenig variable Sequenz bis Nukleotid 123 (korrespondierend mit AS 125 des SHBs), wohingegen die weiter 3'-gelegene Sequenz jedoch starke Signalüberlappungen zeigte (Abbildung 6). Durch Klonierung dieses HBs-Fragments in Sequenziervektoren konnte gezeigt werden, dass diese Sequenzdivergenz durch eine Teilpopulation mit 6 nt-Insertion (an AS 125) hervorgerufen wurde (Cluster 4) (Abbildung 7). Da bei der Sanger-Sequenzierung alle erhaltenen Einzelsequenzen überlagert werden, führte diese 6 nt-Insertion bei direkter Sequenzierung zu einem Vershub und somit zu überlappenden Signalen. Alternativ zur Klonierung wäre auch eine „Nächste-Generationen-Sequenzierung“ (NGS) des PCR-Produkts denkbar gewesen, um aufgeschlüsselte Sequenzinformationen zu erhalten. Jedoch ist die Auswertung solcher Daten komplexer als das in dieser Arbeit verwendete Verfahren.

Die entdeckten Virusvarianten konnten dem HBV-Subgenotypen D3 (HBV-D3) in vier Clustern mit distinkten Sequenzmustern zugeordnet werden: Cluster 1 besaß eine für HBV-D3 untypische Serotypenmutation T127L (Serotyp ayw4) [17], Cluster 2 zeigte eine G130N- (Sequon) und eine T131I-Mutation, Cluster 3 die Mutationen G130R, T131N/M133T (Sequon) mit K141I und Cluster 4 eine bislang unbeschriebene 6 nt-Insertion (C¹²⁴-NC-T¹²⁵) mit zusätzlicher N-Glykosylierungsstelle. Diese vier Cluster sollten anschließend phänotypisch untersucht werden.

Aufgrund der kompakten Struktur des HBV-Genoms können Nukleotid-austausche im S-ORF auch simultane Änderungen im überlappenden Polymeraseprotein verursachen (Abbildung S1 (Anhang)) und damit Einfluss auf die virale Replikationsfähigkeit haben. Da keine Nonsense-Mutationen oder Veränderungen des katalytischen YMDD-Motivs [46] in den Polymerase-sequenzen der untersuchten Varianten festgestellt werden konnten, kann grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass diese Varianten in vivo eigenständig replikativ waren. Experimentelle Daten zur viralen Fitness von Varianten innerhalb des Polymeraseproteins wurden bisher, aufgrund der großen klinischen Bedeutung, fast ausschließlich zu solchen Mutationen erhoben, die Therapeutikaresistenzen verursachen [241-243]. Dahingegen gibt es nur wenige Studien, die die Replikationsfähigkeit von Polymerase-Mutationen aufgrund von HBs-Immunescape untersucht haben. Eine Studie von Jammeh et al. konnte zeigen, dass die rtK149R-Mutation (HBV-C, sK141E) einen Verlust an Replikationskapazität von 5 log₁₀-Stufen im Vergleich zu einer Referenzsequenz aufwies [244]. Eine Mutation an derselben Stelle (rtQ149H; sK141I) konnte auch in dieser Arbeit festgestellt werden (Cluster 3). Ob diese Mutation einen ähnlichen Effekt wie rtK149R auf das virale Replikationsvermögen der hier analysierten HBV-Variante des Subgenotyps D3 hat, muss zukünftig experimentell untersucht werden. Die T131N/M133T-Doppelmutation (auch Cluster 3) hatte dagegen in zwei unabhängigen Studien keinen Effekt auf die virale Replikation [245, 246].

Experimentell konnte in dieser Arbeit eine N-Glykosylierung an den natürlich aufgetretenen Resten N130 (Cluster 2), N131 (Cluster 3) und N125 (Cluster 4) gezeigt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Ergebnissen von Julithe et al., die eine erfolgreiche N-Glykosylierung an rein experimentellen

Sequons zwischen AS 114-146 des SHBs nachweisen konnten, wohingegen keine N-Glykosylierung weiter N- noch C-terminal gelegen (AS 40 und 52 bzw. 165-208) möglich war [247]. Diese Ergebnisse lassen sich mit der Membrantopologie des SHBs erklären (Abbildung 2): AS40-52 befinden sich bei der Proteinsynthese im Zytosol, wo keine N-Glykosylierung stattfinden kann, und AS165-208 stellen die Transmembrandomänen III und IV dar und sind daher für eine Modifikation unzugänglich. Es ist zudem erwähnenswert, dass die G130N-Mutation zwar bereits zuvor beschrieben wurde [248], jedoch diese Arbeit den ersten experimentellen Nachweis der N-Glykosylierung an N130 darstellt. Die Vorhersage-Software NetNGlyc ergab zuvor eine geringere Wahrscheinlichkeit für N-Glykosylierung der zusätzlichen Sequons als für die kanonische N-Glykosylierungsstelle an N146. Die doppelt-glykosylierte Form des SHBs (ggp30) war aber in allen Clustern mit zusätzlichem N-Glykosylierungsmotiv die häufigste Isoform. Eine ähnliche Glykosylierungseffizienz der kanonischen und jeweiligen nicht-kanonischen N-Glykosylierungsstelle ließe sich also annehmen.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die ggp30-Glykoform am effizientesten sekretiert wurde (Abbildung 8C). Julithe et al. konnten bereits zeigen, dass zusätzliche N-Glykosylierungen die Sekretionseffizienz von subviralen HBV-Partikeln (und HDV) erhöhen konnten. Dabei ging eine zusätzliche N-Glykosylierungen in dieser Studie allerdings auch mit gesenkter Infektiosität einher [247]. Da manche HBV-Immunescapemutationen wie G145R mit reduzierter HBsAg-Sekretion assoziiert sind, können zusätzliche N-Glykosylierungen bei HBV außerdem als kompensatorische Mutationen zum Ausgleich dieses Sekretionsdefizits dienen [249, 250]. Für die G130R-Mutation (Cluster 3) konnte bereits ein vollständiger Verlust an Virussekretion ohne Einfluss auf die total-sekretierte Menge an HBsAg gezeigt werden [250], welcher möglicherweise auf die unterschiedlichen Sekretionswege von Virionen und SVP zurückzuführen ist (Abbildung 4) [133]. Um herauszufinden, ob die zusätzlichen N-Glykosylierungen auch bei den präsentierten Varianten einen positiven Effekt auf die Sekretionskompetenz der Virusvarianten haben, könnten zusätzliche Experimente mit Konstrukten, die ausschließlich die Immunescapemutationen, nicht aber die neuen N-Glykosylierungsstellen

beinhalten, durchgeführt und mit den in dieser Arbeit beschriebenen Konstrukten verglichen werden.

Die Untersuchung subviraler Partikel bestehend aus HBsAg des Clusters 2 (G130N, T131I) in zwei diagnostischen Assays zeigte unterschiedliche Ergebnisse (Abbildung 9). Im Architect-HBsAg-Assay konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Cluster 2 und der Referenz festgestellt werden, der Liaison-Assay ergab jedoch einen signifikant geringeren Messwert (Abbildung 9). Thibault et al. konnten bei der Untersuchung des quantitativen Liaison-HBsAg-Assay (Liaison XL Murex) feststellen, dass dieser Test HBsAg mit Escapemutationen wesentlich häufiger unterquantifizierte als der vergleichbare quantitative HBsAg-Assay des Architects (60,8 % vs. 39 % Unterquantifizierungsrate), welcher auch in dieser Arbeit verwendet wurde [251]. Unter der Annahme, dass sich überschneidende (oder identische) Antikörper in den qualitativen und quantitativen Liaison-HBsAg-Assays zur Verwendung kommen, wäre eine Unterquantifizierung des Cluster 2-HBsAg im Vergleich zum Architect-Assay plausibel und würde so den Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Assays erklären. Cluster 3-HBsAg (G130R, T131N, M133T, K141I) wurde durch beide in dieser Arbeit verwendeten Assays nur kaum und Cluster 4-HBsAg (6 nt-Insertion) gar nicht erkannt. In der oben genannten Studie um Thibault et al. wurde HBsAg mit einem ähnlichen, aber erweiterten Mutationsmuster zu Cluster 3 untersucht (S114P, Q129L, G130R, T131N, M133T, Y134W). Diese HBsAg-Variante konnte im Architect-Assay (und einem HBsAg-Elecsys-Assay (Roche)) nur kaum und im Liaison-Murex-Assay gar nicht nachgewiesen werden [251]. Ob nun eine einzelne Mutation oder eine Kombination aus Mutationen bzw. die zusätzliche N-Glykosylierung diesen diagnostischen Escape hervorgerufen hatte, wurde in der Studie leider nicht weiter untersucht. Eine andere, unabhängige Studie konnte das Nachweisversagen des Elecsys-Assays für HBsAg mit der T131N/M133T-Mutation nochmals bestätigen [246]. Der vollständige diagnostische Escape des Cluster 4-HBsAg könnte durch Zerstörung (Insertion) oder Verdeckung (N-Glykan) der Epitope der in den Assays verwendeten monoklonalen Antikörper hervorgerufen worden sein. Eine weitere mögliche Erklärung wäre eine strukturelle Änderung der HBsAg-Tertiärstruktur aufgrund verschobener Disulfidbrücken, da die Insertion einen zusätzlichen Cysteinrest beinhaltet.

Zwar führe eine solche strukturelle Anpassung zu immunologischem (und daraus resultierendem diagnostischem) Escape, würde allerdings auch sehr wahrscheinlich die Infektionsvermittlung über die S-Domäne fundamental stören und die Viren attenuieren. Diese Theorie ließe sich mit Infektionen von Cluster 4-HBsAg-pseudotypisierten HDV untersuchen.

Die HBsAg-Bestätigungstests (Abbildung 9B) konnten HBsAg der Cluster 1, 2 und 3 richtig-positiv nachweisen, wobei Cluster 3-HBsAg eine geringere Reaktivität zeigte. Cluster 4-HBsAg lieferte falsch-negative Ergebnisse. Dieselben Effekte, die auch bei den HBsAg-Assays zu starkem bzw. vollständigem Reaktivitätsverlust geführt haben, könnten auch in den Bestätigungstests eine Rolle gespielt haben, da diese auch auf einer Immunkomplexreaktion von testinternen Anti-HBs-Antikörpern mit dem zu untersuchendem HBsAg beruhen. Auch für die HBsAg-Bestätigungstests sind die Epitope der verwendeten Anti-HBs-Antikörper nicht bekannt, was eine Interpretation der beschriebenen Unterschiede in der Erkennung zwischen Cluster 1/2 und Cluster 3 erschwert.

Die Ergebnisse der Reaktivität von Anti-HBs aus HBV-Geimpften (Impfstoff des HBV-A2, Serotyp *adw2*) und -Genesenen (Abbildung 11) ähnelten den Daten aus den diagnostischen Nachweismethoden. Interessanterweise reagierten die verwendeten Anti-HBs-Antikörper stärker mit Cluster 1-HBsAg als mit der HBV-D3-Kontrolle, wobei aber keine Signifikanz erreicht wurde. Hierbei könnte eine generell bessere Bindung der *adw2*-spezifischen (geimpft) und anderen heterologen Anti-HBs-Antikörpern (genesen) an den *ayw4*-Serotypen (Cluster 1) im Vergleich zur *ayw3*-Referenz vermutet werden. Da sich diese beiden Serotypen allerdings nur in einem Aminosäureaustausch unterscheiden (*ayw3*: T127, *ayw4*: L127), scheint eine solche Erklärung eher unwahrscheinlich. Cluster 2 (G130N, T131I) reagierte schwächer mit Impf- und konvaleszenten Antikörpern, bei Clustern 3 und 4 wurden nur noch sehr geringe Restreaktivitäten beobachtet. Dies könnte mehrere Hintergründe haben: Das Vorhandensein bekannter Immunescapemutationen bzw. zusätzlicher N-Glykosylierungen, aber auch die Veränderung der klassischen „w“/„r“-Determinante (Cluster 2-4: L127R/P/V) sowie bei Cluster 3 der „d“/„y“-Determinante (K160N). Diese Effekte könnten alleine oder auch synergetisch zu einem Bindungsversagen durch Anti-HBs geführt haben. Zur weiteren

Analyse dieser Frage ist wichtig, welche HBsAg-Regionen maßgeblich als Epitope für polyklonaler Anti-HBs-Antikörper dienen. Für die Immunprophylaxe nach HBV-Exposition werden vorrangig aus Serum geimpfter Personen gewonnene Anti-HBs-Antikörper (HBIG) eingesetzt. Eine Studie um Tarafdar et al. konnte bereits zeigen, dass HBIG verschiedener Produktionschargen gemeinsame Hauptepitope des HBsAg erkennen konnten [252], welche in Tabelle 24 dargestellt sind.

Tabelle 24: Durch HBIG-erkannte Hauptepitope des HBsAg [252]. Hochgestellte Nummern geben die Position der jeweiligen Aminosäure innerhalb der S-Domäne an.

Epitop	Sequenz
1	Q ¹⁰¹ GM ¹⁰³
2	C ¹²¹ (R/K)TC ¹²⁴
3	M ¹³³ (Y/F)P ¹³⁵
4	T ¹⁴⁰ KPSDG ¹⁴⁵
5	I ¹⁵² PS ¹⁵⁴

Da die HBIG-Antikörper ausschließlich nach Impfung mit dem konventionellen Impfstoff (Serotyp *adw2*) gewonnen werden, können die Ergebnisse der Impfantikörperreaktivitäten dieser Arbeit direkt mit der genannten Studie verglichen werden.

Mutationen des Cluster 2 (G130N, T131I) liegen zwar außerhalb der beschriebenen Hauptepitope (Tabelle 24), die T131I-Mutation konnte allerdings bereits zuvor mit Antikörpererevasion assoziiert werden [253]. Für die G130N-Mutation konnte in einer Studie mit einem HBV-Isolat des Serotyp *adr* gezeigt werden, dass einer von vier darin verwendeten monoklonalen Anti-„a“-Antikörper aufgrund dieser Mutationen nicht mehr gegen HBsAg reaktiv war, die verbliebenen jedoch keine Änderung in ihrem Bindungsverhalten zeigten. Außerdem reagierten auch monoklonale Antikörper gegen die anderen vorhandenen Determinanten („d“ und „r“) mit G130N-HBsAg [248]. Es scheint also plausibel, dass die G130N-Mutation die Antigenität der „a“-Determinante nur gering beeinflusst. Deshalb ist es wahrscheinlicher, dass der beobachtete partielle Immunescape des Cluster 2-HBsAg eher durch die T131I-Substitution und nicht aufgrund der zusätzlichen N-Glykosylierung verursacht wurde.

Bei Cluster 3 liegen T131N/M133T und K141I innerhalb bzw. in direkter Nähe der beschriebenen Hauptepitope 3 und 4. Vergleichbar zu den Ergebnissen dieser Arbeit (Abbildung 9 und Abbildung 11) konnte für eine K141E-Mutation

in zwei Studien ein vollständiger Verlust der Anti-HBs-Reaktivität von mono- bzw. polyklonalen Antikörpern gezeigt werden [244, 254]. Interessanterweise trat in einer der beiden Studien die K141E-Variante bei einem Patienten simultan mit (eigentlich) protektivem Anti-HBs-Titer, wie auch bei Patienten aus dieser Arbeit (Abschnitt 7.1.1), auf [244]. Die Doppelmutation T131N/M133T des Cluster 3 führte zudem in einer Studie um Kang et al. zu einer verminderten HBsAg-Bindung durch monoklonale Anti-HBs-Antikörper im ELISA [245]. Für die auch in Cluster 3 aufgetretene G130R-Mutation hingegen konnte kein Einfluss auf Anti-S-Antigenität festgestellt werden [250]. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die K141I-Mutation alleine oder in Kombination mit der N-Glykosylierung zu dem Verlust der Anti-S-Antigenität des Cluster 3-HBsAg in dieser Arbeit führte.

Der Antigenitätsverlust des HBsAg von Cluster 4 könnte auch bei der Reaktivität mit Anti-HBs-positiven Seren auf die bereits oben genannten Punkte (Epitopzerstörung durch Insertion, Glykosylierung, strukturelle Änderung aufgrund des zusätzlichen Cysteinrests) zurückzuführen sein.

Da die Insertion des Cluster 4-HBsAg nur benachbart, aber nicht innerhalb des Hauptepitops 2 liegt, lässt sich vermuten, dass nicht die Insertion per se, sondern die zusätzliche N-Glykosylierung, oder, wie bereits oben beschrieben, eine mögliche Tertiärstrukturänderung aufgrund des zusätzlichen Cysteinrests dem vollständigen diagnostischen und Immunescape bei Cluster 4 zugrunde liegt.

Übergreifend wird die Interpretation der Daten der Anti-HBs-Reaktivität aus natürlicher Infektionen durch fehlende Informationen der Serotyp-Spezifität eingeschränkt. Allerdings konnten keine starken Unterschiede in den HBsAg-Reaktivitäten dieser Seren untereinander innerhalb der jeweiligen HBsAg-Varianten beobachtet werden, was für ein allgemeines Bindungsversagen an diese Varianten unabhängig des Anti-HBs-induzierendem HBV-Serotyp spricht.

Zukünftig sollten diese Virusvarianten zusätzlich auf ihre Infektiosität hin untersucht werden. Hierfür wären zunächst Infektionen mit pseudotypisierten Deltaviren wichtig, um die Infektionsvermittlung der S-Mutanten unabhängig von deren Einfluss auf das überlappende Polymerase-Protein oder andere HBV-spezifische regulatorische Elemente zu untersuchen. Anschließend

könnte man den gesamten Replikationszyklus insbesondere in Anbetracht der Replikations- und Sekretionsfähigkeit mittels vollwertiger Viren dieser Varianten *in vitro* untersuchen. Einschränkend hierbei war das Fehlen einer vollständigen HBV-Genomsequenz, die aufgrund der geringen HBV-Viruslast des Patienten mittels PCR nicht amplifizierbar war. Zur Amplifikation musste auf eine Polymerase mit hoher Lese-/Schreibgenauigkeit („proof-reading“) zurückgegriffen werden, um keine artifiziellen Mutationen zu generieren. Dies geht jedoch zwangsläufig zu Lasten der Amplifikationseffizienz. Für eine weiterführende Analyse wäre das Einfügen der spezifischen Mutationen (alleine oder in Kombination) in das HBV-D3-Referenzgenom mit definierter Infektiosität *in vitro* ein geeignetes weiteres Vorgehen.

Die weitere Untersuchung dieser Varianten mit Kombinationen aus Immunescape- und N-Glykosylierungsmutationen ist von hoher klinischer Relevanz. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Viren mit Immunescapemutationen wie z.B. G145R horizontal und vertikal übertragen werden können [165, 166, 255]. Im Gegensatz dazu ist jedoch nur wenig über die Übertragbarkeit von Varianten mit zusätzlichen N-Glykosylierungsstellen bekannt: So konnte bislang nur eine Studie um Yu et al. zeigen, dass die N-Glykosylierungsmutante Q129N horizontal übertragbar zu sein scheint [256].

Zusammenfassend haben die in dieser Arbeit präsentierten Daten verdeutlicht, dass die Identifizierung und molekulare Untersuchung von Immun- und diagnostischen Escapevarianten weiterhin von großer klinischer Bedeutung sind. Besonderes Augenmerk sollte hierbei auf die neuentdeckte 6 nt-Insertion des Clusters 4, die zu einem vollständigen immunologischen und diagnostischen Escape geführt hatte, gelegt werden.

8.2 Charakterisierung der Antigenität und Infektiosität neuartiger Hepadnaviren aus Equiden und Spitzmäusen

Die präsentierten Ergebnisse zu neuartigen Orthohepadnaviren (Abschnitte 7.2 und 7.3) werden im Folgenden diskutiert. Zunächst soll die Konservierung

essentieller antigenen und strukturbedingender Elemente innerhalb der Strukturproteine HBcAg und HBsAg sowie des HBeAg dieser tierischen Hepadnaviren erörtert werden. Es soll zudem diskutiert werden, ob von diesen Viren ein mögliches zoonotisches Potential ausgeht, insbesondere in Bezug auf die Konservierung des viralen Eintrittsmechanismus via NTCP/Ntcp.

8.2.1 Analyse des HBcAg und HBeAg

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, ist das Core-Protein (HBc) als Strukturprotein innerhalb der Orthohepadnaviren konserviert (Abschnitt 3.1.2.2). Es ist von essentieller Rolle im viralen Lebenszyklus, da die HBV reverse Transkription nur innerhalb der vollständig aus Core-Proteinen bestehenden Core-Partikel stattfinden kann [13]. HBcAg ist zudem hochimmunogen und wird deshalb auch z.B. als immunaktivierender Carrier für Peptide bei Immunisierungen verwendet [257, 258].

Das Core-Protein des EqHBV ist 190 AS und das PräC 28 AS lang und besitzt eine ähnliche Länge, sowie eine relativ hohe Similarität zu HBV/WHV (61-70 % Similarität; Abbildung 12). Die Spitzmaushepadnaviren CSHBV/MSHBV besitzen 181 AS-lange Core-Proteine (53-58 % Similarität zu HBV/WHV; Abbildung 27), jedoch erstaunlicherweise keinen PräC-Bereich (CSHBV) bzw. translationsterminierende Mutationen im PräC (MSHBV) (Abbildung 29).

Nach Transfektion der 1.5mer-Überlängen konnte in EqHBV-transfizierten Zellen lediglich durch polyklonales Anti-CSHBc und Anti-WHc, nicht aber durch Anti-HBc-Antikörper, eine schwache, aber spezifische Färbung festgestellt werden (Abbildung 14). Das Core-Protein des EqHBV ist auf Proteinebene auch dem WHV (70 %) ähnlicher als dem HBV (61-67%). Insbesondere der immundominante Loop (AS 78-83; [77]) des EqHBV (TRMIAW; identische AS unterstrichen) ist dem WHV (TKLIAW) näher als dem des HBV (M(T/N/S)LATW).

Im Vergleich zu anderen Orthohepadnaviren sind die Core-Proteine der Spitzmaushepadnaviren generell divergenter als das des EqHBV. Zu HBV zeigen CSHBV und MSHBV 53-58 % Similarität, zu WHV nur 53 % (Abbildung 27). Trotz der hohen Sequenzdivergenz konnten Kaninchenantikörper nach WHc-Immunisierung mit MSHBc kreuzreagieren (Abbildung 28). Dies ließe sich wiederum durch die relative Konservierung des immundominanten Loops an AS

78-83 [77] erklären: Dieser unterscheidet sich nur wenig zwischen den Spitzmausviren (MSHBV: NKLLDW, CSHBV: NKLIQW) und ist dem WHV ähnlich (TKLIAW). Zudem konnte gezeigt werden, dass Anti-WHc-Seren aus Kaninchen zusätzlich mit einem weiteren Bereich des HBc reagieren (AS121-165) [259]. Auch dieser Bereich unterscheidet sich nur wenig zwischen MSHBV und WHV. Von den drei HBV-abgeleiteten Anti-HBc-Seren kreuzreagierte nur eines mit MSHBc (SY6964; Abbildung 28). Der immundominante Loop des HBV (M(T/N/S)LATW) unterscheidet sich ebenfalls stark von dem des MSHBV. Möglicherweise spielt bei dem kreuzreaktiven Kaninchenserum auch das beschriebene Epitop um AS121-165 [259] eine Rolle, welches ähnlich dem WHV auch zwischen HBV und MSHBV stärker konserviert ist. Zueinander zeigen die Spitzmausviren eine höhere Similarität (87-88 % CSHBV vs. MSHBV; Abbildung 27). Auch hier konnte eine Kreuzreaktivität von Anti-CSHBc zu MSHBV-Core nachgewiesen werden (Abbildung 28). Zukünftig könnte man anstelle der polyklonalen Antiseren vorrangig monoklonale Antikörper verwenden, um genauere Kartierungen definierter Core-Epitope zu untersuchen.

Ferner ist der Nachweis des HBc auch ein eindeutiger Hinweis auf die korrekte Transkription der prägenomischen RNA (pgRNA) dieser neuartigen Hepadnaviren, da das Core-Protein von der pgRNA translatiert wird (siehe Abschnitt 3.1.4). Da die Expressionsplasmide der hier beschriebenen Viren endogene virale Promotoren verwenden, müssen daher auch alle nötigen Transkriptionsfaktoren für die pgRNA-Synthese in menschlichen Hepatomzellen vorhanden und kompatibel sein.

Neben dem Strukturprotein HBc sollte auch das sequenziell-verwandte HBeAg auf dessen Konservierung in den tierischen Hepadnaviren untersucht werden. Die Signalpeptidanalyse gab für EqHBV mit hoher Wahrscheinlichkeit eine vorhandene Schnittstelle an derselben Position wie bei HBV an (Abbildung 15). Auch weitere, wichtige Aminosäuren (C-7, WLW-Motiv) in der PräC-Sequenz waren im EqHBV konserviert. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die potentiellen Signalpeptidsequenzen der Spitzmaushepadnaviren stark von denen des HBV (Abbildung 29). Eine Signalpeptidaseschnittstelle ist allerdings für das CSHBV rein putativ, da dieses wie bereits beschrieben kein PräC-Startcodon besitzt. Zudem finden sich in CSHBV und MSHBV Stopp-Codons

an AS -2, welche eine Translation des HBeAg-Vorläuferpolypeptids in jedem Fall verhindern würden und auch bei chronischen HBV-Trägern bei Anti-HBe-Serokonversion häufig auftreten [85]. In bisherigen Untersuchungen von natürlich-infizierten Spitzmäusen konnten bislang keine Isolate mit funktionalem PräC-Bereich identifiziert werden und es konnte außerdem nicht sicher nachgewiesen werden, ob diese Hepadnaviren nur akute oder auch chronische Infektionen auslösen [37]. Da HBeAg beim Menschen (HBV) sowie bei Nagetieren wie dem Walddarmmeltier (WHV) für die Etablierung einer persistierenden Infektion essentiell ist [78, 260], ließe sich vermuten, dass CSHBV und MSHBV in ihren Wirten nur akute Infektionen verursachen. Möglicherweise ist aber ein Immunmodulator wie das HBeAg in den Insektenfressern auch nicht wie bei Menschen notwendig, da auch andere Viren wie Arena- oder Hantaviren, die im Menschen nur akute Infektionen auslösen, in tierischen Reservoiren langfristig persistieren können [261, 262]. Für das hier untersuchte MSHBV-Isolat konnte zudem keine potentielle Schnittstelle durch die verwendete Software vorhergesagt werden. Im Gegensatz dazu konnte in einem anderen MSHBV-Isolat chinesischer Spitzmäuse (MSHBV_{CHN}) zwar ein potenzielles Signalpeptid vorhergesagt werden, aber auch bei diesem Isolat (und anderen Isolaten des MSHBV_{CHN}) lag ein Stopp-Codon an AS -2 vor [37]. Bei den beiden CSHBV-Genotypen wurde eine Schnittstelle angegeben, die allerdings einen wesentlich längeren N-terminalen Rest des PräC-Bereichs als im HBV bedeuten würde (Abbildung 29).

Im folgenden HBeAg-Prozessierungsschritt wird die C-terminale, argininreiche Domäne des HBeAg-Propeptids durch Furin abgetrennt. Experimentell belegt sind bereits die Verwendung des ersten Furinmotivs (non-HBV-A) bzw. des Motivs 2 und des besonderen Motivs A (HBV-A) [80, 81]. Die Analyse mittels zweier Vorhersagesoftwares präferierte sowohl bei allen HBV-Genotypen als auch bei EqHBV die RRRR-Motive 3 und 4 (Abbildung 16). Eine Verwendung dieser Schnittstellen wäre grundsätzlich auch nicht ausgeschlossen, sofern im weiteren Verlauf die weiter N-terminal gelegenen Schnittstellen nachträglich verwendet werden. Bei EqHBV wurde das C-terminalste Motiv 3 als am wahrscheinlichsten von beiden Programmen eingestuft. Am zweitwahrscheinlichsten wurde durch PiTou das Motiv 1 und durch ProP das Motiv B angegeben. Bioinformatische Analysen der Orthohepadnaviren legen die

Vermutung nahe, dass das dritte RxxR-Motiv die archaische Propeptidschnittstelle darstellt und die HBV-typischen Motive erst später hinzukamen [58]. Dies würde sich mit den Ergebnissen der Schnittstellen-Vorhersagesoftwares für das EqHBV decken. Welche Schnittstelle im sekretierten HBeAg des EqHBV nun tatsächlich präferenziell verwendet wird, muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden. Diese Fragestellung ließe sich mittels gezielter Mutagenese der individuellen (möglichen) Schnittstellen ähnlich zu den Experimenten der Studie um Messageot et al. klären [80]. Im Gegensatz dazu besitzen CSHBV/MSHBV ausschließlich das Motiv 2 und die postulierte archaische Furinschnittstelle 3 fehlt. Dies könnte als weiterer Hinweis auf die genetische Abwesenheit eines HBeAg-Homologs in den Hepadnaviren der Spitzmäuse gedeutet werden.

Die in dieser Arbeit präsentierten bioinformatischen Daten sprechen für konservierte Mechanismen der HBeAg-Prozessierung des EqHBV. Sekretiertes HBeAg des EqHBV konnte zudem im diagnostischen Assay (für HBeAg des HBV) nachgewiesen werden (55,1 S/CO) (Abbildung 17). Die im diagnostischen Assay benötigten Antikörperepitope scheinen also (zumindest teilweise) konserviert zu sein. Für MSHBV wurde auch ein Signal im HBeAg-Assay detektiert (5,2 S/CO) (Abbildung 31), obwohl die bioinformatischen Analysen die Produktion eines HBeAg ausschlossen. Der im selben Experiment verwendete, nachweislich HBeAg-negative HBV-G zeigte ein vergleichbar hohes, allerdings falsch-positives Signal (7,9 S/CO). Das erhaltene Signal für MSHBV lässt sich daher eher als falsch-positiv einstufen, da nach Transfektion von replikationsfähigen hepadnaviralen Expressions-Plasmiden in der Zellkultur auch stets nicht-umhüllte Core-Partikel sekretiert werden [13], welche überlappende B-Zell-Epitope mit HBeAg aufweisen [257]. Der Assay erkennt also nicht nur sekretiertes HBeAg, sondern kreuzreagiert auch teilweise mit dem Core-Protein (Abbildung 31).

8.2.2 Analyse des HBsAg

Das SHBs des EqHBV zeigte zum HBV eine Aminosäure-Similarität von 65-67 %, CSHBV von 55-58 % und MSHBV von 53-55 %. Trotz der hohen Sequenzdivergenz sind im EqHBV und den Spitzmausviren alle acht Cysteine, die für die korrekte Tertiärstruktur und somit Infektionsvermittlung des HBsAg

notwendig sind, sowie vier sekretionsrelevante Aminosäurereste erhalten (Abbildung 18 und Abbildung 32). Es ließe sich also spekulieren, dass die dreidimensionale Struktur des SHBs sowohl in CSHBV/MSHBV als auch in EqHBV konserviert ist und das SHBs wie im HBV primär als Bindungspartner für HSPGs der Zelloberfläche fungieren könnte. Trotzdem ist die große hydrophile Region (MHR) des CSHBV/MSHBV und EqHBV stark variabel. Dies erklärt auch die Unfähigkeit fast aller monoklonalen Antikörper an die tierischen HBsAg zu binden. Lediglich das Epitop des HB01/H166 ist in den Spitzmausviren erhalten und konnte auch in der Immunfluoreszenz gegen einen Vertreter der Hepadnaviren aus Spitzmäusen (MSHBV) nachgewiesen werden (Abbildung 33). Ebenfalls konnte ein schwaches, aber spezifisches Signal bei MSHBV-HBsAg in einem diagnostischen HBsAg-Assay ermittelt werden (0,3 IU/ml, Cut-off: 0,05 IU/ml; Abbildung 34). Obwohl die Antikörper des diagnostischen Assays nicht bekannt sind, lässt sich hierdurch vermuten, dass mindestens ein Antikörper an einem zu HB01-analogen Epitop bindet, da die Region AS119-125 der S-Domäne ein häufig auftretendes Ziel monoklonaler Mausantikörper ist [230]. Im Gegensatz zu MSHBV reagierte der HB01-Antikörper nicht mit dem HBV-D3-Isolat, was durch einen T125M-Austausch (Abbildung 32), welcher zu einem vollständigen Bindungsverlust führt [230], erklärt werden kann. Vergleichend hierzu konnte das EqHBV weder in der Immunfluoreszenz noch im diagnostischen Assay nachgewiesen werden (Abbildung 20), was auf die hohe Divergenz zurückzuführen sein könnte. Auch die beiden PräS-spezifischen monoklonalen Antikörper MA18/7 und Q19/10 konnten tierisches HBsAg nicht binden, da die Epitope beider Antikörper in den tierischen Orthohepadnaviren nicht erhalten waren. Außerdem ist die N-Glykosylierung innerhalb des MHBs, die für die Bindung des Q19/10 notwendig ist [227], bei keinem der drei untersuchten Viren konserviert. Zudem zeigte das polykonale Immunsereum eines Kaninchens, nach Impfung mit dem HBV-Impfstoff, keine Kreuzreaktivität mit dem HBsAg der untersuchten tierischen Hepadnaviren. Daher ist davon auszugehen, dass kein Schutz durch die gängige HBV-Impfung nach einer möglichen zoonotischen Übertragungen gegeben wäre.

Auch die in allen restlichen Orthohepadnaviren erhaltene N-Glykosylierungsstelle an N146, deren Bedeutung für den viralen Lebenszyklus noch

unklar ist [50, 54], ist in den Equiden- und Spitzmaushepadnaviren konserviert. Dieser Asparaginrest ist bei HBV zu ungefähr gleichen Teilen ohne und mit N-Glykosylierung in sekretierten Partikeln zu finden [53]. Ob und in welchem Maße das analoge N-Glykosylierungsmotiv der neuartigen tierischen Hepadnaviren verwendet wird, müssen zukünftige Experimente mittels Western Blot zeigen. Zum Nachweis könnten für MSHBV/CSHBV die monoklonalen Antikörper HB01 bzw. H166 verwendet werden. Für das EqHBV sollte ein Anti-EqHBs-positives Serum mittels Peptidimmunisierung erzeugt werden.

Die Spitzmausviren besitzen zudem ein mögliches PräS2-Startcodon, welches zu der Expression des MHBs führen könnte [37]. EqHBV zeigt jedoch kein solches mögliches PräS2-Startcodon [38]. Die genaue Funktion des MHBs im orthohepadnaviralen Lebenszyklus ist bisher ungeklärt, da es für die Bildung und Sekretion subviraler und viraler Partikel, sowie für die Infektiosität von HBV und HDV nicht notwendig ist [13]. Trotzdem ist das mittlere Oberflächenprotein (wenn auch erst für WHV experimentell bestätigt [263]) in vielen tierischen Orthohepadnaviren (WMHBV, CMHBV, WHV, GSHV und den Fledermaus-HBV) höchstwahrscheinlich konserviert [58]. Um zu klären, ob aminoterminal-verlängerte Proteine des SHBs analog zu MHBs und LHBs von tierischen Orthohepadnaviren produziert und auch sekretiert werden, wäre ein Western Blot über oben beschriebene mono- oder polyklonale Antikörper möglich.

8.2.3 Untersuchung der Oberflächenprotein-Rezeptor-Interaktion

Die Interaktion zwischen Rezeptor und viralen Oberflächenproteinen spielt eine fundamentale Rolle im frühen Infektionszyklus vieler Viren und beeinflusst maßgeblich den Spezies- und Gewebstropismus. Bei HBV ist hierfür die Interaktion zwischen NTCP und dem N-terminalen Bereich der PräS1-Domäne wichtig [120, 264]. Um den Eintrittsmechanismus der Oberflächenproteine getrennt von der orthohepadnaviralen Replikation zu untersuchen, ist die Verwendung des HDV-Surrogatmodells verbreitet, da HDV die Oberflächenproteine vieler Orthohepadnaviren zur Verpackung und de novo Infektion nutzen kann. Ein mögliches zoonotisches Potential tierischer Orthohepadnaviren aufgrund von Zelleintrittsstudien konnte bislang nur bei speziellen Primatenviren und einem Fledermausvirus nachgewiesen werden. So konnte

gezeigt werden, dass die beiden Neuweltaffenhepadnaviren CMHBV und WMHBV im HDV-Surrogatmodell den humanen NTCP und diverse tierische Homologe für eine Infektion nutzen konnten [68, 265]. Auch HDV pseudotypisiert mit TMBHBV aus einer Neuweltfledermaus war ein Zelleintritt über das menschliche NTCP möglich [28].

Das HDV-Interaktionsmotiv innerhalb des HBV-SHBs [212], welches für eine Sekretion von HDV-Partikeln notwendig ist, ist auch in den tierischen Orthohepadnaviren EqHBV und CSHBV/MSHBV konserviert (Abbildung 23 und Abbildung 37). Eine Sekretion von pseudotypisierten Deltaviren war für alle verwendeten HBsAg-Konstrukte in menschlichen Hepatomzellen möglich (Abbildung 23 und Abbildung 37). Auffällig ist jedoch, dass die Verpackung/Sekretion des HDV pseudotypisiert mit den Oberflächenproteinen der tierischen Hepadnaviren wesentlich ineffizienter geschah als durch HBV (Abbildung 23 und Abbildung 37). Zellen kotransfiziert mit HDV und CSHBs/MSHBs bzw. EqHBs sekretierten 1-2 log₁₀ weniger GEq/ml psHDV in den Zellkulturüberstand als HBs-koexprimierende Zellen. Die Hintergründe dieses Phänomens sind unklar. Möglicherweise ist die Expression, Prozessierung oder Sekretion des tierischen HBsAg in menschlichen Zellen teilweise gestört. Weiterführende Experimente zur detaillierten Untersuchung der HBsAg-Expression in menschlichen und wirtstierspezifischen Zellkulturen wären hierfür wertvoll.

Nach Infektion von transient NTCP- bzw. Ecel- oder Sorex-Ntcp-exprimierenden HepG2-Zellen mit psHDV konnten keine Infektionsereignisse für EqHBs und CSHBs/MSHBs nachgewiesen werden (Abbildung 24 und Abbildung 38). Da eine Infektion mit psHDV_{HBV} effizient funktionierte, ließe sich vermuten, dass NTCP/Ntcp nicht der von CSHBV/MSHBV bzw. EqHBV verwendete Eintrittsrezeptor ist bzw. dass möglicherweise ein oder mehrere weitere (unbekannte) (Ko)-Rezeptoren für den erfolgreichen Zelleintritt in menschliche Zelllinien nötig sind. Dass eine Interaktion zwischen der PräS-Domäne der tierischen Hepadnaviren und NTCP/Ntcp vermittelt wird, scheint auch aufgrund der vorliegenden Peptidbindungsdaten sehr unwahrscheinlich: Hier konnte gezeigt werden, dass weder N-terminale Myr-PräS1-Peptide des CSHBV/MSHBV noch des EqHBV, welche alle (im HBV-System bekannten)

theoretisch-notwendigen NTCP/Ntcp-interagierenden Aminosäuren enthielten, eine Bindung an NTCP/Ntcp zeigten (Abbildung 22 und Abbildung 36).

Dass das HBsAg des EqHBV-Ze grundsätzlich eine HDV-Infektion vermitteln kann, konnte in dieser Arbeit über Infektion von PEHs nachgewiesen werden (Abbildung 25). Es scheint also plausibel, dass für die Infektion humaner Zellen (PHH und HepG2-NTCP/Ntcp) mit EqHBV ein oder mehrere homologe Rezeptoren fehlen, die in PEH präsent sind. Hierbei ist fraglich, weshalb EqHBV-Ze, nicht aber EqHBV-Do, eine PEH-Infektion im psHDV-Modell vermitteln konnte. Die verwendeten Oberflächenproteine unterscheiden sich in ihrer S-Domäne lediglich in drei Aminosäuren (T/E115, T/S116 und I/M201), von denen zwei in der MHR liegen. Es ist außerdem auffällig, dass eine Infektion von PEH mit psHDV_{EqHBV-Ze} möglich war, bisher jedoch keine Pferde identifiziert werden konnten, die serologische Anzeichen auf eine EqHBV-Infektion zeigten [38]. Möglicherweise kann EqHBV zwar in Pferdehepatozyten eindringen, jedoch (aufgrund fehlender Wirtsfaktoren o.ä.) nicht vollständig oder sehr ineffizient in diesen replizieren, um so eine produktive Infektion zu etablieren. Diese Vermutung wird auch durch Daten dieser Arbeit unterstützt, da vollwertiges EqHBV aus EqHBV-infizierten Esel- und Zebraseren keine Infektion in PEH etablieren konnte (Abbildung 26B).

Bei EqHBV-Do und CSHBV/MSHBV wäre es zudem auch möglich, dass kein oder zu wenig LHBS der tierischen Hepadnaviren auf psHDV-Partikeln vorhanden war, um eine erfolgreiche Infektion in NTCP/Ntcp-exprimierenden HepG2 bzw. in den Primärzellen zu vermitteln. Diese offene Frage ließe sich mittels eines Anti-LHBS-spezifischen Western Blots der HDV-haltigen Zellkulturüberstände klären. Ein solcher Antikörper war jedoch zum Zeitpunkt der durchgeführten Experimente leider nicht verfügbar.

Alle präsentierten Daten lassen darauf schließen, dass die Spitzmaushepadnaviren MSHBV und CSHBV sowie das EqHBV nicht das NTCP/Ntcp als Haupteintrittsrezeptor verwenden oder dass weitere, noch nicht bekannte Rezeptoren essentielle Rollen im Eintrittsprozess dieser Viren spielen. Dass NTCP/Ntcp nicht als alleiniger und allgemeingültiger Eintrittsrezeptor der Orthohepadnaviren begriffen werden kann, wurde auch bereits für WHV nachgewiesen. Hier konnte gezeigt werden, dass psHDV_{WHV}

nicht nur eine Infektion in primären Hepatozyten des eigentlichen Wirts (Waldmurmeltier), sondern auch in PHH etablierte, die aber nicht in vergleichbarem Maße zu psHDV_{HBV} durch HBV-Myr-PräS1-Peptide inhibiert werden konnte [266]. Der Zelleintritt des WHV scheint also nur bedingt von NTCP/Ntcp als Rezeptor abhängig zu sein. Auf Grundlage dieser Arbeit und anderer [265] kann ein zoonotisches Potential der neuartigen Hepadnaviren aus Spitzmäusen und Equiden zwar nicht vollständig ausgeschlossen, aber dennoch als sehr unwahrscheinlich angenommen werden.

Für die Spitzmaushepadnaviren wäre es in Zukunft von großer Bedeutung, Infektionen auf primären Spitzmaushepatozyten der entsprechenden Arten durchzuführen, um eine generelle Infektiosität von CSHBs-/MSHBs-pseudotypisierten HDVs und MSHBV/CSHBV nachzuweisen. Die Entschlüsselung der durch EqHBV und CSHBV/MSHBV verwendeten Eintrittsrezeptoren wäre zudem ein übergeordnetes, längerfristiges Ziel zukünftiger Arbeiten. Der Zugang zu den entsprechenden Ausgangsmaterialien ist jedoch sehr limitiert, da Nachzuchten sehr schwierig und Wildfänge aufgrund des strengen Artenschutzes dieser Tiere sehr limitiert sind.

Im Gegensatz zu den tierischen Hepadnaviren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es HBV möglich war, sowohl über Esel- und Spitzmaus-Ntcp als auch über Ntcp der PEH zu infizieren. Diese Daten untermauern die Beobachtungen einzelner Arbeitsgruppen, dass NTCP/Ntcp als hochaffiner Rezeptor des HBV in vielen Tierspezies fungieren kann: So dienten permissive primäre Hepatozyten des *Tupaia belangeri* lange als in vitro-Modell für HBV-Infektionen [267, 268]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die schon lange bekannte in vivo HBV-Infektion von Menschenaffen (wie Schimpanse und Orangutan) auf der Fähigkeit des HBV basiert, mit Ntcps phylogenetisch dem Menschen nahestehender Spezies zu interagieren [68].

Die Limitationen des HBV des Menschen im Durchbrechen der Spezies-Spezifität zeigten sich jedoch schon innerhalb der Ordnung der Primaten bei der Familie der Meerkatzenverwandten (*Cercopithecidae*) der Altweltaffen (*Catarrhini*), wie z.B. Rhesusmakaken und Mantelpavianen.

Bei diesen Altweltaffen war ein (experimenteller) Aminosäureaustausch nötig (R158G), um den jeweiligen Ntcp für den Zelleintritt des HBV suszeptibel zu

machen [68]. Bei den phylogenetisch weiter entfernten „Labormäusen“ (Familie der Langschwanzmäuse, *Muridae*) sind andere gezielte Austausche im Maus-Ntcp nötig (AS 84-87), um in vitro einen HBV-Zelleintritt zu ermöglichen [269]. Da HBV über den Pferde-Ntcp infizieren kann und auch in PEH eine Infektion etabliert (Abbildung 26A), ist offen, wieso bislang noch keine HBV-Übertragungen von Mensch auf Pferd klinisch nachgewiesen worden sind, da während der jahrhundertelangen Domestikation des Pferds durch den Menschen eine HBV-Übertragung sehr wahrscheinlich erscheint. Diesbezüglich konnte bereits durch Lempp et al. gezeigt werden, dass auch nach erfolgreichem HBV-Zelleintritt durch heterologe Expression des NTCP, primäre Maus-, Ratten- und Hundehepatozyten weiterhin unpermissiv für Infektion mit HBV blieben, wohingegen NTCP der einzig limitierende Faktor in Makaken- und Schweinehepatozyten war [270]. Bei primären Maushepatozyten wird vermutet, dass Wirtsfaktoren für die vollständige Umwandlung der rcDNA in cccDNA nach Zelleintritt fehlen und so die Etablierung einer HBV-Infektion verhindert wird [271]. Dies wäre auch eine plausible Erklärung, warum es trotz erfolgreichem Zelleintritt durch HBV nicht zu Mensch-Tier-Übertragungen bei Pferden und anderen suszeptiblen Tieren kommt.

Ein weiterer limitierender Faktor der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse ist die reine Verwendung von in vitro Zellkulturen, bei denen lediglich angeborene Immunität (Restriktionsfaktoren) nicht aber adaptive Anti-HBV-Antworten Einfluss auf die Infektion haben, da geeignete in vivo-Modellsysteme zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen.

8.3 Ausblick

Viele fundamentale, genetisch-kodierte Merkmale des HBV sind in verwandten tierischen Orthohepadnaviren phylogenetisch konserviert.

Die zentrale Rolle der Oberflächenproteine des HBV (HBsAg) bei der Sekretion infektiöser Virionen und beim Zelleintritt ist für alle Orthohepadnaviren unumstritten. Da die große hydrophile Region (MHR) innerhalb der S-Domäne der Oberflächenproteine außerdem Hauptziel neutralisierender Antikörper (Anti-HBs) ist, kommt es hier vermehrt zur Selektion von Mutationen. Insbesondere solche Mutationen, die Antikörperevasion hervorrufen, sind von klinischer Bedeutung. So können, wie in dieser Arbeit gezeigt, Mutationen, die

z.B. zusätzliche N-Glykosylierungsmotive innerhalb der MHR einführen, zu weitreichender Evasion von diagnostischer Detektion sowie zu Bindungsverlust von Anti-HBs-Antikörpern nach Impfung führen. Solche Mutationen bergen demnach grundsätzlich das Potential eines Impfdurchbruchs. Die zuvor unbeschriebene 6 nt-Insertionsvariante dieser Arbeit verdeutlicht zudem, dass die genetischen Möglichkeiten zur Immunevasion des HBV umfänglich und wahrscheinlich bei Weitem noch nicht vollkommen bekannt sind.

Auch die Oberflächenproteine divergenter, tierischer Orthohepadnaviren bergen die Gefahr einer (zoonotischen) Übertragung auf den Menschen. Aufgrund der geringen antigenen Konservierung der HBsAg-Homologe der hier untersuchten tierischen Orthohepadnaviren könnten auch diese theoretisch bei Kontakt zu einem Impfdurchbruch führen.

Die Verwendung des NTCP/Ntcp als hochaffinen Eintrittsrezeptor scheint jedoch kein allgemeingültiges Merkmal der Orthohepadnaviren zu sein. Lediglich für das Fledermausvirus TMBHBV und die Neuweltaffenviren CMHBV und WMHBV konnte bisher ein Zelleintritt über NTCP/Ntcp nachgewiesen werden. Die Verwendung des Wirtstier-Ntcp durch die in dieser Arbeit untersuchten Viren (EqHBV, MSHBV, CSHBV) kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Es bleibt zu klären, ob ein gemeinsamer Eintrittsrezeptor der nicht-Ntcp-nutzenden Orthohepadnaviren vorhanden ist oder ob sich evolutionär speziesspezifische Eintrittsmechanismen entwickelt haben.

Die gesonderte Synthese eines PräC/Core-Proteins (HBeAg) als maßgeblicher Faktor der Chronifizierung könnte ein weiteres archaisches Merkmal der Orthohepadnaviren darstellen. Das HBeAg-Homolog des EqHBV konnte erfolgreich prozessiert und sekretiert werden und könnte demnach in infizierten Unpaarhufern auch zur Chronifizierung beitragen. Bei den Orthohepadnaviren der Spitzmäuse (CSHBV/MSHBV) konnte kein Hinweis auf ein HBeAg gefunden werden. Möglicherweise ist ein funktionales HBeAg für eine persistente Infektion in den Insektenfressern nicht notwendig, weshalb der PräC-Bereich dieser Viren nach Aufspaltung des jüngsten gemeinsamen Vorfahren der Orthohepadnaviren evolutionär nicht konserviert wurde.

Zusammenfassend konnten die Daten dieser Arbeit die besondere Bedeutung von Sequenzkonservierung und -divergenz in Bezug auf Antigenität und Infektiosität der Strukturproteine HBsAg und HBcAg sowie des Immunmodulators HBeAg des menschlichen und tierischer Orthohepadnaviren aufzeigen.

9. Anhang

A: SHBs

[illegible]

B: Polymerase

	90	100	110	120	130	140	150															
HBV-D3 Referenz	YHLP	LHPA	AMP	HLLV	GSSG	LSRY	VARL	SSNS	RI	LNNQ	HG	TM	PD	L	HD	YCSR	NLYV	SV	LLLL	YQT	FGR	KLH
Cluster 1 (3/12)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	N	.	S	.	.	.	C	.	.	.
Cluster 2 (5/12)	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	N	.	NS	Q	QH	.	.	.	F	.
Cluster 3 (1/12)	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	DH	.	N	.	S	.	QK	.	.	.	H	.
Cluster 4 (3/12)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	N	K	R	.	L	N	QL	.	C	.	.	.

	160	170	180	190	200	210	220																											
HBV-D3 Referenz	LYSH	P	I	L	GFR	KIP	MGV	GLSP	FLLA	QFTSA	IC	SV	RR	AF	PH	CL	AF	S	Y	M	D	D	V	V	L	GAK	SV	QH	LES	L	F	T	AV	TN
Cluster 1 (3/12)	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	YA	.	.
Cluster 2 (5/12)	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	.
Cluster 3 (1/12)	.	.	.	.	.	VM	.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.
Cluster 4 (3/12)	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	YA	.	.

	230	240	250	260	270	280																													
HBV-D3 Referenz	FLL	SLG	I	HL	NP	NK	TKR	WG	YSL	NFM	GY	V	I	G	CG	SL	P	Q	E	H	I	Q	K	I	K	E	C	F	R	K	L	P	I	N	R
Cluster 1 (3/12)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	V	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	
Cluster 2 (5/12)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	V	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	
Cluster 3 (1/12)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	
Cluster 4 (3/12)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	

Abbildung S1: Sequenzvergleich des amplifizierten (partiellen) SHBs- und Polymerase-ORF. (A) SHBs-Primärsequenz (AS 80-226). Bereits beschriebene Immunescape-Mutationen der anderen Cluster sind gelb hinterlegt. Die 2 AS-Insertion des Clusters 4 ist orange dargestellt. Neue N-Glykosylierungsmotive sind mit gestrichelten Kästen markiert, die konservierte N-Glykosylierungsstelle ist in grün angegeben. (B) Primärsequenz der reversen Transkriptase-Domäne (AS 89-280). Das katalytische Zentrum (YMDD; rot) ist in allen Clustern konserviert. Die 2 AS-Insertion des Clusters 4 ist orange dargestellt.

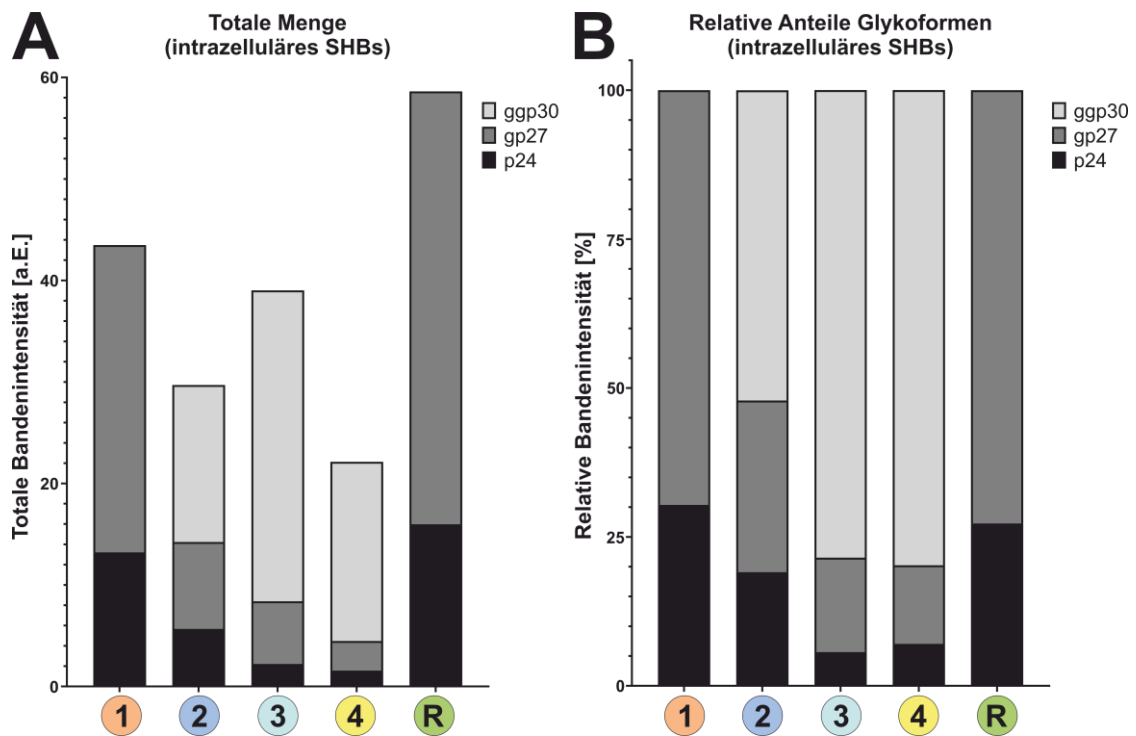


Abbildung S2: Densitometrische Analyse des intrazellulären SHBs. Auf Grundlage der Western Blot-Ergebnisse dargestellt in Abbildung 8B wurde eine densitometrische Analyse mittels Image Studio Lite durchgeführt. Hierfür wurde von allen Werten der Bandenintensitäten das unspezifische Hintergrundsignal abgezogen. Die relativen Bandenintensitäten wurden anhand dieser hintergrundkorrigierten Werte berechnet. (A) Totale Menge an intrazellulärem SHBs unterteilt in die zwei bzw. drei Glykoformen p24, gp27 und ggp30. (B) Relative Anteile der SHBs-Glykoformen. 1-4 – Cluster 1-4 SHBs; R – HBV-D3-SHBs-Referenz; a.E. – arbiträre Einheiten.

Tabelle S1: Originaldaten und daraus berechnete Reaktivitäten von Anti-HBs mit den Virusvarianten. (A) Anti-HBs-positive Seren wurden auf rund 50 IU/l verdünnt und mit 10 IU/ml zellkulturerzeugtem HBsAg für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend in den quantitative Architect Anti-HBs-Assay (Abbott) eingesetzt. (B) Auf Grundlage der Daten aus A wurden relative Anti-HBs/HBsAg-Reaktivitäten wie folgt berechnet: Für jedes Serum wurde ein individueller Wertebereich zwischen der Positivkontrolle R (100 %) und der Negativkontrolle NC (0 %) festgelegt und anhand dessen die gemessenen Anti-HBs-Werte der HBsAg-Varianten in relative Reaktivitäten umgerechnet. Werte >100 % entsprechen höhere Reaktivität von Anti-HBs an HBsAg als bei der Referenz. Werte <0 % entsprechen keiner Reaktivität von Anti-HBs mit HBsAg. Anti-HBs-Level aller naiven Sera waren 0 IU/l für alle getesteten HBsAg-Varianten und wurden demnach nicht aufgeführt.

A	gemessenes Anti-HBs [IU/l]						
	Serum ID	Referenz (R)	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	NC
Geimpft	2100001	23,00	16,15	31,83	51,91	52,92	54,97
	2144557	23,94	19,35	31,28	40,60	41,11	41,66
	2144644	26,38	23,94	31,60	39,45	38,16	39,46
	2145601	23,92	18,07	31,24	43,75	42,57	42,81
	2145578	38,84	40,89	45,65	49,70	50,62	52,14
	2146118	18,84	13,42	24,91	39,90	43,79	46,53
Genesen	2144555	25,59	22,04	31,47	42,63	41,69	41,18
	2144803	11,42	7,72	18,48	38,02	37,87	41,46
	2144893	18,09	22,49	37,08	45,53	44,19	46,34
	2145252	32,57	22,26	36,48	50,66	48,48	48,61
	2145480	31,25	21,87	33,58	52,02	48,78	50,56
	2145813	14,95	10,52	19,58	38,84	40,38	36,91
B	Relative Anti-HBs/HBsAg-Reaktivität [% von R]						
	Serum ID	Referenz (R)	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	NC
Geimpft	2100001	100,00	121,43	72,38	9,57	6,41	0,00
	2144557	100,00	125,90	58,58	5,98	3,10	0,00
	2144644	100,00	118,65	60,09	0,08	9,94	0,00
	2145601	100,00	130,97	61,25	-4,98	1,27	0,00
	2145578	100,00	84,59	48,80	18,35	11,43	0,00
	2146118	100,00	119,57	78,08	23,94	9,90	0,00
Genesen	2144555	100,00	122,77	62,28	-9,30	-3,27	0,00
	2144803	100,00	112,32	76,50	11,45	11,95	0,00
	2144893	100,00	84,42	32,78	2,87	7,61	0,00
	2145252	100,00	164,28	75,62	-12,78	0,81	0,00
	2145480	100,00	148,58	87,93	-7,56	9,22	0,00
	2145813	100,00	120,17	78,92	-8,79	-15,80	0,00

Wirtstierordnung	Primates										Chiroptera		Carnivora		Rodentia		Insectivora			Perissodactyla	
	Mensch										Affen		Fledermäuse		Katze		Ziesel		Murmeltier		
Spezies	HBV-A	HBV-B	HBV-C	HBV-D	HBV-E	HBV-F	HBV-G	HBV-H	WMHBV	CMHBV	TMBHBV	RLBHBV	PBHBV	DCHBV	GSHV	ASHV	WHV	CSHBV	MSHBV		
																		A	B		
Genbank-No.	NRZ-Datenbank, nicht publiziert										AY226578	KY703886	KC790378	KF939649	MH307930	NC001484	AY628096	MK345465	MK345467		
Genomlänge (nt)	3221	3215	3215	3182	3212	3215	3248	3215	3179	3182	3149	3368	3278	3187	3311	3302	3308	3089	3172		
Länge viraler Proteine (Aminosäuren)																					
HBs	HBc	185	183	183	183	183	183	195	183	182	188	189	189	190	187	187	188	181	181	190	
	PräC	29	29	29	29	29	29	**	29	29	33	28	28	28	30	30	30	ø	ø	28	
	LHBs	400	400	400	389	399	400	399	400	391	390	382	445	415	382	428	427	426	367	395	
	SHBs	226	226	226	226	226	226	226	226	228	227	223	224	224	226	222	222	222	225	225	
	PräS2	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	50	47	47	52	60	60	60	65*	104*	
Polymerase	PräS1	119	119	119	108	118	119	118	119	108	108	109	174	144	104	146	145	144	77	66	
		845	843	843	832	842	843	842	843	835	833	827	899	868	838	881	877	879	812	835	
HBx		155	155	155	155	155	155	155	152	153	135	141	142	145	138	138	141	131	135	141	

Abbildung S3: Zusammenfassung der Genom- und ORF-Längen bestimmter Orthohepadnaviren. Für jede Virusspezies wurde eine repräsentative Sequenz (siehe Genbank-Zugriffsnummer) für die Analyse ausgewählt. Sonderzeichen: Mögliches PräS2-Startcodon vorhanden (*), Doppelstopp-Mutante in PräC-Sequenz (**), nicht vorhanden (ø). Abkürzungen: HBV (Hepatitis-B-Virus); WMHBV (Woolly Monkey Hepatitis-B-Virus); CMHBV (Cebus Monkey Hepatitis-B-Virus); TMBHBV (Tent-making Bat Hepatitis-B-

Virus); *RLBHBV* (Roundleaf Bat Hepatitis-B-Virus); *PBHBV* (Pomona Bat Hepatitis-B-Virus); *DCHBV* (domestic Cat Hepatitis-B-Virus); *GSHV* (Ground Squirrel Hepatitis-Virus); *ASHV* (Arctic Squirrel Hepatitis-Virus); *WHV* (Woodchuck Hepatitis-Virus); *CSHBV* (Crowned Shrew Hepatitis-B-Virus); *MSHBV* (Musk Shrew Hepatitis-B-Virus); *EqHBV* (Equides Hepatitis-B-Virus).

10. Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Dieter Glebe für die Möglichkeit zur Promotion am Institut für Medizinische Virologie danken. Erst durch seine vorbildliche Betreuung und fortwährende Unterstützung war mir die Durchführung dieser Arbeit und das Voranbringen meiner wissenschaftlichen Karriere möglich.

Frau Prof. Dr. Elena Evguenieva-Hackenberg möchte ich für die Begutachtung dieser Arbeit und Vertretung vor dem Fachbereich 08 und das damit einhergehende Vertrauen bedanken.

Frau Prof. Dr. Katja Sträßer und Herrn Prof. Dr. Michael Niepmann danke ich für die Bereitschaft, als Prüfende an meiner Disputation teilzunehmen.

Zudem möchte ich allen Mitarbeitenden des Instituts für Medizinische Virologie danken. Die Fülle an wissenschaftlichen Sichtweisen hat mir geholfen, auch die kniffligsten Probleme zu lösen. Ich danke Lena, Maria, Zakia und Siggie für die positive Arbeitsatmosphäre und die gegenseitige Unterstützung. Sibylle möchte ich zum einen für ihren organisatorischen Einsatz danken und zum anderen für die vielen unterhaltsamen Gespräche in der gemeinsamen Frühstückspause.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an Nora aussprechen. Nicht nur für die hervorragende wissenschaftliche Zusammenarbeit, sondern auch besonders für die vielen Stunden, in denen wir Freud und Leid miteinander teilen konnten. Ohne dich wäre meine Promotionszeit nicht die selbe gewesen.

Ich danke außerdem allen Kooperationspartner:innen und Koautor:innen für die gute und produktive Zusammenarbeit. Ich möchte insbesondere Prof. Dr. Felix Drexler meinen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen aussprechen.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie, meinem Partner und meinen Freund:innen danken. Besonders meinen Eltern gilt meine Dankbarkeit, ohne eure bedingungslose Unterstützung wäre mein bisheriger wissenschaftlicher Werdegang nicht möglich gewesen.

11. Literaturverzeichnis

1. Lürman, A., *Eine icterusepidemie*. Berliner klinische Wochenschrift, 1885. **22**(2): p. 20-23.
2. Gerlich, W.H., *Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now*. Virol J, 2013. **10**: p. 239.
3. Dane, D.S., C.H. Cameron, and M. Briggs, *Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis*. Lancet, 1970. **1**(7649): p. 695-8.
4. Almeida, J.D., D. Rubenstein, and E.J. Stott, *New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis*. Lancet, 1971. **2**(7736): p. 1225-7.
5. Kaplan, P.M., et al., *DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen*. J Virol, 1973. **12**(5): p. 995-1005.
6. MacLachlan, J.H. and B.C. Cowie, *Hepatitis B virus epidemiology*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015. **5**(5): p. a021410.
7. Hughes, S.A., H. Wedemeyer, and P.M. Harrison, *Hepatitis delta virus*. The Lancet, 2011. **378**(9785): p. 73-85.
8. Trepo, C., H.L. Chan, and A. Lok, *Hepatitis B virus infection*. Lancet, 2014. **384**(9959): p. 2053-63.
9. World-Health-Organization, *Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021: accountability for the global health sector strategies 2016–2021: actions for impact: web annex 2: data methods*. 2021.
10. Yang, J.D., et al., *Cirrhosis is present in most patients with hepatitis B and hepatocellular carcinoma*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2011. **9**(1): p. 64-70.
11. Lok, A.S., *Chronic hepatitis B*. N Engl J Med, 2002. **346**(22): p. 1682-3.
12. Stanaway, J.D., et al., *The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013*. Lancet, 2016. **388**(10049): p. 1081-1088.
13. Glebe, D. and C.M. Bremer, *The molecular virology of hepatitis B virus*. Semin Liver Dis, 2013. **33**(2): p. 103-12.
14. Locarnini, S.A., M. Littlejohn, and L.K.W. Yuen, *Origins and Evolution of the Primate Hepatitis B Virus*. Front Microbiol, 2021. **12**: p. 653684.
15. Revill, P.A., et al., *The evolution and clinical impact of hepatitis B virus genome diversity*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020. **17**(10): p. 618-634.
16. Magnius, L., et al., *ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepadnaviridae*. J Gen Virol, 2020. **101**(6): p. 571-572.
17. Kramvis, A., *Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus*. Intervirology, 2014. **57**(3-4): p. 141-50.
18. Araujo, N.M. and C. Osioy, *Hepatitis B Virus Genotype G: The Odd Cousin of the Family*. Front Microbiol, 2022. **13**: p. 872766.
19. Lindh, M., *HBV genotype G-an odd genotype of unknown origin*. J Clin Virol, 2005. **34**(4): p. 315-6.
20. Kato, H., et al., *Characteristics of hepatitis B virus isolates of genotype G and their phylogenetic differences from the other six genotypes (A through F)*. J Virol, 2002. **76**(12): p. 6131-7.

21. Tatematsu, K., et al., *A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J*. J Virol, 2009. **83**(20): p. 10538-47.
22. Vaudin, M., et al., *The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee*. J Gen Virol, 1988. **69** (Pt 6): p. 1383-9.
23. Norder, H., et al., *Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus*. Virology, 1996. **218**(1): p. 214-23.
24. Warren, K.S., et al., *A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (Pongo pygmaeus)*. J Virol, 1999. **73**(9): p. 7860-5.
25. Grethe, S., et al., *Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates*. J Virol, 2000. **74**(11): p. 5377-81.
26. Lanford, R.E., et al., *Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5757-61.
27. de Carvalho Dominguez Souza, B.F., et al., *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.
28. Drexler, J.F., et al., *Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(40): p. 16151-6.
29. He, B., et al., *Identification of a novel Orthohepadnavirus in pomona roundleaf bats in China*. Arch Virol, 2015. **160**(1): p. 335-7.
30. 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.
31. Marion, P.L., et al., *A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(5): p. 2941-5.
32. Testut, P., et al., *A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska*. J Virol, 1996. **70**(7): p. 4210-9.
33. Aghazadeh, M., et al., *A Novel Hepadnavirus Identified in an Immunocompromised Domestic Cat in Australia*. Viruses, 2018. **10**(5).
34. Jo, W.K., et al., *Natural co-infection of divergent hepatitis B and C virus homologues in carnivores*. Transbound Emerg Dis, 2022. **69**(2): p. 195-203.
35. Gogarten, J.F., et al., *A Novel Orthohepadnavirus Identified in a Dead Maxwell's Duiker (Philantomba maxwellii) in Tai National Park, Cote d'Ivoire*. Viruses, 2019. **11**(3).
36. Nie, F.Y., et al., *Discovery of a highly divergent hepadnavirus in shrews from China*. Virology, 2019. **531**: p. 162-170.
37. Rasche, A., et al., *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.
38. Rasche, A., et al., *A hepatitis B virus causes chronic infections in equids worldwide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(13).

39. Kim, S.H., et al., *In vivo hepatitis B virus-neutralizing activity of an anti-HBsAg humanized antibody in chimpanzees*. Exp Mol Med, 2008. **40**(1): p. 145-9.
40. Scott, R.M., et al., *Experimental transmission of hepatitis B virus by semen and saliva*. J Infect Dis, 1980. **142**(1): p. 67-71.
41. Tabor, E., et al., *Hepatitis B e antigen and antibody: detection by radioimmunoassay in chimpanzees during experimental hepatitis B*. J Med Virol, 1980. **6**(1): p. 91-9.
42. Noppornpanth, S., et al., *Molecular epidemiology of gibbon hepatitis B virus transmission*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 1): p. 147-155.
43. Moolla, N., M. Kew, and P. Arbuthnot, *Regulatory elements of hepatitis B virus transcription*. J Viral Hepat, 2002. **9**(5): p. 323-31.
44. Yuh, C.H. and L.P. Ting, *The genome of hepatitis B virus contains a second enhancer: cooperation of two elements within this enhancer is required for its function*. J Virol, 1990. **64**(9): p. 4281-7.
45. Loeb, D.D., R.C. Hirsch, and D. Ganem, *Sequence-independent RNA cleavages generate the primers for plus strand DNA synthesis in hepatitis B viruses: implications for other reverse transcribing elements*. EMBO J, 1991. **10**(11): p. 3533-40.
46. Tong, S. and P. Revill, *Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability*. J Hepatol, 2016. **64**(1 Suppl): p. S4-S16.
47. Stirk, H.J., J.M. Thornton, and C.R. Howard, *A topological model for hepatitis B surface antigen*. Intervirology, 1992. **33**(3): p. 148-58.
48. Carman, W.F., *The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus*. J Viral Hepat, 1997. **4 Suppl 1**: p. 11-20.
49. 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.
50. Salisse, J. and C. Sureau, *A function essential to viral entry underlies the hepatitis B virus "a" determinant*. J Virol, 2009. **83**(18): p. 9321-8.
51. Mangold, C.M. and R.E. Streeck, *Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein*. J Virol, 1993. **67**(8): p. 4588-97.
52. Mangold, C.M., et al., *Secretion and antigenicity of hepatitis B virus small envelope proteins lacking cysteines in the major antigenic region*. Virology, 1995. **211**(2): p. 535-43.
53. Dobrica, M.O., C. Lazar, and N. Branza-Nichita, *N-Glycosylation and N-Glycan Processing in HBV Biology and Pathogenesis*. Cells, 2020. **9**(6).
54. Prange, R., M. Werr, and H. Löffler-Mary, *Chaperones involved in hepatitis B virus morphogenesis*. Biol Chem, 1999. **380**(3): p. 305-14.
55. Seeger, C. and W.S. Mason, *Molecular biology of hepatitis B virus infection*. Virology, 2015. **479-480**: p. 672-86.
56. Schmitt, S., et al., *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.
57. Schmitt, S., et al., *Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 7): p. 2045-2053.
58. Wang, Q., et al., *Tracing the evolutionary history of hepadnaviruses in terms of e antigen and middle envelope protein expression or processing*. Virus Res, 2020. **276**: p. 197825.

59. Fernholz, D., et al., *Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier*. Virology, 1993. **194**(1): p. 137-48.
60. Mehta, A., et al., *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*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(5): p. 1822-1827.
61. Gish, R.G., et al., *Chronic hepatitis B: Virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities*. Antiviral Res, 2015. **121**: p. 47-58.
62. Seitz, S., et al., *A Slow Maturation Process Renders Hepatitis B Virus Infectious*. Cell Host Microbe, 2016. **20**(1): p. 25-35.
63. Pontisso, P., et al., *Identification of an attachment site for human liver plasma membranes on hepatitis B virus particles*. Virology, 1989. **173**(2): p. 522-30.
64. Glebe, D., et al., *Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes*. Gastroenterology, 2005. **129**(1): p. 234-45.
65. Bruss, V., et al., *Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity*. Virology, 1996. **218**(2): p. 396-9.
66. Gripon, P., et al., *Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity*. Virology, 1995. **213**(2): p. 292-9.
67. Chen, B.F., *Hepatitis B virus pre-S/S variants in liver diseases*. World J Gastroenterol, 2018. **24**(14): p. 1507-1520.
68. Müller, S.F., et al., *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.
69. Kang, C. and Y.Y. Syed, *Bulevirtide: First Approval*. Drugs, 2020. **80**(15): p. 1601-1605.
70. Kräusslich, H.-G., *Morphogenesis and maturation of retroviruses*. Vol. 214. 2012: Springer Science & Business Media.
71. Lefevre, C., H. Le Guillou-Guillemette, and A. Ducancelle, *A Pleiotropic Role of the Hepatitis B Virus Core Protein in Hepatocarcinogenesis*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(24).
72. Birnbaum, F. and M. Nassal, *Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein*. J Virol, 1990. **64**(7): p. 3319-30.
73. Wang, J.C., M.S. Dhason, and A. Zlotnick, *Structural organization of pregenomic RNA and the carboxy-terminal domain of the capsid protein of hepatitis B virus*. PLoS Pathog, 2012. **8**(9): p. e1002919.
74. Zheng, J., F. Schodel, and D.L. Peterson, *The structure of hepadnaviral core antigens. Identification of free thiols and determination of the disulfide bonding pattern*. J Biol Chem, 1992. **267**(13): p. 9422-9.
75. Crowther, R.A., et al., *Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy*. Cell, 1994. **77**(6): p. 943-50.
76. Ning, X., et al., *Capsid Phosphorylation State and Hepadnavirus Virion Secretion*. J Virol, 2017. **91**(9).

77. Belnap, D.M., et al., *Diversity of core antigen epitopes of hepatitis B virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10884-9.
78. Kramvis, A., et al., *Immunomodulatory Function of HBeAg Related to Short-Sighted Evolution, Transmissibility, and Clinical Manifestation of Hepatitis B Virus*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2521.
79. Garcia, P.D., et al., *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.
80. Messageot, F., et al., *Proteolytic processing of the hepatitis B virus e antigen precursor. Cleavage at two furin consensus sequences*. J Biol Chem, 2003. **278**(2): p. 891-5.
81. Ito, K., et al., *Characterization of genotype-specific carboxyl-terminal cleavage sites of hepatitis B virus e antigen precursor and identification of furin as the candidate enzyme*. J Virol, 2009. **83**(8): p. 3507-17.
82. Nassal, M. and A. Rieger, *An intramolecular disulfide bridge between Cys-7 and Cys61 determines the structure of the secretory core gene product (e antigen) of hepatitis B virus*. J Virol, 1993. **67**(7): p. 4307-15.
83. Wasenauer, G., J. Kock, and H.J. Schlicht, *A cysteine and a hydrophobic sequence in the noncleaved portion of the pre-C leader peptide determine the biophysical properties of the secretory core protein (HBe protein) of human hepatitis B virus*. J Virol, 1992. **66**(9): p. 5338-46.
84. Walsh, R. and S. Locarnini, *Hepatitis B precore protein: pathogenic potential and therapeutic promise*. Yonsei Med J, 2012. **53**(5): p. 875-85.
85. Revill, P., et al., *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.
86. Tian, Y., et al., *Maternal-Derived Hepatitis B Virus e Antigen Alters Macrophage Function in Offspring to Drive Viral Persistence after Vertical Transmission*. Immunity, 2016. **44**(5): p. 1204-14.
87. Theilmann, L., et al., *Detection of hepatitis B virus core gene products in sera and liver of HBV-infected individuals*. J Hepatol, 1989. **8**(1): p. 77-85.
88. Radziwill, G., W. Tucker, and H. Schaller, *Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity*. J Virol, 1990. **64**(2): p. 613-20.
89. Pley, C., et al., *Spacer Domain in Hepatitis B Virus Polymerase: Plugging a Hole or Performing a Role?* J Virol, 2022. **96**(9): p. e0005122.
90. Buhlig, T.S., et al., *Molecular, Evolutionary, and Structural Analysis of the Terminal Protein Domain of Hepatitis B Virus Polymerase, a Potential Drug Target*. Viruses, 2020. **12**(5).
91. Toh, H., H. Hayashida, and T. Miyata, *Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus*. Nature, 1983. **305**(5937): p. 827-9.
92. Bartenschlager, R. and H. Schaller, *The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription*. EMBO J, 1988. **7**(13): p. 4185-92.
93. Lucifora, J. and U. Protzer, *Hepatitis B virus X protein: A key regulator of the virus life cycle*. 2012: INTECH Open Access Publisher Rijeka, Croatia.

94. Lucifora, J., et al., *Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection*. J Hepatol, 2011. **55**(5): p. 996-1003.
95. Decorsiere, A., et al., *Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor*. Nature, 2016. **531**(7594): p. 386-9.
96. Murphy, C.M., et al., *Hepatitis B Virus X Protein Promotes Degradation of SMC5/6 to Enhance HBV Replication*. Cell Rep, 2016. **16**(11): p. 2846-2854.
97. Li, T., et al., *A promiscuous alpha-helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase machinery*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(1): p. 105-11.
98. Abdul, F., et al., *Smc5/6 Antagonism by HBx Is an Evolutionarily Conserved Function of Hepatitis B Virus Infection in Mammals*. J Virol, 2018. **92**(16).
99. Levrero, M. and J. Zucman-Rossi, *Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma*. Journal of hepatology, 2016. **64**(1): p. S84-S101.
100. Li, J., et al., *Naturally occurring 5' preS1 deletions markedly enhance replication and infectivity of HBV genotype B and genotype C*. Gut, 2021. **70**(3): p. 575-584.
101. Jiang, B., et al., *The N-Terminus Makes the Difference: Impact of Genotype-Specific Disparities in the N-Terminal Part of The Hepatitis B Virus Large Surface Protein on Morphogenesis of Viral and Subviral Particles*. Cells, 2020. **9**(8).
102. Gutelius, D., et al., *Characterization of the pleiotropic effects of the genotype G-specific 36-nucleotide insertion in the context of other hepatitis B virus genotypes*. J Virol, 2011. **85**(24): p. 13278-89.
103. Li, K., et al., *Critical role of the 36-nucleotide insertion in hepatitis B virus genotype G in core protein expression, genome replication, and virion secretion*. J Virol, 2007. **81**(17): p. 9202-15.
104. Sugauchi, F., et al., *Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene*. J Virol, 2002. **76**(12): p. 5985-92.
105. Locarnini, S., et al., *Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV)*. Semin Cancer Biol, 2013. **23**(6 Pt B): p. 561-75.
106. Yu, H., et al., *Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I"*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9297.
107. Arankalle, V.A., et al., *A novel HBV recombinant (genotype I) similar to Vietnam/Laos in a primitive tribe in eastern India*. J Viral Hepat, 2010. **17**(7): p. 501-10.
108. Olinger, C.M., et al., *Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(11): p. 1777-80.
109. Magnius, L.O. and H. Norder, *Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene*. Intervirology, 1995. **38**(1-2): p. 24-34.
110. Courouce-Pauty, A.M., A. Plancon, and J.P. Soulier, *Distribution of HBsAg subtypes in the world*. Vox Sang, 1983. **44**(4): p. 197-211.
111. Bancroft, W.H., F.K. Mundon, and P.K. Russell, *Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen*. J Immunol, 1972. **109**(4): p. 842-8.

112. Le Bouvier, G.L., *The heterogeneity of Australia antigen*. J Infect Dis, 1971. **123**(6): p. 671-5.
113. Magnus, L., et al., *A new virus specified determinant of hepatitis B surface antigen*. Acta Pathol Microbiol Scand B, 1975. **83**(3): p. 295-7.
114. Purdy, M.A., et al., *A new algorithm for deduction of hepatitis B surface antigen subtype determinants from the amino acid sequence*. Intervirology, 2007. **50**(1): p. 45-51.
115. Hilleman, M.R., *Yeast recombinant hepatitis B vaccine*. Infection, 1987. **15**(1): p. 3-7.
116. McMahon, B.J., et al., *Antibody levels and protection after hepatitis B vaccination: results of a 15-year follow-up*. Annals of internal medicine, 2005. **142**(5): p. 333-341.
117. Romano, L., et al., *Hepatitis B vaccination*. Hum Vaccin Immunother, 2015. **11**(1): p. 53-7.
118. Bruce, M.G., et al., *Antibody Levels and Protection After Hepatitis B Vaccine: Results of a 30-Year Follow-up Study and Response to a Booster Dose*. J Infect Dis, 2016. **214**(1): p. 16-22.
119. Verrier, E.R., et al., *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.
120. Yan, H., et al., *Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus*. Elife, 2012. **1**: p. e00049.
121. Herrscher, C., et al., *Hepatitis B virus entry into HepG2-NTCP cells requires clathrin-mediated endocytosis*. Cell Microbiol, 2020. **22**(8): p. e13205.
122. Iwamoto, M., et al., *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.
123. Iwamoto, M., et al., *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.
124. Kann, M., et al., *Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex*. J Cell Biol, 1999. **145**(1): p. 45-55.
125. 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.
126. Schmitz, A., et al., *Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket*. PLoS Pathog, 2010. **6**(1): p. e1000741.
127. 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.
128. Bock, C.T., et al., *Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell*. Virus Genes, 1994. **8**(3): p. 215-29.
129. Bock, C.T., et al., *Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome*. J Mol Biol, 2001. **307**(1): p. 183-96.

130. Newbold, J.E., et al., *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.
131. Korniyev, D., et al., *Spatiotemporal Analysis of Hepatitis B Virus X Protein in Primary Human Hepatocytes*. J Virol, 2019. **93**(16).
132. Ganem, D. and H.E. Varmus, *The molecular biology of the hepatitis B viruses*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 651-93.
133. Jiang, B., et al., *Subviral Hepatitis B Virus Filaments, like Infectious Viral Particles, Are Released via Multivesicular Bodies*. J Virol, 2015. **90**(7): p. 3330-41.
134. Ganem, D. and A.M. Prince, *Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences*. N Engl J Med, 2004. **350**(11): p. 1118-29.
135. Beck, J. and M. Nassal, *Hepatitis B virus replication*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(1): p. 48-64.
136. Fouillot, N., et al., *Translation of the hepatitis B virus P gene by ribosomal scanning as an alternative to internal initiation*. J Virol, 1993. **67**(8): p. 4886-95.
137. Hwang, W.L. and T.S. Su, *Translational regulation of hepatitis B virus polymerase gene by termination-reinitiation of an upstream minicistron in a length-dependent manner*. J Gen Virol, 1998. **79** (Pt 9): p. 2181-9.
138. Lin, C.G. and S.J. Lo, *Evidence for involvement of a ribosomal leaky scanning mechanism in the translation of the hepatitis B virus pol gene from the viral pregenome RNA*. Virology, 1992. **188**(1): p. 342-52.
139. 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.
140. Hirsch, R.C., et al., *Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription*. Nature, 1990. **344**(6266): p. 552-5.
141. 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.
142. Weber, M., et al., *Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription*. J Virol, 1994. **68**(5): p. 2994-9.
143. Zoulim, F. and C. Seeger, *Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase*. J Virol, 1994. **68**(1): p. 6-13.
144. Tavis, J.E., S. Perri, and D. Ganem, *Hepadnavirus reverse transcription initiates within the stem-loop of the RNA packaging signal and employs a novel strand transfer*. J Virol, 1994. **68**(6): p. 3536-43.
145. Wang, G.H. and C. Seeger, *Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses*. J Virol, 1993. **67**(11): p. 6507-12.
146. Tu, T., et al., *HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications*. Viruses, 2017. **9**(4).
147. Datta, S., et al., *Molecular biology of the hepatitis B virus for clinicians*. J Clin Exp Hepatol, 2012. **2**(4): p. 353-65.
148. Ning, X., et al., *Common and Distinct Capsid and Surface Protein Requirements for Secretion of Complete and Genome-Free Hepatitis B Virions*. J Virol, 2018. **92**(14).

149. Perlman, D.H., et al., *Reverse transcription-associated dephosphorylation of hepadnavirus nucleocapsids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(25): p. 9020-5.
150. Prange, R., *Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress*. Med Microbiol Immunol, 2012. **201**(4): p. 449-61.
151. Watanabe, T., et al., *Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(24): p. 10205-10.
152. Pastor, F., et al., *Direct interaction between the hepatitis B virus core and envelope proteins analyzed in a cellular context*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 16178.
153. Paganelli, M., X. Stephenne, and E.M. Sokal, *Chronic hepatitis B in children and adolescents*. J Hepatol, 2012. **57**(4): p. 885-96.
154. Pollicino, T. and G. Caminiti, *HBV-Integration Studies in the Clinic: Role in the Natural History of Infection*. Viruses, 2021. **13**(3).
155. Sede, M., et al., *Hepatitis B virus depicts a high degree of conservation during the immune-tolerant phase in familiarly transmitted chronic hepatitis B infection: deep-sequencing and phylogenetic analysis*. J Viral Hepat, 2014. **21**(9): p. 650-61.
156. Alexopoulou, A. and P. Karayiannis, *HBeAg negative variants and their role in the natural history of chronic hepatitis B virus infection*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(24): p. 7644-52.
157. Hannoun, C., P. Horal, and M. Lindh, *Long-term mutation rates in the hepatitis B virus genome*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 1): p. 75-83.
158. Harrison, A., et al., *Genomic analysis of hepatitis B virus reveals antigen state and genotype as sources of evolutionary rate variation*. Viruses, 2011. **3**(2): p. 83-101.
159. Lim, S.G., et al., *Viral quasi-species evolution during hepatitis Be antigen seroconversion*. Gastroenterology, 2007. **133**(3): p. 951-8.
160. Salpini, R., et al., *Hepatitis B surface antigen genetic elements critical for immune escape correlate with hepatitis B virus reactivation upon immunosuppression*. Hepatology, 2015. **61**(3): p. 823-33.
161. Kwak, M.S. and Y.J. Kim, *Occult hepatitis B virus infection*. World J Hepatol, 2014. **6**(12): p. 860-9.
162. Raimondo, G., et al., *Occult hepatitis B virus infection*. J Hepatol, 2007. **46**(1): p. 160-70.
163. Lazarevic, I., et al., *Immune-Escape Hepatitis B Virus Mutations Associated with Viral Reactivation upon Immunosuppression*. Viruses, 2019. **11**(9).
164. Weber, B., *Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact*. J Clin Virol, 2005. **32**(2): p. 102-12.
165. Oon, C.J., et al., *Intra-familial evidence of horizontal transmission of hepatitis B virus surface antigen mutant G145R*. J Infect, 2000. **41**(3): p. 260-4.
166. Thakur, V., et al., *Transmission of G145R mutant of HBV to an unrelated contact*. J Med Virol, 2005. **76**(1): p. 40-6.
167. Hayashi, J., et al., *Frequency of concurrence of hepatitis B surface antigen and antibody in a large number of carriers in Okinawa, Japan*. Gastroenterol Jpn, 1990. **25**(5): p. 593-7.
168. Wang, Y.M., et al., *Serological profiles of hepatitis B carrier patients in Singapore with special reference to the frequency and significance of*

- concurrent presence of HBsAg and anti-HBs*. Singapore Med J, 1996. **37**(2): p. 150-2.
169. Jang, J.S., et al., *Association of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody to hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection*. J Med Virol, 2009. **81**(9): p. 1531-8.
170. Kwak, M.S., et al., *Long-term outcomes of HBsAg/anti-HBs double-positive versus HBsAg single-positive patients with chronic hepatitis B*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 19417.
171. Seo, S.I., et al., *Coexistence of hepatitis B surface antigen and antibody to hepatitis B surface may increase the risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection: a retrospective cohort study*. J Med Virol, 2014. **86**(1): p. 124-30.
172. Yeo, Y.H., et al., *Factors Associated With Rates of HBsAg Seroclearance in Adults With Chronic HBV Infection: A Systematic Review and Meta-analysis*. Gastroenterology, 2019. **156**(3): p. 635-646 e9.
173. Lok, A.S., et al., *Hepatitis B cure: From discovery to regulatory approval*. Hepatology, 2017. **66**(4): p. 1296-1313.
174. Warner, N. and S. Locarnini, *Mechanisms of hepatitis B virus resistance development*. Intervirology, 2014. **57**(3-4): p. 218-24.
175. Pan, C.Q., et al., *First-line therapies for hepatitis B in the United States: A 3-year prospective and multicenter real-world study after approval of tenofovir alafenamide*. Hepatol Commun, 2022.
176. Park, J.W., et al., *Comparison of the long-term efficacy between entecavir and tenofovir in treatment-naïve chronic hepatitis B patients*. BMC Gastroenterol, 2017. **17**(1): p. 39.
177. Perrillo, R., *Benefits and risks of interferon therapy for hepatitis B*. Hepatology, 2009. **49**(5 Suppl): p. S103-11.
178. Rizzetto, M., et al., *Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers*. Gut, 1977. **18**(12): p. 997-1003.
179. Rizzetto, M., et al., *Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees*. J Infect Dis, 1980. **141**(5): p. 590-602.
180. Rizzetto, M., et al., *delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(10): p. 6124-8.
181. Papatheodoridi, M. and G.V. Papatheodoridis, *Is hepatitis delta underestimated?* Liver Int, 2021. **41** Suppl 1: p. 38-44.
182. Rizzetto, M., S. Hamid, and F. Negro, *The changing context of hepatitis D*. J Hepatol, 2021. **74**(5): p. 1200-1211.
183. Farci, P. and G.A. Niro, *Clinical features of hepatitis D*. Semin Liver Dis, 2012. **32**(3): p. 228-36.
184. Pascarella, S. and F. Negro, *Hepatitis D virus: an update*. Liver Int, 2011. **31**(1): p. 7-21.
185. Botelho-Souza, L.F., et al., *Hepatitis delta: virological and clinical aspects*. Virol J, 2017. **14**(1): p. 177.
186. Fattovich, G., et al., *Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep)*. Gut, 2000. **46**(3): p. 420-6.

187. Ji, J., K. Sundquist, and J. Sundquist, *A population-based study of hepatitis D virus as potential risk factor for hepatocellular carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 2012. **104**(10): p. 790-2.
188. Deterding, K. and H. Wedemeyer, *Beyond Pegylated Interferon-Alpha: New Treatments for Hepatitis Delta*. AIDS Rev, 2019. **21**(3): p. 126-134.
189. Wedemeyer, H., et al., *Peginterferon plus adefovir versus either drug alone for hepatitis delta*. N Engl J Med, 2011. **364**(4): p. 322-31.
190. Nkongolo, S., J. Hollnberger, and S. Urban, *[Bulevirtide as the first specific agent against hepatitis D virus infections-mechanism and clinical effect]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2022. **65**(2): p. 254-263.
191. Le Gal, F., et al., *Genetic diversity and worldwide distribution of the deltavirus genus: A study of 2,152 clinical strains*. Hepatology, 2017. **66**(6): p. 1826-1841.
192. Le Gal, F., et al., *Eighth major clade for hepatitis delta virus*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(9): p. 1447-50.
193. Gudima, S., et al., *Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 3709-19.
194. Kos, A., et al., *The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA*. Nature, 1986. **323**(6088): p. 558-60.
195. Wang, K.S., et al., *Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome*. Nature, 1986. **323**(6088): p. 508-14.
196. Taylor, J.M., *Chapter 3. Replication of the hepatitis delta virus RNA genome*. Adv Virus Res, 2009. **74**: p. 103-21.
197. Magnius, L., et al., *ICTV Virus Taxonomy Profile: Deltavirus*. J Gen Virol, 2018. **99**(12): p. 1565-1566.
198. Chou, H.C., et al., *Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA*. J Virol, 1998. **72**(5): p. 3684-90.
199. Macnaughton, T.B., et al., *Rolling circle replication of hepatitis delta virus RNA is carried out by two different cellular RNA polymerases*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 3920-7.
200. Modahl, L.E., et al., *RNA-Dependent replication and transcription of hepatitis delta virus RNA involve distinct cellular RNA polymerases*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(16): p. 6030-9.
201. Sureau, C. and F. Negro, *The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis*. J Hepatol, 2016. **64**(1 Suppl): p. S102-S116.
202. Kuo, M.Y., et al., *Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus*. J Virol, 1988. **62**(12): p. 4439-44.
203. Greco-Stewart, V. and M. Pelchat, *Interaction of host cellular proteins with components of the hepatitis delta virus*. Viruses, 2010. **2**(1): p. 189-212.
204. Weiner, A.J., et al., *A single antigenomic open reading frame of the hepatitis delta virus encodes the epitope(s) of both hepatitis delta antigen polypeptides p24 delta and p27 delta*. J Virol, 1988. **62**(2): p. 594-9.
205. 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.
206. Casey, J.L., *Control of ADAR1 editing of hepatitis delta virus RNAs*. Curr Top Microbiol Immunol, 2012. **353**: p. 123-43.

207. Chang, F.L., et al., *The large form of hepatitis delta antigen is crucial for assembly of hepatitis delta virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(19): p. 8490-4.
208. 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.
209. Poisson, F., et al., *Characterization of RNA-binding domains of hepatitis delta antigen*. J Gen Virol, 1993. **74** (Pt 11): p. 2473-8.
210. Wang, C.C., et al., *Nucleic acid binding properties of the nucleic acid chaperone domain of hepatitis delta antigen*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(22): p. 6481-92.
211. Lee, C.H., et al., *A novel chromosome region maintenance 1-independent nuclear export signal of the large form of hepatitis delta antigen that is required for the viral assembly*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 8142-8.
212. 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.
213. Mentha, N., et al., *A review on hepatitis D: From virology to new therapies*. J Adv Res, 2019. **17**: p. 3-15.
214. Freitas, N., et al., *Envelope proteins derived from naturally integrated hepatitis B virus DNA support assembly and release of infectious hepatitis delta virus particles*. J Virol, 2014. **88**(10): p. 5742-54.
215. Durnik, R., et al., *Bile Acids Transporters of Enterohepatic Circulation for Targeted Drug Delivery*. Molecules, 2022. **27**(9).
216. Manautou, J., S. Campion, and L. Aleksunes, *Regulation of hepatobiliary transporters during liver injury*. Comprehensive Toxicology, 2010. **9**: p. 175-220.
217. Neurath, A.R., et al., *Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus*. Cell, 1986. **46**(3): p. 429-36.
218. Wang, X., et al., *The Na(+)-Taurocholate Cotransporting Polypeptide Traffics with the Epidermal Growth Factor Receptor*. Traffic, 2016. **17**(3): p. 230-44.
219. Perreira, J.M., et al., *IFITMs restrict the replication of multiple pathogenic viruses*. J Mol Biol, 2013. **425**(24): p. 4937-55.
220. Palatini, M., et al., *IFITM3 Interacts with the HBV/HDV Receptor NTCP and Modulates Virus Entry and Infection*. Viruses, 2022. **14**(4).
221. Tong, S., J. Li, and J.R. Wands, *Carboxypeptidase D is an avian hepatitis B virus receptor*. J Virol, 1999. **73**(10): p. 8696-702.
222. Tong, S. and J. Li, *Identification of NTCP as an HBV receptor: the beginning of the end or the end of the beginning?* Gastroenterology, 2014. **146**(4): p. 902-5.
223. Fu, L., et al., *Woodchuck sodium taurocholate cotransporting polypeptide supports low-level hepatitis B and D virus entry*. Virology, 2017. **505**: p. 1-11.
224. Aden, D.P., et al., *Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line*. Nature, 1979. **282**(5739): p. 615-6.

225. Nakabayashi, H., et al., *Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium*. Cancer Res, 1982. **42**(9): p. 3858-63.
226. Sominskaya, I., et al., *Determination of the minimal length of preS1 epitope recognized by a monoclonal antibody which inhibits attachment of hepatitis B virus to hepatocytes*. Med Microbiol Immunol, 1992. **181**(4): p. 215-26.
227. Meisel, H., et al., *Fine mapping and functional characterization of two immuno-dominant regions from the preS2 sequence of hepatitis B virus*. Intervirology, 1994. **37**(6): p. 330-9.
228. Abou El Nasr, A.A.E.W.A., *Use of peptide microarrays for mapping viral B cell epitopes*. Universitätsbibliothek Göttingen, 2011.
229. Sobotta, D., et al., *Mapping of immunodominant B-cell epitopes and the human serum albumin-binding site in natural hepatitis B virus surface antigen of defined genosubtype*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 2): p. 369-78.
230. Kucinskaite-Kodze, I., et al., *New broadly reactive neutralizing antibodies against hepatitis B virus surface antigen*. Virus Res, 2016. **211**: p. 209-21.
231. Chen, Y.C., et al., *Discontinuous epitopes of hepatitis B surface antigen derived from a filamentous phage peptide library*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(5): p. 1997-2001.
232. Kopeck, A.M., et al., *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.
233. Drosten, C., et al., *Evaluation of a new PCR assay with competitive internal control sequence for blood donor screening*. Transfusion, 2000. **40**(6): p. 718-24.
234. Li, C., et al., *FastCloning: a highly simplified, purification-free, sequence- and ligation-independent PCR cloning method*. BMC Biotechnol, 2011. **11**: p. 92.
235. Hiller, K., et al., *PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W375-9.
236. Duckert, P., S. Brunak, and N. Blom, *Prediction of proprotein convertase cleavage sites*. Protein Eng Des Sel, 2004. **17**(1): p. 107-12.
237. Tian, S., W. Huajun, and J. Wu, *Computational prediction of furin cleavage sites by a hybrid method and understanding mechanism underlying diseases*. Sci Rep, 2012. **2**: p. 261.
238. Gerlich, W.H., *Breakthrough of hepatitis B virus escape mutants after vaccination and virus reactivation*. J Clin Virol, 2006. **36 Suppl 1**: p. S18-22.
239. Peterson, D.L., et al., *Antigenic structure of hepatitis B surface antigen: identification of the "d" subtype determinant by chemical modification and use of monoclonal antibodies*. J Immunol, 1984. **132**(2): p. 920-7.
240. Shrima, S., N.A. Cherepanova, and R. Gilmore, *Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **41**: p. 71-8.
241. Hayashi, S., et al., *Characterization of novel entecavir resistance mutations*. J Hepatol, 2015. **63**(3): p. 546-53.
242. Melegari, M., P.P. Scaglioni, and J.R. Wands, *Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective*. Hepatology, 1998. **27**(2): p. 628-33.

243. Ono-Nita, S.K., et al., *YMDD motif in hepatitis B virus DNA polymerase influences on replication and lamivudine resistance: A study by in vitro full-length viral DNA transfection*. Hepatology, 1999. **29**(3): p. 939-45.
244. Jammeh, S., H.C. Thomas, and P. Karayiannis, *Replicative competence of the T131I, K141E, and G145R surface variants of hepatitis B Virus*. J Infect Dis, 2007. **196**(7): p. 1010-3.
245. Kang, Y., et al., *Amino acid substitutions Q129N and T131N/M133T in hepatitis B surface antigen (HBsAg) interfere with the immunogenicity of the corresponding HBsAg or viral replication ability*. Virus Res, 2018. **257**: p. 33-39.
246. Chen, J., et al., *Characterization of Novel Hepatitis B Virus PreS/S-Gene Mutations in a Patient with Occult Hepatitis B Virus Infection*. PLoS One, 2016. **11**(5): p. e0155654.
247. 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.
248. Kohno, H., et al., *Mutations in the envelope gene of hepatitis B virus variants co-occurring with antibody to surface antigen in sera from patients with chronic hepatitis B*. J Gen Virol, 1996. **77** (Pt 8): p. 1825-31.
249. Ito, K., et al., *Impairment of hepatitis B virus virion secretion by single-amino-acid substitutions in the small envelope protein and rescue by a novel glycosylation site*. J Virol, 2010. **84**(24): p. 12850-61.
250. Kwei, K., et al., *Impaired virion secretion by hepatitis B virus immune escape mutants and its rescue by wild-type envelope proteins or a second-site mutation*. J Virol, 2013. **87**(4): p. 2352-7.
251. Thibault, V., et al., *Performance of HBsAg quantification assays for detection of Hepatitis B virus genotypes and diagnostic escape-variants in clinical samples*. J Clin Virol, 2017. **89**: p. 14-21.
252. Tarafdar, S., et al., *Multiple epitopes of hepatitis B virus surface antigen targeted by human plasma-derived immunoglobulins coincide with clinically observed escape mutations*. J Med Virol, 2022. **94**(2): p. 649-658.
253. Seddigh-Tonekaboni, S., et al., *Effect of variation in the common "a" determinant on the antigenicity of hepatitis B surface antigen*. J Med Virol, 2000. **60**(2): p. 113-21.
254. Karthigesu, V.D., et al., *A novel hepatitis B virus variant in the sera of immunized children*. J Gen Virol, 1994. **75** (Pt 2): p. 443-8.
255. Komatsu, H., et al., *Evaluation of the G145R Mutant of the Hepatitis B Virus as a Minor Strain in Mother-to-Child Transmission*. PLoS One, 2016. **11**(11): p. e0165674.
256. Yu, D.M., et al., *N-glycosylation mutations within hepatitis B virus surface major hydrophilic region contribute mostly to immune escape*. J Hepatol, 2014. **60**(3): p. 515-22.
257. Milich, D.R., et al., *Comparative immunogenicity of hepatitis B virus core and E antigens*. J Immunol, 1988. **141**(10): p. 3617-24.
258. Murray, K. and A.L. Shiau, *The core antigen of hepatitis B virus as a carrier for immunogenic peptides*. Biol Chem, 1999. **380**(3): p. 277-83.
259. Bichko, V., et al., *Epitopes recognized by antibodies to denatured core protein of hepatitis B virus*. Mol Immunol, 1993. **30**(3): p. 221-31.

260. Chen, H.S., et al., *The precore gene of the woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host*. J Virol, 1992. **66**(9): p. 5682-4.
261. Charrel, R.N., et al., *Arenaviruses and hantaviruses: from epidemiology and genomics to antivirals*. Antiviral Res, 2011. **90**(2): p. 102-14.
262. Drexler, J.F., et al., *Bats host major mammalian paramyxoviruses*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 796.
263. Tolle, T.K., et al., *Structure and glycosylation patterns of surface proteins from woodchuck hepatitis virus*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 9978-85.
264. Glebe, D., et al., *Pre-s1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus*. J Virol, 2003. **77**(17): p. 9511-21.
265. Goldmann, N.T., *Interaktion des Hepatitis-Delta-Virus (HDV) mit seinem Helfervirus (HBV) und seinem Rezeptor NTCP in einem in vitro Infektionsmodell*. Universitätsbibliothek Giessen, 2021.
266. Gudima, S., et al., *Primary human hepatocytes are susceptible to infection by hepatitis delta virus assembled with envelope proteins of woodchuck hepatitis virus*. J Virol, 2008. **82**(15): p. 7276-83.
267. Kock, J., et al., *Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus*. J Virol, 2001. **75**(11): p. 5084-9.
268. Walter, E., et al., *Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo*. Hepatology, 1996. **24**(1): p. 1-5.
269. Yan, H., et al., *Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide*. J Virol, 2013. **87**(14): p. 7977-91.
270. Lempp, F.A., et al., *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.
271. Wei, L., et al., *Conversion of hepatitis B virus relaxed circular to covalently closed circular DNA is supported in murine cells*. JHEP Rep, 2022. **4**(9): p. 100534.