

**Morphogenese der Hepatitis-B- und Hepatitis-D-
Virus-Partikel:
Funktionelle Analyse intrazellulärer
Transportmechanismen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von **Lisa Maria Zeyen**
geboren am 06.06.91 in Adenau

Mainz, Dezember 2019

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2020

„Somewhere, something incredible is waiting to be known.“

- **Carl Sagan**, Astronom, Astrophysiker und Exobiologe

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Hepatitis-B-Virus (HBV)	1
1.1.1 Hepadnaviridae	1
1.1.2 Bedeutung als Pathogen.....	2
1.1.3 Struktur des HBV-Genoms	3
1.1.4 Molekularer Aufbau viraler und subviraler HBV-Partikel.....	5
1.1.5 Infektionszyklus von HBV	7
1.2 Das Hepatitis-D-Virus (HDV)	10
1.2.1 Struktur des HDV-Genoms	10
1.2.2 Molekularer Aufbau viraler und subviraler HDV-Partikel.....	12
1.2.3 Infektionszyklus und HBV-Dependenz.....	13
1.2.4 Bedeutung als Pathogen.....	15
1.3 Intrazelluläre Transportmechanismen eukaryotischer Zellen	16
1.3.1 Die „Endosomal Sorting Complexes Required for Transport“ (ESCRT)- Maschinerie.....	17
1.3.2 Vesikuläre und nicht-vesikuläre Transportsysteme	19
1.3.3 Der Clathrin-vermittelte Vesikeltransport	21
1.3.4 Der „Coat Protein Complex II“ (COPII)-vermittelte Vesikeltransport.....	24
1.3.4.1 Funktionsweise der COPII-Maschinerie	24
1.3.4.2 Das Sec23/24-Dimer	27
1.4 Zielsetzung	29
2 Material und Methoden	31
2.1 Material	31
2.1.1 Zellen	31
2.1.2 Vektoren.....	31
2.1.3 siRNAs	32
2.1.4 Antikörper.....	34
2.1.5 Enzyme	35
2.1.6 Primer	35
2.1.6.1 Mutagenese-Primer	36

2.1.7 Allgemeine Chemikalien	36
2.1.7.1 Reagenzien.....	36
2.1.7.2 Kits.....	37
2.1.7.3 Lösungen und Puffer	37
2.1.8 Software.....	38
2.2 Zellkultur.....	38
2.2.1 Kultivierung von HuH-7-Zellen	38
2.2.2 Transfektionsmethoden	39
2.2.2.1 Transfektion von siRNA.....	39
2.2.2.2 Transfektion von DNA.....	40
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	40
2.3.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	40
2.3.2 Klonierungen.....	41
2.3.3 Mutagenesen	41
2.3.4 Transformation und Ausplattierung.....	41
2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	42
2.3.6 Plasmid-DNA-Präparation und -Messung.....	42
2.3.7 RNA-Präparation und -Messung.....	42
2.3.8 DNaseI-Verdau und cDNA-Synthese.....	43
2.3.9 Klassische PCR	43
2.3.10 Quantitative PCR	44
2.3.10.1 qPCR mit SYBR Green.....	45
2.3.10.2 Multiplex-qPCR.....	45
2.3.11 Sequenzierung.....	47
2.4 Proteinbiochemische Methoden.....	47
2.4.1 Lyse und Aufarbeitung der Zellüberstände.....	47
2.4.2 Lyse und Aufarbeitung der HBV-Proben.....	48
2.4.3 Immunpräzipitation.....	49
2.4.4 Fraktionierungsmethoden	51
2.4.4.1 Subzelluläre Fraktionierung mit Temperaturshift.....	51
2.4.4.2 Flotationsassay.....	52
2.4.4.3 Cäsiumchlorid-Dichtegradienten.....	53
2.4.4.4 Sucrose-Dichtegradienten	54
2.4.4.5 Iodixanol-Dichtegradienten.....	55
2.4.5 TCA-Fällung.....	56

2.4.6 SDS-PAGE	56
2.4.7 Western Blot	57
2.4.8 Immunfluoreszenz.....	59
2.4.9 ELISA.....	60
2.4.9.1 AFP-ELISA	60
2.4.9.2 HBsAg-ELISA	61
2.4.10 LDH-Assay.....	61
2.5 Statistik.....	61
3 Ergebnisse	62
3.1 Charakterisierung subviraler HDV-Partikel.....	62
3.1.1 Die Notwendigkeit von HBV.S für die Sekretion subviraler HDV-Partikel.	63
3.1.2 Interaktionsanalyse von HBV.S und HDV.L.....	65
3.1.3 Die intrazelluläre Verteilung von HBV.S und HDV.L.....	66
3.2 Untersuchung möglicher Funktionen intrazellulärer Transportmechanismen in den Infektionszyklen von HBV und HDV	68
3.2.1 Die Notwendigkeit der ESCRT-Maschinerie bei der Morphogenese subviraler HDV-Partikel.....	68
3.2.2 Die Notwendigkeit des Clathrin-vermittelten Vesikeltransports bei der Morphogenese und Sekretion subviraler HBV- und HDV-Partikel.....	71
3.2.2.1 Clathrin wird für die Morphogenese und Sekretion subviraler HBV- und HDV-Partikel benötigt.....	72
3.2.2.2 Pitstop 2® inhibiert die Sekretion subviraler HBV-Partikel	73
3.2.3 Die Notwendigkeit des COPII-vermittelten Vesikeltransports bei der Morphogenese und Sekretion subviraler HBV- und HDV-Partikel.....	75
3.2.3.1 Das innere COPII-Mantelprotein Sec24A wird für die Sekretion subviraler HBV-Partikel benötigt.....	75
3.2.3.2 Die GTPase Sar1 wird für die Sekretion subviraler HBV-Partikel benötigt.....	77
3.2.3.3 Funktionen der COPII-Untereinheiten bei der Sekretion subviraler HBV- und HDV-Partikel	79
3.2.3.3.1 Die Rolle des äußeren COPII-Mantelproteins Sec31	82
3.2.3.3.2 Die Rolle des äußeren COPII-Mantelproteins Sec13.....	83
3.2.3.4 Funktionen der COPII-Maschinerie bei der intrazellulären Verteilung von HBV.S	84
3.3 Funktionelle Analyse der COPII-Proteine Sec24A und Sec23B im Infektionszyklus von HBV.....	87
3.3.1 Die Rolle von Sec24A bei der intrazellulären Verteilung von HBV.S.....	88

3.3.2 Interaktionsanalyse von HBV.S und Sec24A.....	94
3.3.2.1 HBV.S benötigt das Paralog Sec24A	94
3.3.2.2 HBV.S interagiert mit Sec24A via AS 78 und 79	95
3.3.2.3 Mutationen der Sec24A-Interaktionsdomäne von HBV.S verhindern die Freisetzung subviraler HBV-Partikel.....	98
3.3.3 Die Notwendigkeit von Sec24A für die Morphogenese und Freisetzung subviraler DHBV-Partikel	99
3.3.4 Die Notwendigkeit von Sec24A und Sec23B für die Morphogenese und Freisetzung infektiöser HBV-Virionen	100
3.3.5 Einflüsse von HBV und HBV.S auf die Expression von Sec24A und Sec23B	101
4 Diskussion	103
4.1 Charakterisierung subviraler HDV-Partikel <i>in vitro</i>	104
4.2 Funktionen der ESCRT-Maschinerie bei der Morphogenese subviraler HDV-Partikel	105
4.3 Funktionen des Clathrin-vermittelten Vesikeltransports bei der Morphogenese und Freisetzung subviraler HBV- und HDV-Partikel.....	109
4.4 Funktionen des COPII-vermittelten Vesikeltransports bei der Freisetzung subviraler HBV- und HDV-Partikel	112
4.5 Analyse spezifischer Funktionen von Sec24A und Sec23B im Infektionszyklus von HBV	118
5 Zusammenfassung.....	127
6 Summary	128
7 Literaturverzeichnis	129

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Aqua Bidest./Bidest.	Bidestilliertes Wasser
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
bp	Basenpaare
BSA	Rinderalbumin (engl. „bovine serum albumine“)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	Komplementäre DNA (engl. „complementary DNA“)
cccDNA	Kovalent geschlossene, zirkuläre DNA (Engl. „covalently closed circular DNA“)
CCV	Clathrin-umhüllte Vesikel (engl. „clathrin-coated vesicle“)
CHC	„clathrin heavy chain“
CHMP	„charged multivesicular body protein“
COPII	„coat protein complex II“
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Con	Kontrolle (engl. „control“)
C-Terminus	Carboxyl-Ende
D	Asparaginsäure
d.h.	das heißt
DN	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. „deoxyribonucleic acid“)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	Englisch
Env	Hülle (engl. „envelope“)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	„endosomal sorting complex required for transport“

et al.	et alii (und andere)
g	Gramm
x g	x-fache Erdbeschleunigung
FCS	Fetales Kälberserum (engl. „fetal calf serum“)
G	Guanin
gg.	gegen
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HBcAg	Core-Antigen des Hepatitis-B-Virus
HBeAg	Precore-Antigen des Hepatitis-B-Virus
HBsAg	Surface-Antigen des Hepatitis-B-Virus
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDAg-L	Großes Antigen des Hepatitis-D-Virus
HDAg-S	Kleines Antigen des Hepatitis-D-Virus
HDV	Hepatitis-D-Virus
HEPES	2-Hydroxythylenpiperazin-2-Ethansulfonsäure
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HuH-7	Humane Leberkarzinomzellen (engl. „human hepatocellular carcinoma cells“)
i. d. R.	in der Regel
Ig	Immunglobulin
kb	Kilo-Basenpaare
KD	Runterregulierung der Genexpression (engl. „knockdown“)
kDa	Kilodalton
L	Großes HBV-Hüllprotein
L	Leucin
LB	Nährmedium für Bakterien (engl. „lysogeny broth“)
M	Molar
mA	Milliampere
MCS	Polylinker (engl. „multiple cloning site“)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	„messenger“-RNA

MVB	Multivesikuläre Körper (engl. „multivesicular bodies“)
min	Minute(n)
NC	Nukleokapsid
nm	Nanometer
NTCP	„sodium-taurocholate cotransporting polypeptide“
N-Terminus	Amino-Ende
o.	oben
ORF	Offener Leserahmen (engl. „open reading frame“)
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. „polymerase chain reaction“)
PFA	Paraformaldehyd
pgRNA	Prägenomische RNA
PI	Proteinaseinhibitor
Pol	Polymerase
POX	Peroxidase
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
R	Arginin
rcDNA	„relaxed circular DNA“
RIPA	Radioimmunopräzipitation-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure (eng. „ribonucleic acid“)
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S	Kleines HBV-Hüllprotein
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	„sodiumdodecyl sulfate“
Sek	Sekunde(n)
siRNA	„short interfering RNA“
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannte
SVP	Subviraler Partikel
T	Thymin
TBS	„tris buffered saline“

TCA	Trichloressigsäure
TMD	Transmembrandomäne
U	Einheiten (engl. „units“)
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
V	Volt
vgl.	vergleiche
VPS	„vacuolar protein sorting-associated protein“
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (engl. „weight per volume“)
z. Bsp.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Das Hepatitis-B-Virus (HBV)

1.1.1 Hepadnaviridae

In die Familie der Hepadnaviren (Hepadnaviridae) sind Viren mit doppelsträngiger DNA einzuordnen, die Säugetiere und einige Vogelarten infizieren können und die ihre Genome mittels einer Reversen Transkriptase synthetisieren. Als Prototyp dieser Gruppe gilt das humane Hepatitis-B-Virus (HBV), das sich über mehrere Jahrzehnte hinweg als eines der erfolgreichsten Pathogene weltweit etablieren konnte (Suh et al., 2014; Minarovits und Niller, 2019). Weitreichende genetische Analysen mehrerer Vertebraten konnten belegen, dass Hepadnaviridae Vögel, Krokodile und Schildkröten bereits vor etwa 250 Millionen Jahren, im Zeitalter des Mesozoikums, infiziert haben. Dies spricht für einen evolutionär bedeutend langen Zeitraum der Koexistenz der jeweiligen Viren mit ihren Wirten (Suh et al., 2014). Laut phylogenetischer Studien haben sich Hepadnaviren vor etwa 400 Millionen Jahren von den sogenannten Nakednaviridae separiert, die über kein Hüllprotein-Gen verfügen und in Fischen vorkommen. Demnach entspringt die Virusfamilie von HBV einer urzeitlichen Version unbehüllter Viren, wodurch die *de novo*-Entstehung des Gens für die Virushülle als wesentlicher Wandel des viralen Lebenszyklus betrachtet werden kann (Lauber et al., 2017).

Interessanterweise führt eine HBV-Infektion nur bei Säugetieren teilweise zur Ausprägung eines Hepatozellulären Karzinoms („hepatocellular carcinoma“; HCC), was anhand der evolutionären Entstehung des Onkogens *x* erklärt werden könnte (Suh et al., 2014). Zu den bekanntesten Vertretern der Orthohepadnaviridae, den Säuger-infizierenden Hepadnaviren, gehören das HBV-ähnliche Woodchuck-Hepatitisvirus (WHV) und einer der HBV-Subtypen, das Woolly-Monkey-Hepatitis-B-Virus (WMHBV). Beide haben sich als bedeutende Versuchsmodelle in der HBV-Forschung etabliert (Kosinska et al., 2015; Lanford et al., 1998; Guo et al., 2018). Ein anderes, weit verbreitetes *in vitro*-Infektionsmodell stellt die Forschung am Enten-Hepatitis-B-Virus („duck hepatitis B virus“; DHBV) dar, dem Prototyp der Gattung der Avihepadnaviridae, den Vögel infizierenden Hepadnaviren. Mithilfe dieses nah mit HBV verwandten Virus konnten seit mehr als 20 Jahren Aufklärungsarbeiten

bezüglich des Replikationszyklus der Hepadnaviridae durchgeführt werden (Glebe und Urban, 2007). Zwar ist es nicht möglich, alle von DHBV generierten Daten auf das humane Virus zu übertragen, dennoch konnte diese Forschung zur Aufklärung endozytotischer Abläufe der HBV-Pathogenese und der Entwicklung eines Inhibitors der HBV-Infektion grundlegend beitragen (Urban und Gripon, 2002; Li und Urban, 2016).

1.1.2 Bedeutung als Pathogen

Seit dessen Entdeckung vor über 50 Jahren ist HBV insbesondere deshalb Gegenstand weltweiter Forschung, weil es eines der erfolgreichsten Pathogene in der humanen Welt darstellt (Blumberg et al., 1970). Geschätzte 250 Millionen Menschen wurden von dem Virus bereits chronisch infiziert und etwa eine Million Todesfälle sind jährlich aufgrund HBV-assoziiierter Krankheiten wie akuter Hepatitis, Leberzirrhose und Leberzellkarzinomen zu verzeichnen (Prange, 2012; Lin und Kao, 2017). Das Virus tritt in den Genotypen A bis J sowie in mehreren Subtypen auf, die sich stark in ihrer geographischen Verteilung unterscheiden. Die Infektion konnte jedoch in Asien, Afrika, Südeuropa, Lateinamerika und auf den Pazifischen Inseln als endemisch charakterisiert werden (Lin und Kao, 2017). Mit der Identifizierung des Antigens HBsAg („HBV surface antigen“) wurden Diagnosen klinisch unauffälliger HBV-Infektionen möglich und einer der frühen Grundsteine für die Entwicklung moderner Virus-Diagnostiken gelegt. Seit den 1980ern können durch Verwendung der Marker anti-HBs gegen das kleine HBV-Hüllprotein und anti-HBc gegen das Kapsid in HBV-spezifischen Assays Analysen des Infektions- bzw. Immunisierungsstatus in routinierter Weise durchgeführt werden (Gerlich, 2013).

HBV kann pränatal, sexuell und via Blut durch intravenöse Injektionen bei medizinischer Behandlung oder illegalem Drogenmissbrauch sowie durch kleine Wunden und Kontakt der Schleimhäute übertragen werden. Insbesondere im Gesundheitsbereich arbeitende Personen gehören daher zu dem gefährdeten Personenkreis (Gerlich, 2013; Lin und Kao, 2017). Während die durch das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) und durch Malaria verursachten Todesfälle in den letzten Jahren deutlich zurückgegangen sind, ist die HBV-assoziierte Todesrate steigend (McNaughton et al., 2019). Trotz der Verfügbarkeit und Effizienz eines prophylaktischen Impfstoffes stellt HBV auch heutzutage noch ein erhebliches

Gesundheitsrisiko für die Menschheit dar. Dies liegt vor allem daran, dass noch immer kein effizientes, antivirales Medikament existiert, das chronische HBV-Infektionen eliminieren könnte (Zeyen und Prange, 2018). Die Identifikation des hepatozellulären Rezeptors, der HBV den Eintritt in die Wirtszelle erlaubt, sowie Aufklärungsarbeiten am viralen Genom und der HBV-Morphogenese bieten jedoch neue Möglichkeiten der Entwicklung antiviraler Therapien (Yan et al., 2012, Krause et al., 2018).

1.1.3 Struktur des HBV-Genoms

HBV besitzt eines der kleinsten bekannten viralen Genome mit einer Größe von nur 3,2 Kilobasenpaaren (kb), das in einer partiell doppelsträngigen, zirkulären DNA-Konformation vorliegt („relaxed circular DNA“; rcDNA). Zudem ist es eines der kompaktesten Genome, was durch die Überlappung mehrerer offener Leserahmen („open reading frames“; ORFs) ermöglicht wird (Tong und Revill, 2016; s. Abb. 1). Es besitzt mehrere als Enhancer wirkende Promotoren und sich wiederholende DNA-Sequenzen, sogenannte „direct repeats“ (DRs). Das unvollständig vorliegende DNA-Genom in den Virionen ist für die erfolgreiche Replikation darauf angewiesen, im Zellkern der Wirtszelle in kovalent geschlossene, zirkuläre DNA („covalently closed circular DNA“; cccDNA) umgeschrieben zu werden. Diese cccDNA verbleibt nach der Infektion stabil im Zellkern und dient als Matrize für die prägenomische Virus-RNA (pgRNA) und die viralen mRNAs (Suzuki et al., 2017, Li et al., 2017; Lee und Lee, 2007).

HBV produziert mithilfe der Promotoren Core, SPI, SPII und X sowie der zellulären RNA-Polymerase vier virale RNA-Transkripte (3,5, 2,4, 2,1 und 0,7 kb) und die pgRNA, die alle in insgesamt sieben unterschiedliche Proteine translatiert werden. Diese gehen aus den Genen *polymerase* (*p*), *surface* (*s*) mit *pre-s1* und *pre-s2*, *precore/core* und *x* hervor. Diese kompakte und effiziente genomische Organisation ist allen Hepadnaviren gemein, wobei die Avihepadnaviridae kein *x*-Gen besitzen. Eine Ausnahme stellt lediglich DHBV dar, dessen Genom ein rudimentäres *x*-Gen enthält (Lin und Anderson, 2000; McNaughton et al., 2019, Tong und Revill, 2016; Kramvis und Kew, 1999).

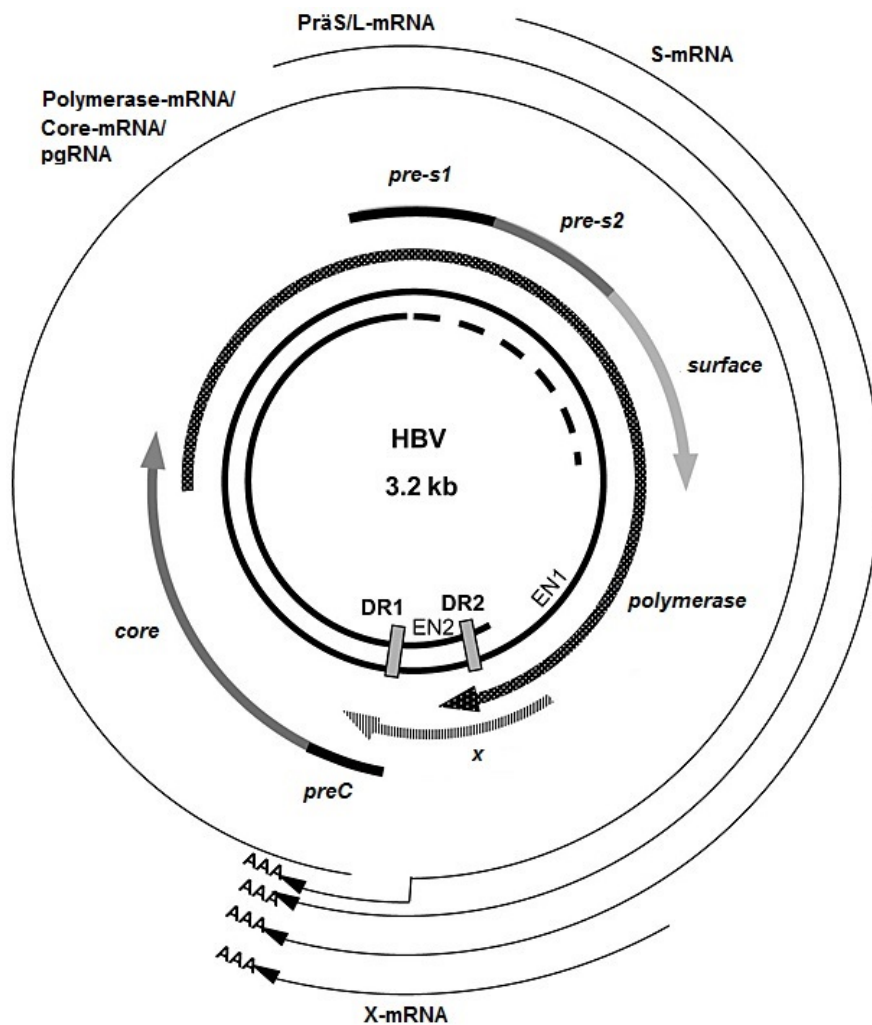


Abb. 1: Struktureller Aufbau des HBV-Genoms. Dargestellt ist der schematische Aufbau des 3.2 kb-großen HBV-Genoms. Dieses besteht aus teilweise doppelsträngiger DNA mit zwei Enhancern (EN1, EN2) und sich wiederholenden DNA-Sequenzen, sogenannten „direct repeats“ (DR1, DR2). Die vier offenen Leserahmen (ORFs) kodieren die Gene *polymerase*, *x*, *surface* mit den Domänen *pre-s1* und *pre-s2* sowie *core* mitsamt der *precore* (*preC*)-Domäne. Durch Transkription der zellulären RNA-Polymerase entstehen die verschiedenen großen mRNAs und die prägenomische RNA (pgRNA), die für die viralen Proteine kodieren. Die Polyadenylierungen an den 3'-Enden der mRNAs sind dargestellt (AAA).

Verändert: Lee und Lee, 2007

Eine Integration der HBV-DNA in das Wirts-Genom kann zu genetischen Veränderungen der Wirts-DNA führen und ist demzufolge eng mit der Entstehung von Leberzellkarzinomen verknüpft. Studien mit therapeutischen Ansätzen beschäftigen sich daher heutzutage häufig mit einer möglichen Eliminierung des sogenannten „Minichromosoms“, der cccDNA, aus der Wirtszelle, beispielsweise mittels der modernen CRISPR-Cas9-Technologie (Li et al., 2017, Lucifora und Protzer, 2016; Moyo et al., 2018).

1.1.4 Molekularer Aufbau viraler und subviraler HBV-Partikel

Vollständige und infektiöse HBV-Partikel bestehen, entsprechend der geringen Anzahl an ORFs im Genom, aus nur vier unterschiedlichen Proteinen bzw. sieben Protein-Varianten. Die viruseigene Polymerase (Pol) mit Reverse-Transkriptase-Funktion ist kovalent an das Virus-Genom oder dessen Vorstufe - die prägenomische RNA (pgRNA) - gebunden und bildet einen Komplex im Inneren des HBV-Kapsids. Diese Ikosaeder-förmige Struktur besteht aus 240 aneinandergelagerten Kopien des HBV-Core-Proteins (HBcAg), das 183 bzw. 185 Aminosäuren (AS) groß ist, und misst etwa 30 nm im Durchmesser. Die Formation aus viralem Genom, Polymerase und Kapsid wird als Nukleokapsid (NC) bezeichnet (Chain und Myers, 2005; Wynne et al., 1999; Patient et al., 2009; s. Abb. 2A). Zur Komplementierung eines infektiösen Partikels benötigt das NC zusätzlich eine Lipiddoppelschicht aus drei verschiedenen Varianten des Hüllproteins HBsAg, die aus nur einem Gen in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) exprimiert werden können (Bruss, 2007). Die Expression eines einzigen ORF unter Verwendung drei unterschiedlicher Start-Codons und einem gemeinsamen Stopp-Codon generiert kleine („small“; S; 226 AS), mittlere („middle“; M; 281 AS) und große („large“; L; 389 bzw. 400 AS) Protein-Varianten. S, M und L teilen sich die C-terminale S-Domäne, wobei M eine weitere Prä-S2-Domäne und L die beiden Domänen Prä-S1 und Prä-S1 besitzt (Zeyen und Prange, 2018, Yan et al., 2016; s. Abb. 2B). Die HBV-Hüllproteine bilden in jeweils unterschiedlicher Anzahl die virale Hülle des reifen Partikels und ermöglichen die Infektiosität. Hierbei macht das kleine Hüllprotein den größten Anteil mit etwa 100 Kopien pro fünf Kopien M bzw. L aus (Yan et al., 2016, Hu und Lui, 2017).

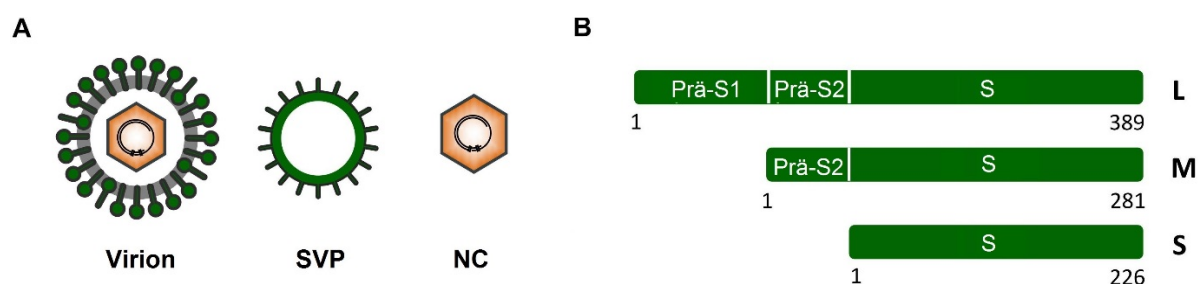


Abb. 2: HBV-Partikeltypen und -Hüllproteine. (A) Zu sehen sind die drei Partikeltypen, die während der HBV-Pathogenese gebildet werden: infektiöse Virionen, leere, subvirale Partikel aus dem kleinen HBV-Hüllprotein (SVP) und Nukleokapside ohne Hülle (NC). (B) Dargestellt ist die Struktur der HBV-Hüllproteine, bestehend aus den Domänen Prä-S1, Prä-S2 und S mit Position der AS im HBV-Genom. Je nach transkribierter Domäne setzen sich dementsprechend die Hüllproteine L, M und S zusammen, die in jeweils unterschiedlicher Anzahl die virale Hülle bilden. Verändert: Zeyen und Prange, 2018

Das HBV-Hüllprotein besitzt mehrere Transmembran (TM)-Domänen sowie Bereiche zwischen diesen Komponenten, die entweder ins Zytosol oder ins ER-Lumen hineinragen. Diese sogenannten zytosolischen bzw. antigenen Schleifen („cytosolic“ bzw. „antigenic loop“) besitzen wichtige Bindemotive für zelluläre Protein-Protein-Interaktionen und erfüllen grundlegende Funktionen in der Formation viraler und subviraler Partikel sowie der Vermittlung der Infektiosität (Shirvani-Dastgerdi und Tacke, 2015; Löffler-Mary, 2000). Über Funktionsweise und Notwendigkeit des vierten Proteins HBxAg (X) herrscht bis zum heutigen Kenntnisstand wenig Klarheit. Es scheint auf vielfältige Weise in regulatorische Prozesse während der Virus-Morphogenese miteingebunden zu sein. Vollständige HBV-Partikel ergeben eine Größe von etwa 42 nm (Hu und Liu, 2017; Bruss, 2007).

Eine der charakteristischsten Eigenschaften von HBV ist die massive Überproduktion unvollständiger viraler Partikel – sogenannter subviraler Partikel (SVPs). Hierbei sind in den Seren betroffener Patienten sowohl nicht-infektiöse, „unreife“, Partikel mit DNA zu finden, als auch solche, die kein Genom besitzen (Ganem, 1991; Wang et al., 2016). Umhüllte Kapside, die kein Genom besitzen, werden ungefähr hundertmal so oft detektiert wie HBV-Virionen. In zahlreichster Form entstehen sogenannte „leere“, sphärische Filamente und quasi-sphärische Partikel, die lediglich aus den S-, M- oder L-Hüllproteinen gebildet werden und weder ein Kapsid noch ein Genom enthalten (Bruss, 2007; s. Abb. 2A). Die Partikel bestehen hauptsächlich aus der S-Variante des Hüllproteins in Verbindung mit zellulären Lipiden und treten meist mit einer Größe von etwa 22 nm auf; die Filamente besitzen variable Größen. Die Formation der sphärischen SVPs aus etwa 100 einzelnen S-Molekülen ist nur teilweise bekannt und von funktionellen Eigenschaften der TM-Domänen des kleinen HBV-Hüllproteins abhängig (Pfeiffer et al., 2018; Siegler und Bruss, 2013). Diese sind unter Anwendung unterschiedlicher Translokations-Signale in der Lage, das virale Protein in die ER-Membran zu integrieren und die Entstehung der zytosolischen und luminalen Schleifen zu initiieren. Bereits kurz nach der Synthese tritt das S-Protein in Dimeren auf, die in der zellulären Membran treiben und anschließend zu höheren Komplexen oligomerisieren. Nach bisherigen Erkenntnissen erfolgt die Dimer-Bildung am ER, die SVP-Bildung nach Transport der Dimere an einer Membran zwischen ER und Golgi-Apparat (Suffner et al., 2018; Huovila et al., 1992). Aktuellen Forschungsdaten folgend werden die sphärischen SVPs mittels des generellen sekretorischen Weges über den Golgi-Apparat aus der Zelle geschleust und sind

dabei von zellulären Faktoren unabhängig, die die Vesikel-Freisetzung aus den sogenannten Multivesikulären Körpern („multivesicular bodies“; MVBs) vermitteln. Filamente und infektiöse Virionen hingegen benötigen diese und scheinen demnach die Wirtszelle mithilfe der MVBs und assoziierter Proteine zu verlassen (Suffner et al., 2018; Peiffer et al., 2018; Yan et al., 2016; Gilbert et al., 2005; Jiang et al., 2015). Die subviralen HBV-Partikel werden sehr effektiv aus den Zellen sekretiert und sind aufgrund deutlich höherer Expression etwa hunderttausendmal öfter außerhalb infizierter Zellen zu finden als die vollständigen HBV-Virionen. Es wird vermutet, dass diese massive Überproduktion die Immunantwort des Wirts auf eine Weise beeinflusst, die sich positiv auf das Virus auswirkt und gegebenenfalls als eine Art Ablenkungsmechanismus des Immunsystems fungiert (Bruss, 2007; Peiffer et al., 2018). Auch scheinen die SVPs in der Lage zu sein, neutralisierende Antikörper gegen HBsAg zu blockieren. Demzufolge würden sie dazu dienen, die Ausbreitung und Lebensdauer des Virus im infizierten Wirt zu fördern (Cornberg et al., 2017). Im Gegensatz zu der für das Virus vorteilhaften Wirkung können SVPs und Virus-ähnliche Partikel („virus-like particles“; VLPs) jedoch auch für prophylaktische, antivirale Behandlungen zum Einsatz kommen. So wurden VLP-Expressionssysteme in Hefen, Säugerkzellen, Insekten und Pflanzen etabliert, die die kommerzielle Herstellung von Impfstoffen ermöglichen (Mohsen et al., 2017). Auch das kleine HBV-Hüllprotein konnte in den 1980ern in *S. cerevisiae* rekombinant exprimiert und als effektiver HBV-Impfstoff weiterentwickelt werden (Valenzuela et al., 1982, Stevens et al., 1987; Eddleston, 1990).

1.1.5 Infektionszyklus von HBV

HBV zeichnet sich unter anderem dadurch aus, dass es spezifisch die Leberzellen von Menschen und einigen nicht-humanen Primaten infiziert. Vor der Identifizierung des spezifischen Rezeptors konnte bereits festgestellt werden, dass HBV primäre Hepatozyten *in vivo* via Clathrin-vermittelter Endozytose betreten kann (Huang et al., 2012). Ende des Jahres 2012 konnte das Protein „sodium-taurocholate cotransporting polypeptide“ (NTCP) als funktioneller Leberzell-Rezeptor von HBV und HDV (vgl. 1.2.3) identifiziert werden, was nähere Erkenntnisse über den viralen Lebenszyklus von HBV liefern und die Entwicklung antiviraler Strategien deutlich vorantreiben konnte (Yan et al., 2012; Ni et al., 2014). Der NTCP-Rezeptor dient

normalerweise dem Recycling-Prozess von Gallensäuren aus dem Blut und deren Aufnahme in die Leber. Erstaunlicherweise konnte gezeigt werden, dass dieses Protein bereits durch kleinste Moleküle blockiert werden kann, wobei die genauen Details der Regulation dieses Rezeptors und dessen Interaktion mit der Virushülle noch nicht vollständig ergründet sind. Nach bisherigen Erkenntnissen ist die PräS1-Domäne im großen HBV-Hüllprotein L für die Interaktion mit NTCP verantwortlich (Eller et al., 2018; Geier et al., 2008; Ni et al., 2014).

Der HBV-Infektionszyklus konnte nach bisherigen Erkenntnissen in mehreren Schritten beschrieben werden (s. Abb. 3). Nach Eintritt des Virus in die Wirtszelle finden die Fusion der viralen Hüllproteine mit endosomalen Membranen sowie der Transport des Genoms und der Polymerase in den Nukleus statt. Die unvollständige Virus-DNA (rcDNA) wird in ihrer teilweise doppelsträngigen Konformation zu einer kovalent-geschlossenen, zirkulären DNA (cccDNA) komplementiert, die permanent und stabil im Nukleus der Wirtszelle verbleibt und auch als Minichromosom bezeichnet wird. Sie dient als Matrize für die prägenomische Virus-RNA (pgRNA) und die viralen „messenger“-RNAs (mRNAs) (Suzuki et al., 2017, Li et al., 2017). Mehrere Promotoren im viralen Genom sorgen hierbei für jeweils verschieden starke Aktivität einer zellulären RNA-Polymerase, die die unterschiedlich großen RNA-Templates *precore*, *surface* und *x* aus der Virus-DNA generiert (Rall et al., 1983; Whittaker et al., 2000). Die pgRNA kodiert für das virale Kapsidprotein Core und die virale Polymerase. Die RNAs werden anschließend in das Zytosol transportiert, wo die Biosynthese der Virusproteine aus den mRNAs, sowie die Verpackung der pgRNA gemeinsam mit der Polymerase in das neu generierte Kapsid stattfinden können (Whittaker et al., 2000; Hirsch et al., 1990). Das Kapsid besteht aus ca. 240 identischen Kopien des Core-Proteins, welches hierzu zunächst Homodimere bildet, die anschließend dimerisieren und eine ikosaedrische Form annehmen. Dieser Prozess wird durch Wirtsfaktoren wie das Chaperon Hsp90 („heat shock protein 90“) und durch die virale Polymerase (Pol) unterstützt (Zhou und Standring, 1992; Wang et al., 2002). Dieses Enzym ist in der Lage, die Verpackung des Pol/pgRNA-Komplexes zu vermitteln und die verpackte pgRNA mittels Reverse-Transkriptase (RT)-Aktivität zunächst zu einzelsträngiger, anschließend zu rcDNA umzuschreiben, was die virale Genom-Replikation vervollständigt (Liu et al., 2017). In Experimenten mit DHBV und HBV konnte gezeigt werden, dass Hemmungen der enzymatischen RT-Aktivität dazu führen, dass die entstehenden Nukleokapside (NCs) mit „unreifem“

Genom kaum von der Virushülle umschlossen oder sekretiert werden (Wei et al., 1996; Summers und Mason, 1982; Perlman und Hu, 2003).

Nach erfolgreicher „Reifung“ des Genoms wird das NC im weiteren Verlauf zum ER transportiert und dort mit den neu synthetisierten Hüllproteinen S, M und L umschlossen. Diese werden in einer umfangreichen, transmembranen Topologie an der ER-Membran generiert und interagieren mit dem HBV-Kapsid auf direkte Weise mittels der PräS1-Domäne im L-Protein. Auch bei diesem Prozess üben zelluläre Chaperone wie Hsc70 („heat shock cognate 70“) und das ER-Protein Calnexin Virus-unterstützende Funktionen aus (Prange et al., 1999; Lambert und Prange, 2003). Bemerkenswert ist hierbei, dass das L-Protein in einer dualen Topologie vorliegt, die es ihm ermöglicht, die N-terminale PräS-Domäne zuerst ins Zytoplasma und anschließend ins ER-Lumen hineinragen zu lassen. Diese sogenannte Translokation führt dazu, dass etwa die Hälfte aller L-Moleküle nach Umhüllen des NCs zytosolisch (in das Virus), die andere Hälfte luminal (aus dem Virus heraus) angeordnet sind und dadurch unterschiedlichen Funktionen in der Virusmorphogenese nachgehen können (Lambert et al., 2004; Lambert und Prange, 2001; Prange und Streeck, 1995; Bruss et al., 1994). Zytosolisch ausgerichtete L-Proteine vermitteln die Bindung an das Nukleokapsid, luminal ausgerichtete die Bindung an den hepatozellulären NTCP-Rezeptor (Bruss, 1997; Zeyen und Prange, 2018). Auch in anderen Hepadnaviridae wie DHBV konnte diese duale Topologie nachgewiesen werden, was für eine evolutionär bedeutende und konservierte Funktion des L-Proteins spricht. Für die Interaktion zwischen dem großen HBV-Hüllprotein und dem Nukleokapsid scheint es dabei unerheblich zu sein, ob dieses das DNA-Genom enthält oder leer ist (Guo und Pugh, 1997; Hourieux et al., 2000; Bruss, 2004).

Die Ausschleusung vollständiger HBV-Virionen benötigt Funktionen der „endosomal sorting complexes required for transport“-Maschinerie (ESCRT) und findet nach bisherigen Erkenntnissen an den Multivesikulären Körpern (MVBs) statt (Watanabe et al., 2007; Stieler und Prange, 2014; Patient et al., 2009). Der Transport zwischen ER, Golgi-Apparat und MVBs ist bisher nicht ergründet; mögliche Transportsysteme stellen der intrazelluläre Vesikeltransport oder die zelluläre Autophagie dar. In beiden Fällen konnten Studien Interaktionen zwischen L und entsprechenden Komponenten zeigen (Rost et al., 2006; Jürgens et al., 2013; Döring et al., 2018; Li et al., 2011). Falls die MVBs als Exozytose-Apparat der HBV-Virionen dienen, würde dies eine Fusion der endosomalen Membranen mit der Plasmamembran unter Freisetzung der

Viruspartikel beinhalten. Solche viralen Austrittsmechanismen via MBVs konnten bereits für andere Hepatitisviren wie das Hepatitis-E-Virus (HEV) gezeigt werden (Jiang et al., 2015; Zeyen und Prange, 2018; Nagashima et al., 2014).

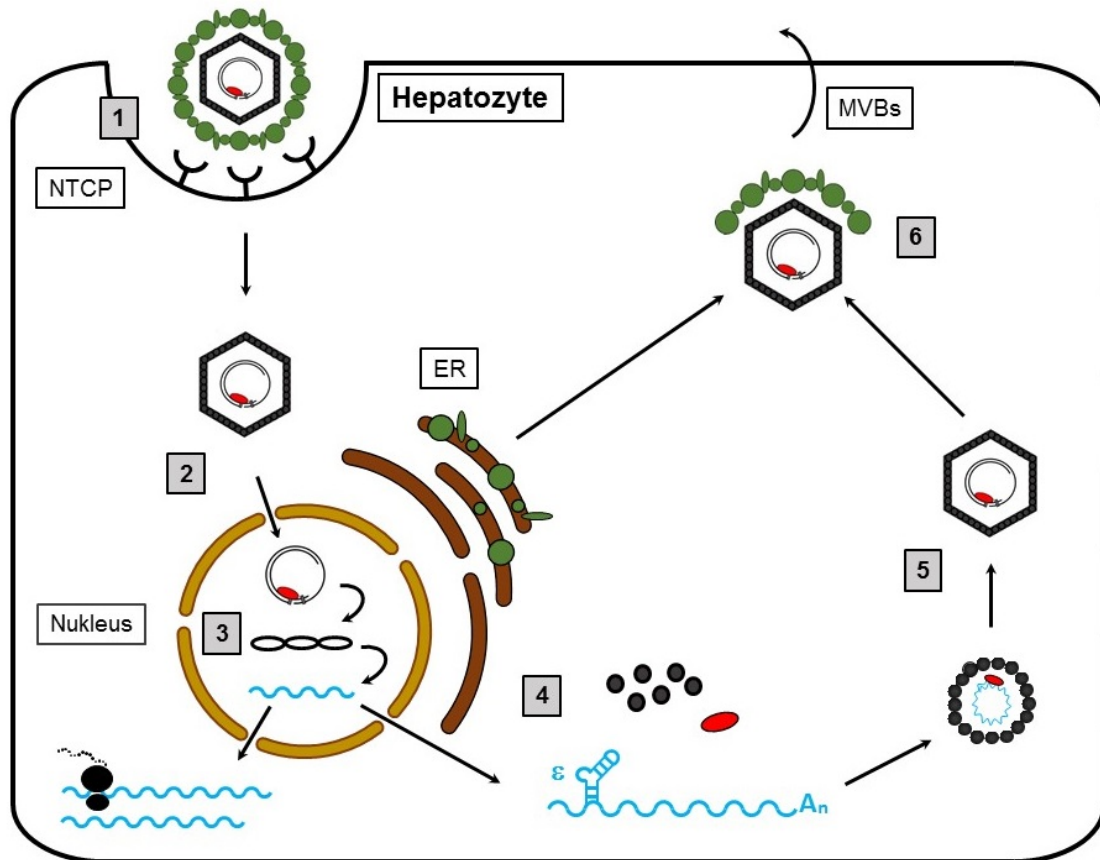


Abb. 3: Infektionszyklus von HBV. Dargestellt ist der vereinfachte Lebenszyklus von HBV nach Infektion der Wirtszelle. **(1)** HBV betritt die Hepatozyte mittels des NTCP-Rezeptors. **(2)** Das Nukleokapsid wird im Zytosol von der Virushülle (grün) befreit und gibt das virale, unvollständige DNA-Genom mit der viralen Polymerase (rot) frei. **(3)** Dieses tritt in den Nucleus der Wirtszelle ein (braun), wird dort zu cccDNA komplementiert, die wiederum als Matrize für die mRNAs (blau, links) und die pgRNA dient (blau, rechts). **(4)** Die HBV-Hüllproteine werden am ER aus verschiedenen mRNAs generiert (dunkelbraun); Kapsidproteine und Polymerase entstehen aus der pgRNA im Zytosol. **(5)** Die pgRNA wird zusammen mit der neu synthetisierten viralen Polymerase im ebenfalls neu gebildeten viralen Kapsid verpackt. Durch Einsatz der HBV-Polymerase mit Reverse-Transkriptase-Funktion wird die pgRNA zum DNA-Genom umgeschrieben und die Replikation abgeschlossen. **(6)** Die Umhüllung des Nukleokapsids geschieht am ER mit Weitertransport zum Golgi-Apparat und dem vermuteten Austritt der reifen HBV-Partikel an den Multivesikulären Körpern (MVBs).

1.2 Das Hepatitis-D-Virus (HDV)

1.2.1 Struktur des HDV-Genoms

Das Hepatitis-D-Virus (HDV), auch Delta genannt, wird als sogenanntes „defektes“ Virus eingestuft, das ein einzelsträngiges, zirkuläres RNA-Genom mit einer Länge

von etwa 1,7 kb enthält - das kleinste bekannte Genom von Säugetier-befallenen Viren. Dieses ist kovalent geschlossen und kodiert mit nur einem ORF in zwei möglichen Varianten für das Delta-Antigen HDAg, die aus jeweils 195 bzw. 214 AS bestehen (Lin et al., 2017; Weiner et al., 1987; Rizzetto, 2016). Es sind weitere ORFS bekannt, von denen einer für ein Polypeptid namens Peptid-K kodiert, das eine bisher unbekannte Funktion ausübt (Bichko et al., 1996). In HDV-infizierten Zellen liegen drei Arten von RNA vor, die in stark unterschiedlicher Anzahl auftreten: die genomische RNA (300.000 Kopien), die antigenomische RNA (100.000 Kopien) und die mRNA (500 Kopien) (Alves et al., 2013). HDV mit seinem RNA-Genom ist unter viralen Pathogenen der Tierwelt einzigartig und eng verwandt mit pflanzlichen Viroiden, die allerdings im Gegensatz zu Delta keine Proteine kodieren (Wang et al., 1986). HDV wird als Prototyp und einziges Mitglied der Familie der „Deltaviridae“ zugeordnet, da es in seiner Abhängigkeit vom Hepatitis-B-Virus nicht der Definition eines Virus entspricht und keiner anderen Virusfamilie zugeordnet werden kann (Sureau und Negro, 2016).

Das virale RNA-Genom benötigt für dessen Vervollständigung die Bearbeitung durch das zelluläre Enzym ADAR1 („adenosine deaminase acting on RNA 1“). Dieses ist in der Lage, das UAG-Stopp-Codon im HDAg-ORF in ein UGG-Codon umzuwandeln und dadurch die Expression des kleinen Delta-Antigens HDAg-S (24 kDa) zu der des großen HDAg-L mit 19 zusätzlichen AS am C-Terminus (27 kDa) zu verändern. Nur mithilfe dieses Wirtsenzyms und des „RNA-Editings“ ist es HDV möglich, seine beiden Proteine aus der 0,8 kb-großen mRNA zu exprimieren (Jayan und Casey, 2002; Chao et al., 2015; Rizzetto, 2016). Auch kodiert das HDV-Genom keine RNA-abhängige RNA-Polymerase, sodass die virale Replikation ebenfalls von Wirtsenzymen abhängig ist. Zelluläre RNA-Polymerasen führen im Nukleus der Wirtszelle die Replikation des genomischen RNA-Strangs unter Entstehung einer antigenomischen Zwischenstufe durch, wobei selbstständig spaltende Elemente, sogenannte Ribozyme, assistieren (Sureau und Negro, 2016). Eine der wichtigsten Eigenschaften des HDV-Genoms ist die Fähigkeit, eine quasi-doppelsträngige Konformation anzunehmen, wobei die beiden Stränge (genomisch und antigenomisch) sich selbstständig mit 74 % ihrer Nukleotide aneinanderlegen. Replikation und Formation der Delta-Virionen sind davon abhängig, dass die RNA flexibel in dieser Form vorliegt, um mit den HDV-Antigenen zu interagieren und den

sogenannten Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) zu bilden (Griffin et al., 2014; Sureau und Negro, 2016).

1.2.2 Molekularer Aufbau viraler und subviraler HDV-Partikel

HDV wird als unvollständiges Satelliten-Virus bezeichnet, da es für die Morphogenese infektiöser Virionen die Hüllproteine von HBV benötigt. Auch verwandte Pathogene aus der Familie der Hepadnaviridae wie das Woodchuck-Hepatitisvirus (WHV) sind in der Lage, HDV-Partikel zu vervollständigen (Ryu et al., 1992). Die Delta-Virionen tragen im Inneren das zirkuläre RNA-Genom aus genomischem und antigenomischem Strang und pro Molekül RNA ca. 200 Kopien des HDV-Antigens HDAg in den beiden Isoformen S-HDAg und L-HDAg (Gudima et al., 2002). S-HDAg agiert als Aktivator der HDV-RNA-Replikation, während L-HDAg die wichtige Funktion der Interaktion mit HBV ausübt sowie einen dominant-negativen Repressor der HDV-Replikation darstellt (Shih et al., 2008; Chao et al., 1990). Diese Komponenten bilden zusammen einen stabilen Ribonukleoprotein-Komplex (RNP), der in einer Kapsid-ähnlichen Struktur mit einer Größe von etwa 19 nm vorliegt (Ryu et al., 1993; Sureau, 2006). Zur Vervollständigung der Virus-Morphogenese und Vermittlung der Infektiosität ist HDV auf die HBV-Hüllproteine S und L angewiesen. Diese Glykoproteine sind in der Lage, mit dem RNP-Komplex zu assoziieren und die etwa 36 nm-großen HDV-Virionen mit der Lipiddoppelschicht zu komplementieren (Freitas et al., 2014; Shirvani-Dastgerdi und Tacke, 2015; Sureau und Negro, 2016).

Bisherige Forschung konnte zeigen, dass das kleine HBV-Hüllprotein S ausreichend ist, um den Zusammenbau der HDV-Partikel zu vervollständigen. Diese subviralen HDV-Partikel zeigen Protein-Eigenschaften, die den natürlich vorkommenden Virionen gleichen, sind jedoch aufgrund des fehlenden L-Proteins nicht in der Lage, neue Zellen zu infizieren (Wang et al., 1991). Eine der neuesten Entdeckungen bezüglich viraler HDV-Partikel besagt, dass nicht nur HBV als Helfer-Virus assistieren kann. Stattdessen konnte in mehreren Modellen demonstriert werden, dass das Delta-RNP mit Glykoproteinen unterschiedlichster Viren interagieren kann. Nicht mit HBV verwandte Viren aus den Gattungen der Vesiculoviren, Flaviviren und Hepaciviren scheinen ebenfalls in der Lage zu sein, mithilfe ihrer jeweiligen

Hüllproteine infektiöse HDV-Partikel *in vivo* zu bilden, die je nach interagierendem Rezeptor unterschiedlichste Gewebe infizieren können (Perez-Vargas et al., 2019).

1.2.3 Infektionszyklus und HBV-Dependenz

Um seinen Lebenszyklus zu komplementieren, benötigt HDV benötigt die Assistenz von HBV. Zwar ist das Virus in der Lage, auch unter Abwesenheit von HBV seine Genom-Replikation durchzuführen, jedoch kann die Verpackung der Virionen sowie deren Infektiosität in diesem Fall nicht vermittelt werden. Dies liegt daran, dass Ein- und Austritt infektiöser Virionen durch die Interaktion des großen HBV-Hüllproteins L mit dem Leberzell-spezifischen NTCP-Rezeptor vermittelt werden (Goyal und Murray, 2016, vgl. 1.1.5).

HDV ist für die Replikation des RNA-Genoms von mehreren Wirtsfaktoren wie der RNA-abhängigen RNA-Polymerase abhängig, die von dem Virus direkt funktionell beeinflusst werden können (Lügtgehetmann et al., 2011). Nachdem das HDV-Genom während der Primärfektion in den Nukleus eingedrungen ist, wird es mittels eines doppelten, sogenannten „Rolling-Circle-Mechanismus“ durch die zelluläre RNA-Polymerase II (Pol-II) vervielfältigt (Macnaughton und Lai, 2002; Sureau und Negro, 2016, s. Abb. 4). Die Initiierung dieses Mechanismus beginnt hierbei mit der Synthese linearer Transkripte unter Verwendung der zirkulären, genomischen RNA als Template in der Kernpore (Nukleolus). Diese multimerischen Abschnitte werden durch sogenannte Ribozyme, selbstständig schneidende und autokatalytische Sequenzen, in Monomere unterteilt. Aus den Monomeren kann anschließend mittels Ligation ein antigenomischer, zirkulärer RNA-Strang als Zwischenstufe synthetisiert werden, der durch Anwendung eines gleichen Rolling-Circle-Mechanismus im Nukleus die genomische RNA vervielfältigt und die virale mRNA produziert (Lai, 1995). Nach Synthese und Prozessieren wird die genomische RNA wahrscheinlich mithilfe zellulärer Signalwege in das Zytosol exportiert, wo sie mit den aus der mRNA hergestellten HDAg-Proteinen zum RNP assoziiert. Der antigenomische Strang verbleibt überwiegend im Nukleus (Macnaughton und Lai, 2002; Lin et al., 2010).

Die Replikation des Delta-Genoms wird durch das kleine HDAg-Protein aktiviert und durch zelluläre Proteine wie Pol-II determiniert, ist jedoch von HBV gänzlich unabhängig. Da HDV jedoch keine eigene Hülle besitzt, können Reifung und Infektiosität der Delta-Virionen nur durch Anwesenheit von HBV erreicht werden

(Sureau und Negro, 2016; Zuccola et al., 1998). Dementsprechend benötigt das Virus zur Komplementierung seiner Pathogenese die cccDNA von HBV in derselben infizierten Hepatozyte (Lügtgehetmann et al., 2011). Hierbei scheint das kleine HBV-Hüllprotein S für den Zusammenbau der Virionen und den Zellaustritt hinreichend zu sein, das große HBV-Hüllprotein L bzw. die PräS1-Domäne jedoch für die virale Infektiosität unabdingbar (Wang et al., 1991; Sureau et al., 1993).

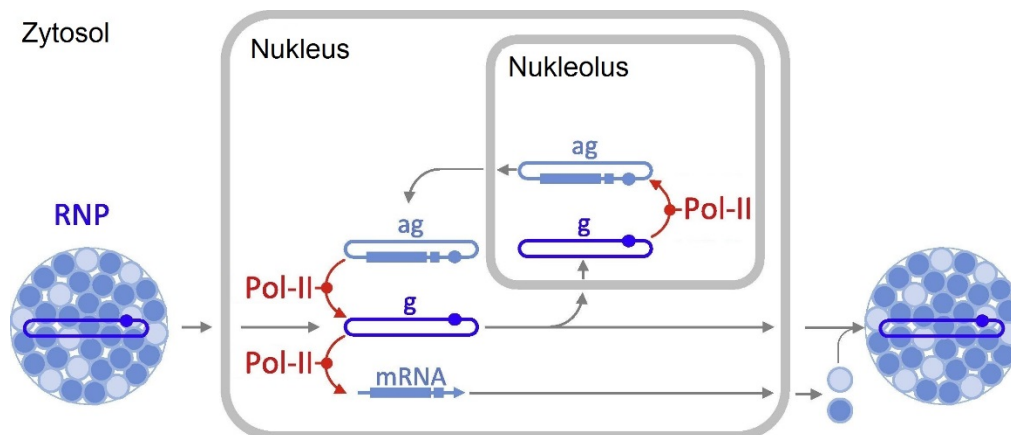


Abb. 4: Replikation der HDV-RNA. Während der HBV-unabhängigen Replikation des HDV-Genoms dringt das Ribonukleoprotein (RNP, blau) aus dem Zytosol in den hepatozellulären Nucleus ein. Im Nucleolus wird aus der genomischen RNA (g) durch einen „Rolling-Circle-Mechanismus“ mittels der zellulären Polymerase II (Pol-II) der antigenomische (ag) Strang synthetisiert. Dieser dient im Nucleus als Template für die Replikation des genomischen Stranges bzw. der viralen mRNA. Auch bei diesem zweiten Rolling-Circle-Mechanismus assistiert Pol-II. Aus der mRNA werden im Zytosol die beiden Varianten des HDAg-Proteins gebildet (hell- und dunkelblau), die gemeinsam mit der genomischen RNA das neu generierte RNP bilden.
Verändert: Sureau und Negro, 2016

Das Delta-RNP wird vorzugsweise am ER mit den HBV-Proteinen umhüllt, indem eine direkte Interaktion zwischen L-HDAg und einem Tryptophan-angereicherten Motiv im C-terminalen Ende von HBV.S stattfindet. Dieses Bindemotiv in S befindet sich in der zweiten zytosolischen Schleife (CYT-II) zwischen den beiden Transmembran-Domänen III und IV und ist neben anderen AS in der ersten Schleife (CYT-I) notwendig und ausreichend für den Zusammenbau der Delta-Virionen (Komla-Soukha und Sureau, 2006; Jenna und Sureau, 1999; Blanchet und Sureau, 2006).

Die weiteren Schritte im Lebenszyklus von HDV, also Transport der Virionen zur Plasmamembran, Zellaustritt und virale Verbreitung, könnten entsprechend der HBV-Pathogenese ablaufen, da diese Schritte durch die extern generierte HBV-Hülle vermittelt werden (vgl. 1.1.5). Jedoch herrscht über diese Schritte im HDV-Infektionszyklus noch große Unklarheit. Bemerkenswerterweise konnte festgestellt

werden, dass HDV trotz seiner Abhängigkeit von HBV in der Lage ist, dessen Expression *in vitro* und *in vivo* zu senken. Dies spricht dafür, dass Delta direkten oder indirekten Einfluss auf die virale Replikations-Maschinerie von HBV nehmen kann (Lütghehmann et al., 2011; Giersch und Dandri, 2015; Eller et al., 2018).

1.2.4 Bedeutung als Pathogen

Seit der Entdeckung Deltas mittels Immunfluoreszenz-Studien vor über 40 Jahren als neues, eigenständiges Antigen in Seren chronisch infizierter HBV-Patienten wurde die Forschung über das Virus intensiviert (Rizzetto et al., 1977). In späteren Jahren konnte außerdem gezeigt werden, dass die Replikation von HDV auch unter der Präsenz anderer Hepadnaviridae wie WHV stattfinden kann (Ponzetto et al., 1984). Genomische Analysen ordneten dem Virus bisher drei Genotypen mit acht Untergruppen zu, die sich ähnlich wie bei HBV in ihrer geographischen Verteilung stark unterscheiden. HDV-1 ist weltweit zu finden, HDV-2 und -4 lediglich in Asien und HDV-3, -5, -6, -7 und -8 treten isoliert in Südamerika und Afrika auf (Lin et al., 2017).

Weltweit sind ca. 20 Millionen Menschen chronische Träger einer HDV-Infektion. Da HDV für eine Infektion auf eine simultan oder zuvor erfolgte HBV-Infektion angewiesen ist und dessen spezifischer Krankheitsverlauf oft harmlos ausfällt, wird die pathogene Bedeutung Deltas meist unterschätzt (Freitas et al., 2014; Hughes et al., 2011). Mehrere medizinische Studien belegen mittlerweile jedoch die klinische Relevanz des Virus und konnten zeigen, dass eine Superinfektion beider Viren zu einem weitaus drastischeren und aggressiveren Krankheitsverlauf führt als eine HBV-Infektion alleine (Hadler et al., 1984; Saracco et al., 1987). Generell resultiert eine anhaltende HDV-Replikation unter HBV-Infektion in der deutlichen Steigerung der Risikofaktoren für die Ausbildung von Leberzirrhosen und HCCs sowie entsprechender Sterblichkeitsraten (Romeo et al., 2009). Heutzutage werden Koinfektionen beider Viren als globales Gesundheitsproblem eingestuft, wobei die HDV-Infektion für die Ausbildung der schwerwiegendsten Form viral induzierter Leberkrankheiten verantwortlich ist. Therapeutische Ansätze gegen chronische Infektionen richten sich vorwiegend gegen die zelluläre Farnesyltransferase, die während der HDV-Morphogenese benötigt wird (Glenn et al., 1992; Lempp und Urban, 2016). Außerdem könnte das Blockieren des vor einigen Jahren identifizierten

NTCP-Rezeptors den Eintritt von HBV und HDV zukünftig effizient inhibieren (Yan et al., 2012; Lempp und Urban, 2016).

Entsprechend neuester Ergebnisse scheint HDV in der Lage zu sein, die Hüllproteine unterschiedlichster, nicht mit HBV verwandter Viren für dessen Morphogenese zu rekrutieren. Falls zukünftige Studien zeigen könnten, dass diese Vielzahl von HDV-Virionen auch natürlicherweise in menschlichen Seren zu detektieren ist, müsste die pathogene Bedeutung des Satelliten-Virus neu bewertet werden. In diesem Fall könnte HDV als eine Art akuter Pathogenese-Verstärker der jeweiligen Primärinfektion agieren, der weltweit immensen Einfluss auf unterschiedlichste Krankheitsverläufe hat (Perez-Vargas et al., 2019).

1.3 Intrazelluläre Transportmechanismen eukaryotischer Zellen

Eine der bemerkenswertesten, evolutionären Eigenschaften, die eukaryotische von prokaryotischen Zellen unterscheiden, ist die subzelluläre Unterteilung in zahlreiche von Membranen umhüllte Kompartimente. Diese „Organellen“ ermöglichen der Zelle, eine Vielzahl verschiedener, metabolischer Prozesse gleichzeitig stattfinden zu lassen, auch wenn sich deren biochemische Ansprüche stark voneinander unterscheiden (Rout und Field, 2017; Lev, 2010). Unterschiedliche Zeitpunkte der Proteinbiosynthese können daher innerhalb derselben Zelle in großer Effizienz bedient werden. Diese Art der Zellorganisation führt jedoch auch dazu, dass ein stabiles Kommunikationssystem zwischen den separierten Organellen bestehen muss. Neben der subzellulären Unterteilung zeichnen sich eukaryotische Zellen daher durch ein extrem dynamisches und umfangreiches Netzwerk an Transportsystemen aus, die stark selektiv Proteine und Lipide transportieren und dadurch die intrazelluläre Kommunikation garantieren können (Gürkan et al., 2006; Kirchhausen, 2000). Komplexe Maschinerien, die Membranen manipulieren und in Endozytose, Exozytose und intrazellulärem Transport agieren, konnten dementsprechend als unabdingbar für die zelluläre Organisation eukaryotischer Zellen klassifiziert werden (Rout und Field, 2017).

1.3.1 Die „Endosomal Sorting Complexes Required for Transport“ (ESCRT)-Maschinerie

Der Transport von Proteinen zwischen eukaryotischen Zellen bzw. zwischen intrazellulären Organellen und Kompartimenten erfordert umfangreiche Umstrukturierungen von Membranen, um beispielsweise die Bildung und Verschmelzung von Vesikeln zu ermöglichen. Die hoch konservierte sogenannte „endosomal sorting complexes required for transport“ (ESCRT)-Maschinerie wurde in den 1990ern mithilfe der Analyse von „vacuolar protein sorting“ (VPS)-Mutanten in *S. cerevisiae* identifiziert und ist für die Umformung von Membranen extrem bedeutend (Raymond et al., 1992). Diese Maschinerie, bestehend aus mehreren spezialisierten Proteinkomplexen, ist in der Lage, topologisch einzigartige Mechanismen der Membrankrümmung und -Abschnürung aus dem Zytoplasma heraus durchzuführen (Schmidt und Teis, 2012). ESCRT ist hierbei ein Teil des endosomalen Signalweges zu den Multivesikulären Körpern (MVBs) und von essentieller Bedeutung bei der zellulären Zytokinese und der Freisetzung verschiedener behüllter Viren (Gatta und Carlon, 2019). Mithilfe langjähriger Forschungen konnten die einzelnen Funktionen der ESCRT-Komplexe an der endosomalen Membran teilweise aufgeklärt werden.

Die Funktionsweise der ESCRT-Maschinerie kann in drei wesentliche Abschnitte unterteilt werden: die Erkennung der mit Ubiquitin markierten Fracht-Moleküle („Cargo“), das Umformen der endosomalen Membran und die Katalysation der finalen Abschnürung unter Bildung intraluminaler Vesikel (ILV) mit entsprechender Fracht (Raiborg und Stenmark, 2009). Zu ESCRT gehören die Komplexe ESCRT-0, -I, -II und -III, die jeweils aus zwei bis sieben Untereinheiten bestehen, sowie mehrere assoziierte Komponenten wie der VPS4-Komplex und das Adaptor-Protein Bro1/ALIX („ALG-2 interacting protein x“). Den einzelnen Komponenten der ESCRT-Maschinerie können dabei spezifische Funktionen innerhalb des Membranumformungsprozesses zugesprochen werden. ESCRT-0, bestehend aus den Untereinheiten HRS und STAM, besitzt Clathrin- und Ubiquitin-bindende Sequenzen und assoziiert außerdem mit dem Komplex ESCRT-I. Dieser besteht aus TSG101, VPS28, VPS37 und MVB12 und ist in der Lage, an ESCRT-0 und ESCRT-II zu binden. ESCRT-II wiederum besitzt die Untereinheiten VPS36, VPS22 und VPS25 (Raiborg und Stenmark, 2009). Alle dieser Komplexe sind an endosomale Membranen assoziiert und in der Lage, an Ubiquitin zu binden und auf diese Weise direkt mit entsprechend markierten Frachtmolekülen zu interagieren, wobei ESCRT-0 durch eine erhöhte Bindekapazität

wahrscheinlich als eine Art Filter und effektive Auffangstelle der zu transportierenden Proteine funktioniert und diese an die anderen Komplexe weiterleitet. Der zuletzt eingereichte Komplex, ESCRT-III, bestehend aus VPS2 (CHMP2), VPS20 (CHMP6), VPS24 (CHMP3), SNF7 (CHMP4), VPS60 (CHMP5), DID2 (CHMP1) sowie IST1 ist nach bisherigen Erkenntnissen der funktionell konservierteste und hauptsächlich Membran-beeinflussende Part der Maschinerie. ESCRT-III-Komplexe polymerisieren in dieser Funktion zu Filamenten, die die Membranumformung und -Abschnürung anschließend in einer ringförmigen Struktur und gemeinsam mit der ATPase VPS4 erreichen (Adell et al., 2016; Christ et al., 2017, s. Abb. 5). Dies legt nahe, dass die Schlüsselfunktionen der anderen Komplexe und assistierenden Proteine in der Maschinerie die Rekrutierung von ESCRT-III an die endosomale Membran sowie die effektive Anlieferung und Selektion von Cargos beinhalten (Christ et al., 2017; Raiborg und Stenmark, 2009).

Eine Vielzahl umhüllter Viren verwendet die ESCRT-Maschinerie, um die infizierte Wirtszelle durch die Plasmamembran zu verlassen. Insbesondere das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) ist dafür bekannt, die ESCRT-Proteine TSG101 und ALIX zu rekrutieren und die Maschinerie für die Freisetzung seiner Virionen auszubeuten (Carlson und Hurley, 2012). Dem Murinen Leukämie-Virus (MLV) konnte, wie HIV, eine strikte Abhängigkeit von CHMP2A, CHMP4B und VPS4 nachgewiesen werden, während die Isoformen CHMP2B und CHMP4A sowie CHMP1, CHMP3, CHMP5 oder CHMP6 für die Sekretion der Virionen entbehrlich waren (Christ et al., 2017, Bartusch und Prange, 2016).

Bezüglich HBV konnten bisherige Studien zeigen, dass die Reifung viraler Partikel abhängig von den CHMP-Proteinen des ESCRT-III-Komplex, dem Adaptor-Protein γ 2-Adaptin und dem VPS4-Komplex ist (Lambert et al., 2007). Zusätzlich benötigt HBV den ESCRT-II-Komplex und Komponenten von ESCRT-0 zur Bildung und Sekretion der viralen Partikel (Stieler und Prange, 2014; Chou et al., 2015). Weitere Forschung belegte, dass das zelluläre Protein α -Taxilin (TXLN), das als Bindepartner der Syntaxin-Familie in intrazellulären Transport involviert ist, die Verbindung zwischen HBV und der ESCRT-I-Untereinheit TSG101 herstellt und dementsprechend die ESCRT-Maschinerie zu den viralen Hüllproteinen rekrutiert (Hoffmann et al., 2013). Im Gegensatz zu den infektiösen Virionen benötigen die subviralen NC-Partikeltypen von HBV das Adaptor-Protein ALIX, nicht aber die ESCRT-Maschinerie für deren Exozytose. Die sphärischen SVPs verwenden nach

bisherigen Erkenntnissen keine ESCRT-Komponente, sondern verlassen die infizierte Zelle mittels des generellen Sekretionsweges (Bardens et al., 2011; Patient et al., 2009). Interessanterweise konnte Gegenteiliges bezüglich der subviralen HBV-Filamente gezeigt werden, die wie infektiöse Virionen für das Verlassen der Zelle auf die funktionelle ESCRT-Maschinerie angewiesen sind. Obwohl HBV während der Pathogenese Gebrauch von allen ESCRT-Komplexen macht, führt das alleinige Blockieren des ESCRT-III-Komplexes bereits zu Beeinträchtigungen der Reifung und Freisetzung viraler Partikel (Jiang et al., 2015; Lambert et al., 2007). Dies entspricht den bisherigen Erkenntnissen, dass dieser Komplex der funktionell wichtigste und konservierteste ist, während die anderen ESCRT-Komponenten hauptsächlich für dessen Rekrutierung verantwortlich sind (Christ et al., 2017, Patient et al., 2009).

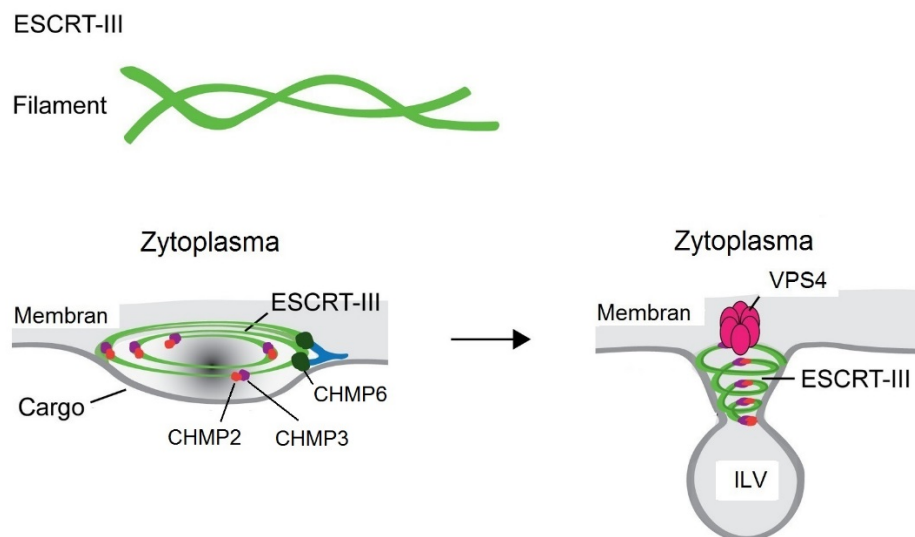


Abb. 5: Membranamformung durch ESCRT-III und VPS4. ESCRT-III-Komplexe polymerisieren zu Filamenten (oben, grün), die anschließend mittels einer ringförmigen Struktur zur Membrankrümmung und -Abschnürung sowie der Ausbildung intraluminaler Vesikel (ILV) führen (unten). Die ESCRT-III-Untereinheiten CHMP2 (orange) und CHMP3 (lila) sowie CHMP6 (dunkelgrün) stabilisieren hierbei die funktionelle Struktur des Komplexes. Bei diesem Prozess assistieren die ATPase VPS4 (pink) sowie der ESCRT-II-Komplex (blau).

Verändert: Adell et al., 2016

1.3.2 Vesikuläre und nicht-vesikuläre Transportsysteme

Die eukaryotische Zelle besitzt eine breite Variation an vesikulären und nicht-vesikulären Transportmechanismen zwischen Organellen und Kompartimenten. Proteine und Lipide, wie beispielsweise Cholesterin, das ein Hauptbestandteil der Plasmamembran und Membranen einiger Organellen ist, werden sowohl mithilfe von Vesikeln als auch durch Vesikel-unabhängige Transportsysteme in der Zelle verteilt.

Cholesterin kann sich unter anderem spontan und ohne jegliche Assistenz zwischen unterschiedlichen Lipiddoppelschichten bewegen (Prinz, 2007). Nicht-vesikuläre Systeme verlangen allerdings oft auch, dass das zu transportierende Protein mit Trägern („Carriers“) assoziiert ist. Zusätzlich erfüllen integrierte Membranproteine wichtige Rollen für die Freisetzung von Cargos aus Membranen, ohne mit Vesikel-Systemen verknüpft zu sein (Maxfield und Menon, 2006). Mitochondrien, die als hochdynamische Kompartimente in existenzielle Zellmechanismen wie Energiesynthese und Apoptose verwickelt sind, führen ebenfalls einen nicht-vesikulären Austausch von Lipiden mit dem ER durch. Mitochondrien sind in keine der drei wesentlichen Vesikeltransport-Routen integriert und daher auf den Lipid-Austausch mithilfe von sogenannten „Membrankontaktseiten“ angewiesen. Solche Austauschreaktionen haben sich als essentiell für den Erhalt der normalen Zellvitalität gezeigt, da eine Störung dieser Transportaktivitäten die unterschiedlichsten Pathogenesen, wie die Entstehung von Karzinomen und Neurodegeneration, hervorrufen kann (Giordano, 2018).

Intrazellulärer Transport mithilfe spezialisierter Mantelproteine, die unterschiedliche Arten von Vesikeln ausbilden, gilt als eine unabdingbare, hoch evolutionäre Eigenschaft eukaryotischer Zellen. Dieser kontinuierliche Transport von Molekülen in Vesikeln, der sogenannte „Cargo Flow“, wird vermittelt durch spezialisierte Knospungs- und Fusionsmaschinerien sowie durch die einzigartigen molekularen und strukturellen Eigenschaften der sogenannten „coat protein complexes“ (CPCs). Dies sind vesikuläre Transportsysteme, die aus mehreren hochspezialisierten Proteinen bestehen und den Transport zwischen unterschiedlichen Zellkompartimenten vermitteln (Dacks und Robinson, 2017; Sato und Nakano, 2007). Im Allgemeinen beginnt der Prozess der Vesikel-Ausbildung damit, dass die entsprechenden Mantelproteine zur jeweiligen Membran rekrutiert werden, meist durch die vorherige Aktivierung einer GTPase. Die korrekten Frachtmoleküle werden anschließend selektiert und die Membran zu einem Transport-Vesikel umgeformt (Robinson, 2015). Die drei bisher identifizierten Vesikel-Typen einer eukaryotischen Zelle sind die gut erforschten Clathrin-ummantelten Vesikel („clathrin-coated vesicles“; CCV) und die später entdeckten „coat protein complex I“- und „coat protein complex II“-ummantelten Vesikel (COPI bzw. COPII, s. Abb. 6). Diese drei Systeme teilen sich einige Eigenschaften, insbesondere hinsichtlich ihrer Architektur, stehen jedoch in bisher ungeklärter Verbindung zueinander (Dacks und Robinson, 2017; Robinson,

2015; Lee und Miller, 2007). Die Clathrin-ummantelten Vesikel erfüllen hierbei den Transport vom Endosom zu den MVBs oder zum Lysosom sowie den Verkehr von Golgi zu MVBs. Sie spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Endozytose der Zelle. Der COPI-Vesikeltransport ereignet sich vom Golgi-Apparat zum ER, der COPII-Transport in entgegengesetzter Richtung (Gürkan et al., 2006; Hsu et al., 2009).

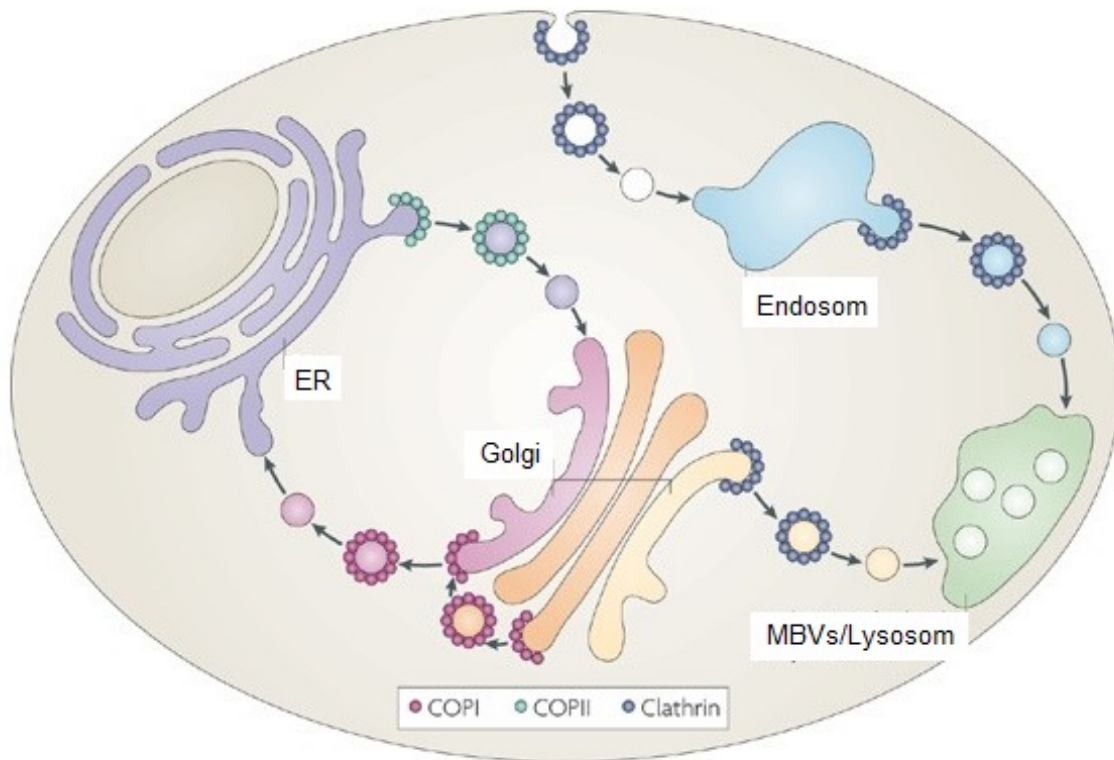


Abb. 6: Vesikulärer Transport in eukaryotischen Zellen. Drei wesentliche Vesikeltransport-Mechanismen erfüllen den „Cargo Flow“ einer eukaryotischen Zelle. Die Maschinerie des „coat protein complex I“ (COPI, rosa) ermöglicht den vesikulären Transport zwischen Golgi-Apparat (Golgi) und Endoplasmatischem Retikulum (ER), während die spezialisierten Proteine des „coat protein complex II“ (COPII, grün) den Protein-Transport von ER zu Golgi kontrollieren. Clathrin-ummantelte Vesikel (blau) verkehren zwischen Endosom bzw. Golgi und Multivesikulären Körpern (MVBs) und Lysosom und spielen außerdem eine Rolle bei endozytotischen Zellprozessen. Verändert: Hsu et al., 2009

1.3.3 Der Clathrin-vermittelte Vesikeltransport

Barbara Pearse gelang es im Jahr 1975 als erster Wissenschaftlerin, ummantelte Vesikel zu reinigen und innerhalb dieses Prozesses Clathrin zu entdecken (Pearse, 1975). Durch die Zusammenarbeit mit Tony Crowther und John Pinch konnte sie außerdem Ende der 1970er feststellen, dass entsprechende Vesikel-Mäntel aus einer Käfig-ähnlichen Struktur mit Hexagonen und Pentagonen bestehen, was eine

mechanische, Membran-beeinflussende Funktion vermuten ließ (Crowther et al., 1976). Nach über 40-jähriger Forschung gelten Clathrin-umhüllte Vesikel als die am besten untersuchten und bekanntesten der drei eukaryotischen vesikulären Transportsysteme. Es konnte teilweise aufgeklärt werden, wie sich die Vesikel zusammensetzen, welche Funktion sie ausüben und wie sie spezifisch Cargo-Moleküle selektieren (Robinson, 2015).

Clathrin ist in Trimeren aufgebaut, die aus drei schweren und drei leichten Ketten bestehen („heavy/light chains“) und ein sogenanntes Triskelion bilden, wobei die schweren mit je einer leichten Kette verknüpft sind. Hierbei bilden die schweren Ketten die funktionelle Einheit, während die leichten für den Zusammenbau der Clathrin-umhüllten Vesikel entbehrlich sind (Kirchhausen und Harrison, 1981; Kirchhausen et al., 2014). Mit nur einer Ausnahme konnte in allen bisher sequenzierten, eukaryotischen Genomen das Gen *clathrin heavy chain* gefunden werden, was für eine stark konservierte, enorme Wichtigkeit des Proteins für den zellulären Metabolismus spricht (Robinson, 2015). Clathrin wird hauptsächlich für zwei unterschiedliche Proteinmäntel benötigt: für die Vesikelhüllen mit den strukturell gleichen Adaptor-Protein (AP)-Komplexen 1 und 2. Diese AP-Komplexe sind hierbei dafür verantwortlich, Clathrin zu entsprechenden Membranen zu rekrutieren und an die transmembranen Cargo-Proteine zu binden (Robinson und Pimpl, 2014; Kelly und Owen, 2011).

Clathrin-umhüllte Vesikel (CCVs) bestehen aus einer äußeren Hülle aus mehreren Clathrin-Triskelions sowie den jeweiligen tetrameren AP-Komplexen oder anderen Adaptoren sowie spezifischen Transmembran-Rezeptoren (Robinson und Pimpl, 2014, s. Abb. 7). AP1 übernimmt hierbei den Cargo-Transport am *trans*-Golgi Netzwerk (TGN), AP2 die endozytotische Vesikel-Formation an der Plasmamembran (PM). Das Clathrin-vermittelte Knospen von Vesikeln an TGN und PM benötigt zusätzlich eine Reihe von weiteren Proteinen, wie beispielsweise die GTPase Arf1, und kann durch Faktoren wie das zelluläre pH-Milieu und Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der AP-Komplexe beeinflusst werden (Schmid, 1997). Die Selektion ausgewählter Frachtmoleküle wird hierbei anhand individueller Bindsignale vermittelt, die von den Clathrin-Adaptoren oder spezifischen Rezeptoren erkannt werden können. Diese Signale können sowohl kurze, lineare Motive als auch posttranslationale Modifikationen wie Ubiquitinierung oder Phosphorylierung oder gefaltete, strukturelle Motive sein (Kelly und Owen, 2011).

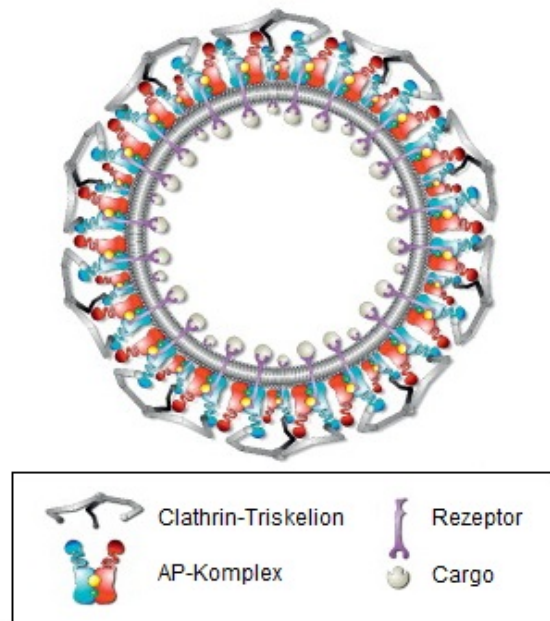


Abb. 7: Aufbau eines Clathrin-umhüllten Vesikels (CCV). Gezeigt ist der schematische Aufbau eines Clathrin-umhüllten Vesikels in eukaryotischen Zellen, bestehend aus einer äußeren Schicht an Clathrin-Triskelionen (grau) und einem Adaptor-Protein-Komplex (AP-Komplex; rot bzw. blau). Im Inneren kann sich ein entsprechender Cargo-Rezeptor (lila) befinden, an den das transmembranäre Frachtmolekül (Cargo; weiß) gebunden ist.
Verändert: Robinson und Pimpl, 2014

Während einige Viren in der Lage sind, durch die Plasmamembran direkt ins Zytosol einer eukaryotischen Wirtszelle einzudringen, so beanspruchen die Vielzahl der Pathogene für die endozytische Aufnahme und den vesikulären Transport ins Zytoplasma das Zellprotein Clathrin. Diese Interaktionen können dabei sehr vielfältig und komplex ausfallen und Clathrin-Adaptor-Proteine miteinbeziehen (Mercer et al., 2010). Dass Clathrin-vermittelte Endozytose als Teil des Infektionszyklus fungieren kann, wurde als erstes für das Semliki-Forest-Virus (SFV) festgestellt und konnte seitdem für zahlreiche andere Viren, wie das Vesikuläre Stomatitis-Virus (VSV), das Hepatitis-C-Virus (HCV) und das Influenza A-Virus nachgewiesen werden (Helenius et al., 1980; Johannsdottir et al., 2009; Douam et al., 2015; Rust et al., 2004). Hierbei konnte zudem gezeigt werden, dass die Pathogene teilweise in der Lage sind, die Bildung von Clathrin-ummantelten Vesikeln zu initiieren und Clathrin-vermittelten Transport auch in späteren Schritten des Infektionszyklus auszunutzen (Benedicto et al., 2015; Mercer et al., 2010).

1.3.4 Der „Coat Protein Complex II“ (COPII)-vermittelte Vesikeltransport

Der vesikuläre Transport zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat ist ein essentieller Prozess in allen eukaryotischen Zellen, dem der sogenannte „coat protein complex II“ (COPII) Anfang der 1990er funktionell zugeordnet werden konnte (Barlowe et al., 1994). Mithilfe dieser Maschinerie werden sekretorische Cargos durch die Assistenz einer Gruppe spezialisierter und stark konservierter, zytoplasmatischer Mantelproteine in umhüllten Vesikeln intrazellulär bewegt. Diese sogenannten „Coat“- oder Sec-Proteine sind Teil des COPII, der spezifisch Cargo-Proteine rekrutiert und die ER-Membran so deformieren kann, dass diese zur Vesikel-Bildung umfunktioniert wird (D’Arcangelo et al., 2013). Der Export vom ER erfolgt an festgelegten Regionen, den sogenannten „ER export sites“ (ERES), an denen die COPII-Maschinerie vermehrt auftritt. ERES spielen als dynamische Cargo-sensitive Abschnitte eine wichtige Rolle bei der Bildung von Transport-Vesikeln, die Frachtmoleküle enthalten (Gürkan et al., 2006; Zanetti et al., 2011; Bannykh et al., 1996). Aufgrund dieser Funktionsweise der COPII-Maschinerie spielen die zugehörigen Sec-Proteine eine essentielle Rolle bei der Biogenese integraler Membranproteine und bei der Sekretion löslicher Proteine. Eine vollständige und korrekte Faltung dieser Frachtproteine führt hierbei zur Eingliederung und Verpackung in COPII-Vesikel und zum weiteren Transport Richtung Golgi-Kompartiment (Pagant et al., 2016). Die molekularen Grundlagen der COPII-Funktionsweise und die zugehörigen zeitlichen Abläufe und Proteinkomponenten konnten in den letzten Jahren vermehrt aufgeklärt werden (Barlowe, 1995; Matsuoka et al., 1998).

1.3.4.1 Funktionsweise der COPII-Maschinerie

Die Initiierung des COPII-Zusammenbaus an ER-Membranen erfolgt in mehreren Schritten und wird zunächst durch die Aktivierung der kleinen GTPase Sar1 ausgelöst (s. Abb. 8). Der dafür notwendige GDP-GTP-Austausch wird durch das integrale Glykoprotein Sec12, das als sogenannter „guanine-nucleotide exchange factor“ (GEF) für Sar1 fungiert, und das GTPase-aktivierende Protein (GAP) Sec23 vermittelt (Zanetti et al., 2011). Ein aktiviertes, also GTP-bindendes, Sar1 führt dessen N-terminale, amphipathische Helix in die ER-Membran ein und generiert dadurch eine Krümmung der Membran und die Einleitung der Vesikel-Bildung.

Außerdem werden durch die Sar1-Aktivierung die COPII-Proteine Sec23 und Sec24 rekrutiert, die anschließend die innere Vesikelhülle bilden werden (Venditti et al., 2014; Matsuoka et al., 1998; Antony et al., 2001). Die COPII-Untereinheit Sec23 bindet hierbei direkt an Sar1-GTP und beeinflusst den GTP-Zyklus der GTPase. Außerdem bildet es ein funktionelles Heterodimer mit Sec24. Diese Komponente ist für die Spezifität der Bindung zwischen COPII-Maschinerie und Cargo-Proteinen verantwortlich, da das Protein multiple Bindeseiten enthält, die jeweils individuelle Motive erkennen (Pagant et al., 2016, Antony et al., 2001). Sec24 kann daher als der wesentliche Cargo-bindende Adaptor von COPII verstanden werden, der direkt mit den Sekretionsmolekülen oder deren Rezeptoren interagiert und mit ihnen während des Transports zum Golgi assoziiert bleibt. Sar1 und Sec23/Sec24 bilden den sogenannten „Prebudding complex“, eine Vorstufe des fertigen Vesikels, der aus der Funktionseinheit der inneren Mantelhülle besteht (Yorimitsu et al., 2014).

Das Heterodimer Sec13/Sec31 formt im nächsten Schritt die Käfig-ähnliche, äußere Vesikelhülle durch die direkte Interaktion mit dem Sec23/24-Sar1-Komplex und verstärkt dadurch die Krümmung der ER-Membran. Die Polymerisierung der inneren Hülle wird hierbei durch Sec16 unterstützt und die Formation der COPII-Vesikel abgeschlossen, indem Sec23 und Sec31 die GTP-Hydrolyse von Sar1 und das Knospen des COPII-Vesikels vermitteln (Matsuoka et al., 1998; Zanetti et al., 2011). Für besonders große Frachtmoleküle wie Kollagen kommen zusätzliche Rezeptor-Komplexe wie TANGO1 („transport and Golgi organization 1“) und Sec12-Bindepartner cTAGE5 zum Einsatz, die beide ebenfalls an den ERES eukaryotischer Zellen generiert werden. TANGO1 interagiert hierbei direkt mit Sec23/Sec24 und rekrutiert Membranen, die ERGIC-53 („ER-Golgi intermediate compartment 53 kDa-protein“) enthalten, um größere Frachtmoleküle zu generieren (Raote et al., 2017; Saito et al., 2009; Chioran et al., 2017). Nach abgeschlossenem Transport der Sekretionsproteine führen weitere Prozesse dazu, dass die Transport-Vesikel wieder aufgeschlossen und die COPII-Komponenten recycelt werden können (D’Arcangelo et al., 2013; Saito et al., 2017). Interessanterweise fungieren einige ER-Cargos nicht nur als zu transportierende Proteine, sondern erfüllen eine aktive Rolle bei der Kontrolle von Stabilität, Geometrie und Dynamik des COPII-Mantels, wodurch sie in der Lage sind, ihre eigenen Transportproteine zu formen und zu steuern. Eine Schlüsselrolle für diese spezifische Interaktion spielen die Transportmotive von Sec24 und Sar1 und deren entsprechenden Cargos, die beispielsweise durch

Phosphorylierung und den Zusammenbau polymerischer Cargo-Moleküle beeinflusst werden können (Venditti et al., 2014).

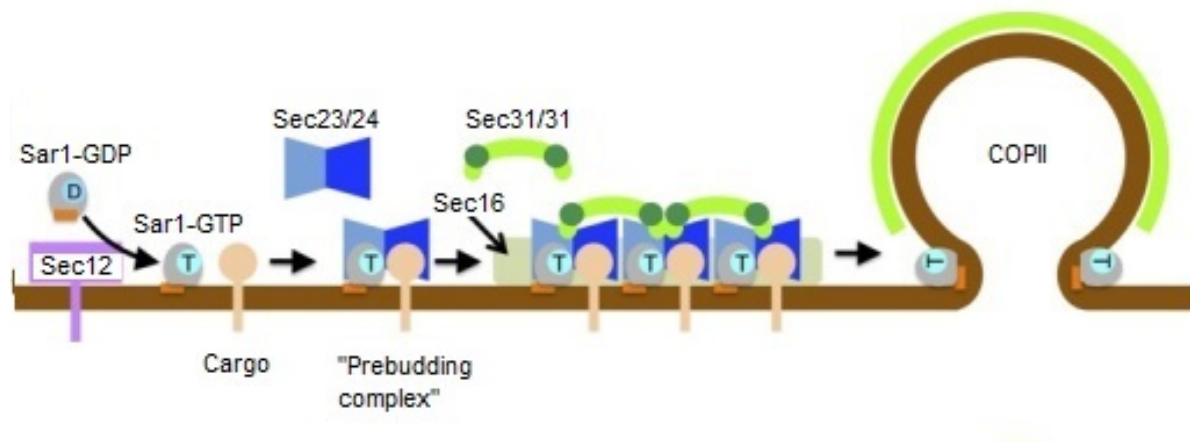


Abb. 8: Bildung von COPII-Transport-Vesikeln. Vesikel mit einer Ummantelung des „coat protein complex II“ (COPII) sind für den intrazellulären Transport von Frachtmolekülen vom ER zum Golgi-Apparat zuständig. Im ersten Schritt der Vesikel-Bildung wird hierfür die kleine GTPase Sar1 (grau), vermittelt durch das integrale Glykoprotein Sec12 (lila), aktiviert. Die Umwandlung von GDP in GTP (D-T) resultiert hierbei in einer Konformations-Änderung der GTPase. Der „Prebudding complex“ wird gebildet, indem Sar1 das Heterodimer Sec23/24 (blau) rekrutiert und die innere Hülle des Vesikels geformt wird. Im Anschluss daran wird die Polymerisation durch Sec16 vermittelt und die äußere Hülle aus Sec13/31 (grün) rekrutiert. Der nun vollständig gebildete COPII-Vesikel kann anschließend abgeschnürt und zum Golgi transportiert werden.

Verändert: Yorimitsu et al., 2014

Neben der kleinen GTPase Sar1 konnte auch der GTPase Rab1 ein Einfluss auf die COPII-Maschinerie nachgewiesen werden. Das Protein mit den beiden Isoformen Rab1A und Rab1B ist im Golgi-Komplex und zwischen ER und Golgi lokalisiert und wird für den vesikulären Transport der Membranen von ER zu Golgi benötigt (Saraste et al., 1995; Tisdale et al., 1992). Der Isoform Rab1B konnte die direkte Interaktion mit den COPII-Komponenten Sec23, Sec24 und Sec31 sowie Einflüsse auf die Sortierungsprozesse der Cargo-Moleküle an den ERES nachgewiesen werden. Dies spricht für eine bedeutende, regulatorische Funktion bezüglich der Vesikel-bildenden Maschinerie (Slavin et al., 2011).

Mehrere Studien der Interaktionen zwischen intrazellulären Transportmechanismen und Pathogenen wie dem Hepatitis-C-Virus (HCV) konnten bereits zeigen, dass COPII als Frachtroute viraler Proteine oder ganzer Virionen verwendet wird (Syed et al., 2017). Auch dem Ebolavirus-Protein VP40 konnte eine direkte Interaktion mit der COPII-Untereinheit Sec24C nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass diese Maschinerie von entscheidender Bedeutung bei der Morphogenese und Sekretion vielfältiger Pathogene ist (Yamayoshi et al., 2008).

1.3.4.2 Das Sec23/24-Dimer

Die drei grundlegenden Komponenten eines COPII-umhüllten Vesikels sind die beiden heterodimeren Komplexe Sec23/24 und Sec13/31 sowie das Initiator-Protein Sar1. Hierbei wird die innere Hülle durch Sec23/24 gebildet, die äußere durch Sec13/31, wobei sich zunächst ein „Prebudding complex“ aus Sar1 und Sec23/24 bildet (Barlowe, 1995; Bi et al., 2002; Miller et al., 2003). Die COPII-Vesikel-Bildung wird unter anderem dadurch ausgelöst, dass die GTPase Sar1 an ihr GTPase-aktivierendes Protein (GAP) Sec23 bindet und daraufhin Sec24 die Bindung an transmembrane Cargo-Proteine einleitet. Innerhalb mehrerer Studien konnte gezeigt werden, dass die Cargo-Spezifität von COPII-Vesikeln durch direkte Bindung an das Sec23/24-Dimer vermittelt wird und die Formierung des initialen Komplexes aus Sec23/24 und Sar1 zellulär richtungsweisend für die gesamte COPII-Maschinerie ist (Cai et al., 2007; Bi et al., 2002). Die beiden strukturell ähnlichen Proteine des Heterodimers unterscheiden sich hierbei jedoch stark in ihrer Funktionsweise und der Paralog-spezifischen Entbehrlichkeit.

Sec23 konnte eine essentielle Rolle bei der Morphogenese der COPII-Vesikel zugeschrieben werden. Hauptsächlich fungiert es als GAP der COPII-GTPase Sar1 beim initiativen Prozess der Vesikel-Bildung (Kodera et al., 2014). Das Protein interagiert außerdem physikalisch und funktionell mit Zellproteinen wie TRAPPI („transport protein particle I“) und dem Dynaktin-Komplex, die sowohl in die Vesikel-Bindung an Membranen als auch in den anterograden Transport entlang der Mikrotubuli involviert sind. Dementsprechend kann Sec23 als die richtungsweisende Verbindung der gesamten COPII-Maschinerie zum Mikrotubuli-getriebenen Transport in Richtung des Golgis betrachtet werden (Fromme et al., 2008; Lord et al., 2011; Cai et al., 2007). Das Sec23-Homolog NEL1 aus *S. cerevisiae* fungiert hingegen nach bisherigen Erkenntnissen nicht als COPII-Untereinheit, zeigt jedoch ebenfalls starke Sar1-GAP-Aktivität (Kodera et al., 2014). In Säugern kommt das Protein in den zwei Paralogen Sec23A und Sec23B vor, wobei sich jeweilige Gen-Defizienzen trotz teilweise funktioneller Übereinstimmung stark unterschiedlich auswirken können. Störungen des *sec23a*-Gens können zu Anomalien des Knochenbaus aufgrund fehlerhafter Kollagen-Sekretion beim Menschen und zu embryonaler Letalität bei Mäusen durch Defekte am Neuralrohr führen (Khoriaty et al., 2018; Zhu et al., 2015). Ein defektes *sec23b* führt zu Beeinträchtigungen der Entwicklung roter Blutzellen beim Menschen und pränataler Letalität bei Mäusen aufgrund von Störungen im

Gewebe des Pankreas. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Phänotypen teilweise mithilfe einer Expressionssteigerung der jeweils anderen Isoform ausgeglichen werden können (Khoriaty et al., 2018, Tao et al., 2012).

Sec24 vermittelt den selektiven Transport von Membranproteinen des ER mittels COPII. Entsprechende Untersuchungen an dem Protein konnten hierbei mehrere Bindestellen detektieren, die unabhängig voneinander eine Diversität an Cargo-Molekül-Motiven erkennen können. Auch kann das Adaptor-Protein als Detektor der zwei simultanen Signale von Frachtmolekülen und entsprechenden Rezeptoren fungieren und dadurch ER-Export zusätzlich spezialisieren und antreiben (Pagant et al., 2015). Bisher wurde gezeigt, dass Sec24-Homologe wie LST1 in *S. cerevisiae* über teilweise dieselben Bindesequenzen verfügen und in anderen Organismen ähnliche Funktionen ausüben können (Miller et al., 2003; Roberg et al., 1999). Das Protein verfügt in Säugetieren über vier Paraloge, Sec24A, B, C und D, wobei deren Sequenzen und Funktionen teilweise redundant sind. Isoform-spezifische Runterregulation der jeweiligen Genexpressionen konnte zeigen, dass die Paraloge unterschiedliche Bindemotive für Frachtmoleküle erkennen können (Wendeler et al., 2007). Studien an Sec24-defizienten Mäusen zeigten außerdem, dass Störungen der Expression von *sec24a* nur zu sehr milden Effekten wie der Absenkung der Cholesterin-Level im Blut führte, während eine *sec24b*-Depletion mittelschwere Defekte im Neuralrohr der Embryonen zeigte. Im Gegensatz dazu brachten Beeinträchtigungen der *sec24c*- und *sec24d*-Gene schwere Entwicklungsstörungen und embryonale Letalität bei Mäusen mit sich. Diese Effekte konnten nur teilweise und Gewebe-spezifisch durch die anderen Paraloge ausgeglichen werden (Adams et al., 2014; Baines et al., 2013).

Die Rekrutierung des funktionellen Heterodimers, bestehend aus dem 85 kDa-großen Sec23 und dem 120 kDa-großen Sec24, gemeinsam mit Sar1 an die ER-Membran, konnte als notwendig und ausreichend für die Formation Cargo-enthaltender Vesikel-Vorstufen charakterisiert werden. Das Knospen solcher Vesikel ist jedoch ohne die polymerisierenden Komponenten Sec13/31 nicht möglich. Daher gilt das Sec23/24-Dimer als notwendig, aber nicht ausreichend für die vollständige Reifung funktioneller COPII-Vesikel (Aridor et al., 1998).

1.4 Zielsetzung

Die deutlich erhöhte Sterblichkeitsrate und die extremeren Krankheitsverläufe durch Koinfektionen beider Viren HBV und HDV sprechen für eine hohe Bedeutung im Bereich der human infizierenden Pathogene. Dementsprechend hat sich in den letzten Jahrzehnten diesbezüglich ein weites Forschungsfeld gebildet, das die molekularen Interaktionen der beiden Viren genauer beleuchten soll (Price, 2014). HDV benötigt als unvollständiges Virus die Präsenz der HBV-Hüllproteine in derselben Zelle, um den infektiösen Lebenszyklus zu vervollständigen. Diese Interaktion findet zwischen dem Delta-Protein L-HDAg und dem kleinen HBV-Hüllprotein S statt, während das große Hüllprotein L den hepatozellulären Eintritt und die Ausbreitung beider Viren vermittelt (Shirvani-Dastgerdi und Tacke, 2015).

Interaktionen zwischen viralen Pathogenen und ihren Wirten können generell in zwei Funktionsweisen gruppiert werden: intrinsische Verteidigungsmechanismen des Wirtes, die durch das Pathogen unterdrückt werden müssen, und zelluläre Wirtsfaktoren, die für die Vervollständigung des pathogenen Lebenszyklus notwendig sind. Innerhalb dieser Studie wurde sich auf die zweite Gruppe von Virus-Wirt-Interaktionen fokussiert. Da sowohl HBV als auch HDV in Genom- und Protein-Kapazität beschränkt sind, sind beide Viren zur Komplementierung ihrer Infektionszyklen auf die Interaktion mit zellulären Wirtsfaktoren angewiesen (Mitra et al., 2018; Zeyen und Prange, 2018; Greco-Stewart und Pelchat, 2010). Dies bedeutet auf der einen Seite eine hohe Effektivität und Anpassung der Pathogene an ihren Wirt, bietet auf der anderen Seite jedoch auch vielfältige Möglichkeiten der Intervention. In den letzten Jahrzehnten der Forschung an Virus-Wirt-Interaktionen konnten mehrere Proteine der infizierten Hepatozyte identifiziert werden, die von den Viren zu deren Vorteil rekrutiert werden (Gehring et al., 2014). Bereits der Eintritt in die Wirtszelle geschieht durch die spezifische Interaktion der Virushülle mit dem NTCP-Rezeptor der Leberzellen humaner und einiger nicht-humaner Primaten. Das Blockieren des Rezeptors stellt daher bereits eine wertvolle, prophylaktische Therapiemöglichkeit gegen sowohl HBV als auch HDV dar (Krepstakies et al., 2012; Blank et al., 2016; Mitra et al., 2018). Auch ist bereits bekannt, dass HBV Teile der zellulären Autophagie-Maschinerie als Morphogenese-Plattform für dessen Virionen verwendet und mit anderen Zellproteinen und -komplexen wie Rab-GTPasen, der ESCRT-Maschinerie und der RNA-Polymerase II direkt interagiert (Döring et al.,

2018; Zeyen und Prange, 2018; Stieler und Prange, 2014; Nguyen et al., 2008). HDV ist in ähnlicher Weise von mehreren Wirtsfaktoren abhängig. Das virale Genom kodiert für keine RNA-abhängige RNA-Polymerase und keine posttranskriptional modulierenden Enzyme, die zur Replikation und für die Synthese der beiden Virusproteine benötigt werden. Die gesamte HDV-Pathogenese ist daher deutlich von der Interaktion mit Zellfaktoren abhängig (Greco-Stewart und Pelchat, 2010). Für die erfolgreiche Morphogenese beider Viren ist es notwendig, dass unterschiedliche virale Komponenten sich verschiedener Transportrouten in der eukaryotischen Zelle bedienen. So müssen beispielsweise die viralen Genome für die Replikation durch das Zytoplasma und via nuklearer Transportwege in die Kernpore transportiert werden. Auch im späteren Verlauf der HBV-Pathogenese muss das Nukleokapsid im Zytosol zur ER-Membran transportiert werden, um dort von den Hüllproteinen umschlossen werden zu können (Kann et al., 2007; Blondot et al., 2016). Es konnte zudem gezeigt werden, dass sich HDV für die erfolgreiche Morphogenese infektiöser Virionen an Clathrin-vermittelten Transportmechanismen bedient, die zwischen dem *trans*-Golgi-Netzwerk und den Endosomen agieren (Huang et al., 2009).

Subvirale HDV-Partikel, die nur aus HDAg-L und HBsAg-S bestehen, kommen nach bisherigen Erkenntnissen *in vivo* nicht vor, können jedoch als nicht-infektiöse Modelle Erkenntnisse über das Zusammenspiel beider Viren liefern. Innerhalb dieser Arbeit sollten daher solche HDV-SVPs konstruiert und hinsichtlich ihrer molekularen Eigenschaften charakterisiert werden. Aufgrund der immensen Bedeutung von Virus-Wirt-Interaktionen für die Aufklärung der pathogenen Lebenszyklen und der Entwicklung therapeutischer Maßnahmen wurde der Hauptaspekt dieser Arbeit auf die Untersuchung intrazellulärer Transportmechanismen im Kontext beider Viren gelegt. Hierfür sollte die Bedeutung der ESCRT-Maschinerie, des Clathrin-vermittelten und des COPII-vermittelten Vesikeltransports für Morphogenese und Sekretion subviraler HBV- und HDV-Partikel ergründet werden. Dies dient dem Zweck, eventuelle Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede zwischen beiden Viren hinsichtlich ihres Bedarfs an zellulären Faktoren aufzudecken und zukünftige Möglichkeiten der Intervention beider Pathogenesen zu erkennen. Mögliche Interaktionspartner aus zellulären Transportmaschinerien sollten detaillierter bezüglich ihrer Rolle im Lebenszyklus infektiöser HBV-Partikel untersucht werden, da das Blockieren der HBV-Pathogenese auch eine Störung im HDV-Lebenszyklus bedeuten würde.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Tab. 1: Verwendete Zellen

Zellen	Art; Hersteller
HuH-7	Menschliche hepatozelluläre Karzinomzellen (Nakabayshi und Sato); Japanese Collection of Research Bioresources, Japan
<i>E. coli DH5α</i>	Kompetente Bakterienzellen; New England Biolabs, USA

2.1.2 Vektoren

Selbst hergestellte Plasmide sind im Ergebnisteil dargestellt. Die anderen verwendeten Vektoren sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tab. 2: Verwendete Vektoren

Vektor	Hersteller
p3xFlag-CMV-10	Sigma-Aldrich, USA
p3xFlag-CMV-14	Sigma-Aldrich, USA
pCMV.MYC	Clontech Laboratories, Schweiz
pCMV.HA	Clontech Laboratories, Schweiz
pCMV.Delta.HA	Julianne Tiedemann, Mainz
pMSV.S.HA	Carsten Lambert, Mainz
pCEP4ΔCMVΔSV40/1.1xHBV (Genotyp D)	Jens T. Stieler, Mainz
pFLAG.Sec24A	Karin Awe, Mainz
pSD33A	Carola Klentsch-Zimmer, Mainz
pSR78K	Carola Klentsch-Zimmer, Mainz
pSR79L	Carola Klentsch-Zimmer, Mainz
pSR79K	Carola Klentsch-Zimmer, Mainz
pSar1A.MYC.DDK	OriGene Technologies, Inc., USA
pDHBV.SHA	Reinhild Prange, Mainz
p123.HA	Camille Sureau, Frankreich

2.1.3 siRNAs

Im siRNA- „Pool“ wurden üblicherweise vier vom Hersteller zusammengeführte Zielsequenzen gleichzeitig verwendet. Als „single“ gekennzeichnete siRNAs bestanden lediglich aus einer Sequenz. Die Kontroll-siRNA „AllStars Neg. Control“ (Qiagen) besteht aus einer „Nonsense“-Sequenz, die keinen posttranskriptionalen Effekt hat.

Tab. 3: Verwendete siRNAs

siRNA	Codogene Sequenz (5' nach 3')	Hersteller
siControl	AllStars Neg. Control siRNA	Qiagen, Niederlande
siCHMP1A pool	GAAGGUCUCCUCAGUGAUG GAGAACGCCAUCCGCAAGA CACCGCGUCUUGCCUUUGU GGUGUUGAGUUUCUGCAA	Thermo Fisher Scientific, USA
siCHMP1B pool	GAAGAUUUCUGCUUUGAUG GGAGCAGGAUGAACUGUCU GAUAUGCUGCUCCAGGAAA GAGGAUACACGCCGAAA	Thermo Fisher Scientific, USA
siCHMP2A pool	AGGCAGAGAUCAUGGAUUAU GCGCAAGUUUGUAUUGAUG UUAAGAAGAUGGCCAAGCA CAGAUGAGCUGUCGAACCU	Thermo Fisher Scientific, USA
siCHMP2A single	GCGCAAGUUUGUAUUGAUG	Thermo Fisher Scientific, USA
siCHMP2B pool	GAAGAUGGCUGGAGCAAUG UAAGGAAGCUUGCAAAGUU GCUCGAAGCUUACCAUCUG GCCAGGAUUAUUGUGAAUCA	Thermo Fisher Scientific, USA
siCHMP3 pool	UGACAGAAUUCUCUUUGAA GAAGAGCACAGAAGUGAUG GGCAAAGCACCCAGUAAA AGAACCAGCUCGCGGUCUU	Thermo Fisher Scientific, USA
siCHMP4A pool	CAAGGUAGAUGAACUGAUG UAAGAGAGCUGCCCUACAG GGAAUUGGCCAGGAGUUG GAAGCAAUACAGAAACUGA	Thermo Fisher Scientific, USA

siCHMP4B pool	AGGCAGAGAUCAUGGAUUAU GCGCAAGUUUGUAUUGAUG UUAAGAAGAUGGCCAAGCA CAGAUGAGCUGUCGAACCU	Sigma-Aldrich, USA
siCHMP5 single	CAGAAAGCCUUGCGAGUUU	Sigma-Aldrich, USA
siCHMP6 pool	UCACCCAGAUCGAAAUGAA CGCAAUCACUCAGGAACAA GAGUACCAGCGGCAAUAG CGGAUUAACUCUCGACCGA	Thermo Fisher Scientific, USA
siCHC single	AUCCAAUUCGAAGACCAAUTT	Qiagen, Niederlande
siRab1A.NT single	GCACUACAACAGAUUCUUA	Sigma-Aldrich, USA
siRab1B single	CUGCGGUGGGAUCUGAGUAUUA U	Dharmacon, USA
siSar1A pool	GAGCAAGCACGUCGCGUUU UUA AUGGGAUUGUCUUUCU CUGGAAAACUUGUAUUCUU GUGCAUGCAUUUCGUUUUAU	Dharmacon, USA
siSar1B single	GCAUAACUUGAAUUCAAUAUU	Dharmacon, USA
siSec13 single	GGAGGAGCAGAAGCUAGAAUU	Dharmacon, USA
siSec13_UTR single	GCACUCAUGUUACGAGGAAUU	Dharmacon, USA
siSec23A single	GUUAUGCUGGUUAUAUCUGAUU	Dharmacon, USA
siSec23B single	CACGUUACAUCAACACGGAUU	Dharmacon, USA
siSec24A single	GAGUCAGUGAGCCAAGGAUTT	Sigma-Aldrich, USA
siSec24A pool	CCAAGAAGGUUUACAUCA CAA AUGCACGUCUAGAUGA GGAAACUUCUUUGUUAGGU GGUUGUAUUUCUCGGUAUU	Dharmacon, USA
siSec24B single	GCCGAUCCUGUCGAACGUAUATT	Sigma-Aldrich, USA
siSec24C single	GGCUGCUGUGUAGAUCUCUTT	Sigma-Aldrich, USA
siSec24C single	GCAAACGUGUGGAUGCUUA	Dharmacon, USA
siSec24D single	CUGUCUUACCCAGGAGGCUTT	Sigma-Aldrich, USA
siSec31A single	GACCUUUGUUUACAUGAUUAU	Dharmacon, USA
siSec31B single	CAGGAAAUCUACUGAAUUA	Dharmacon, USA

2.1.4 Antikörper

Tab. 4: Verwendete primäre Antikörper

Primäre Antikörper	
Antikörper	Hersteller
α - β -Aktin	Thermo Fisher Scientific, USA
α -Calnexin (Kaninchen)	StressGen Biotechnologies, Kanada
α -Calnexin (Maus)	Santa Cruz Biotechnology, USA
α -CHC (gg. Clathrin Heavy Chain)	BD Biosciences, USA
α -ERGIC-53	Santa Cruz Biotechnology, USA
α -FLAG	Sigma-Aldrich, USA
α -HA	Covance, Deutschland
α -K1350 (gg. HBV.L)	AG Prange, Mainz
α -K38 (gg. HBV.S)	AG Prange, Mainz
α -K45 (gg. HBV.Core)	AG Prange, Mainz
α -K50 (gg. HDV.L)	AG Prange, Mainz
α -K52 (gg. HDV L)	AG Prange, Mainz
α -MYC	Covance, Deutschland
α -PDI (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, USA
α -PDI (Maus)	StressGen Biotechnologies, Kanada
α -Sec24A	Sigma-Aldrich, USA
α - α -Tubulin	Sigma-Aldrich, USA

Tab. 5: Verwendete sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper	
Antikörper	Hersteller
α -Maus-POX (1:10000)	Dianova, Deutschland
α -Kaninchen-POX (1:10000)	Dianova, Deutschland
Alexa Fluor ® 488 α -Maus (1:200)	Thermo Fisher Scientific, USA
Alexa Fluor ® 546 α -Maus (1:400)	
Alexa Fluor ® 647 α -Maus (1:125)	
Alexa Fluor ® 488 α -Kaninchen (1:200)	
Alexa Fluor ® 546 α -Kaninchen (1:250)	
Alexa Fluor ® 647 α -Kaninchen (1:200)	
Alexa Fluor ® 488 α -Ratte (1:250)	

2.1.5 Enzyme

Tab. 6: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Antarktische Phosphatase (AAP)	New England Biolabs, USA
DNase I recombinant	Hoffmann-La Roche, Schweiz
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England Biolabs, USA
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, USA
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, USA
Trypsin (2,5 %)	Thermo Fisher Scientific, USA

2.1.6 Primer

Im Folgenden werden alle verwendeten Oligonukleotide (Primer) angegeben, die bei den Versuchen mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR, s. 2.3.9 und 2.3.10) sowie beim Sequenzieren zum Einsatz kamen. Die Primer wurden von Thermo Fisher Scientific (USA) sowie Sigma-Aldrich (USA) bezogen und teilweise mittels des Programms NEBaseChanger (New England Biolabs, USA) kreiert.

Tab. 7: Verwendete Primer für PCR, qPCR und Sequenzierungen

Primer	Sequenz (5' nach 3')
CMV forward (StarSeq)	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG
Core.Seq.f	GCG CTG CAC TCC ACC ACG CCT
EBVrev (StarSeq)	GTG GTT TGT CCA AAC TCA TC
Sar1A.f	TTG GGC TTT ATG GAC AGA CC
Sar1A.r	TTG AGC ACA CTG CAC ATG AA
Sar1B.f	TGC AGG AAA AAC AAC ATT GC
Sar1B.r	GGT CAG TTC TTC GGA AGT GG
Sec23A.f	TGC GTT CCT CTG GGG TGG CA
Sec23A.r	CCA GGC CCC TGA GTA GCA GGA
Sec23B.f	ATG GTT GTA CCC CTG GCT TG
Sec23B.r	GCA GGG ACT CTT TGA GTG CT
Sec24A.f	GTC TCC CTA CAC CAA CGG TC
Sec24A.r	GAA GCG AAG GTG TCA CTG GA
Sec24C.f	TGG CAG CAG TCA TCA AAC C
Sec24C.r	GGT CCA CAA CAT ACG GTG AA

Sec24D.f	CAA CTT CTT TGC CAA GTC AGC
Sec24D.r	GAA TTT CCC GGA TGA CCT TC
Sec31A.f	ATC CAG ATG TGG GAT CTT CG
Sec31A.r	CTC CAA GCA ATT GCC AAA AT
Sec31B.f	GGA CCC TTC TCT GGA CTT GA
Sec31B.r	CCA GAC CAG CTT GTG AAA C
T7 kurz (StarSeq)	AATACG ACT CAC TAT AGG

2.1.6.1 Mutagenese-Primer

Die nachfolgende Tabelle enthält alle Primer, die für Mutationen mittels Mutagenese-PCR verwendet wurden (s. 2.3.3). Die Oligonukleotide wurden mittels NEBaseChanger (New England Biolabs, USA) erstellt und über Thermo Fisher Scientific (USA) erworben.

Tab. 8: Verwendete Mutagenese-Primer

Primer	Sequenz (5' nach 3')
Sar1A.T39.f	AAA ACA CTC TTC ACA TGC TC
Sar1A.T39.r	TGC CGG CAT TAT CCA AAC CTA AG
S.HA.LL.f	GCG GCA CCA ATT TTC TTT TGT CTT TGG
S.HA.LL.r	CGG TGC AAA GGG ACT CAA GAT GCT G

2.1.7 Allgemeine Chemikalien

Die innerhalb dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck KGaA (Deutschland), Hoffmann-La Roche (Schweiz), Carl Roth (Deutschland), AppliChem (Deutschland), Biozym Scientific (Österreich) sowie Sigma-Aldrich (USA).

2.1.7.1 Reagenzien

Tab. 9: Verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, USA
Opti-MEM® Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific, USA
OptiPrep™	Sigma-Aldrich, USA
Dynabeads® Magnetic Beads	Thermo Fisher Scientific, USA

Fluoprep	bioMérieux, Frankreich
Fötale Rinderserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, USA
Lipofectamine™ Reagent	Thermo Fisher Scientific, USA
Lipofectamine® RNAiMAX Reagent	Thermo Fisher Scientific, USA
PLUS™ Reagent	Thermo Fisher Scientific, USA
PureProteome™ Protein G Magnetic Beads	GE Healthcare Life Sciences, USA
peqGold TriFast	Peqlab Biotechnologie, Deutschland
ProLong® Diamond Antifade Mountant	Thermo Fisher Scientific, USA
Western Lightning® Plus-ECL	PerkinElmer, USA
Western Lightning® Plus-Ultra	PerkinElmer, USA

2.1.7.2 Kits

Tab. 10: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
AFP ELISA Kit	Demeditec Diagnostics, Deutschland
Cytotoxicity Detection Kit ^{PLUS} (LDH)	Hoffmann-La Roche, Schweiz
Direct-zol RNA MiniPrep Kit	Zymo Research, USA
FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)	Hoffmann-La Roche, Schweiz
FastStart Universal Probe Master (Rox)	Hoffmann-La Roche, Schweiz
High Pure PCR Product Purification Kit	Hoffmann-La Roche, Schweiz
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Hoffmann-La Roche, Schweiz
Murex HBsAg ELISA Version 3	DiaSorin, Italien
PeqGold Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab Biotechnologie, Deutschland
Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel, Deutschland
Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs, USA
qScript™ cDNA Synthesis Kit	Quanta BioSciences, USA

2.1.7.3 Lösungen und Puffer

Kulturmedien sowie Puffer für den mikrobiologischen Einsatz (PBS, TBS, LB-Medium) wurden nach Ausubel et al., 2003 angesetzt und verwendet. Die Ansätze der Protein-Ladepuffer sind in folgender Tabelle festgehalten.

Tab. 11: Herstellung von 1X und 4X Laemmli

Puffer	Ansatz
1X Laemmli	10 % Glycin 50 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2 % SDS 10 % β -Mercaptoethanol Spatelspitze Bromphenolblau
4X Laemmli	30 % Glycin 125 mM Tris-HCl (pH 6,8) 8 % SDS 10 % β -Mercaptoethanol Spatelspitze Bromphenolblau

2.1.8 Software

Tab. 12: Verwendete Software

Software	Hersteller
AxioVision 4.6	Carl Zeiss MicroImaging, Deutschland
Citavi 5.7 VS	Swiss Academic Software, Schweiz
GENTle	Magnus Manske, Deutschland
NCBI BLAST	National Center for Biotechnology Information, USA
NEBaseChanger™	New England Biolabs, USA
Office 2013	Microsoft, USA
Photoshop	Adobe Inc., USA
PlasmaDNA	Angers-Loustau et al., 2007
TINA 2.09	Isotopenmessgeräte GmbH, Deutschland

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung von HuH-7-Zellen

Die hier verwendete Zellkulturlinie HuH-7 wurde in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit einem Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 5 μ g/ml des Antibiotikums Ciprofloxacin (Fresenius) im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen innerhalb einer Gewebekulturflasche passagiert, die Flasche alle zehn Tage durch eine neue ersetzt.

Für das Verdünnen der Zellen wurde zunächst das verbrauchte Medium abgesaugt, anschließend 10 ml einer 1X PBS-Lösung (pH 7,2) mit 2,5 mM EDTA und 0,25 % Trypsin hinzugegeben und nach kurzem Schwenken wieder abgesaugt. Nach etwa 5-minütiger Inkubation der Zellen bei 37 °C konnten diese in 10 ml DMEM abgelöst und resuspendiert werden. Anschließend erfolgte die Verdünnung der HuH-7-Zellen auf 1:10 und Hinzugabe von 20 ml frischem Medium. Die restlichen Zellen wurden verworfen oder entsprechend anstehender Versuche gezählt und in gewünschter Konfluenz ausgesät. Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in DMEM unter Zusatz von 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in flüssigem Stickstoff und etwa alle drei Monate konnten konservierte Zellen entnommen, neu aufgetaut und kultiviert werden.

2.2.2 Transfektionsmethoden

Die hier aufgeführten Experimente mittels Zellkultur erforderten das Einbringen von zellfremder DNA oder RNA und somit die Durchführung unterschiedlicher Transfektionsmethoden. Zur Suppression ausgewählter Genexpressionen wurden spezifische siRNAs in die Zellen gebracht, zur Untersuchung nicht-endogener Proteine wurden Plasmid-DNAs in die Kulturen eingeführt.

2.2.2.1 Transfektion von siRNA

Die Transfektion von „small interfering RNAs“ (siRNAs) in eukaryotische Zellen ist eine effektive Methode der posttranskriptionalen Genregulation, die gezielt die Expression spezifischer Gene herunter regulieren kann. Hierfür werden kurze RNA-Moleküle in die Zelle geschleust, die komplementär zu der Zielsequenz sind und dementsprechend an diese binden. Diese sogenannte RNA-Interferenz führt dazu, dass die Proteinexpression des Ziel-Gens spezifisch unterbunden wird. Zur Effizienzüberprüfung einer siRNA können die mRNA-Konzentrationen des Ziel-Gens mittels qPCR ermittelt werden (s. 2.3.10.1). Für die siRNA-Transfektion wurden HuH-7-Zellen am Vortag mit einer Dichte von 50 % ausgesät und am darauffolgenden Tag mithilfe des Reagenzes „Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent“ und des serumfreien Mediums Opti-MEM in folgenden Mengen gemäß Herstellerangaben behandelt. Die Zellen wurden anschließend in antibiotikafreiem DMEM mit 10 % FCS für 48 - 120 h kultiviert.

Tab. 13: Pipettierschema der siRNA-Transfektion

	100 % siRNA	50 % siRNA	Opti-MEM	RNAiMAX	DMEM ohne Antibiotikum
12-Well	1,8 µl	0,9 µl	100 µl	2 µl	1 ml
6-Well	4,5 µl	2,25 µl	250 µl	5 µl	2,5 ml

2.2.2.2 Transfektion von DNA

Für die transiente Expression nicht-endogener Proteine wurden die Zellen am Vortag auf 80 % Konfluenz ausgesät und am folgenden Tag transfiziert. Das Einbringen unterschiedlicher Plasmid-DNAs in HuH-7-Zellen erfolgte mittels der Transfektionsreagenzien Lipofectamine™ LTX Reagent und PLUS™ Reagent sowie des serumfreien Mediums Opti-MEM. Pipettierschema und Inkubationszeiten wurden wie folgt nach Herstellerangaben umgesetzt. Nach 3 h Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank erfolgte der Wechsel zu Zellmedium mit FCS und Antibiotikum (2 ml pro 12-Well, 3,5 ml pro 6-Well).

Tab. 14: Pipettierschema der DNA-Transfektion

	DNA	PLUS	Opti-MEM	Lipofectamine	Opti-MEM
12-Well	1,6 µg	2,4 µl	40 µl	1,6 µl	0,32 ml
6-Well	4 µg	6 µl	100 µl	4 µl	0,8 ml

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Der *E. coli*-Stamm *DH5α* wurde auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmarker Ampicillin oder Kanamycin bei 37 °C über Nacht im Bakterien-Brutschrank inkubiert. Bakterienkulturen in Ansätzen von 5 bzw. 300 ml sterilem LB-Medium und Selektionsmarker wurden über Nacht unter Schütteln bei gleicher Temperatur inkubiert werden. Längerfristige Lagerung der Stämme erfolgte als Dauerkulturen in Kryoröhrchen mit Glycerol bei -80 °C, wobei das Verhältnis von Medium und Glycerol bei 50 % liegt.

2.3.2 Klonierungen

Für die Konstruktion verschiedener Plasmid-Konstrukte wurden Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs (NEB) verwendet. Nach Herstellerangaben wurden Ansätze vorbereitet, die jeweils 1 - 2 µl (5-20 U/µl) Enzym und 10 % Reaktionspuffer enthielten. Die Restriktionen wurden bei 37 °C für 1 - 2 h inkubiert. Um eine Religation des Vektors zu verhindern, wurde mittels des Enzyms Antarktische Phosphatase (NEB) die Phosphatgruppen der Vektor-DNA entfernt. Überhängende Enden („sticky ends“) konnten bei Bedarf mithilfe des der DNA-Polymerase I Klenow (NEB) zu glatten Enden aufgefüllt werden („blunt ends“). Beide Enzyme wurden gemäß der Herstellerprotokolle verwendet. DNA-Aufreinigungen wurden mithilfe des „High Pure PCR Product Purification Kits“ (Hofmann-La Roche) durchgeführt werden. Fragment und Vektor wurden mithilfe einer T4-Ligase (NEB) ligiert. Hierbei enthielt der jeweilige Ligationsansatz in der Regel Vektor- und Fragment-DNAs im Verhältnis 1:4, außerdem 10 % T4-Puffer und 1 µl (400 U) Ligase. Die Inkubation wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend erfolgte die Transformation in den *E. coli*-Stamm *DH5α*.

2.3.3 Mutagenesen

Mithilfe des „Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit“ (NEB) und selbst designter Mutagenese-Primer konnten gerichtete Mutationen in DNAs eingeführt werden. Ansätze der entsprechenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden nach Pipettierschema des Herstellers angefertigt. Die PCR-Schritte (s. 2.3.9) und anschließende KLD-Reaktion zur enzymatischen Zerstörung der Matrize entsprachen den Herstellervorgaben. Die im KLD-Mix enthaltenen Enzyme Kinase, Ligase und Dnpl sind hierbei für die Phosphorylierung und intramolekulare Ligation der PCR-Fragmente sowie für die enzymatische Zerstörung der Template-DNA zuständig. Anschließend erfolgte die Transformation in den *E. coli*-Stamm *DH5α*.

2.3.4 Transformation und Ausplattierung

Zum Einbringen von Plasmid-DNA in *E. coli* wurde das Standardprotokoll zur Bakterientransformation nach Ausubel et al., 2003 sowie die Herstellerangaben des Mutagenese-Kits (NEB) angewandt. Es wurden entsprechende DNAs aus Ligationsansatz (7,5 µl) oder KDL-Verdau (5 µl) verwendet (s. 2.3.2 und 2.3.3). Die

anschließende Ausplattierung erfolgte pro Ansatz auf jeweils zwei Platten mit Selektionsmedium. Die Agarplatten konnten nun über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag auf entsprechende Klone detektiert werden.

2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA entsprechend ihrer Größe wurden Agarosegele mit einem Agarose-Anteil von 0,8 - 1,2 % durchgeführt. Die Gele wurden in 1%igem Acetat-EDTA (TAE)-Puffer gegossen und bei 80 V in einer Elektrophoresekammer, gefüllt mit selbigem Puffer, für etwa 30 - 60 Minuten inkubiert. Auf einen 50 ml-Ansatz Agarosegel wurden 7 µl des interkalierenden DNA-Farbstoffs Ethidiumbromid in einer Konzentration von 10 mg/ml hinzugefügt. Die Detektion der entsprechenden DNA-Banden fand mittels UV-Gerät statt, wobei Marker von 10 kb- und 1 kb-Größe (Fermentas bzw. NEB) als Orientierung dienten. Innerhalb der Klonierungsstrategien konnten korrekt identifizierte DNA-Banden aus dem Gel isoliert und mithilfe des „High Pure PCR Product Purification Kits“ (Roche) aufgereinigt werden.

2.3.6 Plasmid-DNA-Präparation und -Messung

Entsprechend der Bakterienmenge wurden Übernachtskulturen mithilfe des „peqGold Plasmid Miniprep Kits I“ (Peqlab) in kleinem Format oder mithilfe des „NucleoBond Xtra Midi“ (Macherey-Nagel) in größerem Format aufgearbeitet. Gepickte Klone aus einer Transformation (s. 2.3.4) wurden in einer 5 ml-Kultur angeimpft, Dauerkulturen oder große Ansätze in einer Menge von 300 ml. Lyse der Bakterien, sowie Isolation und Aufreinigung der Plasmid-DNA fanden nach Herstellerprotokoll statt; das DNA-Pellet wurde in Nuklease-freiem Wasser gelöst. Zur Ermittlung der Konzentrationen wurden die DNAs am Spektrometer NanoDrop (Thermo Fisher) gemessen und ggf. auf eine Menge von 1µg/µl verdünnt. Alle Zentrifugationsschritte fanden in der Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed-Zentrifuge (Du Pont Instruments) statt.

2.3.7 RNA-Präparation und -Messung

Die Isolation von mRNAs aus Zelllysaten erfolgte mittels „peqGOLD TriFast“ (Peqlab). Im Anschluss daran konnten die RNAs mithilfe des „Direct-zol RNA

MiniPrep Kits“ (Zymo) aufgereinigt, in Nuklease-freiem Wasser gelöst und anschließend am Spektrometer NanoDrop (Thermo Fisher) gemessen werden.

2.3.8 DNaseI-Verdau und cDNA-Synthese

Zur Reinigung der extrahierten mRNAs für die Detektion mithilfe einer qRT-PCR (s. 2.3.10) erfolgte ein DNaseI-Verdau, um jegliche DNAs zu entfernen. Dieser Verdau wurde nach folgendem Pipettierschema im Thermo-Cycler (Eppendorf) für 20 Minuten bei 30 °C und für weitere 10 Minuten bei 75 °C durchgeführt.

Tab. 15: Pipettierschema des DNaseI-Verdaus

Nuklease-freies Wasser	~ 7,5 µl
DNase I-Puffer (10X)	2 µl
DNase I	0,5 µl
Template (RNA)	~ 10 µl (2,5 µg)
Total	20 µl

Als finaler Schritt der Probenaufbereitung wurden die mRNAs in cDNAs umgeschrieben. Dies wurde mithilfe des „qScript™ cDNA Synthesis Kits“ (Quanta) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt, dem kein Enzym hinzugefügt wurde.

Tab. 16: Pipettierschema der cDNA-Synthese

Nuklease-freies Wasser	3 µl
Puffer (10X)	4 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
Template (DNase I-Verdauansatz; RNA)	12 µl
Total	20 µl

2.3.9 Klassische PCR

Klassische Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs) zur Herstellung und Vervielfältigung von PCR-Fragmenten wurden mithilfe der Q5®-Polymerase (NEB) nach folgendem Schema pipettiert.

Tab. 17: Pipettierschema einer klassischen PCR

5X Q5 Reaktionspuffer	5 µl
10 mM dNTPs	0,5 µl
10 µM Forward Primer	1,25 µl
10 µM Reverse Primer	1,25 µl
Template DNA (1 - 25 ng/µl)	1 µl
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,25 µl
5X Q5 High GC Enhancer	5 µl
Nuklease-freies Wasser	10,25 µl
Total	25 µl

Die PCR konnte im Thermo-Cycler (Eppendorf) in folgenden Schritten durchgeführt werden, wobei die Hybridisierungstemperatur je nach den Ansprüchen des Primer-Paars richtete.

Tab. 18: Temperatureinstellungen einer klassischen PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98°C	30 Sek
25 Zyklen: Denaturierung Hybridisierung Elongation	98°C 50 - 72°C 72°C	10 Sek 30 Sek 30 Sek/ kb
Finale Elongation	72°C	2 Min
Stopp	4 - 10°C	

2.3.10 Quantitative PCR

Quantitative Echtzeit-PCRs (qRT-PCRs) können eingesetzt werden, um zelluläre Genexpressionslevel zu bestimmen. Zusätzlich zu der durch PCR bedingten Amplifikation der DNA werden innerhalb der qPCR interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe gemessen. Die Signalstärke nimmt hierbei proportional zur DNA-Menge zu, wodurch eine Quantifizierung der Nukleinsäuren ermöglicht wird. Maßgeblich für die Interpretation der Ergebnisse ist der sogenannte ct-Wert, welcher den PCR-Zyklus benennt, bei dem der Schwellenwert überschritten wird, ab dem die Fluoreszenzstärke des PCR-Produkts die des Farbstoffs signifikant übersteigt. Alle hier durchgeführten qPCRs wurden mithilfe des 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) durchgeführt und Proben in Doppelbestimmung aufgetragen.

2.3.10.1 qPCR mit SYBR Green

SYBR Green hat als interkalierender DNA-Farbstoff innerhalb der qPCR-Methode Anwendung gefunden. Hierzu wurde folgendes Pipettierschema angewandt.

Tab. 19: Pipettierschema einer qPCR mit SYBR Green

Nuklease-freies Wasser	3 μ l
10 μ M Forward Primer	1 μ l
10 μ M Reverse Primer	1 μ l
2X Mastermix SYBR Green	10 μ l
Template (cDNA)	5 μ l
Total	20 μl

Die DNA-Matrize wurde im Regelfall in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt. Zusätzlich wurde die Effizienz der Amplifikation überprüft, in dem eine der Proben (üblicherweise die Kontrolle) in Verdünnungsstufen von 1:5 bis 1:20 eingesetzt wurden. Als zelluläre Referenz wurde jedes Primer-Paar sowie jede Probe gegen β -Aktin normalisiert. Der Auswertung der Daten erfolgte gemäß der $\Delta\Delta$ Ct-Wert-Methode. Die SYBR Green-basierte qPCR wurde in folgenden Schritten durchgeführt.

Tab. 20: Temperatureinstellungen einer qPCR mit SYBR Green

Schritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung der Uracil-DNA-Glykosylase	50°C	2 Min
Aktivierung der AmpliTaq DNA-Polymerase	95 °C	10 Min
40 Zyklen: Denaturierung Hybridisierung und Elongation	95°C 60 °C	15 Sek 60 Sek
Schmelzpunktanalyse	95°C 60 °C 95 °C	15 Sek 60 Sek 15 Sek
Stopp	4 - 10°C	

2.3.10.2 Multiplex-qPCR

Zur Quantifizierung viraler DNA aus HBV Virionen und Nukleokapsiden wurde nach entsprechendem Aufschluss der Proben und Immunpräzipitation (s. 2.4.2) eine spezifische TaqManTM-basierte Multiplex-qPCR mit den interkalierenden Farbstoffen Yakima Yellow® und 6-FAM-phosphoramidit (FAM) durchgeführt. TaqMan-Sonden, auch Hydrolyse-Sonden genannt, basieren auf dem Prinzip des „Fluoreszenz Resonance Energy Transfers“ (FRET) und definieren sich durch einen Fluorophor-

Farbstoff am 5'-Ende und einen sogenannten „Quencher“-Farbstoff am 3'-Ende eines DNA-Abschnitts, der spezifisch an die zu amplifizierende DNA bindet. Räumliche Nähe der beiden Farbstoffe bewirkt, dass das durch eine Lichtquelle entstehende Fluoreszenzsignal des ersten Farbstoffs durch den Quencher absorbiert wird. Dementsprechend führt die spezifische Anlagerung von Sonde und DNA-Abschnitt zu einer Aufhebung des Fluoreszenzsignals. Die innerhalb der qPCR verwendete Taq-Polymerase ist jedoch durch ihre zusätzliche 5'-3'-Exonuklease-Aktivität in der Lage, die gebundenen Sonden während der Elongationsphase zu hydrolysieren. Dadurch werden sowohl Reporterfarbstoff als auch Quencher freigesetzt und das Fluorophor-Signal der Elongationsphase entsprechend der PCR-Produktmenge kann innerhalb jedes weiteren Zyklus detektiert und quantifiziert werden. Zur Differenzierung zwischen zuvor transfizierter und neu gebildeter HBV-DNA wurden zwei unterschiedliche Sets an Hydrolyse-Sonden verwendet. Die an den Farbstoff FAM gekoppelte Sonde erkennt und bindet hierbei an das S-Hüllprotein-Gen im HBV-Genom neu gebildeter DNA, während das Yakima Yellow-gekoppelte Primerset an das Hygromycin-Resistenzgen im transfizierten HBV-Plasmid bindet. Hierdurch entsteht bei neu gebildeter Virus-DNA lediglich ein FAM-Signal, bei transfizierter DNA hingegen eine Amplifikation mittels FAM sowie Yakima Yellow. Innerhalb dieses Versuchs wurde nach folgendem Schema pipettiert.

Tab. 21: Pipettierschema einer Multiplex-qPCR

Nuklease-freies Wasser	4 μ l
10 μ M HBV_genome.F-Primer	0,4 μ l
10 μ M HBV_genome.R-Primer	0,4 μ l
10 μ M HYGRO -F-Primer	0,4 μ l
10 μ M HYGRO -R-Primer	0,4 μ l
10 μ M HBV-P-FAM-Probe	0,2 μ l
10 μ M HYGRO-P-YY-Probe	0,2 μ l
2X Probe Mastermix	10 μ l
Template (DNA)	5 μ l
Total	20 μl

Zur Quantifizierung wurden eine HBV- sowie eine HYGRO-Standardreihe verwendet, die für jede qPCR neu angefertigt wurden. Sie beinhalteten Konzentrationen von 1×10^{-1} bis 1×10^6 fg/ μ l mit einem 10-fachen Verdünnungsfaktor zwischen den Stufen. Die Menge neu gebildeter HBV-DNA konnte nach Subtraktion der Hygromycin- von den HBV-Werten ermittelt werden. Die Temperatureinstellungen der qPCR sind in folgender Tabelle wiedergegeben.

Tab. 22: Temperatureinstellungen einer Multiplex-qPCR

Schritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung der Uracil-DNA-Glykosylase	50°C	2 Min
Aktivierung der AmpliTaq DNA-Polymerase	95 °C	10 Min
40 Zyklen: Denaturierung Hybridisierung und Elongation	95°C 60 °C	15 Sek 60 Sek
Stopp	4 - 10°C	

2.3.11 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma StarSeq (Mainz) durchgeführt und teilweise mit Firm-eigenen Primern absolviert. Als externe Primer wurden verwendet: T7 kurz, CMV forward, EBVrev.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Lyse und Aufarbeitung der Zellüberstände

Der Aufschluss der transfizierten HuH-7-Zellen (s. 2.4.1) erfolgte i.d.R. auf Eis mittels eines Lysepuffers, bestehend aus 1X TBS und 0,5 % NP-40. Hierzu wurden die Zellüberstände verworfen oder gesichert bzw., weiterverarbeitet, die Zellen einmal mit kaltem 1X TBS gewaschen und anschließend 20 Minuten auf Eis mit überschichtetem Lysepuffer inkubiert. Nach Zusammenschaben der Zellen erfolgte ein 5-minütiger Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 13000 rpm. Die im Pellet enthaltenden Zellüberreste wurden verworfen, der Überstand gesichert und entsprechendes Volumen von 30 - 60 µl für die elektrophoretische Auftrennung abgenommen und mit 4X Laemmli im Verhältnis 1:4 versetzt und aufgekocht werden. Einige Experimente erforderten Aufschluss und Sicherung des gesamten Zellinhaltes. Hierfür wurden die Zellen des Mediums entleert und nach dem Waschen mit 1X TBS in 250 - 300 µl 1X Laemmli direkt aufgenommen und zusammengeschaubt und 10 Minuten aufgekocht. Für Immunpräzipitation und subzelluläre Fraktionierungen wurden unterschiedliche Aufschlussmethoden und -Puffer verwendet (s. 2.4.3 bzw. 2.4.4)

Die Zellkulturüberstände müssen für den Nachweis viraler Partikel mittels SDS-PAGE und Western Blot durch Ultrazentrifugation pelletiert werden. Das Medium

wurde hierfür mit einer 5 ml-Spritze abgenommen und durch einen Filteraufsatz mit 45 µm-Durchmesser in entsprechende Zentrifugenröhrchen (Seton Scientific) filtriert. Anschließend konnten 600 µl 20%ige Sucrose der Probe mithilfe einer 1 ml-Spritze und 26G-Kanüle unterschichtet werden. Auf diesem Sucrosekissen wurde der Überstand bei 40000 rpm für 4 h bei 4 °C zentrifugiert, anschließend das Pellet des Überstandes gesichert und getrocknet. Nach Hinzugabe von 70 - 100 µl 1X Laemmli wurden die Röhrchen mit Parafilm verschlossen und gevortext, bevor sie über Nacht bei 4 °C gelagert wurden. Am darauffolgenden Tag erfolgte der Transfer des gelösten Pellets in geeignete Reaktionsgefäße und das Aufkochen der Proben. Zelllysate sowie Überstände konnten für eine Langzeitlagerung bei -20 °C aufbewahrt werden.

2.4.2 Lyse und Aufarbeitung der HBV-Proben

Zelllysate und -überstände, die hinsichtlich ihrer Konzentration an intrazellulären Nukleokapsiden und extrazellulären HBV-Virionen untersucht werden sollten, wurden nach Gewinnung mithilfe einer spezifischen Immunpräzipitation behandelt. Hierzu wurden PureProteome™ Protein G Magnetische Beads (GE Healthcare) in Vorreinigungs- und Waschsritten vorbereitet, mit den Kapsid- oder Hüllprotein-spezifischen Antikörpern α-K45 bzw. α-K1350 und α-K38 beschichtet und anschließend zur Präzipitation der Nukleokapside und Viren verwendet. Für alle Waschschriffe kamen geeignete Magnetständer zum Einsatz.

Zunächst wurden 25 µl Beads pro Probe einmalig in je 50 µl 1X PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ und 2 % FCS gewaschen, danach in 50 µl desselben Puffers aufgenommen. Die Vorreinigung der Probe geschah mit je 20 µl gewaschenen Protein G Beads und 500 µl Zelllysate bzw. 1000 µl Überstand für eine Stunde bei RT im Rotator. Gleichzeitig konnten die restlichen 30 µl Beads für Zelllysate mit je 3,5 µl α-K45-Antikörper beschichtet werden. Für den Einsatz bei Zellüberständen wurden nach der Inkubation von je 3,5 µl α-K45 pro 30 µl Beads für eine Stunde weitere 1,5 µl α-K38 sowie 1,2 µl α-K1350 verwendet und erneut für eine Stunde bei RT auf dem Rotator inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 30 µl 1X PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ und 2 % FCS wurden die Beads in gleichem Puffervolumen aufgenommen. Die eigentliche Präzipitation konnte anschließend mit den 30 µl gereinigten und beschichteten Protein G Beads und je 500 µl vorgereinigtem Lysat oder Überstand bei 4 °C über

Nacht auf dem Rotator erfolgen. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben abgenommen, die Beads dreimalig in 30 µl 1X PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und in je 200 µl Benzonase-Reaktionspuffer aufgenommen. Dies bezweckt, dass freie Nukleinsäuren degradiert werden könnten, während die verpackte, virale DNA geschützt bleibt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C im Überkopfschüttler war die Immunpräzipitation der HBV-Proben abgeschlossen. Die Zusammensetzung des Benzonase-Puffers kann folgender Tabelle entnommen werden.

Tab. 23: Zusammensetzung des Benzonase-Reaktionspuffers

Benzonase-Reaktionspuffer
1 % Benzonase (10 U/µl) 0,2 % Triton X-100 in 1X PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

Die Lyse der HBV-transfizierten Zellen geschah auf Eis unter vorheriger Abnahme der Zellüberstände. Diese wurden für 10 Minuten bei 2500 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Überstände konnten nun für die Immunpräzipitation verwendet werden. Die Zellen wurden zweifach mithilfe eines 1X PBS/ $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Puffers gewaschen und mit Triton-Lysepuffer für 15 Minuten auf Eis aufgeschlossen. Nach Lösen der Zellen und Überführen in ein neues Gefäß konnten diese für 15 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert werden. Der resultierende Überstand wurde gesichert und in der Immunpräzipitation weiterverarbeitet.

Nach Präzipitation der Virionen und nackten Kapside aus den Lysaten und Überständen konnte die Isolation der viralen DNA mithilfe des „High Pure Viral Nucleic Acid Kits“ (Roche) durchgeführt werden. Anschließend erfolgte die Detektion mittels Multiplex-qPCR (s. 2.3.10.2).

2.4.3 Immunpräzipitation

Zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Proteinen wurden Immunpräzipitationsversuche (IP) durchgeführt. Superparamagnetische Dynabeads®, kovalent gekoppelt mit Spezies-spezifischen Antikörpern („sheep anti-rabbit“, „sheep anti-mouse“; Thermo Fisher), wurden mit verschiedenen primären Antikörpern verbunden. Entsprechende Antigene wurden mithilfe dieser Methode aus Zelllysaten präzipitiert und interagierende Partner des gefällten Proteins im

Anschluss mittels Immunblot detektiert. Für den Umgang mit den Beads während der Waschschriffe wurden speziell geeignete Magnetständer verwendet.

Pro Probe kamen 25 μ l Beads zum Einsatz, die nach zweifachem Waschen mit PBS/BSA (0,1 %) in selbigem Puffer und mit gewünschten primären Antikörpern über Nacht bei 4 °C auf dem Rotator inkubiert wurden. Zur Entfernung ungebundener Antikörper sowie zur Quervernetzung („Crosslinking“) und Stabilisierung der Antikörper-Antikörper-Komplexe wurden die Beads am nächsten Tag zunächst in 0,2 M Triethanolamin (pH 8,2) gewaschen und in 20 mM Dimethylpimelimidat (DMP) für 45 Minuten bei RT rotiert. Nach Abnahme der Lösung wurden die Beads in 50 mM Ethanolamin in PBS gewaschen und anschließend in selbiger Lösung für eine weitere Stunde bei RT auf dem Rotator inkubiert. Es folgten ein dreimaliges Waschen in PBS/BSA (0,1 %)-Lösung und Aufnahme der Beads in selbigem Puffer. Eine Lagerung bei 4 °C bis zur Versuchsdurchführung war an diesem Zeitpunkt möglich.

Die Lyse der Zellen erfolgte auf Eis nach einmaligem Waschen mit 1X TBS durch Hinzugabe frisch hergestellter RIPA- oder CHAPS-Lysepuffer. Nach Inkubation für 20 Minuten auf Eis wurden die Zellen zusammengeschaßt und bei 13000 rpm bei 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Von den Lysaten wurden pro Probe je 60 μ l abgenommen und mit 20 μ l 4X Laemmli aufgekocht (Input), der Rest der Lysate wurde mit den Antikörper-beschichteten Beads versetzt und für 3 h bei 4 °C auf dem Rotator inkubiert. Nach Präzipitation wurde das Lysat abgenommen, die Beads in entsprechendem RIPA- oder CHAPS-Waschpuffer dreimal sowie anschließend einmal mit 1X PBS gewaschen und zum Schluss mit 70 μ l 1X Laemmli aufgekocht. Die Detektion erfolgte mittels elektrophoretischer Auftrennung und Immunblot. Die während der Immunpräzipitation verwendeten Puffer wurden in folgender Zusammensetzung verwendet.

Tab. 24: Zusammensetzung der Lysepuffer für Immunpräzipitationen

Puffer	Zusammensetzung	Puffer	Zusammensetzung
CHAPS-Lysepuffer	200 mM NaCl 50 mM HEPES (pH 7,5) 2 % Chaps 20 mM NEM 1X Proteaseinhibitoren	RIPA-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % NP-40 0,5 % DOC 1X Proteaseinhibitoren
CHAPS-Waschpuffer	200 mM NaCl 50 mM HEPES (pH 7,5) 0,5 % Chaps	RIPA-Waschpuffer	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0,5 % NP-40 0,1 % DOC

2.4.4 Fraktionierungsmethoden

Innerhalb dieser Arbeit wurden unterschiedliche Fraktionierungsmethoden angewandt, um je nach Fragestellung die Verteilung spezifischer Proteine innerhalb der Zelle zu untersuchen. Die Methoden unterscheiden sich hinsichtlich des zellulären Aufschlusses und der Lysepuffer, sowie der anschließenden Trennung der Lysate in unterschiedliche Fraktionen je nach Löslichkeit, Lipidanteil oder Dichte. Alle hier verwendeten Zentrifugenröhrchen SW40, 55, 60 stammen von der Firma Seton Scientific und entsprechen den verwendeten Rotorengößen der Ultrazentrifuge Optima™ LE-80K (Beckman Coulter).

2.4.4.1 Subzelluläre Fraktionierung mit Temperaturshift

Die subzelluläre Fraktionierung mittels Temperaturshift-Lyse ermöglicht die Detektion eines bestimmten Proteins in löslichen oder unlöslichen Fraktionen und gibt dementsprechend Informationen über dessen Konfiguration und Verteilung innerhalb der Zelle. Hierfür wurden transfizierte Zellen im 6-Well auf Eis in speziellem Hypo-Puffer lysiert. Nach Absaugen des Mediums und zweimaligem Waschen mit 1X TBS konnten pro Well 250 µl des Puffers hinzugefügt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert werden. Je nach Bedarf wurden zwei oder drei Wells mit identischer Transfektion nach Zusammenschaben der Zellen zusammengeführt. Der eigentliche Zellaufschluss erfolgte mittels abwechselnder Inkubation der Zellen für je 5 Minuten in flüssigem Stickstoff sowie in einem 37 °C-warmen Wasserbad. Nach dreimaligem Wechsel zwischen extrem kalter und optimaler Temperatur wurde den mechanisch aufgebrochenen Zellen jeweils 1 M NaCl hinzugeführt mit anschließender Zentrifugation für 25 Minuten bei 2000 rpm und 4 °C. Die Pellets nach diesem Schritt

wurden verworfen, die Überstände erneut für 30 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die hieraus resultierenden Überstände wurden als Fraktionen mit löslichen Proteinen (S-Fraktionen) gesichert und mit 10%igem NP-40 versetzt. Die Pellets aus diesem Schritt wurden in je 250 µl Hypo-Puffer gelöst, anschließend mit 1 M NaCl sowie 10%igem NP-40 versetzt, sowie für 20 Minuten auf Eis inkubiert und danach für 5 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die entstandenen Überstände wurden als Fraktionen unlöslicher Proteine gesichert (P-Fraktionen). Von S- und P-Fraktionen konnten letztendlich Proben abgenommen, mit 4X Laemmli versetzt und mittels SDS-PAGE und Western Blot ausgewertet werden. Der für diese Lyse verwendete Puffer wurde nach folgendem Schema angesetzt.

Tab. 25: Zusammensetzung des Hypo-Lysepuffers

Hypo-Puffer
10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
1,5 mM MgCl ₂
10 mM NaCl
1X Proteaseinhibitoren

2.4.4.2 Flotationsassay

Die Flotationsanalyse ist eine Methode zur subzellulären Fraktionierung mithilfe der Ultrazentrifugation eines Iodixanol-Gradienten (OptiPrep™, Sigma-Aldrich). Sie ermöglicht die Erstellung des Flotationsprofils eines bestimmten Proteins hinsichtlich seiner Membranassoziation. Die transfizierten Zellen im 6-Well-Format wurden hierbei nach einmaligem Waschen mit 1X PBS in einem spezifischen Homogenisierungs- Puffer (HB-Puffer) für 15 Minuten auf Eis lysiert sowie zusammengeschaubt und anschließend jeweils 2 Wells zu einer Probe von 500 µl vereint. Danach erfolgte der mechanische Aufbruch der Zellen mittels 5-maligem Aufziehen der Proben mit einer 1 ml-Spritze und 26G-Kanüle sowie anschließendem 25-fachen Pottern in einem Homogenisator.

Nach dem Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 4 °C und 2500

rpm wurden 300 µl der Überstände auf den Boden der Zentrifugationsröhrchen SW60 gegeben und mit 1,2 ml 40%igem OptiPrep gemischt; der Rest des Lysats

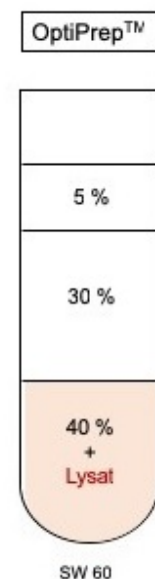


Abb. 9: Aufbau des Flotationsgradienten

wurde eingefroren. Anschließend erfolgte die Überschichtung des Gradienten, bestehend aus 1,7 ml 30%iger und 0,8 ml 5%iger OptiPrep-Lösung (s. Abb. 9). Das Flotieren der Probe fand bei 45000 rpm und 4 °C für 3 h in der Ultrazentrifuge statt. Danach konnten die Gradienten von unten nach oben in 10 Fraktionen von je 400 µl abgenommen werden. Nach TCA-Fällung wurde die Verteilung des Ziel-Proteins mithilfe von SDS-PAGE und Immunblot detektiert. HB-Lysepuffer sowie der Verdünnungspuffer der OptiPrep-Gradienten (VB-Puffer) wurden nach folgendem Schema angefertigt.

Tab. 26: Zusammensetzung von HB- und VB-Puffer

HB	VB
8,5 % Sucrose	8,5 % Sucrose
1 mM EDTA	6 mM EDTA
20 mM HEPES	120 mM HEPES
2 mM CaCl ₂	12 mM CaCl ₂
pH auf 7,4	

2.4.4.3 Cäsiumchlorid-Dichtegradienten

Mithilfe der Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation können Zellkompartimente bzw. virale Partikel entsprechend ihrer Dichte fraktioniert werden. Der hier durchgeführte Zellaufschluss erfolgte gemäß Temperaturshift-Protokoll (s. 2.4.4.1), wobei pro Probe jeweils drei 6 Wells gleicher Transfektion vereinigt wurden. Für die weitere Verwendung der Lysate für die subzelluläre Fraktionierung mittels Gradienten wurden lediglich die S-Fractionen verwendet, die P-Fractionen verworfen. Durch Verwendung eines TNE-Verdünnungspuffers konnten verschieden konzentrierte Cäsiumchlorid (CsCl)-Stufen angesetzt und als Gradient in SW40-Zentrifugenröhrchen überschichtet werden (s. Abb. 10). 500 µl der Probe wurden zuletzt aufgetragen, die Gradienten dann für 16 h bei 35000 rpm und 10 °C zentrifugiert, sowie am darauffolgenden Tag von oben nach unten in 14 Fraktionen von je 750 µl unterteilt.

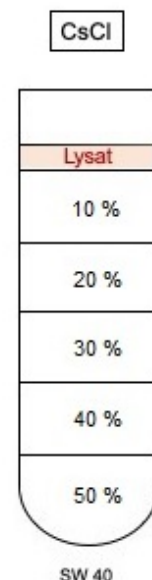


Abb. 10: Aufbau des CsCl-Gradienten

Die Detektion erfolgte hier via Refraktometer sowie unverdünnt im HBsAg-ELISA (s. 2.4.9.2)

Tab. 27: Zusammensetzung der CsCl-Stufen und des TNE-Verdünnungspuffers

%	CsCl	TNE	Stufengröße	TNE-Puffer
10	2 g	Auf 20 ml	2 ml	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 1 mM EDTA
20	4 g		2 ml	
30	6 g		2 ml	
40	8 g		2 ml	
50	10 g		2 ml	
Probe			0,5 ml	

2.4.4.4 Sucrose-Dichtegradienten

Statt mit Cäsiumchlorid könnten Gradienten ähnlichen Typs mit unterschiedlich hoch konzentrierten Sucrose-Lösungen bereitete werden. Die Lyse der Zellen erfolgte mithilfe des Temperaturshift-Aufschlusses unter Zusammenführung von je drei 6-Wellen transfizierten Zellen und Weiterverwendung der S-Fractionen (s. 2.4.4.1). Überstände wurden nach Pelletierung mittels Ultrazentrifugation (s. 2.4.1) in je 200 µl TNE-Puffer aufgenommen, über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend vereinigt. Der hier verwendete TNE-Puffer unterschied sich verglichen mit dem der Cäsiumchlorid-Gradienten durch seinen Gehalt an Tris-HCl und NaCl (vgl. Tab. 27) und wurde nach folgendem Schema angesetzt.

Tab. 28: Zusammensetzung des TNE-Verdünnungspuffers

TNE-Puffer
20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 140 mM NaCl 1 mM EDTA

Die Herstellung der Sucrose-Gradienten erfolgte durch Ansetzen unterschiedlich hoch konzentrierter Lösungen aus einer 2 M Sucrose-Lösung und TNE-Puffer. Die Stufen wurden von unten nach oben in SW40-Röhrchen gegossen und anschließend ohne Probe für 4 h bei 4 °C inkubiert (s. Abb. 11). Danach erfolgten der Lysat-Auftrag von 500 µl und der zweite Zentrifugationsschritt von 16 h bei 35000 rpm und 4 °C. Am darauffolgenden Tag konnten die Gradienten in je 14 Fraktionen zu 750 µl abgenommen werden und mittels Refraktometer sowie unverdünnt im HBsAg-ELISA ausgewertet werden (s. 2.4.9.2). Die Sucrocestufen wurden nach folgendem Schema erstellt und gegossen.

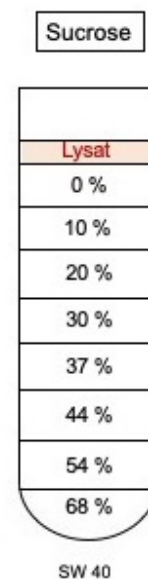


Abb. 11: Aufbau des Sucrose-Gradienten

Tab. 29: Zusammensetzung und Größe der Sucrose-Stufen

%	Sucrose*	TNE	Stufengröße
68	10 ml	-	1,2 ml
54	8 ml	2 ml	1,4 ml
44	6,5 ml	3,5 ml	1,4 ml
37	5,5 ml	4,5 ml	1,4 ml
30	4,5 ml	5,5 ml	1,4 ml
20	3 ml	7 ml	1,4 ml
10	1,5 ml	8,5 ml	1,4 ml
0	-	10 ml	0,3 ml
Probe			0,5 ml

2.4.4.5 Iodixanol-Dichtegradienten

Die Iodixanol-Lösung OptiPrep™ (Sigma-Aldrich), die für das Flotationsassay verwendet wurde, kann ebenfalls für die Dichtegradientenzentrifugation zum Einsatz kommen. Diese Fraktionierung wurde mithilfe eines Homogenisierungsmediums (HM) und eines Verdünnungspuffers (VP), sowie unterschiedlicher Iodixanol-Konzentrationen durchgeführt. Die Puffer wurden nach folgendem Rezept angesetzt.

Tab. 30: Zusammensetzung der Iodixanol-Puffer

Homogenisierungsmedium (HM)	Davon 5 ml	Verdünnungspuffer
250 mM Sucrose 1 mM EDTA 10 mM HEPES (pH 7.4)	+ 100 µl 50X Protease- inhibitoren	250 mM Sucrose 6 mM EDTA 60 mM HEPES (pH 7.4)

Nach Verwerfen des Zellmediums wurden die Zellen auf Eis zweimal mit 1X PBS und einmal mit HM gewaschen. 270 µl HM mit 1X Proteaseinhibitoren konnten pro Well für die Lyse verwendet werden. Direkt darauf wurden die Zellen zusammengeschaubt, je drei Wells vereinigt (810 µl) und je 12-mal mit einer 1 ml-Spritze sowie 26G-Kanüle passagiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C konnte der postnukleäre Überstande (PNS) abgenommen und auf die vorgeformten Gradienten geladen werden (s. Abb. 12). Die Stufen wurden hierbei aus einer 25%igen OptiPrep-Verdünnung und HM erstellt und in einem SW40-Röhrchen überschichtet, anschließend bis zum Rand mit 10%igem Iodixanol aufgefüllt und zunächst für 45 Minuten bei RT in horizontale Lage gebracht. Nach Abnahme von 600 µl der

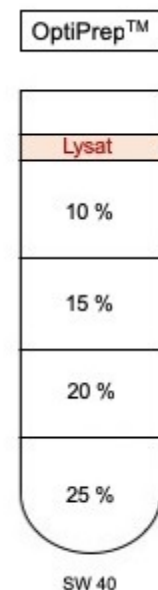


Abb. 12: Aufbau des Iodixanol-gradienten

obersten Schicht wurden die Gradienten für weitere 4 h bei 35000 rpm und 4 °C ohne Probe zentrifugiert. Danach konnten weitere 800 µl abgenommen und das Zellysat aufgeladen werden. Mit Probe wurde für weitere 3 h bei 35000 rpm und 4 °C zentrifugiert, danach in je 30 Fraktionen von 380 µl unterteilt. Die Auswertung fand mittels Refraktometer sowie SDS-PAGE und Western Blot statt. Die Fraktionen wurden zu diesem Zweck mit jeweils 20 µl 10%igem NP-40 versetzt, für 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit TCA gefällt (s. 2.4.5). Herstellung sowie Auftragen der Stufen erfolgte nach folgender tabellarischer Aufstellung.

Tab. 31: Zusammensetzung und Größe der Iodixanol-Stufen

%	25 % OptiPrep	HM-Puffer	Stufengröße
25	10 ml	0 ml	2,7 ml
20	8 ml	2 ml	2,7 ml
15	6 ml	4 ml	2,7 ml
10	4 ml	6 ml	2,7 ml
10	Auffüllen		1,4 ml
Probe			0,8 ml

2.4.5 TCA-Fällung

Eine klassische Methode zur Fällung aller Proteine in einer Lösung ist die Verwendung von Trichloressigsäure (TCA) sowie Aceton. Diese Fällungsmethode kam innerhalb einiger subzellulärer Fraktionsmethoden zum Einsatz. Hierfür wurden entsprechende Proben zunächst mit 100%igem TCA mit einem Volumen von 1/10 des Lysats versetzt. Nach gründlichem Vortexen musste die TCA-versetzte Probe über Nacht bei 4 °C inkubiert werden. Am darauffolgenden Tag wurde das Lysat zunächst für 30 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert und entstandener Überstand verworfen. Nach kurzen Trocknen wurde das Pellet mit 500 µl 5%igem TCA versetzt und bei selber Temperatur und Drehgeschwindigkeit für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde letzter Schritt mit 500 µl 100%igem Aceton wiederholt und die Probe nach dem letzten Zentrifugationsschritt für einige Minuten getrocknet. Zuletzt konnten die pelletierten Proteine in 70 µl 1X Laemmli aufgekocht und anschließend für die SDS-PAGE verwendet werden.

2.4.6 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts kann die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet

werden (Laemmli, 1970). Falls die aufzutragenden Proben nicht bereits in 1X Laemmli aufgenommen wurden, mussten sämtliche Lysate mit entsprechender Menge 4X Laemmli (Endverhältnis 1:4) versetzt und aufgeköcht werden. Die hitzedenaturierten Proteine können anschließend auf ein 7,5 - 15%iges SDS-Gel aufgetragen und bei 200 V und 75 mA für ca. 3 h getrennt werden. Die Konzentration des Gels ist hierbei abhängig von gewünschter Auftrennung sowie Größe der Proteine. Die Gele wurden nach folgender Rezeptur gegossen. Lösung B besteht hierbei aus 1,5 M Tris-HCl, und 0,4 % SDS (pH 8,8), Lösung C aus 0,5 M Tris-HCl und 0,4 % SDS (pH 6,8).

Tab. 32: Zusammensetzung der SDS-Gele

Trenngel	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %
Bidest. (ml)	17,2	14,2	11,3	8,4
Polyacrylamid (ml)	8,8	11,7	14,6	17,5
Lösung B (ml)	8,8	8,8	8,8	8,8
10 % APS (μ l)	350	350	350	350
TEMED (μ l)	17,5	17,5	17,5	17,5
Gesamt (ml)	35	35	35	35

Sammelgel	5 %
Bidest. (ml)	8,8
Acrylamid-Stammlösung (ml)	2,5
Lösung C (ml)	3,75
10 % APS (μ l)	150
TEMED (μ l)	15
Gesamt (ml)	15,2

2.4.7 Western Blot

Das Western Blot-Verfahren, das im Anschluss an die SDS-PAGE durchgeführt werden kann, erlaubt, die aufgetrennten Proteine in der Gelmatrix auf eine Membran zu übertragen und für Immundetektionen zugänglich zu machen. Für die hier aufgeführten Versuche wurden Nitrozellulose (NC)-Membranen innerhalb des „Tank-Blot-Systems“ verwendet. Die NC-Membran wurde daher direkt auf das Gel geschichtet, umgeben von jeweils zwei Lagen Whatman-Papier (VWR) unterhalb und unterhalb, sowie ein bis zwei Schwämmen ganz außen. Diese sogenannte „Sandwich“-Konstruktion wurde innerhalb passender Mappen zusammengehalten. Von hoher Wichtigkeit ist, den gesamten Aufbau und die einzelnen Schichten ständig mit Blot-Puffer feucht zu halten und die unterschiedlichen Lagen von Luftblasen zu

befreien, die beim Vorgang des Protein-Transfers störend sein würden. Die fertig konstruierte Mappe konnte in vertikaler Lage innerhalb einer entsprechenden Laufkammer befestigt werden und komplett von Puffer überdeckt werden. Der hier verwendete Transferpuffer besteht aus Tris-Glycin-Puffer (10 % Anteil), 100%igem Methanol (20 %) und Bidest. Der Transfer wurde bei 400 mA für 1 - 2 h durchgeführt, wobei bei kleineren Proteinen eine kürzere Übertragungs-Zeit bevorzugt wurde.

Eine erfolgreiche Proteinübertragung auf die NC-Membran sowie das Vorhandensein von Luftblasen konnte nach Transfer mithilfe einer Ponceau S-Färbelösung überprüft werden. Die reversible Färbung wurde durch mehrfaches Waschen der Membran mit 1X PBS mit 0,1 % Tween-20 (1X PBS-Tween) aufgehoben. Das Blockieren freier Bindestellen der Membran konnte mithilfe einer 5%igen Lösung aus Magermilchpulver und PBS-Tween für 30 Minuten, bei Raumtemperatur auf dem Schüttler durchgeführt werden. Im Anschluss daran wurde der primäre Antikörper in entsprechender Verdünnung nach Herstellerangaben in Milchlösung auf die Membran gegeben und dieses bei 4 °C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Vier jeweils 15-Minütige Waschschriffe mit 1X PBS-Tween wurden am nächsten Tag durchgeführt, um die Membran vollständig von ungebundenem Antikörper zu befreien. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 oder 1:10000 in Magermilchlösung für eine Stunde bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach weiteren drei Waschschriffen mit PBS-Tween für jeweils 15 Minuten wurde im letzten Schritt mit 1X PBS gewaschen. Die anschließende Detektion der Immunreaktion erfolgte mittels Chemilumineszenz des sekundären Peroxidase (POX)-gebundenen Antikörpers. Zu diesem Zweck kamen die Western Lightning Plus-ECL-Lösungen Luminol und Wasserstoffperoxid zum Einsatz, die im Verhältnis 1:1 auf die Membran gegeben wurden. Nach Benetzen der Membran mit den Detektionsflüssigkeiten konnte eine Auswertung der spezifischen Antikörperbanden auf Röntgenfilmen (Amersham Hyperfilm, GE Healthcare) innerhalb eines Dunkellabors stattfinden. Hierfür wurden die notwendigen Flüssigkeiten Entwickler und Fixierer (Sigma-Aldrich) in einer Verdünnung von 1:4 verwendet.

2.4.8 Immunfluoreszenz

Für die Proteindetektion mittels Fluorophor-markierter Antikörper wurden HuH-7 nach zwei bis vier Tagen transienter Expression im 12-Well passagiert und auf Deckgläschen ausgesät. Hierfür wurde zunächst das Zellmedium abgesaugt und anschließend je 1 ml der PBS/EDTA/Trypsin-Lösung (s. 2.2.1) auf die Zellen gegeben, abgesaugt und die 12-Well-Platte kurz bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurden je nach Dichte der Zellen ca. 800-1000 µl DMEM pro Well hinzugegeben, die Zellen resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:5 bis 1:10 auf die Deckgläschen frischer Wellplatten gegeben. Nach einem weiteren Tag konnten die transfizierten, auf Deckgläschen befindlichen Zellen mittels Methanol oder Paraformaldehyd (PFA) fixiert und entsprechend der jeweiligen Immundetektion gefärbt werden.

Zur Fixierung mittels Methanol wurden zunächst das Zellkulturmedium entfernt, anschließend die Zellen mehrmals mit 1X PBS gewaschen und danach mit 500 – 1000 µl 100%igem Methanol und 0.2 M EGTA (pH 7,5) im Verhältnis 9:1 versetzt und für 10 Minuten bei -20 °C inkubiert. Nach Abnahme des Methanols erfolgte erneut mehrfaches Waschen mit 1X PBS, sowie die anschließende Lagerung der fixierten Zellen in PBS bei 4 °C oder die anschließende Antikörperbehandlung. Das Fixieren mittels PFA erfolgte nach selbigem Muster: zunächst wurden die Zellen gewaschen, anschließend erfolgte die Hinzugabe von 500 - 1000 µl PFA, die Inkubation bei RT für 15 Minuten und das erneute Waschen und anschließendes Lagern oder Weiterverwenden der fixierten Platten. Im Fall der Weiterverwendung musste im Anschluss an die PFA-Fixierung die Permeabilisierung der Zellen mittels 0,2%igem Triton X-100 in PBS für 15 Minuten bei RT erfolgen, um eine Durchlässigkeit der Zellmembranen für die Antikörperbehandlung zu erreichen.

Zu Beginn der Immundetektion wurden die Methanol- oder PFA-fixierten Zellen für 30 Minuten bei RT in 1%iger Lösung Bovines Serumalbumin (BSA) in 1X PBS blockiert. Danach konnten die gewünschten primären Antikörper in PBS/BSA-Verdünnungen nach Herstellerangaben für 1 Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert werden. Zweifaches Waschen in 1X PBS und einmaliges Waschen in PBS/BSA für je 10 Minuten auf der Wippe bereitete die Zellen im Anschluss daran auf die Hinzugabe der Fluorophor-markierten sekundären Farbstoffe vor, die nach Herstellerangaben konzentriert in PBS/BSA angewandt wurden (s. 2.1.4). Für alle weiteren Schritte wurden die Präparate von Licht isoliert behandelt, um die

Fluoreszenzstärke zu maximieren. Nach erneuter Inkubation der Zellen im Brutschrank für 50 Minuten wurden diese für weitere 10 Minuten bei RT nach Hinzugabe des Zellkernfarbstoffs Hoechst 33342 (DAPI, Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 1:20000 platziert. Zuletzt erfolgten die zwei PBS- sowie der letzte BSA/PBS-Waschschritt nach gleichem Muster wie zuvor und das Eindeckeln der Präparate mittels ProLong™ Diamond Antifade Mountant Medium. Nach 24-stündiger Trockenzeit konnten die Präparate mithilfe des Inversen Fluoreszenzmikroskops Axiovert 200 (Zeiss) und einem 100X-Objektiv (1.4 Numerische Apertur) detektiert und fotografisch mittels Axiocam Digitalkamera (Zeiss) dokumentiert werden.

2.4.9 ELISA

Das Enzyme-linked Immunosorbend Assay (ELISA) ist ein auf Antikörpern basiertes Nachweisverfahren, das mithilfe einer enzymatischen Farbreaktion Proteine, Viren oder andere niedermolekulare Verbindungen detektieren kann. Innerhalb dieser Arbeit kamen zwei unterschiedliche ELISA-Verfahren zum Einsatz: zum einen das AFP- zum anderen das HBsAg-spezifische ELISA. Alle hier durchgeführten ELISAs wurden mittels des LabSystems Multiskan RC Microplate Readers (Artisan) detektiert.

2.4.9.1 AFP-ELISA

Die quantitative Bestimmung des humanen Alpha-Fetoproteins (AFP) mithilfe der ELISA-Methode wird für die Diagnostik von Mehrlingsschwangerschaften oder unterschiedlichen Karzinomarten verwendet. Die hier verwendete Zelllinie HuH-7 besteht aus Karzinomzellen, die daher AFP sezernieren und in den hier vorliegenden Experimenten wurde das AFP-ELISA als Kontrolle der zellulären Sekretion verwendet. Hierfür wurde ein entsprechendes AFP-ELISA-Kit (Demeditec) nach Herstellerangaben verwendet. Als externe Negativkontrolle kam frisches Zellmedium zum Einsatz (s. 2.2), die Proben wurden je nach Versuchsdauer verdünnt. Ab 72 h Inkubation wurde generell eine Verdünnung von 1:5, ab 96 h 1:10 und bei 120 h 1:20 durchgeführt. Detektiert wurde bei 450 nm (Referenz: 620 nm), Auswertung der ELISA-Werte erfolgte mithilfe des Programms Excel 2013.

2.4.9.2 HBsAg-ELISA

Mithilfe des HBsAg-ELISA-Kits (DiaSorin) kann spezifisch das kleine HBV-Hüllprotein HBsAg in Seren detektiert und dadurch eine HBV-Infektion nachgewiesen werden. Bei allen hier aufgeführten Versuchen wurde diese Methode eingesetzt, um das zuvor transfizierte S-Protein bzw. die subviralen HBV-Partikel zu quantifizieren. Es konnte daher bei mehreren Experimenten mit Dichtegradienten (s. 2.4.4.3f) als Detektionsalternative zu SDS-PAGE und Western Blot angesehen werden. Zu diesem Zweck wurde das ELISA-Kit nach Herstellerangaben eingesetzt. Lysate wurde hierbei ggf. zuvor auf 1:75, Zellüberstände auf 1:200 verdünnt und bei 450 nm (Referenz: 620 nm) gemessen, die Auswertung erfolgte mittels Excel 2013.

2.4.10 LDH-Assay

Die Messung der enzymatischen Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) mittels eines kolorimetrischen Assays dient der Quantifizierung von Zelltod und Zellyse. Das Enzym wird bei Zerstörung der Membranstrukturen eukaryotischer Zellen freigesetzt und dessen extrazelluläre Präsenz korreliert daher mit der Zelltoxizität einer Substanz. Für die LDH-Messung von je 50 µl Zellüberstand in Doppelbestimmung wurde das Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (Roche) und der LabSystems Multiskan RC Microplate Reader (Artisan) verwendet. Detektiert wurde bei 494 nm (Referenz: 620 nm), die Auswertung der Werte erfolgte mithilfe des Programms Excel 2013.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem unabhängigen t-Test für zwei Stichproben mithilfe des Programms Excel 2013. Hierbei wurden die Signifikanzen in P-Werten wie folgt angegeben:

$P < 0,05$ = signifikant (*)

$P < 0,01$ = hoch signifikant (**)

$P < 0,001$ = höchst signifikant (***)

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung subviraler HDV-Partikel

Das Hepatitis-D-Virus (HDV) wird als charakterisierter Satellit des Hepatitis-B-Virus (HBV) seit über 30 Jahren intensiv erforscht. Superinfektionen von HBV und HDV führen zu einer erheblichen Dramatisierung der Pathogenese, wie dem erhöhten Risiko von Hepatozellulären Karzinomen (HCC) und Leberzirrhose (Farci und Niro, 2012). Für die Morphogenese infektiöser Virionen benötigt HDV die beiden Virus-eigenen Proteine HDAg-L (HDV.L) und HDAg-S (HDV.S), sowie das L-Hüllprotein von HBV. Dieses ist hierbei für die Infektiosität der Virionen essentiell, da es an den Leberzell-spezifischen NTCP-Rezeptor binden kann (Dastgerdi et al., 2012; Rizzetto, 2009). Werden die HDV-Proteine lediglich mit dem kleinen HBV-Hüllprotein S von umgeben, können diese zwar die Zellen verlassen, jedoch keine weiteren Zellen infizieren. Diese subviralen HDV-Partikel können mit den subviralen, nicht infektiösen HBV-Partikeln verglichen werden, die lediglich aus dem S-Hüllprotein bestehen und die bei einer HBV-Infektion *in vivo* in hohem Überschuss gebildet und sezerniert werden (Wang et al., 1991). Für die Bindung von HDV an die HBV-Hülle ist HDV.L, nicht aber HDV.S notwendig, weshalb die hier untersuchten subviralen HDV-Partikel unter Kombination des großen HDV-Antigens und des S-Proteins von HBV kreiert wurden (Pascarella und Negro, 2010). Auf diese Weise konnte insbesondere der zeitliche Rahmen der Experimente begrenzt werden, da mehr als zehn Tage transiente Expression des HDV-Genoms notwendig sind, bis die Proteinvariante HDV.S gebildet wird (Chao et al., 2015; Rizzetto, 2016). Zur näheren Charakterisierung der subviralen Partikel wurde zunächst ein Sekretionsprofil unter Einbezug der HBV-Abhängigkeit erstellt, anschließend die Interaktion zwischen HBV.S und HDV.L untersucht sowie die intrazelluläre Verteilung beider Proteine genauer beleuchtet. Für alle folgenden Versuche wurden Hepatozyten der Zelllinie HuH-7 sowie die Kontrollen p3xFlag-CMV-10 bzw. p3xFlag-CMV-14 (FLAG) verwendet. Für das HBV-Protein S kamen die Plasmidkonstrukte pMSV.S (S) und pMSV.S.HA (S.HA) zum Einsatz, die jeweils den humanen Metallothionein-Promotor hMTIIa und das virale Gen *HBsAg-S* mitsamt der vier Transmembrandomänen aufweisen, das im HA-Konstrukt zusätzlich mit dem HA-Epitop versehen wurde (s. Abb. 13). HDV.L konnte mithilfe des Plasmids pCMV.Delta.HA (Δ .HA) exprimiert

werden, wobei *HDAg-L* aus diesem Konstrukt zusätzlich in den Vektor pCMV.MYC (Clontech Laboratories) umkloniert wurde, um vielfältigere Anwendungsmöglichkeiten zu ermöglichen. Dieses Plasmid wurde pCMV.Delta.MYC (Δ .MYC) benannt und beide Konstrukte tragen den Cytomegalovirus-Promotor CMV (s. Abb. 14). Es ist außerdem zu bemerken, dass die Protein-Tags HA und MYC in den HDV-Vektoren N-terminal angebracht wurden, um das C-terminale nukleare Exportsignal (NES) nicht zu stören, welches für die Partikelformation und -Sekretion von HDV benötigt wird (Huang et al., 2016; Huang et al., 2018).

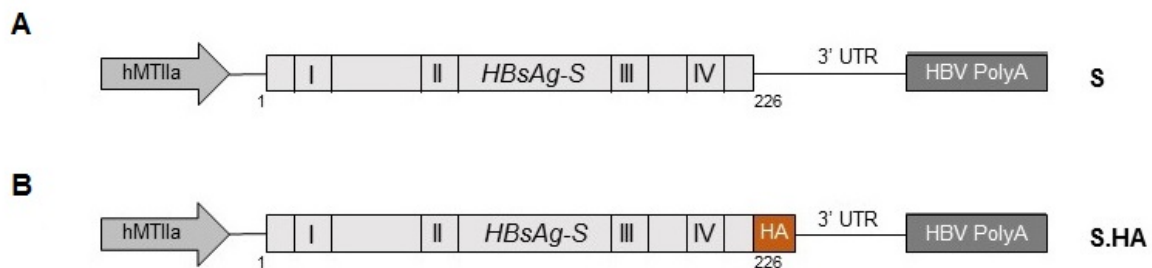


Abb. 13: Transkriptionskassetten der HBV.S-Plasmide. (A) Gezeigt ist der Aufbau von pMSV.S (S), bestehend aus dem Metallothionein-Promotor hMTIIa, dem Gen *HBsAg-S* mitsamt der Transmembran-Regionen I-IV, der 3'-UTR-Region und dem Poly-A-Signal. (B) pMSV.S.HA zeigt sich gleichermaßen aufgebaut, jedoch besitzt das Konstrukt ein HA-Tag am C-terminalen Ende. Die kleinen Ziffern geben die AS-Positionen an.

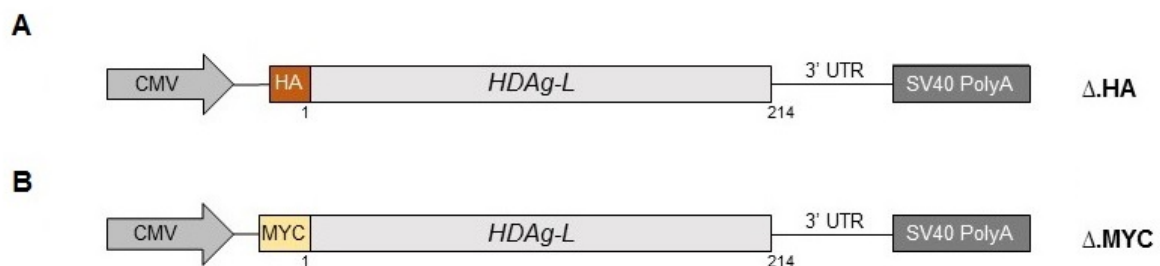


Abb. 14: Transkriptionskassetten der HDV.L-Plasmide. (A) Gezeigt ist der Aufbau von pCMV.Delta.HA (Δ .HA), bestehend aus dem Cytomegalovirus-Promotor CMV, dem Gen *HDAg-L*, der 3'-UTR-Region und dem Poly-A-Signal. Das Konstrukt besitzt ein HA-Tag am N-terminalen Ende. (B) pCMV.Delta.MYC (Δ .MYC) zeigt sich gleichermaßen aufgebaut, jedoch besitzt das Konstrukt ein MYC-Tag statt eines HA-Epitops. Die kleinen Ziffern geben die AS-Positionen an.

3.1.1 Die Notwendigkeit von HBV.S für die Sekretion subviraler HDV-Partikel

Zur Ermittlung der sekretorischen Abhängigkeit des HDV.L-Proteins vom kleinen HBV-Hüllprotein S und zur Bestimmung der jeweiligen Expressionslevel wurde eine Titration beider Proteine durchgeführt. Die Vektoren pCMV. Δ .HA und pMSV.S.HA wurden jeweils einzeln sowie in Kombination in HuH-7-Zellen im 6-Well-Format für 72 h exprimiert. Die Menge eingesetzter DNA von pCMV. Δ .HA wurde in folgenden

Schritten reduziert: 0,5, 0,1, 0,05, 0,01 µg. Von pMSV.S.HA wurden standardmäßig 3,5 µg verwendet und die jeweiligen Volumina mit dem Kontrollvektor p3xFlag-CMV-10 bzw. p3xFlag-CMV-14 (FLAG) aufgefüllt. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet. Die Aufarbeitung, SDS-PAGE und WB-spezifische Analyse der Lysate und Überstände fanden gemäß Standardprotokoll (s. 2.4.1 und 2.4.6f) statt. Hierzu wurden die Zellen mittels eines Lysepuffers aus den Detergenzien 1X TBS und 0,5 % NP-40 aufgeschlossen, nachdem sie zuvor mit 1X TBS gewaschen wurden. Nach 20-minütiger Inkubation des Puffers konnten die Zellen zusammengeschaubt und zentrifugiert werden, um Zellüberreste zu verwerfen. Das aufgereinigte Lysat wurde mit Laemmli-Ladepuffer versehen und mittels elektrophoretischer Auftrennung und immun-spezifischem WB ausgewertet. Die extrazellulären Zellüberstände wurden durch Ultrazentrifugation unter Verwendung eines 20%igen Sucrosekissens pelletiert, sodass komplette subvirale Partikel und keine einzelnen Virus-Proteine aufgereinigt und per Elektrophorese und WB analysiert werden konnten. Auf den WB-Abbildungen dargestellt sind dementsprechend die intrazellulären Lysate sowie die extrazellulären Überstände nach Antikörper-spezifischer Detektion. Die Auswertung ergab, dass die Expression von HBV.S im Lysat bei Vorhandensein der größten Menge HDV.L leicht verringert, dessen Sekretion jedoch kaum beeinflusst ist (s. Abb. 15). HBV.S tritt hierbei in zwei Banden von unterschiedlichen Größen auf, wobei eine dem unglykosylierten Protein mit einer Größe von 24 kDa (p24) und eine dem N-terminal glykosylierten Protein mit 27 kDa (gp27) entspricht, die beide natürlicherweise zu etwa gleichen Anteilen in der infizierten Zelle auftreten (Wunderlich und Bruss, 1996; Patient et al., 2007). Für weitere Versuche wurde die höchste hier getestete Konzentration an HDV.L für eine Transfektion im 6-Well-Format verwendet (0,5 µg). Zudem konnte entsprechend bisheriger Forschungsergebnisse bestätigt werden, dass HDV.L ohne das Vorhandensein von HBV.S nicht in der Lage ist, die Zellen zu verlassen und dementsprechend bei alleiniger Expression nicht in den Überständen zu finden ist (Goray und Murray, 2016).

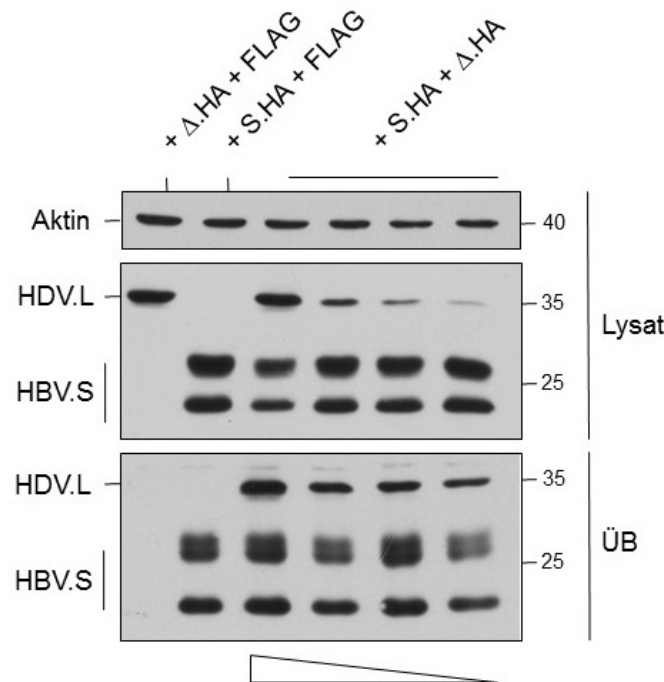


Abb. 15: Die Notwendigkeit von HBV.S für die Sekretion subviraler HDV-Partikel. Dargestellt ist die HA-spezifische WB-Analyse der Lysate und Überstände (ÜB) von HuH-7-Zellen nach der transienten Expression von pCMV.Δ.HA (Δ.HA) bzw. pMSV.S.HA (S.HA) für 72 h im 6-Well-Format in unterschiedlichen Konzentrationen. Von S.HA wurden jeweils 3,5 µg verwendet, von Δ.HA Mengen im Bereich von 0,5 - 0,01 µg. Als Kontrollvektor wurde p3xFlag-CMV-10 bzw. p3xFlag-CMV-14 (FLAG) verwendet, als Ladekontrolle β-Aktin. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Lysate, der untere Teil die Überstände mit Angaben der Proteingrößen in kDa. Das abfallende Dreieck am unteren Bildrand gibt die Reduktion der Δ.HA-Konzentration an.

3.1.2 Interaktionsanalyse von HBV.S und HDV.L

Zur Detektion der spezifischen Protein-Protein-Interaktion von HDV.L und HBV.S und einer eventuellen Beeinträchtigung durch das heterologe Hämagglutinin-Epitop (HA) im S.HA-Vektor wurde die Methode der Immunpräzipitation (IP) angewandt. Hierbei wurde das Standardprotokoll (s. 2.4.3) sowie die Aufarbeitung mittels CHAPS-Lyse- und -Waschpuffer verwendet. pMSV.S bzw. pMSV.S.HA sowie pCMV.Δ.HA wurden für 72 h transient in HuH-7-Zellen im 6-Well-Format exprimiert. Hierbei wurde aufgrund der stärkeren Expression des HDV-Proteins das Mengenverhältnis 7:1 verwendet (s. 3.1.1). Nach Entnahme sogenannter „Input“-Proben wurden die Lysate mit dem S-spezifischen Antikörper α-K38 behandelt, um das HBV.S-Protein zu präzipitieren. Die Input-Proben und Immunpräzipitate wurden mithilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und anhand des HA-spezifischen WB analysiert. Die WB-Analyse der Input-Proben zeigte eine effiziente Expression der HA-getaggten HDV.L- und HBV.S-Proteine. Unabhängig vom Vorhandensein des Protein-Epitops im S-Vektor

konnte in allen Lysaten nach S-spezifischer IP das HDV-Protein nachgewiesen werden, wobei dieses nach Interaktion mit dem HA-getaggen S-Protein schwächer auftrat (s. Abb. 16). Dies liegt möglicherweise daran, dass das HA-Tag am C-terminalen Terminus von HBV.S angebracht wurde, in welchem sich ebenfalls das Bindemotiv für die Interaktion mit HDV.L befindet (Komla-Soukha und Sureau, 2006; Jenna und Sureau, 1999). Die spezifische Interaktion der Virusproteine zeigte sich dennoch in beiden Fällen als bestätigt und für weitere Versuche konnte daher das S.HA-Konstrukt verwendet werden, welches die Detektion via WB erleichtert.

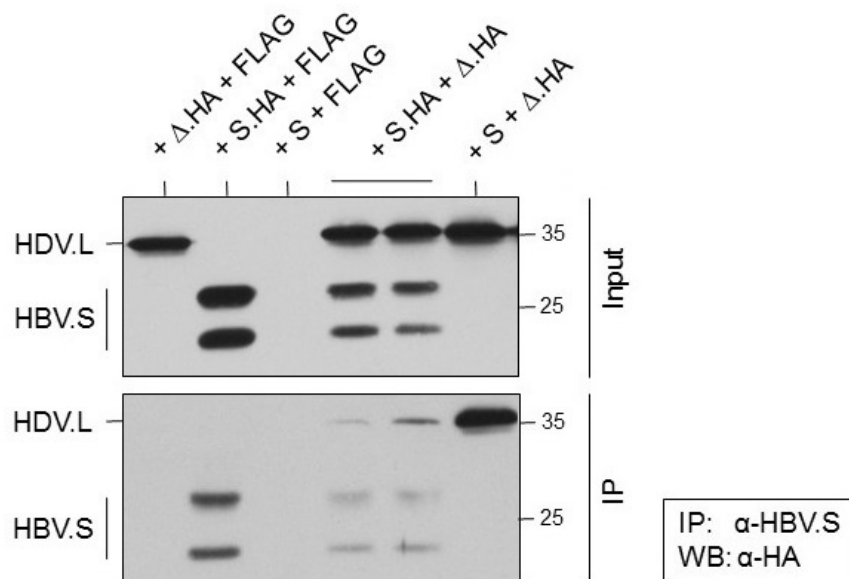


Abb. 16: Interaktionsanalyse von HBV.S und HDV.L. Dargestellt ist die HA-spezifische WB-Analyse der IP von HBV.S und HDV.L nach 72-stündiger Expression der Vektoren pCMV.Δ.HA und pMSV.S bzw. pMSV.S.HA in HuH-7-Zellen im 6-Well-Format. Als Kontrollvektor wurde p3xFlag-CMV-10 bzw. p3xFlag-CMV-14 (FLAG) verwendet. Die oberen Hälfte der Abbildung zeigt die Proteine vor S-spezifischer Präzipitation (Input), der untere Teil nach IP mit Angaben der Proteingrößen in kDa.

3.1.3 Die intrazelluläre Verteilung von HBV.S und HDV.L

Zur weiteren Charakterisierung subviraler HDV-Partikel wurden unterschiedliche Immunfluoreszenz-Experimente durchgeführt. Mithilfe dieser Methode ist es möglich, spezifische Einblicke in die zelluläre Verteilung sowie Protein-Protein-Interaktionen zu gewinnen. Zu diesem Zweck wurden HuH-7-Zellen für 72 h im 12-Well-Format mit den Konstrukten pMSV.S.HA sowie pCMV.Δ.MYC transfiziert und nach Standardprotokoll für die Detektion mittels Fluoreszenzfarbstoffen und entsprechendem Mikroskop aufbereitet (s. 2.4.8). Dies beinhaltet das Passagieren der Zellen am zweiten Tag transients Expression auf Deckgläschen und in diesem Experiment das Fixieren mittels Methanol/EGTA (9:1) am Tag darauf. Mithilfe

spezifischer Antikörper konnten die Proteine HDV.L und HBV.S anschließend detektiert und hinsichtlich ihrer zellulären Organisation untersucht werden. Zudem wurden Färbungen gegen das ER-Protein PDI („protein disulfide isomerase“) durchgeführt (s. Abb. 17). Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Kollokalisierung von HBV.S und dem ER-Marker, während HDV.L stattdessen im Zellkern lokalisiert war. Nach gemeinsamer Transfektion der Plasmide konnte festgestellt werden, dass das HDV-Protein auch außerhalb des Nukleus zu finden ist. Dies spricht dafür, dass die Präsenz des HBV-Hüllproteins ausreichend ist, um eine Translokation von HDV.L aus dem Zellkern heraus zu induzieren, sodass eine Interaktion der beiden Proteine ermöglicht werden kann.

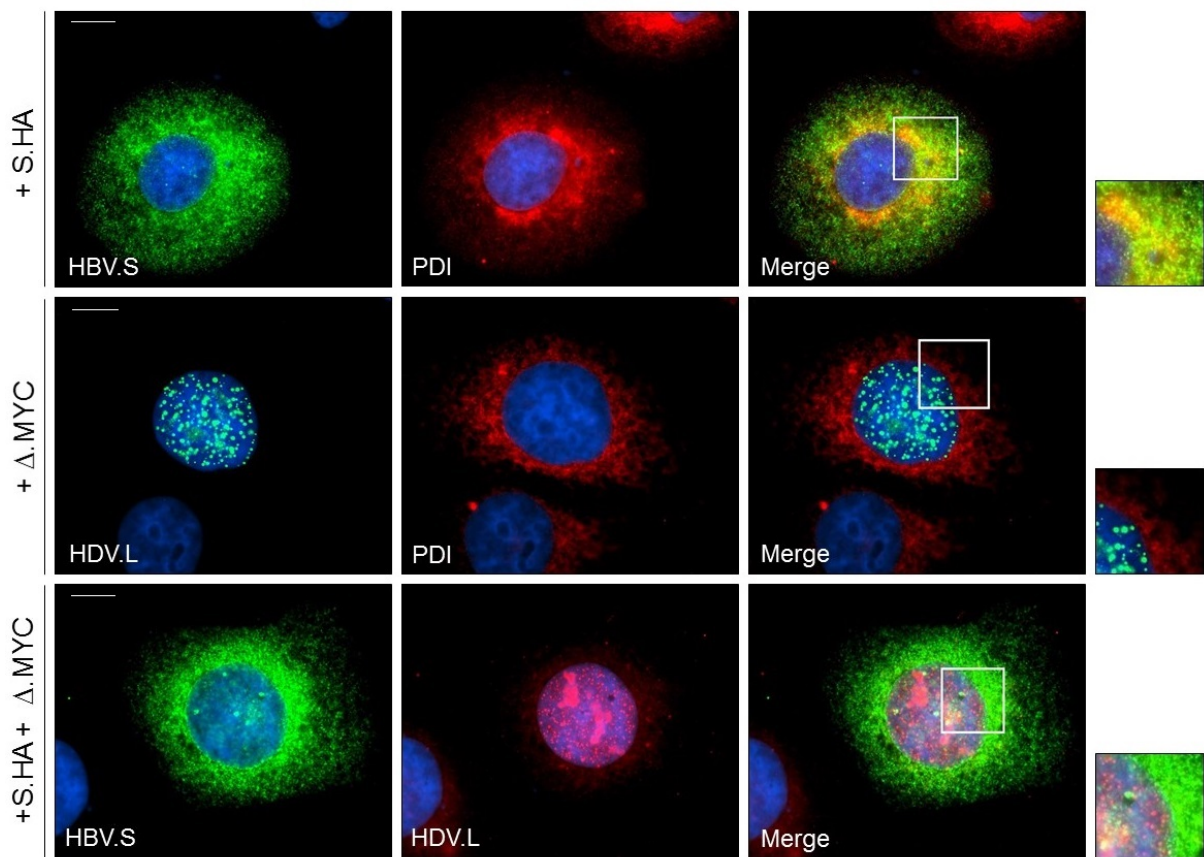


Abb. 17: Intrazelluläre Verteilung von HBV.S und HDV.L. Hier gezeigt sind die immun-spezifischen Fluoreszenzaufnahmen von HuH-7-Zellen nach 72-stündiger Expression der Vektoren pCMV.Δ.MYC und pMSV.S.HA im 12-Well-Format. Als ER-Markerprotein wurde PDI detektiert, „Merge“ gibt die Überlagerung der zwei vorherigen Signale an und der rechte Teil der Abbildung zeigt entsprechende Vergrößerungen aus den Merge-Bildern an. Die obere Reihe zeigt die Färbungen gegen HBV.S und PDI einzeln und in Kombination nach Expression von S.HA. In der Mitte sind die Fluoreszenzsignale von HDV.L und PDI bei Präsenz von Δ.MYC zu sehen. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Färbungen beider Virusproteine nach Transfektion der beiden Vektoren.

3.2 Untersuchung möglicher Funktionen intrazellulärer Transportmechanismen in den Infektionszyklen von HBV und HDV

Da intrazellulären Transportmechanismen in eukaryotischen Zellen eine hohe Wichtigkeit in vielfältigen Stoffwechselprozessen zugeschrieben werden können, ist es naheliegend, dass sie bei der Pathogenese unterschiedlicher Viren ebenfalls eine essentielle Rolle spielen (De Craene et al., 2017). Sei es zum Transport einzelner Virusproteine sowie reifer -Partikel oder als Teil des viralen Recycling-Mechanismus: eine starke Abhängigkeit des jeweiligen Pathogens von diesen zellulären Prozessen ist naheliegend. Tatsächlich konnten Transportmechanismen in die Infektionszyklen mehrerer Viren wie dem Ebolavirus und dem Hepatitis-C-Virus (HCV) eingeordnet werden (Syed et al., 2017; Yamayoshi et al., 2008). Aufgrund der kleinen Genome von HBV und HDV ist deren Abhängigkeit von zellulären Wirtsfaktoren naheliegend und die Untersuchung der Interaktionen zwischen Virus und Wirt von großer Wichtigkeit hinsichtlich der Entwicklung von Therapeutika (Eller et al., 2018; Huang et al., 2016). Insbesondere die spezifische Blockade des Transports von Virusproteinen oder -Partikeln könnte zukünftig eine wirksame Methode der Bekämpfung beider Viren sein. Da die Morphogenese infektiöser HDV-Partikel vom HBV-Lebenszyklus abhängig ist, macht es Sinn, beide Viren in die intrazellulären Interaktionsstudien miteinzubeziehen. Im Folgenden sollten mehrere dieser Transportmechanismen hinsichtlich ihrer Rolle in der Pathogenese von HBV und HDV beleuchtet werden.

3.2.1 Die Notwendigkeit der ESCRT-Maschinerie bei der Morphogenese subviraler HDV-Partikel

Die Proteine des Endosomalen Sortierungskomplexes (ESCRT) konnten als beteiligte Komponenten in den Lebenszyklen einiger behüllter Viren identifiziert werden. So ist diese Transportmaschinerie bei der Morphogenese und Sekretion von Partikeln des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) und des Murinen Leukämie-Virus (MLV) involviert. Aus dem funktionell bedeutenden ESCRT-III-Komplex, der eine Vielzahl an Membran-verändernden Prozessen katalysiert, konnten den Untereinheiten CHMP2 und CHMP4B hierbei essentielle Funktionen zugeordnet werden (Caillat et al., 2019; Christ et al., 2017, Bartusch und Prange, 2016). Auch für die Morphogenese und Sekretion infektiöser HBV-Partikel ist dieser Komplex mitsamt seiner Adaptor-Proteine funktionell wichtig. Jedoch konnte gezeigt werden, dass

sphärische HBV-SVPs die ESCRT-Maschinerie nicht benötigen und stattdessen den generellen Sekretionsweg der Zelle nutzen (Lambert et al., 2007; Bardens et al., 2011; Patient et al., 2009). Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern diese Komponenten bei der Morphogenese und Sekretion von HDV-SVPs eine Rolle spielen könnten. Um eine mögliche Notwendigkeit der Maschinerie zu analysieren, wurde eine siRNA-Bibliothek von entsprechenden CHMP-Proteinen im ESCRT-III-Komplex verwendet, dessen Funktion notwendig für die Reifung und Freisetzung viraler Partikel ist (Jiang et al., 2015; Lambert et al., 2007). Die Depletionseffizienzen in der verwendeten Zelllinie HuH-7 konnten in vorherigen Experimenten innerhalb der Arbeitsgruppe bereits bestätigt werden (Bartusch, Dissertation 2018). Nach 48-stündiger Depletion fand die transiente Expression der Vektoren pCMV. Δ .HA und pMSV.S.HA für 24 h statt. Anschließend wurden Lysate und Überstände nach Standardprotokoll aufgearbeitet (s. 2.4.1) und mittels SDS-PAGE und spezifischer WB-Analyse detektiert (s. 2.4.6f). Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet (s. Abb. 18). Die Resultate zeigten, dass für die HDV-SVP-Morphogenese insbesondere CHMP2A und CHMP4B maßgebend zu sein scheinen. Die Überstände reflektierten die Proteinlevel in den Lysaten und deuteten daher keinen Einfluss der Depletionen auf die Sekretion der HDV-SVPs an.

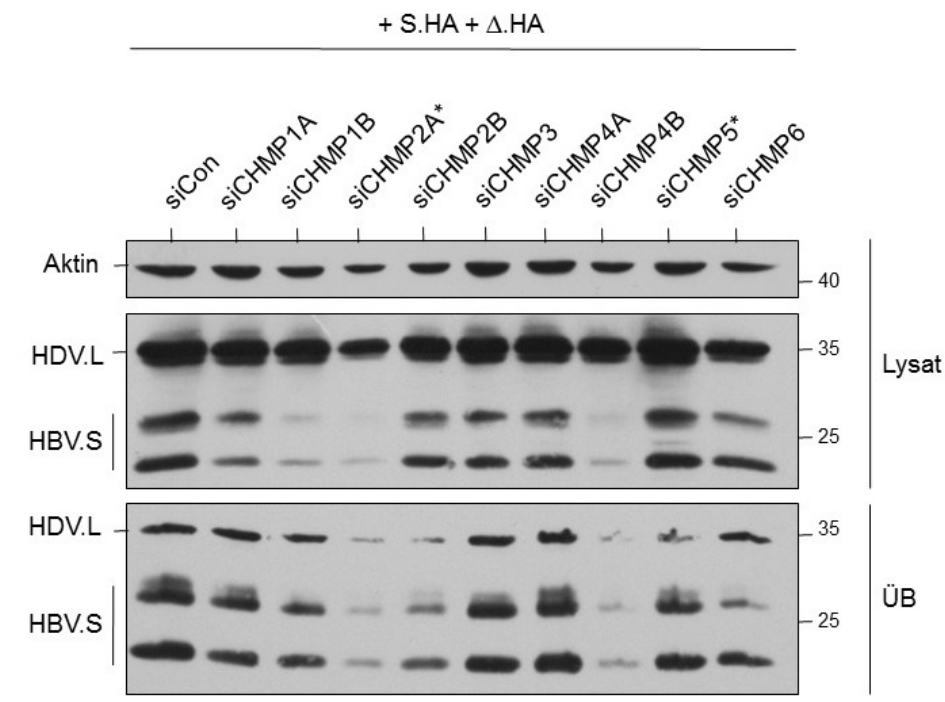


Abb. 18: Notwendigkeit der ESCRT-Maschinerie bei der Morphogenese subviraler HDV-Partikel. Dargestellt ist die HA-spezifische WB-Analyse der Lysate und Überstände (ÜB) von HuH-7-Zellen nach transienter Expression von pCMV. Δ .HA und pMSV.S.HA für 24 h nach 48-stündiger Depletion jeweiliger ESCRT-Proteine. Oben gezeigt sind die Zellysate, unten die Überstände mit Angaben der Proteingrößen in kDa. Die Kontroll-siRNA ist siCon genannt, single siRNAs gekennzeichnet (*).

Zur Überprüfung des Einflusses jeweiliger CHMP-Protein-Depletionen auf die zelluläre Vitalität wurde eine Analyse der Zelltoxizität mittels Lactatdehydrogenase (LDH)-Assay durchgeführt. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität dieses Proteins ist eine weit verbreitete Methode, zelltoxische Effekte von Substanzen zu untersuchen und beruht darauf, dass LDH in allen Zellen gefunden werden kann und bei dem Aufbruch der Plasmamembran freigesetzt wird - ein sicherer Indikator von Apoptose, Nekrose und anderer zellulärer Schädigung. Gemessen wird hierbei die Reduktion eines methodisch leicht zu detektierbaren Substrats durch NADH (Nicotinamidadenindinukleotid), welches bei der enzymatischen LDH-Reaktion von Lactat zu Pyruvat entsteht (Kumar et al., 2018). In diesem Experiment wurden je 50 µl der Überstände aus dem oben beschriebenen Versuchsaufbau verwendet und das Experiment laut Standardprotokoll durchgeführt (s. 2.4.10). Gemessen wird die LDH-Aktivität, wobei die Kontrolle (siCon) auf 100 % gesetzt wird. Ein Wert über 100 % reflektiert dementsprechend in diesem Fall einen toxischen Effekt der siRNA auf die HuH-7-Zellen.

Festgestellt werden konnte, dass den siRNAs, die spezifisch für CHMP2A und CHMP4B sind, die stärksten toxischen Effekte bei bis zu 20 % Steigerung verglichen mit den Kontrollzellen zugewiesen werden konnten; siCHMP2B und siCHMP5 zeigten ebenfalls leichten zelltoxischen Einfluss (s. Abb. 19). Dies spricht für relativ starke Beeinträchtigungen der zellulären Vitalität und muss daher bei der Interpretation der vorherigen siRNA-Analyse miteinbezogen werden. Die potentiellen Effekte der Depletionen der beiden ESCRT-Proteine CHMP2A und CHMP4B auf die Morphogenese subviraler HDV-Partikel könnten durch die zelltoxischen Effekte nicht mehr als spezifisch interpretiert werden. Außerdem legen diese Daten nahe, dass ein Eingriff in den ESCRT-Transportmechanismus, insbesondere Beeinträchtigungen der beiden hochfunktionellen Proteine CHMP2A und CHMP4B allgemeine Schädigungen der zellulären Vitalität mit sich bringen könnte.

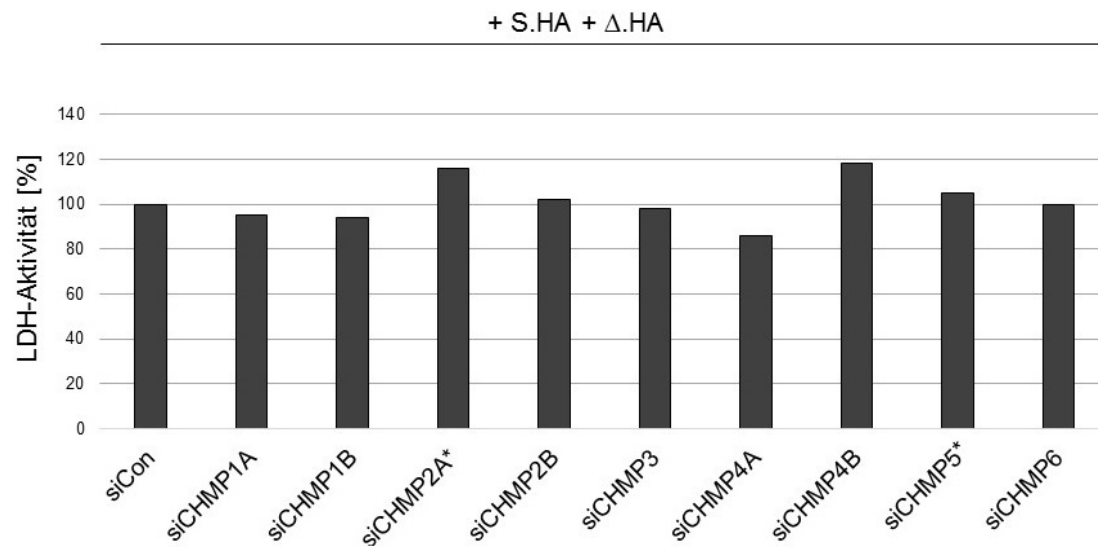


Abb. 19: Analyse der Zelltoxizität mittels LDH-Assay nach Depletionen der ESCRT-Proteine. Dargestellt sind die relativen Daten der Zelltoxizitätsbestimmung von Zellüberständen mittels LDH-Assay, wobei die Aktivität des Enzyms bestimmt wurde (%). Die Kontrolle wurde siCon benannt und auf 100 % gesetzt, single siRNAs sind gekennzeichnet (*). Unter Verwendung spezifischer siRNAs gegen CHMP1A, CHMP1B, CHMP3, CHMP4A und CHMP6 wurden LDH-Aktivitäten von 95 %, 94 %, 98 %, 86 % und 100 % festgestellt, was für keinen toxischen Effekt der siRNAs spricht. KD der anderen ESCRT-Proteine führten im Gegensatz dazu zu gesteigerter LDH-Aktivität. Die Depletion von CHMP2A zeigte ein Level von 116 %, CHMP2B lag bei 102 %, CHMP4B bei 118 % und CHMP5 bei 105 %. Diese Werte reflektieren zelltoxische Effekte dieser siRNAs.

3.2.2 Die Notwendigkeit des Clathrin-vermittelten Vesikeltransports bei der Morphogenese und Sekretion subviraler HBV- und HDV-Partikel

Clathrin spielt eine entscheidende Rolle innerhalb mehrerer eukaryotischer Transportmechanismen wie der Endo- und Exozytose. Auch vesikulärer Transport kann durch das Protein getrieben sein und wurde schon oft mit viralen Pathogenesen in Verbindung gebracht. Beispielsweise interagiert Clathrin mit dem Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV), dem Hepatitis-C-Virus (HCV) und dem Influenza A-Virus (Mercer et al., 2010). Außerdem konnten bisherige Studien zeigen, dass HDV über ein Clathrin-Bindemotiv in seinem großen Delta-Antigen verfügt und direkt mit Clathrins schwerer Kette („clathrin heavy chain“; CHC) interagiert (Huang et al., 2009; Huang et al., 2018). Dies legt die Vermutung nahe, dass Clathrin in den Lebenszyklus von HDV, und möglicherweise auch HBV, funktionell involviert ist. Die folgenden Experimente sollten dementsprechend Aufschluss darüber geben, ob und inwiefern Clathrin-vermittelter Vesikeltransport bei der Morphogenese und Sekretion von HBV- und HDV-SVPs eine Rolle spielt.

3.2.2.1 Clathrin wird für die Morphogenese und Sekretion subviraler HBV- und HDV-Partikel benötigt

Zur Analyse einer möglichen Funktion Clathrins in den Infektionszyklen von HBV und HDV wurden verschiedene Depletionsansätze durchgeführt. Hierfür wurden HuH-7-Zellen für 48 h mit siRNA gegen CHC bzw. mit Kontroll-siRNA behandelt und anschließend einer 48-stündigen Expression der Vektoren pCMV.Δ.HA und pMSV.S.HA ausgesetzt. Fehlende Volumina bei einzelnen Expressionen wurden mit dem Kontrollvektor p3xFlag-CMV-10 bzw. p3xFlag-CMV-14 (FLAG) ausgeglichen und als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. Die Aufarbeitung nach Standardprotokoll (s. 2.4.1), sowie SDS-PAGE und HA-spezifische WB-Analyse der Lysate und Überstände (s. 2.4.6f) ergaben eine leichte Reduktion von HDV.L im Überstand und zusätzlich eine starke Reduktion von HBV.S in Lysaten und Überständen nach Knockdown (KD) von CHC (s. Abb. 20A). Zur Überprüfung einer eventuellen Beeinträchtigung der allgemeinen hepatozellulären Sekretion wurde zusätzlich die quantitative Bestimmung des humanen Alpha-Fetoproteins (AFP) mittels spezifischem ELISA von 50 μ l der Zellüberstände gemäß Standardprotokoll durchgeführt (s. 2.4.9.1; B). Dieses Protein wird von Karzinomzellen wie der hier verwendeten Zelllinie HuH-7 sezerniert und kann daher als Kontrolle der zellulären Sekretion detektiert werden. Die Auswertung entsprechender Daten ergab keine Reduktion der AFP-Freisetzung. Im Gegenteil zeigte sich nach KD von CHC eine Steigerung dieser auf etwa 150 % im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 20B). Als Depletionskontrolle wurde ein CHC-spezifischer WB durchgeführt, der ein stark verringertes Signal nach Verwendung der siRNA bestätigte (s. Abb. 20C). Die CHC-Depletion beeinträchtigte dementsprechend spezifisch die Sekretion subviraler HBV- und HDV-Partikel, was eine wesentliche Rolle des Clathrin-vermittelten Vesikeltransports innerhalb der SVP-Morphogenese beider Viren nahelegt. Dieser Effekt scheint spezifisch für die beiden Pathogene zu sein, da der generelle Sekretionsapparat der Zelle offensichtlich nicht negativ beeinträchtigt ist. Da Clathrin als multifunktionelles Protein in vielfältiger Weise von der Zelle benötigt wird, sollte für spezifische Interventionen zwischen CHC und den Virusproteinen immer auch die Zellvitalität berücksichtigt werden. In dem hierauf folgenden Anschlussversuch wurde das zelluläre Protein daher mithilfe einer spezifischen Droge blockiert und bezüglich HBV-Spezifität und Toxizität untersucht.

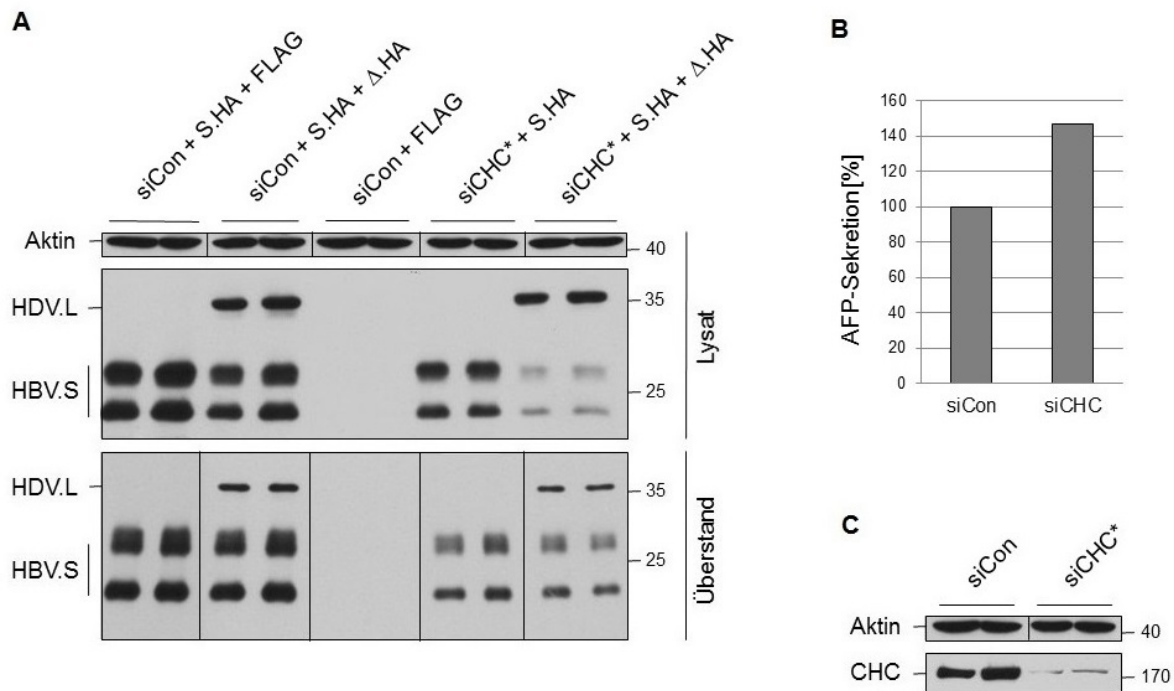


Abb. 20: Die Notwendigkeit von Clathrin bei der Morphogenese und Freisetzung subviraler HBV- und HDV-Partikel. Dargestellt ist die HA-spezifische WB-Analyse der Lysate und Überstände von HuH-7-Zellen nach der transienten Expression von pCMV.Δ.HA bzw. pMSV.S.HA für 48 h nach 48-stündiger Depletion von Clathrin Heavy Chain (CHC). **(A)** Der obere Teil der Abbildung zeigt die Zelllysate, der untere die Überstände mit Angaben der Proteingrößen in kDa. Als Ladekontrolle ist β-Aktin zu sehen. Die verwendete Kontroll-siRNA ist siCon genannt, die single-siRNA gekennzeichnet (*). **(B)** Die Analyse der allgemeinen Sekretion mittels AFP-ELISA zeigte im Fall des KD von CHC eine Steigerung des AFP-Levels auf 146,7 % im Vergleich zur Kontrolle. **(C)** Zu sehen ist der CHC-spezifische WB nach selbigen Depletions- und Expressionsbedingungen.

3.2.2.2 Pitstop 2® inhibiert die Sekretion subviraler HBV-Partikel

Ein alternativer Ansatz, um nähere Erkenntnisse über die Rolle Clathrins in den Infektionszyklen von HBV und HDV zu gewinnen, ist der Einsatz des zellpermeablen, chemisch hergestellten und selektiven Clathrin-Inhibitors Pitstop 2®. Dieser blockiert die Assoziation der N-terminalen Region von CHC mit endozytotischen Liganden wie Amphiphysin. Clathrin-abhängiger Viruseintritt, beispielsweise von HIV, und Clathrin-abhängige Transportdynamiken können mithilfe dieses Wirkstoffs unterbunden werden. Der chemische Name des Produktes lautet *N*-[5-(4-Bromobenzylidene)-4-oxo-4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-yl]naphthalene-1-sulfonamide, das in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wurde (Dutta et al., 2012; von Kleist et al., 2011). Für das folgende Experiment wurde Pitstop 2 in unterschiedlicher Konzentration sowie Einwirkdauer eingesetzt, um sowohl den spezifischen Effekt auf HBV-SVPs als auch den Einfluss auf die Zellvitalität untersuchen zu können. Aus einer Stocklösung von 30 mM Pitstop in 100 % DMSO wurden die Arbeitslösungen von 3 μM und 30 μM in

Zellkulturmedium (DMEM) mit je 1 % DMSO angefertigt. Als Kontrolle diente eine 1%ige DMSO-Lösung in DMEM. Abweichend von üblicher Anwendung in der Zellkultur wurde hier antibiotikafreies DMEM mit einem Anteil von nur 0,1 % FCS verwendet (vgl. 2.2.1). Auf die für 48 h mit pMSV.S.HA transfizierten HuH-7-Zellen im 6-Well-Format wurden je dreimal Kontrolllösungen (K) sowie die zwei unterschiedlichen Pitstop 2-Konzentrationen hinzugefügt und für 3, 6 oder 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend fanden Zellaufschluss, Verarbeitung der Lysate und Überstände nach Standardprotokoll (s. 2.4.1) sowie SDS-PAGE und die HA-spezifische WB-Detektion statt (s. 2.4.6f), wobei β -Aktin als Ladekontrolle verwendet wurde (s. Abb. 21). Nach drei- sowie sechsständiger Inkubation von Pitstop 2 konnte unter Verwendung der höchsten Konzentration eine signifikante Reduktion der subviralen HBV-Sekretion im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden, wobei die Zellvitalität nach 6 h verringert war. Nach 20 h war dies nicht weiter zu beurteilen, da die HBV.S- sowie Aktin-Proteinlevel bei Verwendung von 30 μ M Pitstop 2 bereits stark abgesunken waren. Diese Ergebnisse bestätigen die Clathrin-spezifischen siRNA-Versuche (vgl. 3.2.2.1) und deuten auf eine essentielle Rolle des Proteins während der Bildung und Sekretion subviraler HBV-Partikel hin.

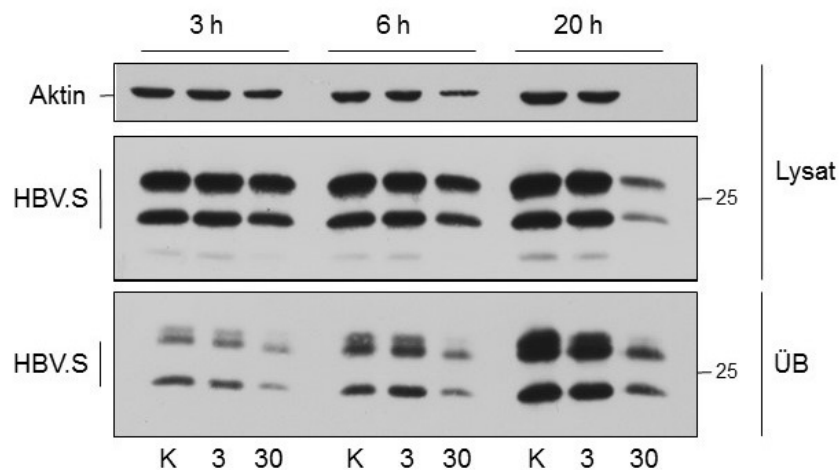


Abb. 21: Einfluss des Clathrin-Inhibitors Pitstop 2® auf die Sekretion subviraler HBV-Partikel. Dargestellt ist die HA-spezifische WB-Analyse der Lysate und Überstände (ÜB) von HuH-7-Zellen nach der transienten Expression von pMSV.S.HA für 48 h und anschließender Behandlung mit dem Clathrin-Inhibitor Pitstop 2®. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Zellysate, der untere die Überstände mit Angaben der Proteingrößen in kDa und unter Verwendung von β -Aktin als Ladekontrolle. Es sind drei Dreierblöcke an Banden zu sehen, die jeweils einer anderen Inkubationsdauer entsprechen (3, 6, 20 h). Die verwendete Kontrolle (K) besteht aus 1 % DMSO in DMEM, Pitstop wurde in den Konzentrationen 3 μ M (3) und 30 μ M (30) mit 1 % DMSO in DMEM eingesetzt.

3.2.3 Die Notwendigkeit des COPII-vermittelten Vesikeltransports bei der Morphogenese und Sekretion subviraler HBV- und HDV-Partikel

Neben des Clathrin-vermittelten Vesikeltransports in eukaryotischen Zellen ist der Transport mittels sogenannter „coat protein complex II“ (COPII)-Vesikel von entscheidender Bedeutung. Die COPII-Maschinerie, bestehend aus mehreren spezialisierten Sec-Proteinen, ist hierbei für Transport zwischen dem ER und dem Golgi zuständig (Gürkan et al., 2006; Zanetti et al., 2011; Bannykh et al., 1996). In bisherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Virusproteine wie das Ebolavirus-Protein VP40 oder komplette Virionen wie die des Hepatitis-C-Virus mithilfe dieser spezialisierten Vesikelgruppen transportiert werden (Syed et al., 2017; Yamayoshi et al., 2008). Anhand folgender Experimente sollte aufgeklärt werden, ob und inwiefern dieser Transportmechanismus oder einzelne dieser Komponenten in die Lebenszyklen von HBV und HDV involviert sind. Hierfür wurden die Proteine der inneren sowie äußeren Vesikelhülle hinsichtlich einer möglichen Funktion beleuchtet. Außerdem sollten die COPII-initiiierenden bzw. regulierenden Proteine Sar1 und Rab1 dahingehend untersucht werden.

3.2.3.1 Das innere COPII-Mantelprotein Sec24A wird für die Sekretion subviraler HBV-Partikel benötigt

COPII-Vesikel bestehen klassischerweise aus der inneren Schicht mit den Proteinen Sec24 und Sec23 sowie einem äußeren Mantel aus den Proteinen Sec13 und Sec31, die jeweils in Dimeren auftreten. Das innere Mantelprotein Sec24 ist hierbei für die Bindung der spezifischen Cargo-Proteine verantwortlich und tritt in Form verschiedener Paraloge in eukaryotischen Zellen auf. Eine direkte Interaktion der Isoform Sec24A mit der S-Domäne der HBV-Hüllproteine konnte bereits mittels des Split-Ubiquitin-Hefe-2-Hybrid-Assays innerhalb dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden (Awe, Dissertation 2009).

Zur näheren Charakterisierung der spezifischen Rolle des COPII-Adaptor-Proteins Sec24A im Infektionszyklus von HBV wurde zunächst ein entsprechender siRNA-Versuch auf subviraler Ebene durchgeführt. Hierfür wurden HuH-7-Zellen für 72 h mit einem siRNA-Pool gegen Sec24A bzw. Kontroll-siRNA behandelt und anschließend einer 48-stündigen Expression des Vektors pMSV.S.HA ausgesetzt. Danach erfolgte die Aufarbeitung der Lysate und Überstände gemäß Protokoll (s. 2.4.1) sowie SDS-

PAGE und die HA-spezifische Detektion des HBV.S-Proteins im WB (s. 2.4.6f), wobei α -Tubulin als Ladekontrolle verwendet wurde (s. Abb. 22A). Die Kontrolle des Sec24A-Knockdowns (KD) auf Transfektions-Level fand mittels FLAG-spezifischem WB gegen das Sec24A-Konstrukt statt. Hierfür wurden die HuH-7-Zellen nach 48-stündiger Depletion von Sec24A mit dem Plasmid pSec24A-FLAG für weitere 48 h behandelt, aufgearbeitet und detektiert (s. Abb. 22B). Die Depletionskontrolle auf endogenem Level wurde mittels qPCR unter Verwendung spezifischer Primer nach Standardprotokoll (s. 2.3.10.1) durchgeführt (s. Abb. 22C). Die Auswertungen ergaben, dass die erfolgreiche Depletion des COPII-Proteins Sec24A zu einer intrazellulären Akkumulation des HBV.S-Proteins und zu einer starken Reduktion dessen außerhalb der Zelle führte. Dies legt nahe, dass Sec24A für die Sekretion subviraler HBV-Partikel von entscheidender Bedeutung ist.

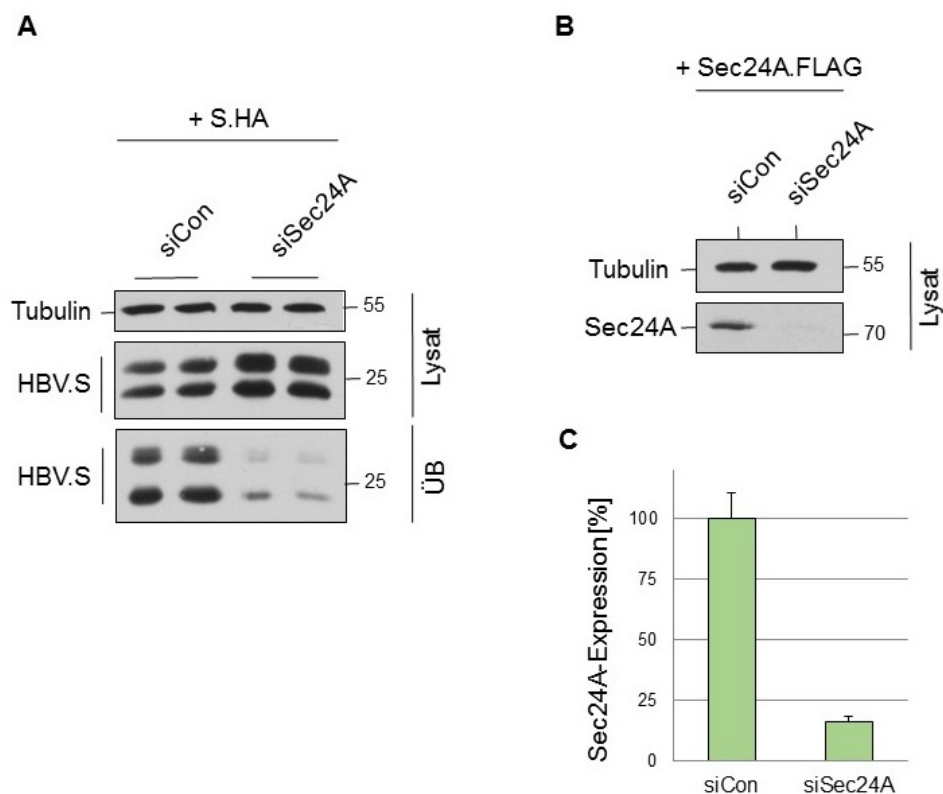


Abb. 22: Die Notwendigkeit von Sec24A für die Sekretion subviraler HBV-Partikel. Gezeigt sind die HA-spezifische WB-Analyse der Lysate und Überstände (ÜB) von HuH-7-Zellen nach transienter Expression von pMSV.S.HA für 48 h nach 72-stündiger Sec24A-Depletion sowie die Depletionskontrollen mittels WB und qPCR. **(A)** Links sind Zelllysate (oben) und Überstände (ÜB, unten) mit Angaben der Proteingrößen in kDa zu sehen. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. Die verwendete Kontroll-siRNA ist siCon genannt. **(B)** Dargestellt ist die Depletionskontrolle von Sec24A mittels spezifischem FLAG-WB nach 48-stündiger Depletion von Sec24A und 48-stündiger Expression von pSec24A.FLAG. **(C)** Zu sehen ist die Depletionskontrolle der Sec24A-siRNA mittels qPCR und unter Verwendung spezifischer Primer mit einer Verringerung des Sec24A-Expressionslevels auf 16,3 %. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an, gemessen wurde in Duplikaten ($n = 2$).

Da sich das *HBsAg-S*-Gen im Vektor pMSV.S.HA nicht unter dem natürlichen, viralen Promotor befindet, wurde der Einfluss der Sec24A-Depletion auf das S-Hüllprotein unter Verwendung eines weiteren Konstrukts wiederholt. Zu diesem Zweck wurden HuH-7-Zellen zunächst für 72 h mit siRNA bzw. entsprechender Kontrolle behandelt, anschließend die beiden Plasmide pMSV.S.HA sowie p123.HA für 48 h transient exprimiert. p123.HA kodiert hierbei das HA-getaggte S-Protein unter seinem natürlichen Promotor. Das Ergebnis zeigte, dass kein Unterschied zwischen den Protein-Expressionsleveln der beiden Konstrukte festzustellen ist. Zudem ist die Menge an HBV.S in den Überständen nach KD von Sec24A in beiden Fällen gleichermaßen deutlich reduziert (s. Abb. 23). Dies spricht dafür, dass Sec24A auch unter natürlichen Bedingungen - also unter Verwendung des natürlichen HBV-Promotors - mit HBV.S interagiert und für die Sekretion von SVPs unentbehrlich ist.

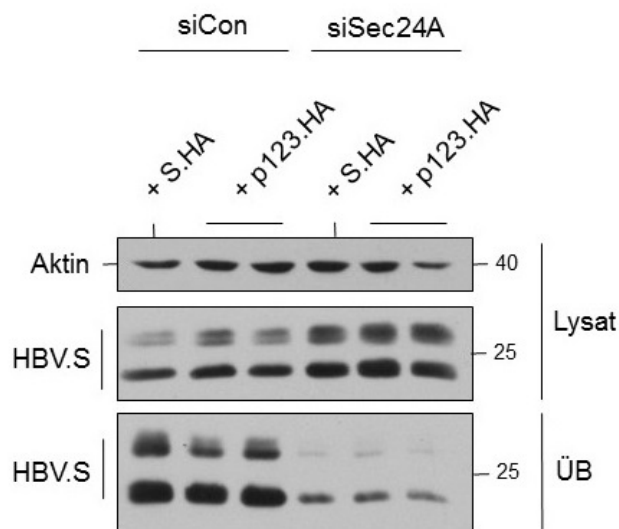


Abb. 23: Die Notwendigkeit von Sec24A für die Sekretion subviraler HBV-Partikel unter Verwendung des HBV-Promotors. Dargestellt ist die HA-spezifische WB-Analyse der Lysate und Überstände (ÜB) von HuH-7-Zellen nach der transienten Expression von pMSV.S.HA und p123.HA für 48 h nach 72-stündiger Depletion von Sec24A. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Zelllysate, der untere die entsprechenden Überstände mit Angaben der Proteingrößen in kDa. Als Ladekontrolle diente β -Aktin und die verwendete Kontroll-siRNA ist siCon genannt.

3.2.3.2 Die GTPase Sar1 wird für die Sekretion subviraler HBV-Partikel benötigt

Nachdem Sec24A, das als Adaptor-Protein für die Cargo-Proteine der COPII-Maschinerie funktioniert, eine entscheidende Rolle bei der Sekretion subviraler HBV-Partikel nachgewiesen werden konnte (s. 3.2.3.1), sollte im Folgenden eine mögliche Funktion der gesamten Maschinerie untersucht werden. Hierzu wurden siRNA-Depletionsversuche der kleinen GTPase Sar1, dem Initiator-Protein der Maschinerie,

sowie des COPII-Regulators Rab1 durchgeführt. HuH-7-Zellen wurden für 48 h mit spezifischen siRNAs gegen die jeweiligen Isoformen Rab1A und Rab1B sowie Sar1A und Sar1B in Kombination bzw. mit Kontroll-siRNA behandelt und anschließend einer 24-stündigen Expression des Vektors pMSV.S.HA ausgesetzt. Aufgrund der existentiellen Bedeutung der GTPase Sar1 wurde ein kürzeres Depletions- sowie Expressions-Zeitfenster als in vorherigen Versuchen verwendet (vgl. 3.2.3.1), um Zelltoxizität zu vermeiden. Zum Vergleich wurde der siRNA-Pool gegen Sec24A unter Anwendung des kürzeren Zeitfensters mitgeführt (s. Abb. 24A). Als Kontrolle der Rab1- und Sar1- spezifischen Depletionen wurden qPCRs mit spezifischen Primern durchgeführt (s. 2.3.10.1; Abb. 24C-F). Es konnte festgestellt werden, dass der erfolgreiche KD des COPII-Regulators Rab1 verglichen mit der Kontrolle in einem nur minimal reduzierenden Effekt auf die HBV.S-Expressionslevel im Lysat resultierte und keinen ersichtlichen Einfluss auf die SVP-Sekretion hatte. Die Verwendung der siRNAs gegen Sar1 führte hingegen zu einer Akkumulation des HBV.S-Proteins innerhalb der Zelle und zu einer starken Reduktion außerhalb der Zelle, wie es in einem längeren Zeitfenster auch bei Sec24A zu beobachten war (vgl. 3.2.3.1). Innerhalb des hier verwendeten kürzeren Zeitfensters konnte der Depletionseffekt der GTPase den von Sec24A sogar übertreffen.

Des Weiteren wurde entsprechend der Literatur die trans-dominant negative Sar1A-Mutante pSar1A.T39N generiert und entsprechend ihres Einflusses auf HBV.S untersucht. Diese Mutante besitzt eine hohe Bindepräferenz für GDP, sodass die GTPase-Funktion von Sar1A unterbunden und die Formation der COPII-Vesikel stark inhibiert wird (Wang et al., 2018; Kuge et al., 1994). pSar1A.T39N.MYC.DDK konnte mithilfe einer Mutagenese-PCR aus dem kommerziell erworbenen Wildtyp-Vektor pSar1A.MYC.DDK (OriGene Technologies) kreiert werden. Dieser besitzt die beiden Protein-Tags MYC und DDK (FLAG), von denen FLAG hier für die Detektion via WB gewählt wurde (pSar1A.FLAG). In folgendem Versuch wurden HuH-7-Zellen für 72 h der Expression der Vektoren pSar1A.FLAG (Sar1A.WT), pSar1A.T39N.FLAG (Sar1A.T39N) oder der Kontrolle p3xFlag-CMV-10 bzw. p3xFlag-CMV-14 (FLAG) ausgesetzt und nach Standardprotokoll aufgearbeitet und via SDS-PAGE und WB detektiert (s.o.). Die Mutante zeigte hierbei eine nahezu vollständige Reduktion der HBV-SVPs außerhalb der Zelle, wobei bereits die intrazellulären Proteinlevel reduziert waren (s. Abb. 24B). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass Sar1 - stellvertretend für den gesamten Transport mittels COPII-Maschinerie - für die

Morphogenese sowie Sekretion subviraler HBV-Partikel essentiell wichtig ist. Der COPII-Regulator Rab1 hingegen scheint nach bisherigen Erkenntnissen für die Freisetzung von HBV-SVPs nicht vonnöten zu sein.

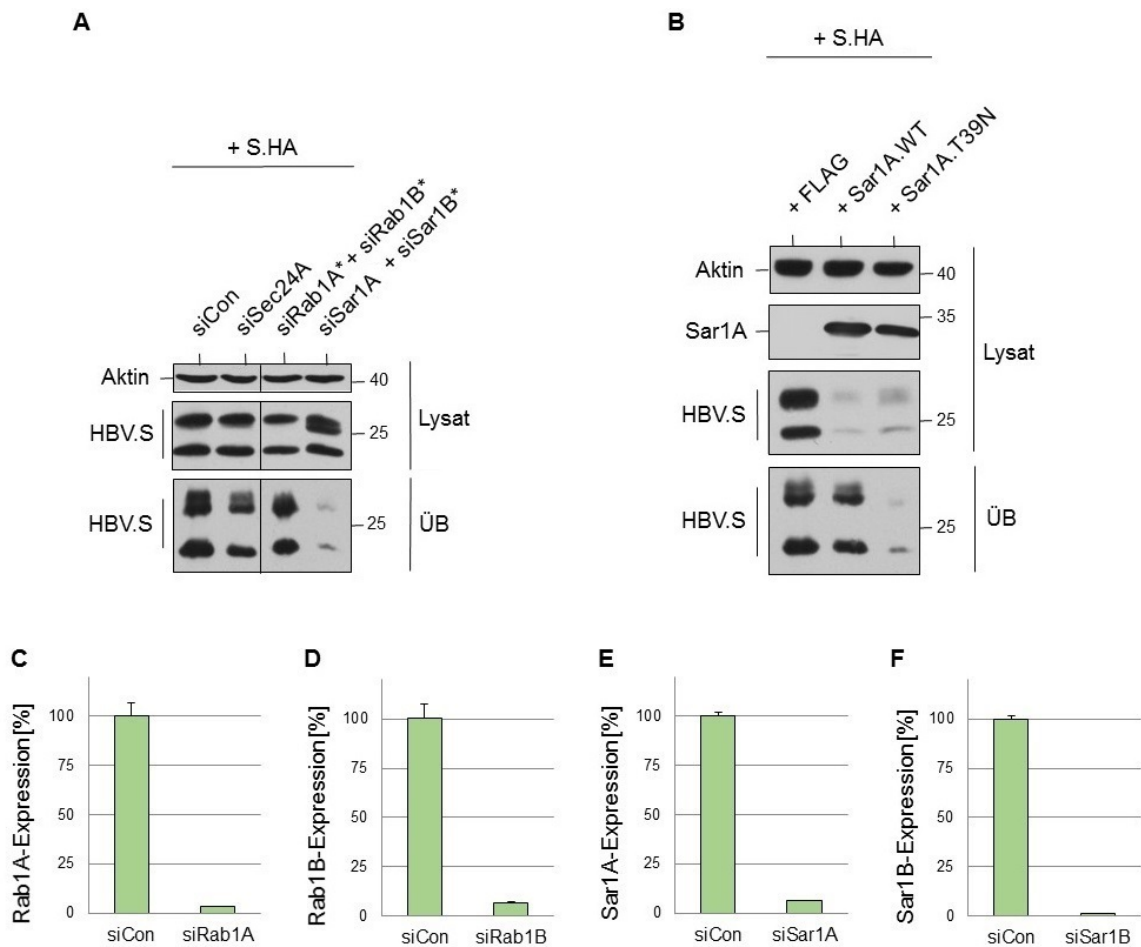


Abb. 24: Die Notwendigkeit von Rab1 und Sar1 für die Sekretion subviraler HBV-Partikel. Dargestellt sind die HA- und FLAG-spezifischen WB-Analyse der Lysate und Überstände (ÜB) von HuH-7-Zellen nach der transienten Expression von pMSV.S.HA für 24 h nach 48-stündiger Depletion von Rab1A und Rab1B, sowie Sar1A und Sar1B bzw. der Expression der dominant negativen Sar1A-Mutante für 72 h. **(A)** Im oberen Teil sind die Zellysate, im unteren die Überstände mit Angaben der Proteingrößen in kDa zu sehen. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin detektiert. Die verwendete Kontroll-siRNA ist siCon genannt. **(B)** Die Expression der dominant negativen Sar1A-Mutante Sar1A.T39N zeigte verglichen mit Kontrolle (FLAG) und Wildtyp (Sar1A.WT) eine deutliche Verringerung der extrazellulären HBV.S-Level. **(C)** Gezeigt sind die Depletionskontrollen der single-Rab1- und Sar1-siRNAs (*) mittels qPCR und unter Verwendung spezifischer Primer. Die Kontrolle (siCon) wurde hierbei auf 100 % gesetzt. Es konnten Verringerungen der Expressionslevel wie folgt erreicht werden: Rab1A auf 3,2 %, **(D)** Rab1B auf 6,5 %, **(E)** Sar1A auf 6,1 %, **(F)** Sar1B auf 1,1 %. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an, gemessen wurde in Duplikaten (n = 2).

3.2.3.3 Funktionen der COPII-Untereinheiten bei der Sekretion subviraler HBV- und HDV-Partikel

Aufgrund der essentiellen Funktion des COPII-Initiator-Proteins Sar1 bei der Sekretion subviraler HBV-Partikel wurde anschließend die Beteiligung weiterer COPII-Vesikelproteine hinsichtlich der Freisetzung von HBV- und HDV-SVPs

untersucht. Hierfür wurde ein spezifischer siRNA-Screen potentiell beteiligter Sec-Proteine mit ihren unterschiedlichen Isoformen durchgeführt. HuH-7-Zellen wurden für 72 h mit spezifischen siRNAs gegen die COPII-Proteine Sec24A, Sec24B, Sec23A, Sec23B, Sec13, Sar1A und Sar1B bzw. Kontroll-siRNA behandelt, anschließend eine 48-stündige Expression des Vektors pMSV.S.HA alleine (s. Abb. 25A) oder in Kombination mit pCMV. Δ .HA durchgeführt (s. Abb. 25B). Die Depletionseffizienz wurde mittels qPCR und spezifischer Primer untersucht (s. 2.3.10.1; Abb. 26). Die bereits identifizierte Funktion von Sec24A bei der Sekretion von HBV-SVPs (s. 3.2.3.1) konnte bestätigt und für HDV-SVPs ebenfalls beobachtet werden. Die Sekretion von HDV.L sowie HBV.S war in beiden Fällen nach Depletion von Sec24A deutlich verringert. Gleiches zeigte sich bei der Sec23B-spezifischen sowie in leicht ausgeprägter Form bei beiden Sar1-Isoformspezifischen Depletionen bei beiden subviralen Typen (vgl. 3.2.3.2). KD von Sec24B und Sec23A blieben ohne erkennbaren Einfluss auf die Sekretion der subviralen Partikel. Der Sec13-spezifischen siRNA konnte anhand der Ladekontrolle ein toxischer Effekt nachgewiesen werden, wodurch Auswertungen dieser Daten nicht möglich waren. Diese Resultate deuten darauf hin, dass insbesondere die COPII-Proteine Sec24A und Sec23B für die Sekretion subviraler HBV- und HDV-Partikel wichtig sind.

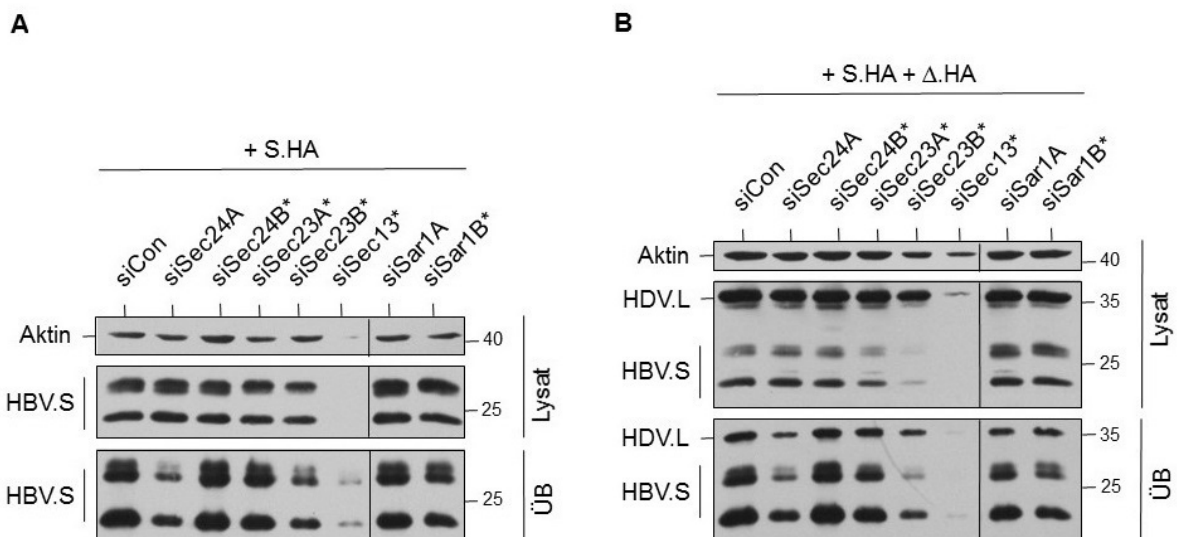


Abb. 25: Die Rolle der COPII-Proteine bei der Sekretion subviraler HBV- und HDV-Partikel. Dargestellt ist die HA-spezifische WB-Analyse der Lysate und Überstände (ÜB) von HuH-7-Zellen nach 72-stündiger Depletion von Sec24A, Sec24B, Sec23A, Sec23B, Sec13, Sar1A und Sar1B und der anschließenden transienten Expression von **(A)** pMSV.S.HA alleine oder von **(B)** pMSV.S.HA und pCMV. Δ .HA gemeinsam für 48 h. Im oberen Teil der Abbildung sind die Zellysate, im unteren die Überstände mit Angaben der Proteingrößen in kDa zu sehen. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin detektiert. Die verwendete Kontroll-siRNA ist siCon genannt; single-siRNAs sind gekennzeichnet (*).

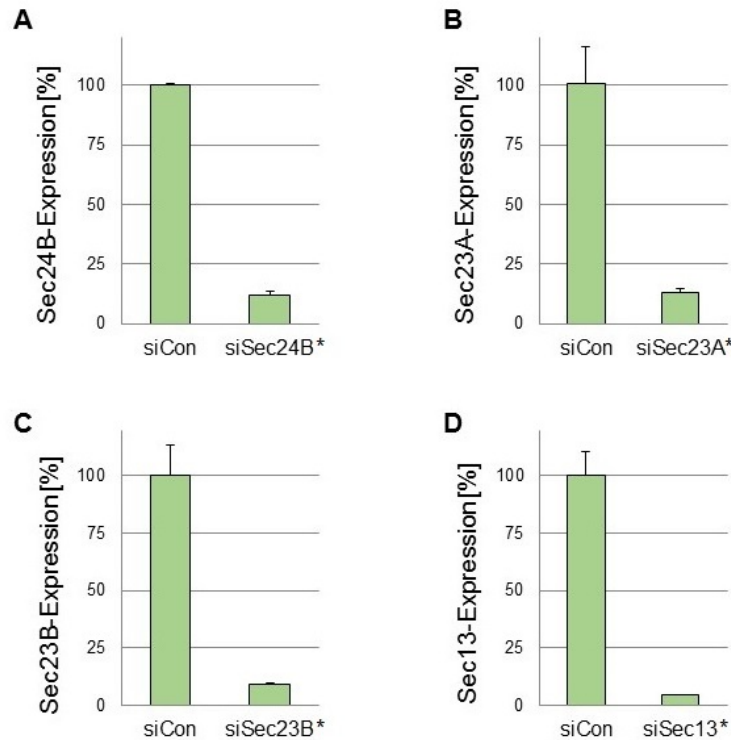


Abb. 26: Depletionskontrollen von Sec24B, Sec23A, Sec23B und Sec13. Zu sehen sind die Depletionskontrollen der single-COPII-siRNAs (*) mittels qPCR und unter Verwendung spezifischer Primer. Die Kontrolle (siCon) wurde hierbei auf 100 % gesetzt. Es konnten Verringerungen aller Expressionslevel erreicht werden. Diese lagen unter Verwendung von (A) siSec24B bei 12 %, (B) siSec23A bei 13 %, (C) siSec23B bei 8,9 % und von (D) siSec13 bei 4,5 %, wobei hier die hohe Rate an Zellmortalität beachtet werden muss (s. Abb. 25). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an, gemessen wurde in Duplikaten (n = 2).

Der Einfluss der Sec-Depletionen auf die generelle zelluläre Sekretion wurde mittels Alpha-Fetoprotein (AFP)-ELISA untersucht. Daher wurden 50 µl der Überstände aus den oben beschriebenen Versuchen verwendet. Gemessen wird hierbei die jeweilige Menge an sekretiertem Zellprotein AFP, wobei die Kontrolle (siCon) auf 100 % gesetzt wird. Es konnte festgestellt werden, dass nahezu alle Depletionen kaum oder keinen Einfluss auf die allgemeine Sekretion der Zelle hatten (s. Abb. 27). Unter Verwendung spezifischer siRNAs gegen Sec24A, Sec24B, Sec23A sowie Sar1B wurde das AFP-Level nicht reduziert, teilweise sogar leicht erhöht (bis auf 110 %). KD von Sec23B und Sar1A resultierten in leichten Beeinträchtigungen bis auf etwa 85 %. Lediglich der KD von Sec13 führte zu einer starken Reduktion von AFP im Überstand auf etwa 30 % verglichen mit der Kontrolle, was mit der erhöhten Zellmortalität in Verbindung gebracht werden kann (s. o.). Unter Einbezug dieser Daten ist der Einfluss der KD von Sec24A und Sec23B sowie Sar1A/Sar1B auf die Sekretion subviraler HBV- und HDV-Partikel als spezifisch zu bewerten, da die zelluläre Sekretionsmaschinerie nicht oder nur leicht beeinträchtigt zu sein scheint.

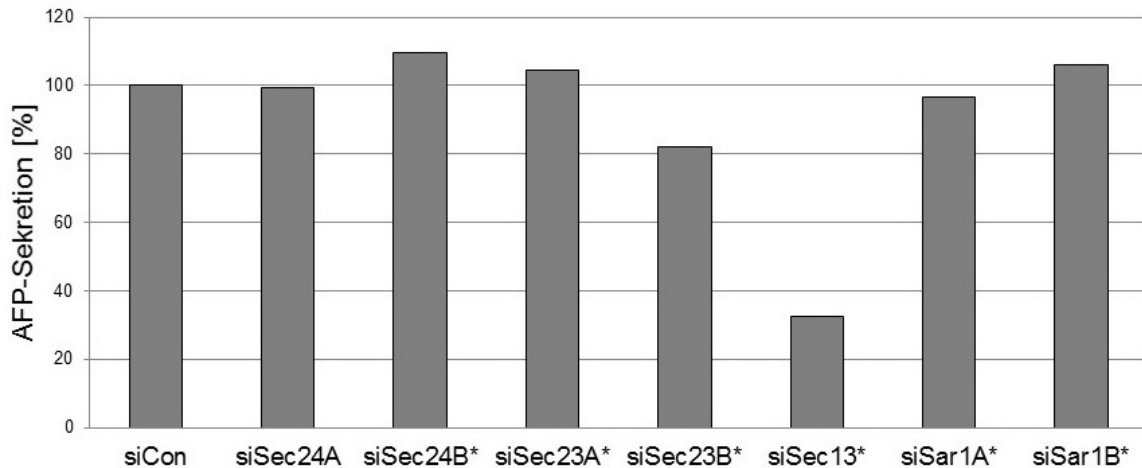


Abb. 27: Analyse der zellulären Sekretion von AFP nach Depletionen der COPII-Proteine. Dargestellt sind die relativen Daten einer Sekretionsanalyse von Zellüberständen mittels AFP-ELISA (%). Die Kontrolle wurde siCon benannt und auf 100 % gesetzt. Verwendete single-siRNAs sind gekennzeichnet (*). Die AFP-Sekretion lag bei KD von Sec24A bei 99,3 %, von Sec24B bei 109,6 %, nach Depletion von Sec23A bei 104,3 % und bei Sar1B bei 106,2 %. Depletionen der COPII-Proteine Sec23B und Sar1A führten zu Reduktionen des AFP-Levels auf 82,2 % und 96,6 %. Der Einsatz von siSec13 führte zu einem starken Abfall der zellulären Sekretion auf 32,5 %, was durch die erhöhte Zelltoxizität erklärt werden kann (s. Abb. 25).

3.2.3.3.1 Die Rolle des äußeren COPII-Mantelproteins Sec31

Das COPII-Protein Sec31, das sich gemeinsam mit Sec13 in der äußeren Mantelhülle der Vesikel befindet, sollte ebenfalls funktionell untersucht werden. Hierfür wurden siRNAs gegen Sec31A und Sec31B für 72 h auf HuH-7-Zellen inkubiert, danach das Plasmid pMSV.S.HA für weitere 48 h exprimiert. Die Auswertung der S-Proteinlevel nach Depletion von Sec31A ergaben eine leichte Verringerung in Lysaten sowie Überständen im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 28A). Die Analysen mittels qPCR und spezifischer Primer zeigten eine erfolgreiche Reduktion des Sec31A-Expressionslevels auf etwa ein Fünftel im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 28B). Im Falle der Sec31B-spezifischen siRNA konnte jedoch kein KD des Proteins nachgewiesen werden. Im Gegenteil wurde sogar eine starke Erhöhung der Sec31B-Transkripte nach Einsatz der siRNA festgestellt. Im Vergleich zur Kontrolle befand sich das Proteinlevel bei etwa der 2,5-fachen Menge (s. Abb. 28C). Diese Ergebnisse wurden aufgrund der erfolglosen Depletion von Sec31B als nicht eindeutig eingestuft und nicht mit dem HDV-Konstrukt wiederholt. Eine mögliche Rolle von Sec31A ist nach diesen Ergebnissen lediglich angedeutet.

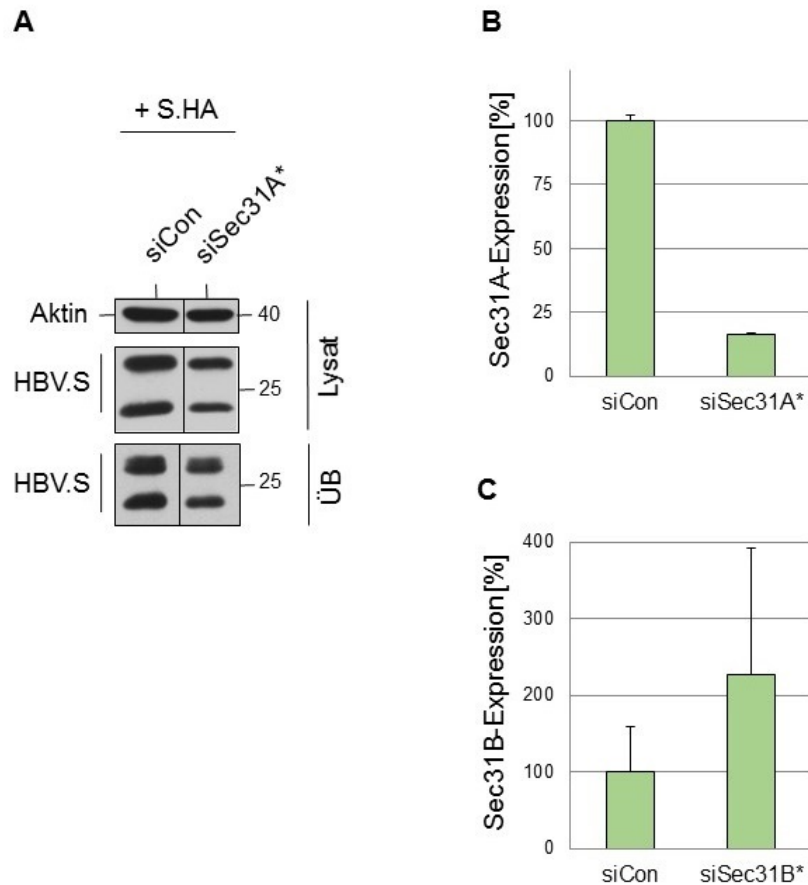


Abb. 28: Die Rolle des äußeren COPII-Mantelproteins Sec31 bei der Sekretion subviraler HBV-Partikel. Dargestellt ist die HA-spezifische WB-Analyse der Lysate und Überstände von HuH-7-Zellen nach der transienten Expression von pMSV.S.HA für 48 h nach 72-stündiger Depletion von Sec31A sowie die Überprüfungen der Depletionseffizienzen der single-siRNAs siSec31A und siSec31B (*). **(A)** Links sind sowohl Zelllysate (oben), als auch Überstände (ÜB, unten) mit Angaben der Proteingrößen in kDa zu sehen. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin detektiert. Die verwendete Kontroll-siRNA ist siCon genannt. **(B)** Dargestellt ist die Depletionskontrolle von Sec31A mittels qPCR und unter Verwendung spezifischer Primer. Die Depletion war als erfolgreich zu detektieren und das Sec31A-Transkriptlevel lag bei 16,4 %. **(C)** Zu sehen ist die Depletionskontrolle der Sec31B-siRNA mittels qPCR und unter Verwendung spezifischer Primer. Es konnte keine Verringerung des Sec31B-Expressionslevels erreicht werden, stattdessen lagen die mRNA-Level nach Verwendung der siRNA bei 226,3 %. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an, gemessen wurde in Duplikaten ($n = 2$).

3.2.3.3.2 Die Rolle des äußeren COPII-Mantelproteins Sec13

Aufgrund der hohen Rate an Zellmortalität nach Verwendung der Sec13-spezifischen siRNA (vgl. 3.2.3.3) wurden weitere Untersuchungen von Sec13 mit geringeren siRNA-Konzentrationen unternommen. Zu diesem Zweck wurden HuH-7-Zellen mit je 10, 20, 30, 40 oder 50 % siRNA bzw. 50 % siCon für 48 h inkubiert und anschließend das Plasmid pMSV.S.HA für 24 h exprimiert. Neben der HA-spezifischen WB-Analyse wurden Calnexin und β -Aktin als Zellmarker verwendet (s. Abb. 29A). Zusätzlich wurden alle unterschiedlich verwendeten Konzentrationen an siRNA

mittels qPCR bezüglich der Depletionseffizienz überprüft (s. Abb. 29B). Bereits ab der Verwendung von 20 % siRNA war die Expression von Sec13 nahezu vollständig heruntergefahren, während Zellvitalität (Aktin) sowie ER-Organisation (Calnexin) kaum beeinflusst waren. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich bei KD von Sec13 eine vollständige Reduktion von S.HA in den Lysaten, einhergehend mit einer nahezu vollständigen Reduktion in den Zellüberständen. Dies legt nahe, dass Sec13 insbesondere an der Morphogenese subviraler HBV-Partikel wesentlich beteiligt ist.

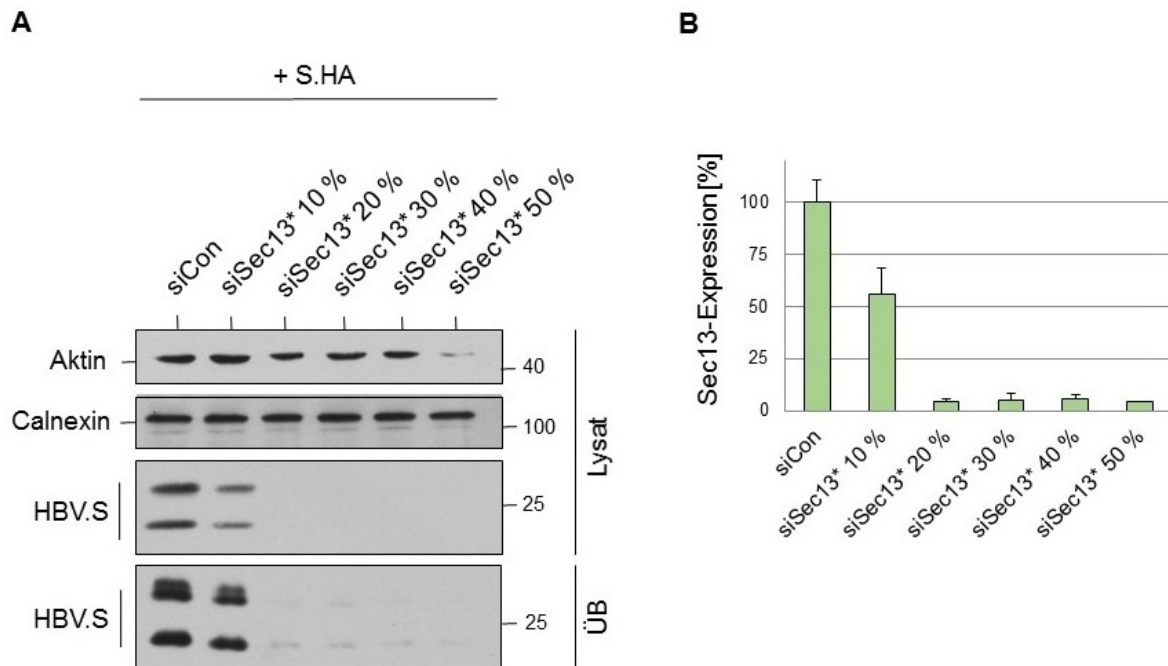


Abb. 29: Die Rolle des äußeren COPII-Mantelproteins Sec13 bei der Sekretion subviraler HBV-Partikel. Dargestellt ist die HA-spezifische WB-Analyse der Lysate und Überstände (ÜB) von HuH-7-Zellen nach der transienten Expression von pMSV.S.HA für 24 h nach 48-stündiger Depletion von Sec13 unter Verwendung verschiedener Konzentrationen der entsprechenden single-siRNA (*) sowie die jeweilige Überprüfung der Depletionseffizienz mittels qPCR-Analyse. **(A)** Es sind Zelllysate (oben) und Überstände (unten) mit Angaben der Proteingrößen in kDa zu sehen. Als Ladekontrolle wurden β -Aktin sowie das ER-Protein Calnexin detektiert. Die verwendete Kontroll-siRNA ist siCon genannt. **(B)** Dargestellt ist die Depletionskontrolle von Sec13 mittels qPCR und unter Verwendung spezifischer Primer. Es konnte je nach Menge der verwendeten siRNA eine Verringerung des Sec13-Expressionslevels auf 55,6 %, 4 %, 5 %, 5,4 % und 4,5 % erreicht werden (10 - 50 % siRNA). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an, gemessen wurde in Duplikaten (n = 2).

3.2.3.4 Funktionen der COPII-Maschinerie bei der intrazellulären Verteilung von HBV.S

Zur weiteren Untersuchung der Interaktion der COPII-Proteine Sec24A, Sec23B und Sar1 mit dem HBV-Hüllprotein S wurden Immunfluoreszenz-Experimente (IF) durchgeführt. Mithilfe dieser Methode ist es möglich, die intrazelluläre Verteilung von Proteinen und deren Interaktionen miteinander zu untersuchen. Hierfür wurden

Sec24A, Sec23B und Sar1A/B in HuH-7-Zellen für 48 h mittels spezifischer siRNAs depletiert, anschließend fand die Transfektion mit dem Plasmid pMSV.S.HA und dessen Expression für weitere 48 h statt (s. Abb. 30). Die in den folgenden Experimenten gezeigten Proben wurden allesamt nach Protokoll angefertigt (s. 2.4.8), in Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend mittels 0,2%igem Triton X-100 in PBS für die Antikörperbehandlung permeabilisiert. In Kontrollzellen konnte eine vollständige Kolokalisation von HBV.S und Sec24A in Umgebung des Zellkerns festgestellt werden. Diese war unter KD von Sec24A, Sec23B oder Sar1 nicht mehr zu erkennen. Die Depletion von Sec24A zeigte sich in den Fluoreszenzaufnahmen deutlich durch eine starke Reduktion des endogenen COPII-Proteins bestätigt. In Sec24A-depletierten Zellen wies HBV.S verglichen mit der Kontrolle eine veränderte intrazelluläre Verteilung auf und befand sich nicht mehr in nuklearer Nähe, sondern in den peripheren Bereichen der Zelle. Zudem konnte beobachtet werden, dass das virale Protein ohne die Anwesenheit von Sec24A in aggregierten Formationen auftritt statt in der üblichen, gleichmäßigen Verteilung. Der KD von Sar1 unter Kombination beider Isoformen A und B resultierte in einer Umorganisation von Sec24A in großflächige, akkumulierte Strukturen in Zellkern-Nähe und fehlender Kolokalisation mit HBV.S. Die Depletion des Sec24-Dimerpartners Sec23B führte dazu, dass das virale Protein und Sec24A nebeneinander in Zellkern-Nähe auftraten, jedoch nicht mehr kolokalisierten. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Interaktion von Sec24A und HBV.S von der Präsenz der beiden COPII-Komponenten Sar1 und Sec23B abhängig ist. Im Falle einer Störung der Protein-Protein-Interaktion von Sec24A und S scheinen Dislokation und Akkumulation des viralen Proteins in den äußeren Zellbereichen zu entstehen.

Des Weiteren sollte untersucht werden, in welchem zellulären Bereich die Kolokalisation von HBV.S und Sec24A stattfinden könnte und ob diese örtliche Bindung durch Depletion des COPII-Proteins verändert ist. Um diese Fragestellung zu adressieren, wurden IFs nach vorherigem Ablauf unter Anwendung einer Kontroll- und einer Sec24A-spezifischen siRNA (s. o.) angefertigt. Detektiert wurden HBV.S und das zelluläre Membranprotein ERGIC-53 („ER-Golgi intermediate compartment 53 kDa-protein“), das als Marker des ER-Golgi-Zwischenkompartiments (ERGIC) eingesetzt werden kann (s. Abb. 31). Die Immunsignale zeigten, dass das virale Protein in den Kontrollzellen vollständig mit dem ERGIC-Marker kolokalisiert, während dies in Sec24A-defizienten Hepatozyten nicht mehr zu beobachten war.

Dies spricht dafür, dass HBV.S natürlicherweise im Kompartiment zwischen ER und Golgi mit Sec24A interagiert und ohne dessen Präsenz in einen anderen Bereich der Zelle dislokalisiert wird.

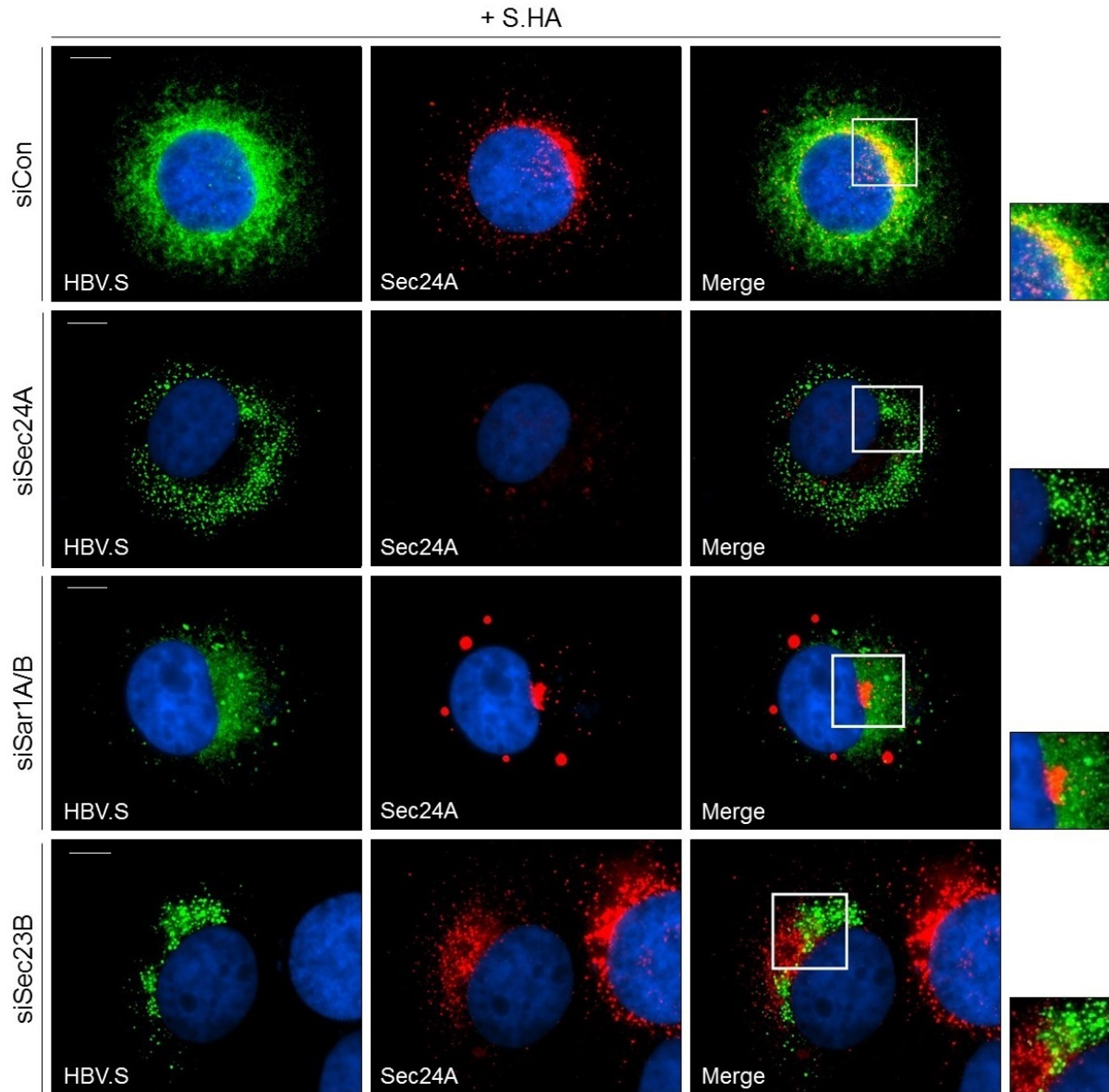


Abb. 30: Intrazelluläre Verteilung von HBV.S und Sec24A nach KD von COPII-Komponenten. Hier gezeigt sind die immun-spezifischen Fluoreszenzaufnahmen von HuH-7-Zellen nach 48-stündiger Expression des Vektors pMSV.S.HA nach siRNA-Depletion von Sec24A, Sar1A/B oder Sec23B für 48 h im 12-Well-Format. „Merge“ gibt die Überlagerung der zwei vorherigen Signale an und der rechte Teil der Abbildung zeigt entsprechende Vergrößerungen aus den Merge-Bildern. In der obersten Reihe sind Kontrollzellen mit Färbungen gegen HBV.S und Sec24A einzeln und in Kombination gezeigt (siCon). In zweiter Reihe sind die Fluoreszenzsignale der beiden Proteine nach KD von Sec24A, in der dritten nach KD von Sar1A/B und in der untersten Reihe nach Depletion von Sec23B dargestellt. Der graue Balken am oberen, linken Bildrand entspricht einer Größe von 10 µm.

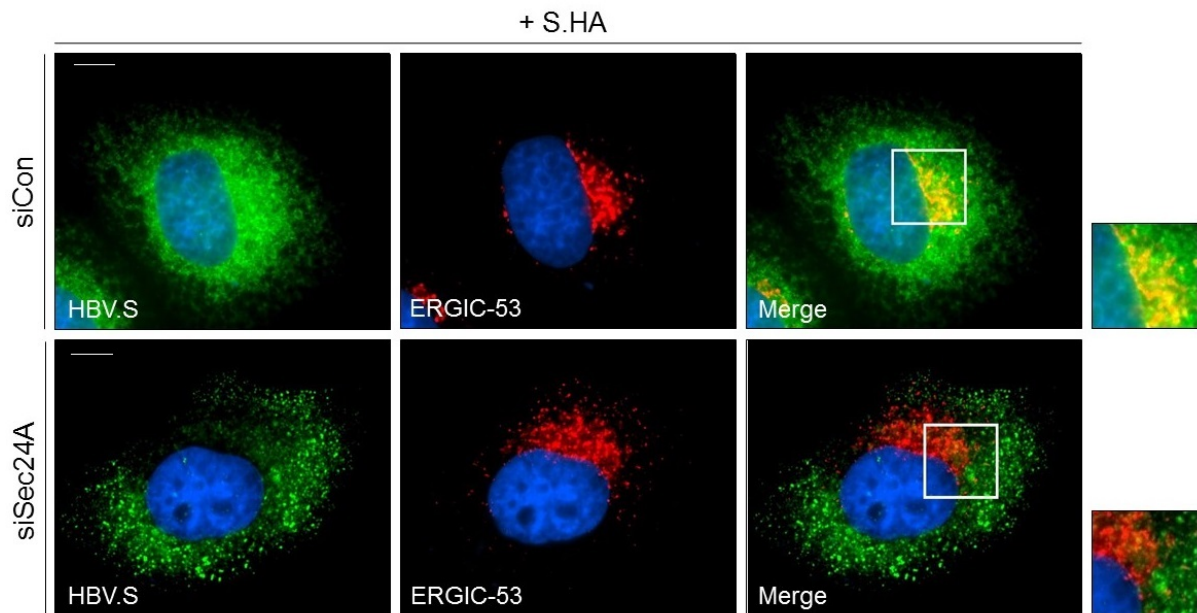


Abb. 31: Intrazelluläre Verteilung von HBV.S nach KD von Sec24A. Hier gezeigt sind die immun-spezifischen Fluoreszenzaufnahmen von HuH-7-Zellen nach 48-stündiger Expression des Vektors pMSV.S.HA nach siRNA-Depletion von Sec24A 48 h im 12-Well-Format. „Merge“ gibt die Überlagerung der zwei vorherigen Signale an und der rechte Teil der Abbildung zeigt entsprechende Vergrößerungen aus den Merge-Bildern. Die obere Reihe zeigt Kontrollzellen mit Färbungen gegen HBV.S und das ERGIC-Markerprotein ERGIC-53 einzeln und in Kombination (siCon). In der unteren Reihe sind die Fluoreszenzsignale der beiden Proteine nach KD von Sec24A dargestellt. Der graue Balken am oberen, linken Bildrand entspricht einer Größe von 10 µm.

3.3 Funktionelle Analyse der COPII-Proteine Sec24A und Sec23B im Infektionszyklus von HBV

Als weiterer Fokus dieser Arbeit sollte eine detaillierte Analyse der COPII-Proteine Sec24A und Sec23B stattfinden, die als essentielle Bestandteile der HBV- und HDV-SVP-Freisetzung identifiziert werden konnten (vgl. 3.2.3.3). Sec23 und Sec24 agieren innerhalb der COPII-Maschinerie als innere Vesikelhülle und funktionelles Dimer, das zum einen an das zu transportierende Cargo-Protein und die GTPase Sar1 und zum anderen an die äußere Vesikelhülle aus Sec13 und Sec31 bindet (Barlowe, 1995). Sec24 garantiert hierbei die Selektivität der Transportproteine, Sec23 die Verknüpfung des gesamten COPII-Mantels (Cai et al., 2007; Bi et al., 2002). Bisher konnte festgestellt werden, dass die beiden zellulären Proteine für die Sekretion von HBV-SVPs unentbehrlich sind. In folgenden Experimenten wurden spezifische Interaktions- sowie Kartierungsanalysen angefertigt, um das Zwischenspiel des Sec23B/Sec24A-Dimers mit dem HBV-Hüllprotein S genauer

charakterisieren zu können und hinsichtlich der Sekretion subviraler als auch viraler Partikel zu untersuchen.

3.3.1 Die Rolle von Sec24A bei der intrazellulären Verteilung von HBV.S

Untersuchungen bezüglich des Einflusses einer Depletion des COPII-Adaptor-Proteins Sec24A auf die Sekretion subviraler HBV-Partikel konnten nahelegen, dass diese insbesondere aufgrund der Beeinflussung des HBV.S-Proteins gestört ist (vgl. 3.2.3.4). Hierbei scheint die intrazelluläre Organisation von S, die normalerweise im Kompartiment zwischen ER und Golgi stationiert ist, nach KD von Sec24A verändert zu sein. Im weiteren Verlauf sollte mittels unterschiedlicher Fraktionierungsmethoden genauer untersucht werden, ob und inwiefern die Depletion von Sec24A die intrazelluläre Verteilung des Virusproteins und die Komposition der subviralen Partikel beeinflusst.

Zunächst fand eine Analyse mithilfe des sogenannten Flotationsassays statt, mit dem die zelluläre Verteilung von Proteinen hinsichtlich ihrer Membranassoziation untersucht werden kann. Hierbei wird zwischen Membran-ständigen und löslichen Protein unterschieden, die zytosolisch und intraluminal vorliegen können (Döring et al., 2018). Zu diesem Zweck wurden HuH-7-Zellen für 48 h mit Sec24A-spezifischer siRNA bzw. Kontrolle (siCon) behandelt und anschließend mit dem Plasmid pMSV.S.HA transfiziert. Nach 24-stündiger Expression konnten jeweils zwei 6-Well-Platten vereinigt und entsprechend des Flotationsprotokolls aufgearbeitet werden (s. 2.4.4.2). Nach Fraktionierung mithilfe eines Iodixanolgradienten (OptiPrep™) und Ultrazentrifugation fand die Detektion von HBV.S mittels SDS-PAGE und HA-spezifischer WB-Analyse statt (s. 2.4.6f), wobei das transmembrane Protein Calnexin als Marker für Membran-Fraktionen und α -Tubulin als Marker für zytosolische Fraktionen verwendet wurden. Während sich S.HA in Kontrollzellen hauptsächlich Membran-gebunden sowie schwach in drei löslichen Fraktionen zeigte (s. Abb. 32A), lag nach Depletion von Sec24A eine andere Verteilung vor. S war insgesamt gleichmäßiger verteilt. Die stärkste Proteinakkumulation zeigte sich in zwei Membran-Fraktionen; weitere sechs lösliche Fraktionen konnten ebenfalls schwach das Protein aufweisen (s. Abb. 32B). Diese Beobachtung spricht dafür, dass das HBV-Hüllprotein nach Depletion von Sec24A nicht mehr vollständig an der natürlichen Zellstruktur akkumuliert, sondern sich weiträumiger innerhalb der Zelle

verteilt. Zwar liegt das HBV-Protein auch nach Sec24A-Depletion hauptsächlich Membran-gebunden vor, jedoch erscheint die subzelluläre Verteilung diffuser zu sein. Alternative Fraktionierungsmethoden sollten diesbezüglich in folgenden Experimenten weitere Einblicke bieten.

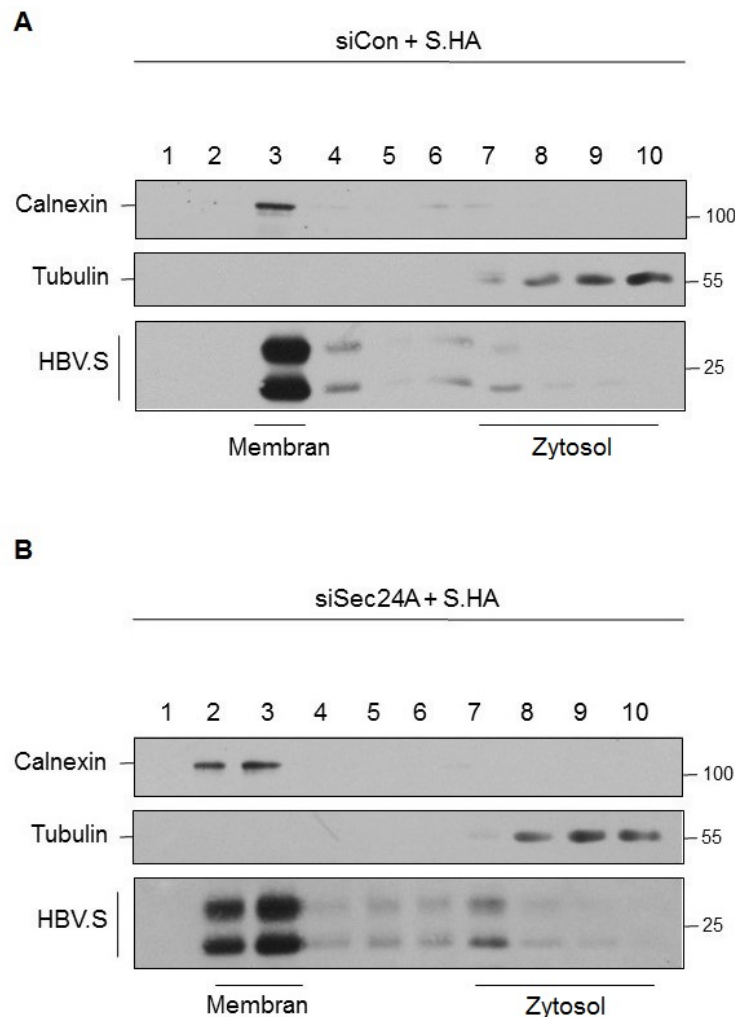


Abb. 32: Flotationsassay von S.HA nach Sec24A-Depletion. Dargestellt ist die HA-spezifische WB-Analyse der Lysate von HuH-7-Zellen nach der transienten Expression von pMSV.S.HA für 24 h nach 48-stündiger Depletion von Sec24A bzw. Verwendung einer Kontrolle (siCon) mit anschließender Fraktionierung mittels eines Iodixanolgradienten und Ultrazentrifugation. Calnexin ist als Membran-Marker, α -Tubulin als Zytosol-Marker detektiert und die jeweiligen Proteingrößen sind in kDa angegeben. **(A)** Zu sehen ist die Verteilung von S.HA in siCon-behandelten Zellen. **(B)** Dargestellt ist die Verteilung von S.HA in siSec24A-behandelten Zellen.

Zur weiteren Charakterisierung der scheinbar veränderten intrazellulären Verteilung des S-Proteins nach Depletion von Sec24A und eventuell resultierender Hemmungen der Partikel-Formation wurde ein Versuchsaufbau mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradienten angewandt. Mithilfe dieser Methode können Zellkompartimente und zelluläre Partikel hinsichtlich ihrer Dichte fraktioniert werden,

was das kompositionelle Verhältnis von Proteinen und Lipiden angeben kann (Nasukawa et al., 2017). Zu diesem Zweck wurden HuH-7-Zellen für 48 h mit Sec24A-spezifischer siRNA bzw. Kontroll-siRNA (siCon) behandelt, anschließend für weitere 24 h der Expression von pMSV.S.HA ausgesetzt. Je drei gleich transfizierte 6-Wells wurden vereinigt und anschließend per Temperaturshift-Protokoll aufgeschlossen (s. 2.4.4.1). Dieses beinhaltet den mechanischen Aufschluss mittels wiederholtem Einfrieren und Auftauen der Zelllysate („freeze-thaw-cycles“) in hypotonischen Pufferlösungen und resultierender Zerstörung der Zellwände durch die entstehenden Scherkräfte, wobei Membran-zerstörende Detergenzien nicht zum Einsatz kommen. Anfertigung und Auftrag der Gradienten, sowie die Unterteilung in je 14 Fraktionen fanden nach Protokoll statt (s. 2.4.4.3). Anschließend konnten die Fraktionen mithilfe des Refraktometers (A. Krüss Optronic) hinsichtlich der Dichte untersucht und anhand des HBsAg-ELISAs bezüglich des HBV.S-Proteins quantifiziert werden. Die Auswertung von Kontrolle (s. Abb. 33A) und siRNA-Depletion (s. Abb. 33B) ergab einen Protein-Peak bei ca. 1,15 - 1,2 g/ml in beiden Fällen. Dies entspricht der Dichte der HBV.S-Lipoprotein-Partikel gemäß der Literatur (Gerin et al., 1975; Paran et al., 2001). Als Unterschied war lediglich zu beobachten, dass sich der Peak der Kontrolle etwas breiter, über die Fraktionen 2 - 7, im Fall der Sec24A-Depletion über die Fraktionen 2 - 6 erstreckte. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Depletion von Sec24A die Produktion der HBV.S-Lipoprotein-Partikel nicht verhindert. Ob diese SVPs den unter Sec24A-Präsenz generierten Partikeln in all ihren morphologischen Eigenschaften entsprechen, kann jedoch durch diesen Versuch nicht festgestellt werden.

Statt Cäsiumchlorid können für die Anfertigung von Dichtegradienten unterschiedliche Konzentrationen an Sucrose herhalten. Diese untersuchen nicht das Verhältnis von Proteinen zu Lipiden, sondern geben Aufschluss über das Sedimentationsverhalten dieser Partikel und dementsprechend deren Größe (Bermejo et al., 2014). Dementsprechend könnten Versuche wie diese Hinweise zur Komposition der jeweiligen Partikel liefern.

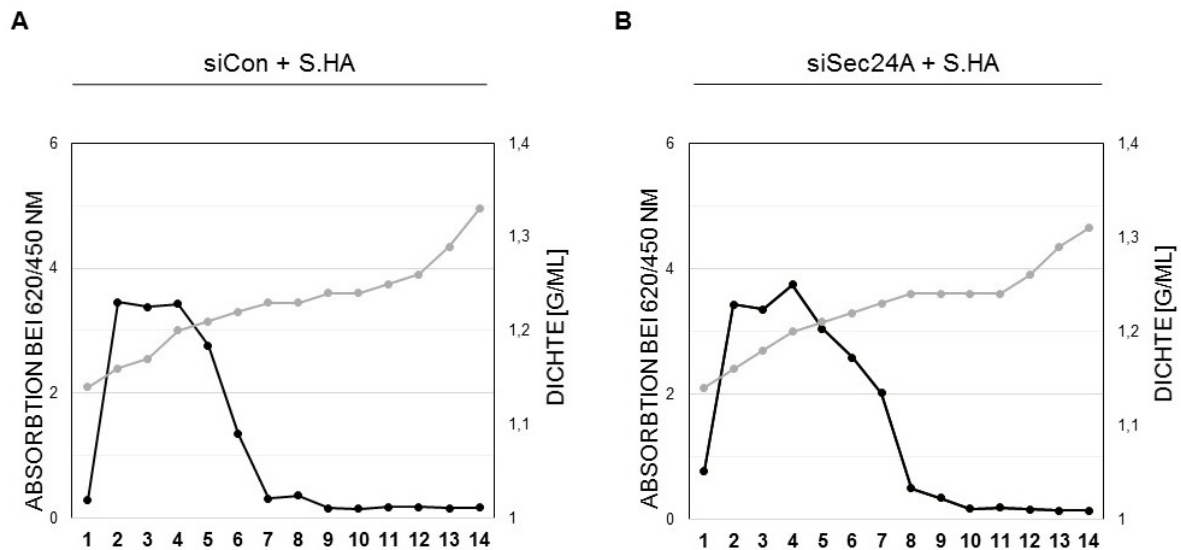


Abb. 33: Cäsiumchlorid-Dichtegradienten von S.HA nach Sec24A-Depletion. Dargestellt ist die Analyse aller Fraktionen (1 - 14) mittels Refraktometer sowie spezifischem HBsAg-ELISA nach Zentrifugation der Lysate im Cäsiumchlorid-Dichtegradienten. Die Dichte der jeweiligen Fraktionen ist in g/ml angegeben (hellgrau), sowie die im ELISA gemessene Absorption bei 620/450 nm (schwarz). Die Kontrolle ist siCon benannt. **(A)** Unter Verwendung der Kontroll-siRNA ergab die Quantifizierung von HBV.S einen Peak im Bereich von 1,15 bis 1,2 g/ml Dichte in den Fraktionen 2 bis 7. Dies entspricht der Dichte von HBV-SVPs. **(B)** Nach Depletion von Sec24A zeigte sich der HBV.S-Peak bei gleicher Dichte wie bei der Kontrolle in den Fraktionen 2 bis 6.

Transfektionsschema, Lyse und Aufarbeitung des folgenden Versuchs fanden gemäß der Cäsiumchloridgradienten statt (vgl. o.), die Sucrosegradienten wurden nach Protokoll angefertigt (s. 2.4.4.4) und ausgewertet. Die je 14 Fraktionen von Kontrolle (s. Abb. 34A) und Sec24A-Depletion (s. Abb. 34B) wurden mithilfe des Refraktometers und des HBsAg-ELISAs ausgewertet. Wie bereits bei der Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation lagen die HBV.S-Peaks in beiden Fällen nah beieinander. In der Kontrolle befand sich dieses bei etwa 34 - 35 % Sucrose, nach Sec24A-Depletion bei 32 - 35 %. Trotz leicht unterschiedlicher Verläufe der Peaks spricht dieses Ergebnis dafür, dass die kompositionellen Eigenschaften der hier detektierten HBV-SVPs durch den KD von Sec24A nicht verändert sind.

Aufgrund dieser unerwarteten Ergebnisse wurde ein weiterer Dichtegradient angewandt, der die Verwendung von Iodixanol (OptiPrep™) beinhaltet. Im Gegensatz zu den vorherigen Methoden mittels Cäsiumchlorid bzw. Sucrose fand der Aufschluss der Zellen nicht mittels Temperaturshift (vgl. o.) statt. Stattdessen wurde der gesamte postnukleare Überstand (PNS) verwendet.

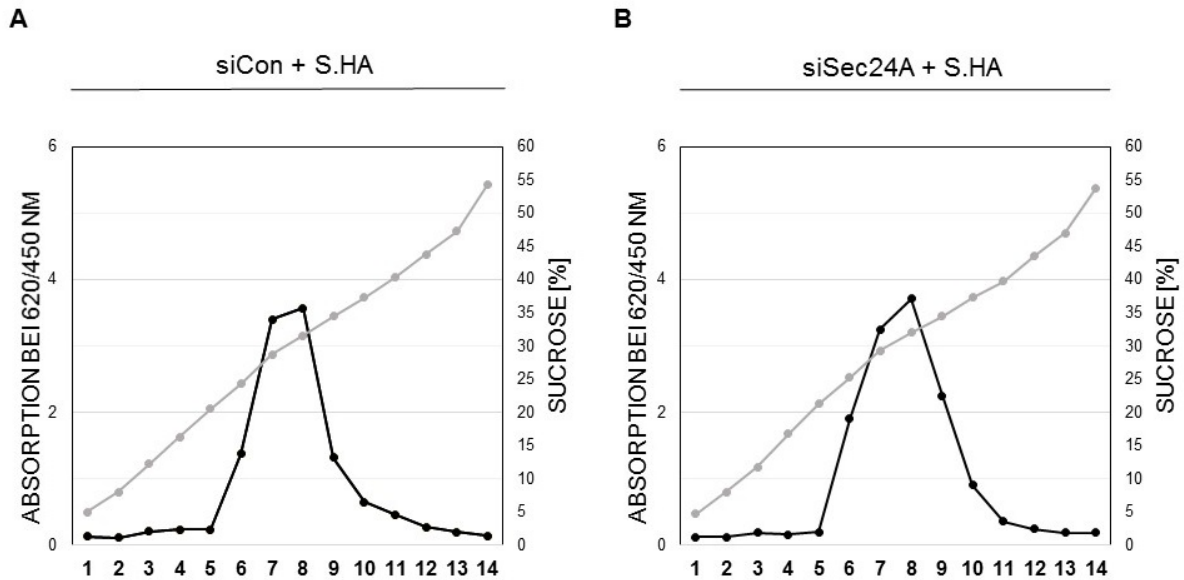


Abb. 34: Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation von S.HA nach Sec24A-Depletion. Dargestellt ist die Analyse aller Fraktionen (1 - 14) mittels Refraktometer sowie spezifischem HBsAg-ELISA nach Zentrifugation der Lysate im Sucrose-Dichtegradienten. Die Sucrosekonzentration der jeweiligen Fraktionen ist in % angegeben (hellgrau), sowie die im ELISA detektierte Absorption bei 620/450 nm (schwarz). Die Kontrolle ist siCon benannt. **(A)** Unter Verwendung der Kontroll-siRNA ergab die Quantifizierung von HBV.S einen Peak im Bereich von 34 bis 35 % Sucrose in den Fraktionen 6 bis 12. **(B)** Nach Depletion von Sec24A mittels spezifischer siRNA zeigte sich der HBV.S-Peak bei einer Sucrosekonzentration von 32 bis 35 % und wie bei der Kontrolle in den Fraktionen 6 bis 12.

Die hier durchgeführte Fraktionierung mittels Iodixanolgradienten fand anhand des angegebenen Protokolls statt (s. 2.4.4.5), die Detektion im Anschluss daran sowohl mittels Refraktometer als auch mittels TCA-Fällung (s. 2.4.5) und SDS-PAGE mit HA-spezifischer WB-Analyse (s. 2.4.6f). Mithilfe des Refraktationsindex (RIX) aller Fraktionen von Kontrolle und Sec24A-Depletion konnte nachgewiesen werden, dass beide Gradienten im Verlauf der Iodixanolkonzentration nahezu identisch waren (s. Abb. 35B). Dies erlaubt, die WB-Analyse beider Ansätze miteinander zu vergleichen. Von je 30 abgenommenen Fraktionen wurden nur jeweils 15 alternierende pro SDS-PAGE aufgetragen und ausgewertet (s. Abb. 35A). Beim Kontroll-Lysat zeigten sich eine starke Anreicherung von HBV.S innerhalb der 15. Fraktion sowie weitere, weitaus schwächere Signale in den Fraktionen 9, 10, 13 und 19. Insgesamt schien das Protein hauptsächlich an einer spezifischen Zellstruktur akkumuliert zu sein. Nach Depletion von Sec24A war eine solche Akkumulation nicht mehr auszumachen. Stattdessen waren schwache Signale von S.HA in den Fraktionen 5, 7, 9, 10, 13, 15 und 17 zu erkennen. Diese Verteilung erschien gleichmäßig über ein breites Spektrum in der Zelle verteilt zu sein und eine spezifische Akkumulation des Proteins

war nicht mehr auszumachen. Hiermit unterscheiden sich die beiden Fraktionsprofile der Zelllysate von Kontrolle und Sec24A-Depletion enorm und lassen vermuten, dass der KD des COPII-Proteins zu einer diffusen Verteilung von HBV.S innerhalb der Zelle führt, statt wie normalerweise, zu einer spezifischen Akkumulation an einem Zellkompartiment. Diese diffuse Verteilung des HBV-Proteins als Folge der fehlenden Interaktion mit COPII und die daraus resultierende fehlende Präsenz an dem natürlichen Morphogenese-Ort für subvirale Partikel könnten erklären, warum die Sekretion der HBV-SVPs nach Sec24A-KD gestört ist.

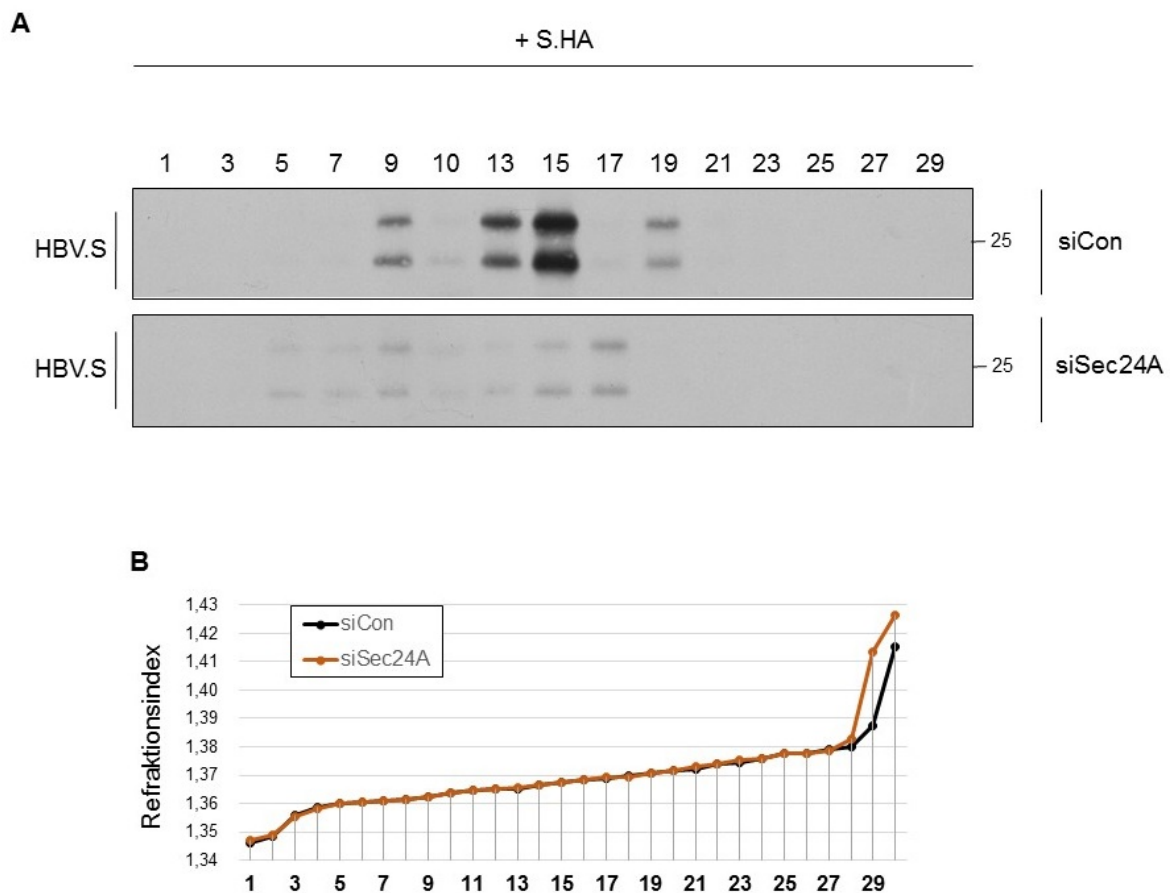


Abb. 35: Iodixanol-Dichtegradienten von S.HA nach Sec24A-Depletion. Dargestellt sind die Messdaten mittels Refraktometer sowie die HA-spezifische WB-Analyse der Lysate von HuH-7-Zellen nach der transienten Expression von pMSV.S.HA für 24 h nach 48-stündiger Depletion von Sec24A bzw. Einsatz eines Kontrollkonstrukts (siCon) mit anschließender Fraktionierung mittels eines Iodixanolgradienten. **(A)** Zu sehen sind 15 der 30 S.HA-Fraktionen unter Verwendung der Kontroll- bzw. der Sec24A-spezifischen siRNA nach Separierung im Gradienten. Die jeweiligen Proteingrößen sind in kDa angegeben. Das HBV-Protein liegt in der Kontrolle größtenteils akkumuliert in Fraktion 15 vor, sowie in deutlich schwächeren Anteilen in Fraktionen 9, 10, 13 und 19 (oben). Nach Depletion von Sec24A zeigt sich ein gegensätzliches Bild, das keine Akkumulation, sondern eine gleichmäßige Verteilung von HBV.S in den Fraktionen 5, 7, 9, 10, 13, 15, und 17 aufweist. **(B)** Zu sehen ist die graphische Darstellung der Refraktionsindizes (RIX) aller Kontroll- sowie siSec24A-Fraktionen 1 - 30 (schwarz bzw. rot). Es ist ersichtlich, dass die Fraktionen bezüglich ihrer Iodixanolkonzentrationen nahezu vollständig übereinstimmen und untereinander verglichen werden können.

3.3.2 Interaktionsanalyse von HBV.S und Sec24A

3.3.2.1 HBV.S benötigt das Paralog Sec24A

Die bisherigen Untersuchungen sprechen für Paralog-spezifische Funktionen der COPII-Proteine Sec24A und Sec23B während der Freisetzung subviraler HBV- und HDV-Partikel. Auch ergab der ursprüngliche Screen nach HBV-spezifischen Interaktionspartnern mittels des Split-Ubiquitin-Hefe-2-Hybrid-Systems lediglich eine Interaktion mit Sec24A, nicht aber mit anderen Isoformen des Proteins (Awe, Dissertation 2009). Während Sec23 lediglich durch *sec23a* und *sec23b* kodiert wird, so zeichnet sich Sec24 in Säugerzellen durch das Vorhandensein von vier Paralogen aus. Um deren spezifische Rollen hinsichtlich des HBV-Infektionszyklus weiterführend zu ergründen, wurde eine vergleichende Analyse aller vier Sec24-Paraloge durchgeführt. Für diesen Versuch wurden HuH-7-Zellen für 48 h mit spezifischen siRNAs gegen Sec24A, Sec24B, Sec24C und Sec24D bzw. Kontroll-siRNA behandelt, anschließend fand die Expression des Vektors pMSV.S.HA für weitere 24 h statt. Lysate und Überstände wurden gemäß des Standardprotokolls aufgearbeitet und mit SDS-PAGE und immun-spezifischem WB analysiert (s. 2.4.1, 2.4.6f s. Abb. 36A). Die Untersuchungen der jeweiligen Depletionseffizienz von Sec24C und Sec24D fanden mittels qPCR und spezifischer Primer nach Protokoll statt (s. 2.3.10.1; s. Abb. 36B/C). Für Sec24A und Sec24B konnten die KD-Effizienzen bereits in vorherigen Experimenten nachgewiesen werden (vgl. 3.2.3.1/ 3.2.3.3). Die Detektion von HBV.S ergab eine extrazelluläre Reduktion des Proteins ausschließlich nach Depletion von Sec24A. In allen anderen Fällen konnte dies nicht beobachtet werden. Dies spricht für eine hohe Spezifität der Interaktion zwischen HBV.S und Sec24A, die für die Sekretion von HBV-SVPs bedeutend ist und nicht durch das Vorhandensein einer der anderen Isoformen ersetzt werden kann.

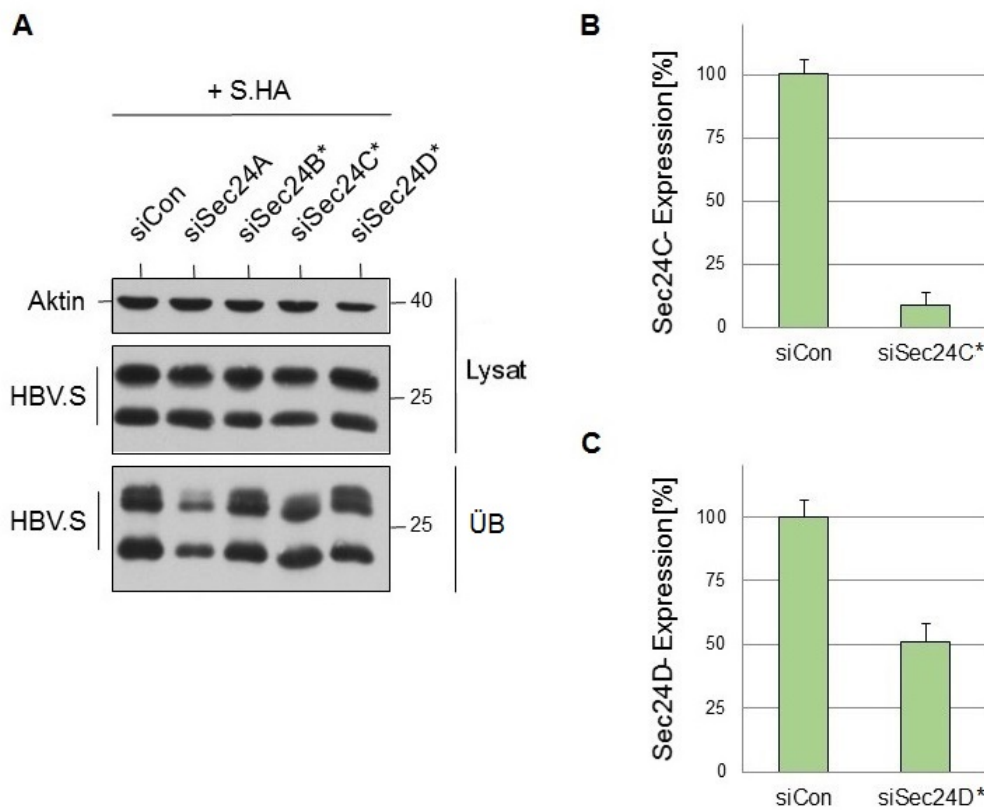


Abb. 36: Die Rollen Sec24-spezifischer Paraloge bei der Sekretion von subviralen HBV-Partikeln. Dargestellt ist die HA-spezifische WB-Analyse der Lysate und Überstände (ÜB) von HuH-7-Zellen nach der transienten Expression von pMSV.S.HA für 24 h nach 48-stündiger Depletion von Sec24A, Sec24B, Sec24C und Sec24D sowie die Depletionskontrollen von Sec24C und Sec24D mittels qPCR-Analyse. **(A)** Links sind sowohl Zelllysate (oben), als auch Überstände (unten) mit Angaben der Proteingrößen in kDa gezeigt. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin detektiert. Die verwendete Kontroll-siRNA ist siCon genannt, single-siRNAs gekennzeichnet (*). **(B)** Zu sehen ist die Depletionskontrolle der Sec24C-spezifischen siRNA mittels qPCR und unter Verwendung spezifischer Primer. Es konnte eine Verringerung des Sec24C-Expressionslevels auf 8,6 % erreicht werden. **(C)** Dargestellt ist die Depletionskontrolle der Sec24D-spezifischen siRNA mittels qPCR mit einer Verringerung des Sec24D-Expressionslevels auf 51,1 %. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an, gemessen wurde in Duplikaten zweier Experimente ($n=4$).

3.3.2.2 HBV.S interagiert mit Sec24A via AS 78 und 79

Zur weiteren Ergründung der spezifischen Interaktion zwischen Sec24A und HBV.S wurden Immunpräzipitationsversuche (IP) unter Anwendung des Standardprotokolls mit RIPA-Lyse (s. 2.4.2) durchgeführt. Hierfür wurde das *sec24a*-Gen aus dem Konstrukt pFLAG.Sec24A (Sec24A.FLAG) zusätzlich in den Vektor pCMV.MYC eingebracht, da das MYC-Epitop für IP-Versuche im Vorhinein als sehr effizient charakterisiert werden konnte und dies vielfältigere Anwendungsmöglichkeiten eröffnete. Das nun entstandene Plasmid wurde Sec24A.MYC genannt. Außerdem wurden die Konstrukte pSD33A, pSR78K, pSR79K und pSR79L mit Substitutionen in

den Aminosäuren 33 (Asparaginsäure), 78 und 79 (Arginine) zu Alanin (A), Lysin (K) oder Leucin (L) in den Vektor pMSV.S.HA umkloniert. Die neuen Konstrukte wurden pMSV.S.D33A.HA, pMSV.S.R78K.HA, pMSV.S.R79K.HA und pMSV.S.R79L.HA (S.D33A.HA, S.R78K.HA, S.R79K.HA, S.R79L.HA) benannt. Die Positionen 33, 78 und 79 wurden hierbei gewählt, da sie sich in der Richtung Zytosol gerichteten Schleife („cytosolic loop“; CL) des HBV.S-Proteins befinden, die entsprechend ihrer Lage für die Interaktion mit Sec24A infrage käme, wenn diese im transmembranen Zustand von S stattfindet. Außerdem entsprechen die AS möglichen Anordnungen für typische ER-Exportmotive in Cargo-Molekülen von COPII, die meist zwei basische, saure oder hydrophile Komponenten enthalten. Es konnte in vorherigen Studien gezeigt werden, dass bereits einzelne AS-Mutationen dieser Bindemotive zu maßgeblichen Fehlfunktionen führen können (Kumichel et al., 2015; Miller et al., 2003; Nufer et al., 2002). Des Weiteren wurde das Konstrukt pMSV.S.HA.LL (S.HA.LL) durch Mutagenese-PCR kreiert, welches Substitutionen in den AS 213 - 216 (Leucin, Prolin, Leucin, Leucin) der Transmembran-Domäne im C-Terminus von HBV.S enthält. Hierbei wurden alle Leucine mit Alaninen ersetzt. Dieser Bereich wurde gewählt, weil die C-terminale Domäne von S für vielfältige Interaktionen mit anderen Proteinen bekannt ist, unter anderem mit HDV.L, und die AS-Kombination ebenfalls möglichen ER-Exportmotiven entspricht (Komla-Soukha und Sureau, 2006; Miller et al., 2003). Eine Übersicht der Mutationsstellen aller Konstrukte im HBV.S-Protein ist schematisch dargestellt (s. Abb. 37C).

Für die IPs wurden die Plasmids pSec24A.MYC oder pFLAG.Sec24A jeweils mit dem Wildtyp oder den S-Mutanten für 72 h transient in HuH-7-Zellen exprimiert. Aufgrund der *per se* stärkeren Expression der Sec24A-Konstrukte wurde jeweils ein Mengenverhältnis von 3:5 verwendet (1,5 + 2,5 µg). Mithilfe des S-spezifischen Antikörpers α-K38 wurde das HBV-Hüllprotein präzipitiert und anschließend mithilfe des MYC- oder FLAG-spezifischen WBs nach Sec24A.MYC bzw. Sec24A.FLAG detektiert. Die Fällung der S-Konstrukte konnte mithilfe eines HA-spezifischen WBs überprüft werden (s. Abb. 37A/B). Nach Präzipitation mit S-spezifischem Antikörper konnte die COPII-Untereinheit Sec24A nicht nur in der Positivkontrolle (S.HA), sondern ebenso unter Verwendung der Mutanten S.D33A.HA und S.HA.LL detektiert werden. Nach den Fällungen von S.R78K.HA, S.R79K.HA oder S.R79L.HA konnte Sec24A nur kaum mehr detektiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Interaktion mit Sec24A mithilfe einer Bindestelle in der zytosolischen Schleife des

HBV.S-Proteins stattfindet, die die beiden Arginine 78 und 79 beinhaltet und dass die Substitutions-Veränderungen dieses Motivs ausreichend sind, die Interaktion mit Sec24A signifikant zu stören. Die AS 33 und 213 - 216 scheinen hingegen für diese Interaktion scheinbar nicht essentiell zu sein.

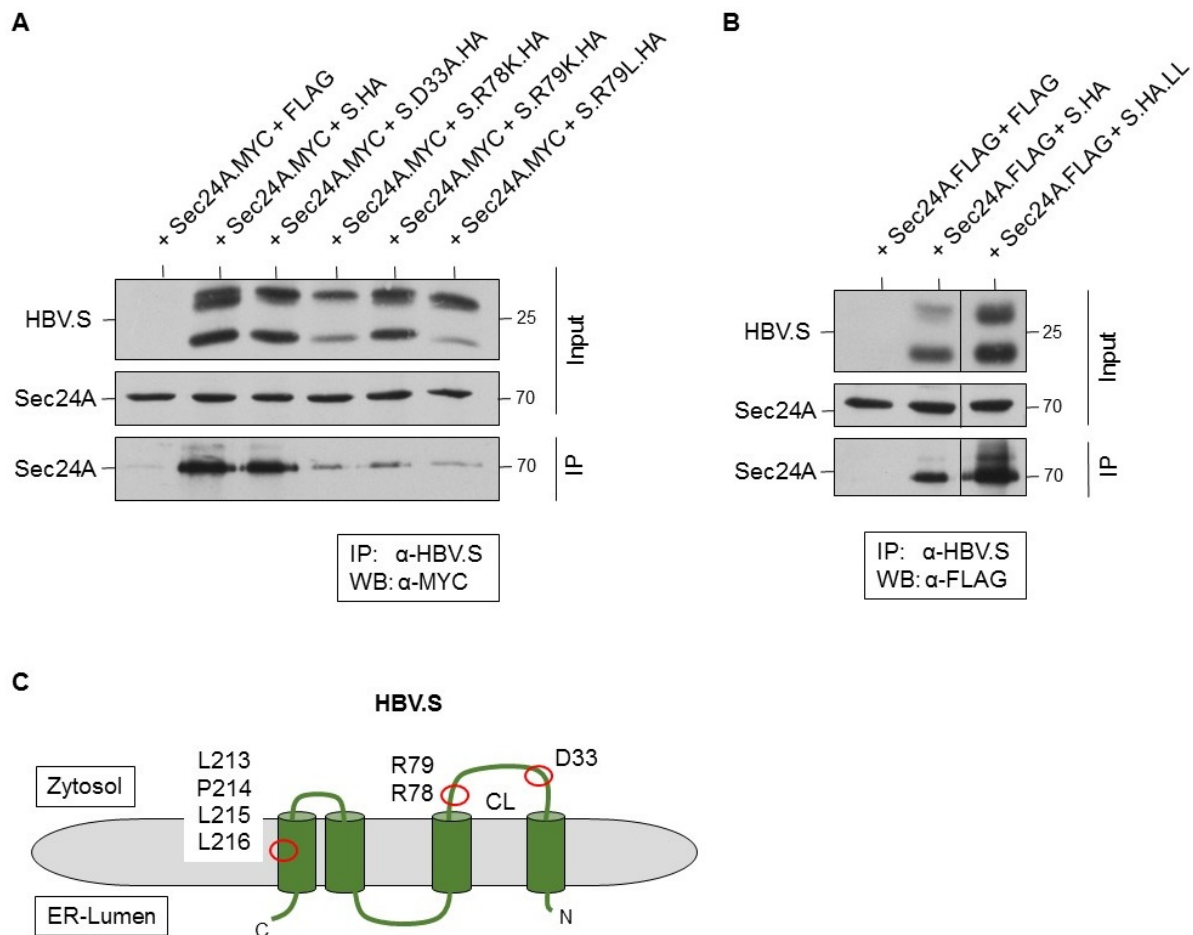


Abb. 37: Kartierung der Sec24A-Interaktionsstelle in HBV.S Dargestellt ist die MYC-, FLAG- bzw. HA-spezifische WB-Analyse der IPs von Sec24A und unterschiedlichen S-Mutanten nach 72-stündiger Expression der Konstrukte pSec24A.MYC bzw. pFLAG.Sec24A gemeinsam mit pMSV.S.D33A.HA, pMSV.S.R78K.HA, pMSV.S.R79K.HA, pMSV.S.R79L.HA und pMSV.S.HA.LL bzw. pMSV.S.HA in HuH-7-Zellen. Als Kontrollvektor wurde p3xFlag-CMV-10 bzw. p3xFlag-CMV-14 (FLAG) verwendet. **(A)** Oben gezeigt ist die Expression der unterschiedlichen S-Konstrukte. In zweiter Reihe ist Sec24A vor S-spezifischer Präzipitation zu sehen (Input), im unteren Teil danach (IP) mit Angaben der Proteingrößen in kDa. **(B)** Der obere Teil der Abbildung zeigt die Expression des S-Konstrukts S.HA.LL verglichen mit den Kontrollen FLAG und S.HA. Im mittleren Teil der Abbildung ist Sec24A vor S-spezifischer Präzipitation zu sehen (Input), im unteren Teil danach (IP) mit Angaben der Proteingrößen in kDa. **(C)** Schematisch dargestellt ist die strukturelle Lage der jeweiligen Mutanten im HBV.S-Protein unter Angabe der AS Leucin (L), Prolin (P), Arginin (R) und Asparaginsäure (D), die substituiert wurden. S.HA.LL besitzt einen AS-Austausch an den Positionen 213 - 216, die anderen vier Mutanten jeweils an den Positionen 78, 79 und 33 in der zytosolischen Schleife (CL).

3.3.2.3 Mutationen der Sec24A-Interaktionsdomäne von HBV.S verhindern die Freisetzung subviraler HBV-Partikel

Mithilfe vorheriger Experimente konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen HBV.S und Sec24A Paralog-spezifisch ist (s. 3.3.2.1) und die Bindestelle im S-Protein die beiden Arginine 78 und 79 beinhaltet (s. 3.3.2.2). Die für diese Interaktionsanalyse verwendeten S.HA-Varianten S.R78K.HA, S.R79K.HA und S.R79L.HA sollten des Weiteren bezüglich ihrer Sekretionskompetenz untersucht werden. Dies stellt eine effektive Möglichkeit dar, die funktionelle Bedeutung dieser beiden AS hinsichtlich der Morphogenese und Sekretion subviraler HBV-Partikel zu beleuchten. Die Mutante S.D33A.HA wurde nicht weiter untersucht, da sie nach bisherigen Erkenntnissen nicht an der Interaktion von HBV.S mit Sec24A beteiligt zu sein scheint (s. 3.3.2.2). Die hier verwendeten HuH-7-Zellen wurden dementsprechend im 6-Well-Format mit den Plasmiden pMSV.S.HA, pMSV.S.R78K.HA, pMSV.S.R79K.HA und pMSV.S.R79L.HA transfiziert und diese für 48 h transient exprimiert. Im Anschluss daran fand der Aufschluss der Lysate und Überstände gemäß Standardprotokoll mit anschließender SDS-PAGE und WB statt (s. 2.4.1, 2.4.6f) statt. Während die drei Mutanten intrazellulär in vergleichbarer Menge wie die Kontrolle S.HA zu detektieren waren, zeigte sich extrazellulär ein anderes Bild. Unter Verwendung des S.HA-Konstrukts konnte eine effiziente SVP-Sekretion festgestellt werden, während alle der drei untersuchten Mutanten nicht bzw. kaum in den Überständen zu finden waren (s. Abb. 38). Insbesondere die Konstrukte S.R78K.HA und S.R79K.HA zeigten keinerlei S-spezifisches Signal in den Zellüberständen und S.R79L.HA lies lediglich eine sehr schwache SVP-Sekretion detektieren. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass Substitutions-Veränderungen der AS 78 oder 79 der Sec24A-Interaktionsdomäne von HBV.S ausreichend sind, um die Sekretion von HBV-SVPs zu inhibieren.

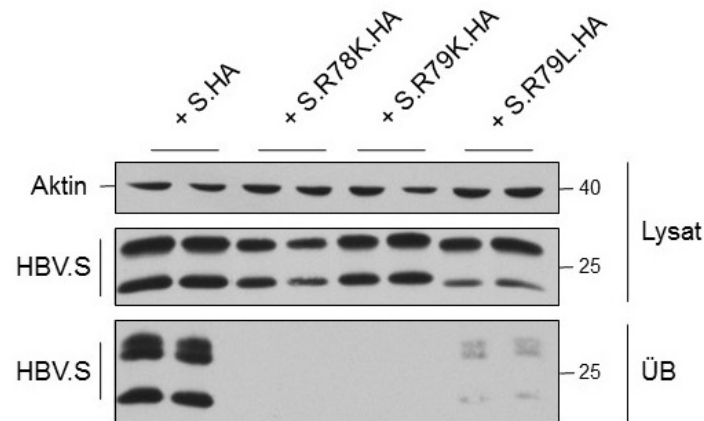


Abb. 38: Der Einfluss von HBV.S-Mutationen der AS 78 und 79 auf die Sekretion subviraler HBV-Partikel. Dargestellt ist die HA-spezifische WB-Analyse der Lysate und Überstände (ÜB) von HuH-7-Zellen nach der transienten Expression von pMSV.S.HA, pMSV.S.R78K.HA, pMSV.S.R79K.HA und pMSV.S.R79L.HA für 48 h. Im oberen Teil der Abbildung sind die Zelllysate zu sehen, im unteren die Überstände mit Angaben der Proteingrößen in kDa und β -Aktin als Ladekontrolle.

3.3.3 Die Notwendigkeit von Sec24A für die Morphogenese und Freisetzung subviraler DHBV-Partikel

Ein weiterer Vertreter der Familie der Hepadnaviridae ist das Hepatitis-Virus der Ente (DHBV), das ein weit verbreitetes *in vitro*-Infektionsmodell darstellt und seit mehr als 20 Jahren für Forschung an den Replikationszyklen der Hepadnaviridae verwendet wird (Glebe und Urban, 2007). Um einen Einblick zu gewinnen, ob die Interaktion zwischen Sec24A und S auf das humane Virus beschränkt ist oder eventuell auch bei anderen Hepadnaviren wichtig sein könnte, wurde des Weiteren ein Depletionsversuch nach bereits beschriebenem Schema mit DHBV durchgeführt (vgl. 3.2.3.1). Hierfür wurde das Plasmid pDHBV.S.HA in HuH-7-Zellen nach 72-stündiger Depletion von Sec24A mittels siRNA für weitere 48 h exprimiert. Dieses Plasmid entspricht dem pMSV.S.HA-Vektor unter hMTIIa-Promotor, nur wurde statt des humanen Virus-Gens *HBsAg-S* das DHBV-Gen *dHBsAg-S* integriert. Aufschluss und Aufarbeitung der Lysate und Überstände fanden gemäß des Standardprotokolls statt, wonach mittels HA-spezifischem WB nach DHBV.S detektiert wurde (s. 2.4.1, 2.4.6f). Die Depletion von Sec24A ergab auch bezüglich subviraler DHBV-Partikel ein mit dem humanen Virus vergleichbares Bild (s. Abb. 39). Im Gegensatz zur Kontrolle waren eine Akkumulation von DHBV.S innerhalb der Zelle sowie eine fast vollständige extrazelluläre Reduktion des Proteins zu beobachten. Dies spricht dafür, dass Sec24A in die Morphogenese und Sekretion subviraler DHBV-Partikel ebenso

wie bei HBV involviert ist und daher auch in den Lebenszyklen anderer Hepadnaviridae von bedeutender Wichtigkeit sein könnte.

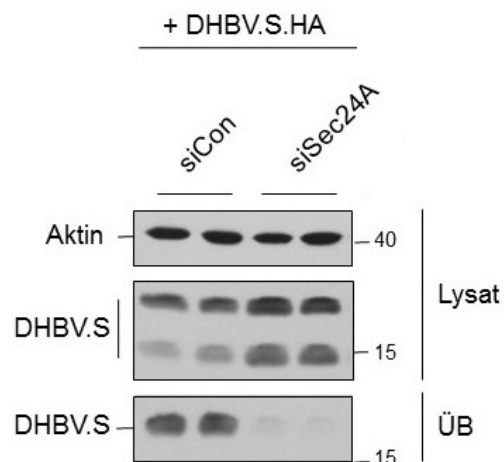


Abb. 39: Die Notwendigkeit von Sec24A für die Morphogenese und Freisetzung subviraler DHBV-Partikel. Dargestellt ist die HA-spezifische WB-Analyse der Lysate und Überstände von HuH-7-Zellen nach der transienten Expression von pDHBV.S.HA für 48 h nach 72-stündiger Depletion von Sec24A mit spezifischer siRNA. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Zelllysate, der untere die Überstände mit Angaben der Proteingrößen in kDa. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin detektiert. Die verwendete Kontroll-siRNA ist siCon genannt.

3.3.4 Die Notwendigkeit von Sec24A und Sec23B für die Morphogenese und Freisetzung infektiöser HBV-Virionen

Wie oben dargestellt, üben die beiden COPII-Proteine Sec24A und Sec23B während der Sekretion subviraler HBV- und HDV-Partikel entscheidende Funktionen aus (vgl. 3.2.3.1/ 3.2.3.3). Um zu ergründen, ob diese Proteine auch beim Zellaustritt infektiöser HBV-Virionen von Bedeutung sein könnten und in diesem Fall ebenfalls eine hohe Spezifität für die bereits identifizierten Isoformen vorliegt, wurde in folgendem Experiment vom subviralen auf das virale *in vitro*-System gewechselt. Hierzu wurden HuH-7-Zellen für 48 h mit spezifischen siRNAs gegen die COPII-Proteine Sec24A, Sec24B, Sec23A und Sec23B bzw. Kontroll-siRNA behandelt, anschließend eine 72-stündige Expression des replikationsfähigen HBV-Plasmids pCEP4 Δ CMV Δ SV40/1.1xHBV durchgeführt. Die Aufarbeitung der Lysate und Überstände, sowie die Präzipitation intrazellulärer Nukleokapside und extrazellulärer Virionen fanden entsprechend des Protokolls für HBV-Proben statt (s. 2.4.2). Die Detektion der HBV-Genome konnte mittels qPCR unter Verwendung einer HBV-spezifischen Taqman-Sonde durchgeführt werden (s. 2.3.10.2). Die Auswertung der Daten ergab nach individueller Depletion der beiden COPII-Komponenten Sec24A

und Sec23B verglichen mit den Kontroll-Lysaten keine signifikante Reduktion intrazellulärer Nukleokapside, jedoch eine höchst signifikante Reduktion extrazellulärer HBV-Virionen (s. Abb. 40). Bei den jeweiligen verwandten Isoformen Sec24B und Sec23A konnte entweder nur eine schwache Tendenz dessen festgestellt werden (Sec23A) oder sogar der gegenteilige Effekt einer hoch signifikanten Steigerung extrazellulärer Virionen (Sec24B). Unter KD von Sec23A war außerdem eine signifikante Steigerung intrazellulärer NCs zu beobachten. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Sec24A und Sec23B von essentieller Bedeutung für die Freisetzung sowohl subviraler als auch viraler HBV-Partikel sind. Die beiden zellulären Proteine und die COPII-Maschinerie scheinen dementsprechend mit grundlegenden Funktionen in den Infektionszyklus des Virus involviert zu sein, die nicht durch die jeweils anderen Isoformen ersetzt werden können.

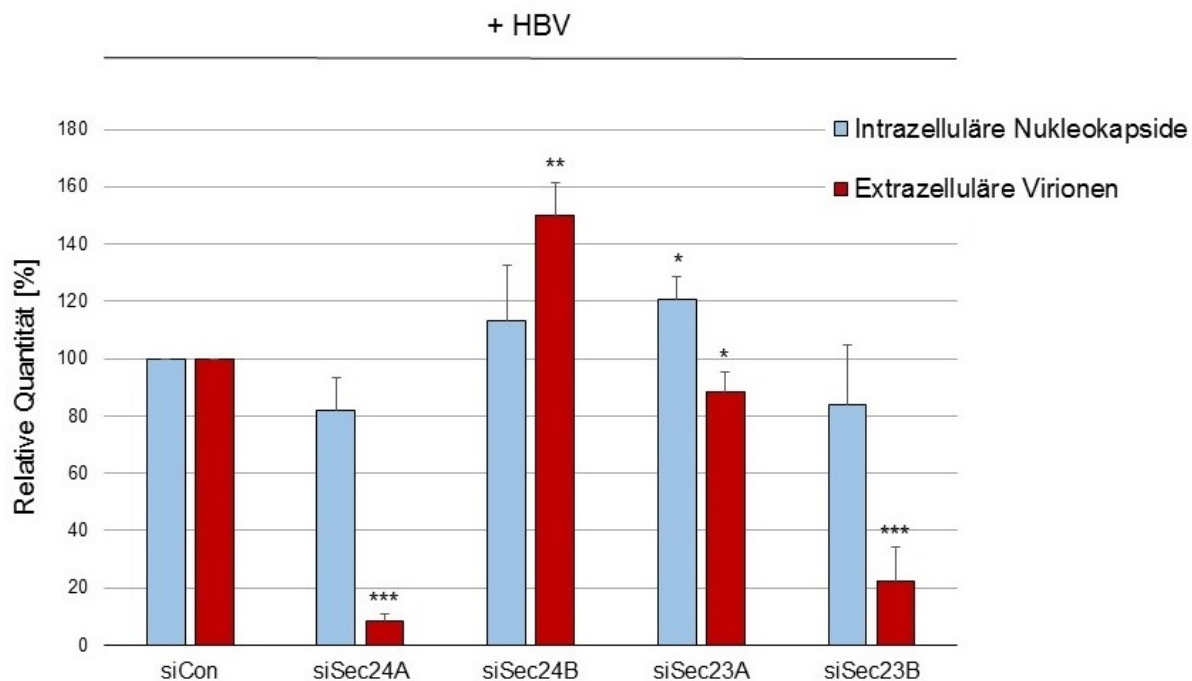


Abb. 40: Die Notwendigkeit von Sec24A und Sec23B für die Morphogenese und Freisetzung von HBV-Virionen. Dargestellt sind die relativen Werte der Detektion intrazellulärer Nukleokapside und extrazellulärer HBV-Virionen mittels Virus-spezifischer IP und anschließender Quantifizierung der viralen Genome mittels qPCR. Dies erfolgte nach 48-stündiger Behandlung von HuH-7-Zellen mit siRNAs gegen die COPII-Proteine Sec24A, Sec24B, Sec23A und Sec23B bzw. Kontroll-siRNA und 72-stündiger Expression des replikationsfähigen HBV-Plasmids pCEP4 Δ CMV Δ SV40/1.1xHBV. Gezeigt ist die relative Quantität der Virus-DNA [%], wobei die Kontrolle (siCon) hierbei auf 100 % gesetzt wurde. $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0,001$ ***. Gemessen wurde in Duplikaten; $n = 3$.

3.3.5 Einflüsse von HBV und HBV.S auf die Expression von Sec24A und Sec23B

Aufgrund der vermuteten proviralen Rollen von Sec24A und Sec23B hinsichtlich HBV sollten weitere Analysen mittels qPCR aufklären, ob die Präsenz des S-Hüllproteins

oder des gesamten HBV-Genoms in der Zelle zu einer Erhöhung der Transkriptionslevel beider Sec-Proteine führen kann. Für dieses Experiment wurden HuH-7-Zellen mit den Plasmiden pMSV.S.HA und pCEP4 Δ CMV Δ SV40/1.1xHBV (HBV) bzw. Kontrollvektoren transfiziert. Nach 48-stündiger transienter Expression fand die Aufarbeitung der Lysate nach Standardprotokoll für die qPCR mittels SYBR Green statt (s. 2.3.10.1). Mithilfe spezifischer Primer gegen Sec24A und Sec23B konnten anschließend die jeweiligen endogenen mRNA-Level bestimmt werden. Die Untersuchung der Sec24A-Expression ergab verglichen mit der Kontrolle eine Erhöhung um ca. 30 % bei alleiniger Expression von S.HA und eine Erhöhung um ca. 80 % im Falle der HBV-Präsenz (s. Abb. 41A). Bezüglich der Sec23B-Transkripte wiederholte sich diese Beobachtung und zeigte sich zudem in verstärkter Form. Hier führte das Vorhandensein von S oder HBV in beiden Fällen zu einer Steigerung der Sec23B-Expression um etwa das 2,5-fache im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 41B). Diese Ergebnisse bestätigen, dass bereits das alleinige Vorhandensein des Virusproteins HBV.S ausreichend ist, die Transkriptionslevel der zellulären Interaktionspartner Sec24A und Sec23B hochzuregulieren. Dieser Effekt verstärkt sich zusätzlich in HBV-replizierenden Zellen.

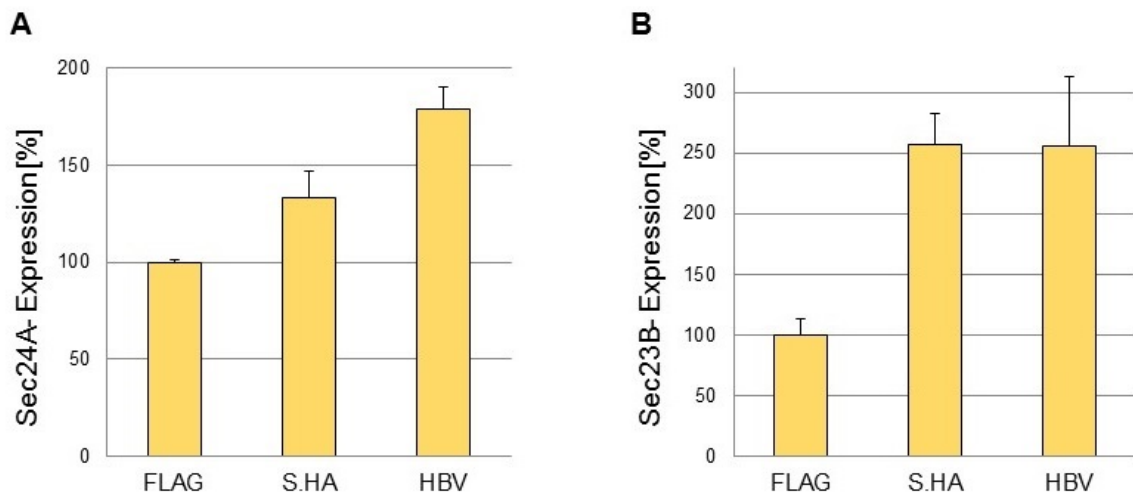


Abb. 41: Einflüsse von HBV und HBV.S auf die Expression von Sec24A und Sec23B. Hier abgebildet sind die jeweiligen Transkriptionslevel der zellulären COPII-Proteine Sec24A und Sec23B nach 48-stündiger Expression der Vektoren pMSV.S.HA, pCEP4 Δ CMV Δ SV40/1.1xHBV oder p3xFlag-CMV-10 bzw. p3xFlag-CMV-14 (FLAG) in HuH-7-Zellen. Ermittelt wurden diese mittels qPCR und spezifischer Primer. Die jeweilige Expression nach Transfektion der Kontrolle (FLAG) wurde auf 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Transkript-Konzentrationen von **(A)** Sec24A und **(B)** Sec23B. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an, gemessen wurde in Duplikaten zweier Experimente (n = 4).

4 Diskussion

Virale Pathogene mit kleinen Genomen und beschränkten Möglichkeiten der eigenständigen Proteinexpression sind auf zelluläre Proteine und Mechanismen der Wirtszelle angewiesen (Mitra et al., 2018; Zeyen und Prange, 2018). Das Hepatitis-B-Virus (HBV) und das Hepatitis-D-Virus (HDV), auch Delta genannt, stimmen in ihren Lebenszyklen teilweise überein, da Delta als unvollständiger Satellit auf die Helferfunktion von HBV angewiesen ist. Zur Komplementierung des HDV-Lebenszyklus, insbesondere der Generierung infektiöser Virionen sowie Ein- und Austritt aus der Hepatozyte, ist das Virus auf die viralen Hüllproteine von HBV angewiesen (Shirvani-Dastgerdi und Tacke, 2015; Goyal und Murray, 2016). Dementsprechend könnten die beiden Viren in ihren Ansprüchen an die Wirtszelle und deren funktionelle Proteine teilweise übereinstimmen, was es nachvollziehbar macht, Virus-Wirt-Interaktionen beider Viren simultan zu untersuchen. Innerhalb dieser Arbeit wurde der Fokus auf intrazelluläre Transportmechanismen und deren mögliche Funktionen in den Infektionszyklen beider Pathogene gelegt. Vesikuläre und nicht-vesikuläre sowie Membran-formende Signalkaskaden aus mehreren spezialisierten Proteinen und Proteinkomplexen dienen dazu, ein dynamisches Transport- und Kommunikationsnetzwerk zwischen den Kompartimenten eukaryotischer Zellen zu garantieren (Gürkan et al., 2006; Kirchhausen, 2000). Vielerlei virale Pathogene, unter anderem das Hepatitisvirus HCV, sind dafür bekannt, diese Mechanismen als Teil ihrer Infektionszyklen für Endozytose, Exozytose oder intrazellulären Transport der viralen Proteine oder Partikel zu nutzen (Syed et al., 2017; Rust et al., 2004; Lambert et al., 2007). Drei dieser Mechanismen, die ESCRT-Maschinerie als Membran-beeinflussende Komponente sowie die beiden Transportsysteme der Clathrin- und COPII-ummantelten Vesikel, wurden innerhalb dieser Arbeit im Kontext beider Viren beleuchtet. Mithilfe vielfältiger methodischer und thematischer Herangehensweisen konnten mehrere Komponenten dieser intrazellulären Signalwege identifiziert werden, die von einem oder beiden der Viren zu deren Vorteil rekrutiert werden. Interaktionsanalysen wie diese ermöglichen therapeutische Ansätze, die die viralen Pathogenesen unterbrechen und die Ausbreitung der Viren verhindern können (Zeyen und Prange, 2018).

4.1 Charakterisierung subviraler HDV-Partikel *in vitro*

Die Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit wurden je nach Versuchsaufbau auf zwei unterschiedlichen Virus-Ebenen durchgeführt: subviral oder viral. Das Arbeiten mit nicht-infektiösen, also subviralen oder Virus-ähnlichen Partikeln (SVPs bzw. VLPs) ist in der molekularbiologischen Forschung an vielen Pathogenen wie dem humanen Cytomegalovirus (hCMV), dem Hepatitis-C-Virus (HCV) und dem Influenza-A-Virus H1N1 etabliert (Lehmann et al., 2019; Denolly et al., 2017; Venereo-Sánchez et al., 2019). Die Herstellung und Veränderung solcher Partikel ist außerdem wichtiger Bestandteil der Forschung an potentiellen Impfstoffen, beispielsweise für das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) (Cervera et al., 2019). Bezüglich HBV wurden in den letzten Jahren vielfältige Charakterisierungen der verschiedenen Partikeltypen durchgeführt. Neben den vollständigen, infektiösen DNA-Virionen kommt in den Seren infizierter Patienten eine Vielzahl an SVPs vor, die in hohem Überschuss gebildet und ausgeschleust werden (Patient et al., 2009; Bruss, 2007). Diese HBV-SVPs können RNA oder DNA enthalten oder auch gar kein Genom aufweisen, zudem ein Nukleokapsid beinhalten oder gänzlich ohne das HBV-Core-Protein vorliegen (Wang et al., 2016). Mit Abstand am häufigsten, nämlich in ca. hunderttausendfachem Überschuss gegenüber Virionen, liegen sogenannte sphärische und filamentöse SVPs außerhalb infizierter Zellen vor, die lediglich aus den viralen Hüllproteinen in Verbindung mit zellulären Lipiden bestehen (Peiffer et al., 2018; Yan et al., 2016). Innerhalb dieser Arbeit wurden die subviralen, sphärischen HBV-Partikel *in vitro* mittels alleiniger Transfektion des S-Hüllproteins unter artifiziellem oder natürlichem Promotor generiert, die infektiösen Virionen durch Einbringung eines Replikations-kompetenten HBV-Plasmids mit dem vollständigen viralen Genom.

Im Gegensatz zu HBV sind für HDV innerhalb des Patienten-Kontextes *in vivo* keine subviralen Partikeltypen bekannt (Taylor, 2015). Da für die Komplementierung des HDV-Infektionszyklus das HBV-Genom in der Wirtszelle vorliegen muss und der Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) ohne die HBV-Hüllproteine die Zelle weder befallen noch verlassen kann, äußert sich eine Koinfektion beider Viren durch dieselben HBV-spezifischen SVPs in den Patientenserum (Freitas et al., 2014; Sureau und Negro, 2016). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das kleine HBV-Hüllprotein S alleine ausreichend ist, um den RNP zu umhüllen und mit dem HDV-

Genom die Zelle zu verlassen. Aufgrund des fehlenden L-Hüllproteins von HBV ist allerdings kein erneutes Infizieren durch diese Partikeltypen mehr möglich, da L die Bindung an den Leberzell-spezifischen Rezeptor vermittelt (Wang et al., 1991; Julithe et al., 2014). Für die Umhüllung des RNPs und das Verlassen der Zellen ist daher die Interaktion von S mit dem großen Delta-Antigen HDAg-L notwendig und hinreichend (Chao et al., 1990). Die innerhalb dieser Arbeit *in vitro* generierten subviralen HDV-Partikel wurden dementsprechend mittels kombinierter Transfektion des HBV.S-Plasmids unter artifiziellem oder natürlichem Promotor und des Plasmids mit *HDAg-L*-Gen unter artifiziellem Promotor generiert. Dabei konnte bestätigt werden, dass die beiden viralen Proteine direkt miteinander interagieren und die Sekretion des HDV-Proteins von S abhängig ist. Außerdem ändert HDV.L unter Präsenz von HBV.S seine intrazelluläre Verteilung aus dem Nukleus heraus in Nähe seines Interaktionspartners, sodass das Zusammenspiel beider Proteine räumlich ermöglicht wird. Ähnliche HDV-VLPs wurden zuvor bereits in anderen Arbeitsgruppen durch die kombinierte Transduktion zweier rekombinanter Baculoviren generiert, von denen eines HBsAg und eines HDAg-L kodiert (Chen et al., 2005). Im Gegensatz zum subviralen HBV-Modell, das teilweise den Bedingungen *in vivo* entspricht, können diese VLPs von HDV jedoch nur als artifizierlicher Rahmen betrachtet werden, da diese Art subviraler Partikel *in vivo* bisher nicht gefunden werden konnte. Als Vorstufe eines geeigneten viralen Systems können diese Versuche jedoch wertvolle Indizien für zukünftige Ansätze liefern, ohne dabei das extrem lange Zeitfenster der vollständigen HDV-Morphogenese miteinbeziehen zu müssen (Chao et al., 2015; Rizzetto, 2016).

4.2 Funktionen der ESCRT-Maschinerie bei der Morphogenese subviraler HDV-Partikel

Aufgrund der komplexen Differenzierung eukaryotischer Zellen in unterschiedliche Kompartimente und Organellen mit verschiedensten molekularen Eigenschaften und zellulären Funktionen ist ein dynamisches Transportnetzwerk von essentieller Bedeutung (Lev, 2010; Gürkan et al., 2006). Die „endosomal sorting complexes required for transport“ (ESCRT)-Maschinerie sind spezialisierte und hoch konservierte, Membran-beeinflussende Proteinkomplexe, die vorwiegend an den

endosomalen Membranen der Multivesikulären Körper (MVBs) agieren (Raymond, 1992). Die MVB-Kaskade vermittelt die Sortierung Ubiquitin-markierter Cargo-Moleküle in intraluminale Vesikel (ILVs), die sowohl mit Lysosomen als auch mit der Plasmamembran verschmelzen können. Dementsprechend sind MVBs und ESCRT in degradierende und sekretorische Prozesse involviert (Woodman, 2016). Für mehrere virale Pathogene konnte bereits festgestellt werden, dass diese während der Replikation Komponenten der ESCRT-Maschinerie rekrutieren, um von infizierten Zellen freigesetzt zu werden (Christ et al., 2017; Bartusch und Prange, 2016). Auch bezüglich HBV konnte nachgewiesen werden, dass das Virus den ESCRT-III-Komplex und dessen Adaptor-Proteine ALIX und Vsp4 rekrutiert, um die Morphogenese und Sekretion der infektiösen Virionen zu fördern. Im Gegensatz dazu ist bekannt, dass subvirale, sphärische HBV-Partikel ESCRT-unabhängige Sekretionswege aus der Zelle verwenden (Lambert et al., 2007; Bardens et al., 2011; Patient et al., 2009).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese Transport-Maschinerie für die Freisetzung subviraler HDV-Partikel vonnöten sein könnte. Mithilfe von Depletionsversuchen mittels siRNA-Screen konnten Untereinheiten des ESCRT-III-Komplexes spezifisch runterreguliert und der jeweilige Effekt auf die subviralen Partikel untersucht werden. Eine erste Analyse ergab, dass die ESCRT-Proteine CHMP2A und CHMP4B für die Morphogenese subviraler HDV-Partikel benötigt werden. Hingegen zeigten die Depletionen der anderen ESCRT-III-Proteine keinen maßgeblichen Effekt auf die intrazellulären HBV.S- und HDV.L-Level. Die Analyse der Zellüberstände spiegelte die Proteinlevel innerhalb der Zellen wider und deutete daher keinen Einfluss der Depletionen auf die Sekretion der Partikel an. Da die ESCRT-Maschinerie in Verbindung mit den MVBs von entscheidender Bedeutung für die allgemeine Vitalität eukaryotischer Zellen ist, sollten diese Ergebnisse mithilfe eines Zelltoxizität-Assays hinsichtlich ihrer Spezifität in Kontext gesetzt werden (Henne et al., 2011; Woodman, 2016). Zur Bestimmung eventueller, toxischer Effekte der siRNAs auf die HuH-7-Zellen wurde auf die allgemein angewandte Bestimmung der Aktivität des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) zurückgegriffen. LDH ist ein stabiles Protein, das in jeder eukaryotischen Zelle zu finden ist und bei Zerstörung der Plasmamembran freigesetzt wird. Das Aktivitätslevel des Enzyms in den Zellüberständen kann daher in direkter Korrelation zur Zellvitalität und -Mortalität quantifiziert werden (Kumar et al., 2018). Die Auswertung des LDH-Assays ergab,

dass Beeinträchtigungen der Genexpression von *Chmp2a*, *Chmp2b*, *Chmp4b* und *Chmp5* verglichen mit den Kontrollzellen zu Erhöhung der Enzymaktivität um bis zu 20 % führten. Dies spiegelt zelltoxische Effekte der siRNA-Behandlung wider. Unter Einbezug dieser Daten sind die Effekte nach Depletionen von CHMP2A und CHMP4B auf die subviralen HDV-Partikel nicht mehr als signifikant zu interpretieren, da in beiden Fällen die allgemeine zelluläre Vitalität negativ beeinflusst ist. Anhand dieser Versuche ist lediglich eine entsprechende Tendenz zu beobachten. Über mögliche Funktionen der beiden ESCRT-Proteine CHMP2A und CHMP4B bei der Morphogenese von HDV-SVPs kann an diesem Punkt dementsprechend nur spekuliert werden.

Die Proteine „charged multivesicular body protein 2A bzw. 4B“ (CHMP2A bzw. CHMP4B) sind als Schlüsselkomponenten des ESCRT-III-Komplexes und für dessen Strukturierung in Filamente unentbehrlich. Die beiden Proteine tragen gemeinsam als hauptsächliche Effektoren zur zytokinetischen Abschnürung während späterer Schritte der Mitose bei und werden zu diesem Zweck von ESCRT-I, ESCRT-II und ESCRT-III-Untereinheit CHMP6 rekrutiert (Christ et al., 2016; Olmos et al., 2015; Zhou et al., 2019). Für das HIV-1 und das Virus der equinen infektiösen Anämie (EIAV) konnte gezeigt werden, dass der Verlust von CHMP2- oder 4-Proteinen das virale Knospen blockiert, da die Interaktion zwischen CHMP2A und CHMP4B bzw. die CHMP4B-ALIX-Interaktion hierfür funktionell essentiell ist. Die Proteine werden dementsprechend zu den jeweiligen Orten des Virus-Zusammenbaus rekrutiert (Morita et al., 2011; Sandrin und Sundquist, 2013; Bleck et al., 2014). CHMP4B ist an der Ausprägung von autophagosomalen Strukturen und an neuronalen Apoptose-Abläufen beteiligt und CHMP2A konnte als Regulator der Phagophore-Schließung im Autophagie-Prozess identifiziert werden. Als Untereinheit des ESCRT-III-Komplexes sind die Proteine außerdem für die Morphogenese der MVBs, die allgemeine Zellteilung und die Formation extrazellulärer Vesikel unentbehrlich (Zhen et al., 2019; Takahashi et al., 2018; Shen et al., 2015; Morita, 2012; McCullough et al., 2013).

Eines der wesentlichen Krankheitsbilder einer HBV-Infektion ist die Ausbildung hepatozellulärer Karzinome (HCC), welches durch die Ko- oder Superinfektion mit HDV in der Aggressivität des Krankheitsverlaufs deutlich gesteigert wird (Prange, 2012; Romeo et al., 2009). Innerhalb vergangener Studien konnte gezeigt werden, dass das ESCRT-Protein CHMP4B mit der Proliferation solcher Leberkrebszellen stark assoziiert ist und in HCC-Gewebe eine deutliche Hochregulation der CHMP4B-

Expression festgestellt werden kann. Während die ESCRT-Maschinerie bekannt dafür ist, bei der Entstehung mehrerer Krebsarten wichtig zu sein, so konnte dies an CHMP4B für eine einzelne funktionelle ESCRT-Untereinheit erstmals spezifisch gezeigt werden (Saksena und Emr, 2009; Hu et al., 2015). Funktionen an späten Schritten der Virionen-Morphogenese, hauptsächlich am Knospen der Partikel, übt CHMP4B wahrscheinlich dadurch aus, dass es ringförmige Strukturen an den knospenden Partikeln bildet und unter Rekrutierung und Bindung an CHMP2A und an die ATPase VPS4 zu deren Abschnürung führt (Morita et al., 2011; Carlson und Hurley, 2012; Sandrin und Sundquist, 2013). In beiden Fällen waren diese proviralen Effekte sowohl Protein- als auch Isoform-spezifisch, da die Depletionen anderer ESCRT-III-Untereinheiten wie CHMP3 und CHMP6 oder anderer Paraloge wie CHMP4A oder CHMP2B geringen oder keinen Effekt auf die virale Sekretion ausübten (Morita et al., 2011; Sandrin und Sundquist, 2013).

Dieses Bild konnte innerhalb dieser HDV-spezifischen Experimente lediglich tendenziell widergespiegelt werden, da im Kontext der HDV-SVPs die stärksten Effekte unter KD von CHMP2A und CHMP4B zu beobachten waren, während die anderen ESCRT-III-Proteine bzw. -Isoformen dies nicht zeigten. Es erscheint nachvollziehbar, dass subvirale HDV-Partikel zur Vervollständigung der Morphogenese auf die Rekrutierung einzelner Untereinheiten der Maschinerie angewiesen sein könnten und deren Funktionen spezifisch für sich beanspruchen, während die funktionelle Aktivität ESCRTs in der Zelle erhalten bleibt. Interessanterweise konnte hier tendenziell eine Reduktion des intrazellulären Proteinlevels von HBV.S nach KD von CHMP2A oder CHMP4B festgestellt werden, während HDV.L nicht oder nur sehr schwach beeinträchtigt zu sein schien. Dies würde für eine morphologische Beeinträchtigung des HBV-Hüllproteins und einen möglicherweise daraus resultierenden, fehlerhaften Zusammenbau der HDV-SVPs sprechen. Die Sekretion der HDV-SVPs erscheint nach diesen Ergebnissen ESCRT-III-unabhängig - eine Beobachtung, die den bisherigen Daten bezüglich subviraler HBV-Partikel entspricht (Bardens et al., 2011; Patient et al., 2009).

4.3 Funktionen des Clathrin-vermittelten Vesikeltransports bei der Morphogenese und Freisetzung subviraler HBV- und HDV-Partikel

Unter den drei wesentlichen eukaryotischen Transportsystemen, die Vesikel beinhalten, ist der Clathrin-vermittelte Transport das am besten untersuchte. Clathrin erfüllt hierbei nicht nur als Teil des intrazellulären Transportweges zwischen Endosomen, MVBs und Lysosomen eine essentielle Rolle, sondern ist vor allem auch an endo- und exozytotischen Prozessen der Zelle beteiligt (Robinson, 2015). Mehrere virale Pathogene wie das Semliki-Forest-Virus (SFV), das Vesikuläre Stomatitis-Virus (VSV) oder das HCV sind dafür bekannt, die Wirtszelle mittels Clathrin-vermittelter Endozytose zu infizieren oder Clathrin-umhüllte Vesikel (CCVs) während der Morphogenese als Transportmittel für virale Proteine zu verwenden (Mercer et al., 2010; Helenius et al., 1980; Johannsdottir et al., 2009). Diese Interaktionen zwischen Virus und Clathrin involvieren häufig verschiedene Adaptor-Proteine (Mercer et al., 2010). Für HBV konnte bereits gezeigt werden, dass das große L-Hüllprotein mit dem Clathrin-Adaptor γ 2-Adaptin interagiert und dieses für die virale Morphogenese rekrutiert. Außerdem wird die Bindung von L an die schwere Kette Clathrins (CHC) und an das Clathrin-Adaptor-Protein AP-2 für die Infektion in humanen Hepatozyten benötigt (Hartmann-Stühler und Prange, 2001; Huang et al., 2012; Ishida et al., 2015). Das große Antigen von HDV konnte vor mehreren Jahren als direkter Assoziationspartner von Clathrin identifiziert werden. Hierbei interagiert HDAg-L entsprechend anderer Clathrin-Adaptor mittels einer stark konservierten Binderegion, der sogenannten Clathrin-Box, im C-Terminus mit dem N-terminalen Ende von CHC. Diese Interaktion scheint für die Morphogenese viraler Partikel und den Infektionszyklus von HDV von essentieller Bedeutung zu sein (Huang et al., 2007; Wang et al., 2009). Die Clathrin-Box entspricht im Generellen der AS-Abfolge LLpL(-), wobei L meist ein Leucin bezeichnet und p und (-) meist einen polaren und negativ geladenen Rest angeben; im Falle von HDV umfasst die Clathrin-Box die AS 199-LFPAD-203. Bemerkenswerterweise konnten für unterschiedliche CHC-Bindepartner außerhalb dieser Region keine übereinstimmenden Sequenzen detektiert werden (Kirchhausen, 2000-1; Huang et al., 2007). Bereits Mutationen einzelner Aminosäuren in der hoch konservierten Binderegion von HDV oder eine Verringerung der Clathrin-Expression in früheren Studien resultierten in Beeinträchtigungen der viralen Morphogenese und belegten eine Schlüsselrolle des

zellulären Proteins im pathogenen HDV-Infektionszyklus. Interessanterweise konnte dieses Phänomen als HDV-spezifisch interpretiert werden, da subvirale HBV-Partikel durch KD von CHC in ihrer Sekretion nicht beeinträchtigt waren (Huang et al., 2009). Innerhalb dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Interaktion zwischen HBV und HDV mit unterschiedlichen intrazellulären Transportsystemen gelegt. Anhand von siRNA-Experimenten sollte der Einfluss von Clathrin auf die Lebenszyklen beider Viren genauer beleuchtet werden. Mithilfe des DNA-Transfektionsmodells, im Gegensatz zu einem Infektionsmodell, war es dabei möglich, die Funktion Clathrins in der Morphogenese und Sekretion beider Viren zu identifizieren, ohne dabei die zellulär dominanten endozytotischen Prozesse miteinzubeziehen. Wie entsprechend der Literatur zu erwarten war, konnte innerhalb dieser Versuchsreihe gezeigt werden, dass die Sekretion subviraler HDV-Partikel durch Verringerung der CHC-Expression inhibiert wird (vgl. Huang et al., 2018). Überraschenderweise konnte selbiges Phänomen für HBV-SVPs beobachtet werden, die nach KD von Clathrin, auch unabhängig von Vorhandensein des Delta-Proteins, in ihrer extrazellulären Freisetzung stark beeinträchtigt waren. Die funktionelle Wichtigkeit Clathrins scheint außerdem im Kontext beider Viren spezifisch zu sein, da Daten eines AFP-spezifischen ELISAs keine Reduktion der allgemeinen zellulären Sekretion anzeigten, sondern im Gegensatz dazu eine gesteigerte Freisetzung des Markerproteins aus Clathrin-depletierten Zellen. Zur weiteren Evaluierung dieses überraschenden Ergebnisses wurde der Clathrin-Inhibitor Pitstop 2® eingesetzt und entsprechend des Einflusses auf die Sekretion von HBV-SVPs untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass eine Konzentration von 30 µM des Inhibitors ab einem Zeitraum von 3 h zu einer signifikanten Reduktion der S-Proteinlevel im Überstand führt. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass Pitstop 2 in seiner spezifischen Wirkungsweise kritisch betrachtet werden sollte. Dem Reagenz konnte zwar eine hoch wirksame Inhibierung der Clathrin-abhängigen Endozytose durch Blockade einer der vier funktionellen Bindestellen der Amino-terminalen Domäne nachgewiesen werden, dennoch waren auch Effekte auf andere zelluläre Komponenten und die Clathrin-unabhängige Endozytose zu beobachten (Dutta et al., 2012). Pitstop 2 scheint zudem einen Einfluss auf die Permeabilität der Kernpore zu nehmen und wird aufgrund unspezifischer zellulärer Effekte nicht als Methode der funktionellen Charakterisierung der N-Domäne von Clathrin empfohlen (Liashkovich et al., 2015; Willox et al., 2014).

Die hier durchgeführten Versuche sprechen dennoch dafür, dass CHC nicht nur bei der Sekretion von HDV-SVPs, sondern auch bei HBV eine wichtige Funktion ausübt. Frühere Studien zeigten, dass HDV.L und das kleine HBV-Hüllprotein S im Falle einer Kotransfektion gemeinsam mit CHC am *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) kolokalisieren, während der Zusammenbau von HBV-SVPs unabhängig von Clathrin am ER stattfindet. Dementsprechend würde HBV.S in Abhängigkeit der Funktion von HDAg-L als Clathrin-Adaptor an Clathrin-umhüllte Vesikel rekrutiert werden (Huang et al., 2009). Diesen Daten widersprechend wurde innerhalb dieser Arbeit gezeigt, dass HBV.S auch ohne das Vorhandensein von HDV.L in seiner Sekretion von CHC abhängig ist. Dies spricht dafür, dass die sphärischen HBV-SVPs in Clathrin-abhängigen Transportrouten intra- und/oder extrazellulär transportiert werden oder bei ihrem Zellaustritt über die Zellsekretionsmaschinerie des Golgi-Apparates die Unterstützung des Zellproteins benötigen. Während über die Formation Clathrin-umhüllter Vesikel an der Plasmamembran und die jeweilige Interaktion mit Cargo-Molekülen durch Zelloberflächen-Rezeptoren zu endozytotischen Zwecken bereits vielfältige Details ergründet werden konnten, so ist über diese Interaktionen des Zellproteins mit seinen Cargos im intrazellulären Transport weitaus weniger bekannt (Hill et al., 2001; Schmid, 1997). Zwar wurde dem HBV-Hüllprotein S bisher keine direkte Interaktion mit CHC nachgewiesen, dennoch haben Forschungen ergeben, dass HBV für den hepatozellulären Eintritt auf das zelluläre Protein angewiesen ist (Huang et al., 2012; Zhang et al., 2016). Demzufolge ist anzunehmen, dass eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen der HBV-Hülle und Clathrin stattfindet, die die endozytotischen Prozesse begünstigt. Entsprechende Interaktion könnte auch in morphogenetischer und sekretorischer Weise für das Virus von Vorteil sein, möglicherweise zum Transport der einzelnen Virusproteine oder der bereits generierten subviralen Partikel, bestehend aus dem S-Hüllprotein. Intrazellulärer Transport von Cargos wie verschiedenen Nährstoffen, Hormonen und defekten Proteinen zur Degradation mithilfe von Vesikeln und selbst-generierendem Clathrin-Mantel ist einer der wichtigsten Signalwege der eukaryotischen Zelle. Das Protein wird nicht als spezialisiert betrachtet, sondern übernimmt vielfältigste Funktionen, die Einfluss auf die Gesundheit des Wirtes haben, wie beispielsweise bei der mitotischen Zellteilung und dem Zuckerstoffwechsel (Ybe, 2014). Aufgrund der essentiellen Bedeutung Clathrins für vielerlei Prozesse ist es daher unwahrscheinlich, spezifisch

zwischen dieser Virus-Wirts-Interaktion intervenieren zu können, ohne dabei den zellulären Metabolismus erheblich zu stören.

4.4 Funktionen des COPII-vermittelten Vesikeltransports bei der Freisetzung subviraler HBV- und HDV-Partikel

Neben Clathrin sind auch andere zelluläre Proteine in der Lage, ummantelte Vesikel zu bilden, die unterschiedliche Transportrouten zwischen den Kompartimenten abdecken können. Auf den Transport zwischen Endoplasmatischem Retikulum (ER) und Golgi-Apparat sind sogenannte „coat protein complex II“ (COPII)-Proteine spezialisiert (Barlowe et al., 1994). Innerhalb dieser Maschinerie agieren hoch konservierte und spezialisierte Sec-Proteine in Membran-formendender, Mantelbildender Weise, um sekretorische Cargo-Moleküle zu selektieren und innerhalb der neu bildenden Vesikel einzuschließen (D’Arcangelo et al., 2013; Pagant et al., 2016). Die wesentlichen COPII-Elemente sind die kleine GTPase Sar1, die nach Aktivierung die Krümmung der ER-Membran einleitet, der Sec23/Sec24-Komplex, der die Selektivität der Frachtmoleküle vermittelt und die innere Vesikelhülle bildet, und der Sec13/Sec31-Komplex, der die äußere Hülle erstellt und die Formation der COPII-Vesikel abschließt (Antonny et al., 2001; Yorimitsu et al., 2014; Zanetti et al., 2011). Diese existentielle, zelluläre Maschinerie wurde bereits des Öfteren bezüglich ihrer funktionellen Wichtigkeit in den Infektionszyklen unterschiedlicher Pathogene untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass beispielsweise das Ebolavirus-Protein VP40 direkt mit der Untereinheit Sec24C interagiert und COPII insgesamt an der Morphogenese und Sekretion des Virus beteiligt zu sein scheint (Yamayoshi et al., 2008). Für das Hepatitisvirus HCV wurde sogar bereits gezeigt, dass dieses innerhalb seiner Pathogenese virale Proteine oder ganze Virionen mithilfe dieses Mechanismus durch die Zelle transportiert (Syed et al., 2017). Aus diesen Erkenntnissen folgernd ergab sich die Fragestellung, ob HBV und HDV mit COPII-Proteinen interagieren oder sogar den gesamten Signalweg für den Transport ihrer viralen Proteine und Partikel nutzen. Naheliegender wäre dies, da die HBV-Hüllproteine, die an der Morphogenese subviraler und viraler Partikel beteiligt sind, am ER generiert werden und von dort freigesetzt, transportiert oder mit dem HBV-Nukleokapsid bzw. dem HDV-Ribonukleoprotein zusammengebracht werden müssen

(Prange et al., 1999; Lambert und Prange, 2003; Komla-Soukha und Sureau, 2006; Jenna und Sureau, 1999). Ein Interaktions-Screen mittels des Split-Ubiquitin-Hefe-2-Hybrid-Systems deckte in früheren Forschungen dieser Arbeitsgruppe auf, dass das große HBV-Hüllprotein L mithilfe der S-Domäne spezifisch mit der COPII-Untereinheit Sec24A interagiert (Awe, Dissertation 2009). Auch dies lässt vermuten, dass diese COPII-Untereinheit eine entscheidende Rolle, eventuell in Verbindung mit der gesamten Maschinerie, im Infektionszyklus des Virus spielen kann.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse und genaueren Charakterisierung der Sec24A- und COPII-Funktion für beide Hepatitisviren wurden zunächst siRNA-Versuche im subviralen Kontext durchgeführt. Der erfolgreiche KD des COPII-Proteins führte zu einer intrazellulären Akkumulation und einer nahezu vollständigen extrazellulären Reduktion des kleinen HBV-Hüllproteins S. Dieser Phänotyp war sowohl im HA-markierten S-Konstrukt unter artifiziellem Promotor als auch im Plasmidkonstrukt mit HBV-Promotor zu beobachten und bestätigt, dass die Interaktion zwischen S und Sec24A für die Sekretion subviraler HBV-Partikel notwendig ist. Zur Feststellung, ob Sec24A im COPII-Kontext agiert oder separat rekrutiert wird, wurden des Weiteren siRNA-Depletionen der beiden regulatorischen Einheiten Sar1 und Rab1 durchgeführt, jeweils unter Berücksichtigung beider zellulär verfügbaren Isoformen. Die kleine GTPase Sar1 gilt als das Initiator-Protein der gesamten Maschinerie, während die Rab1-GTPase als direkter Interaktionspartner von Sec23, Sec24 und Sec31 und für Einflüsse auf die COPII-Cargo-Selektion bekannt ist (Antonny et al., 2001; Slavin et al., 2011). Der durch Sec24A-Depletion entstandene Phänotyp konnte durch KD von Sar1 oder Überexpression einer dominant negativen (DN) Variante bestätigt werden, wohingegen Rab1 ohne erkennbaren Einfluss auf die subvirale Morphogenese zu sein schien (vgl. Wang et al., 2018). Vorherige Untersuchungen zeigten zwar, dass die hydrolytische Funktion von Sar1 für die Abschnürung und Freisetzung von COPII-Vesikeln entbehrlich, ein funktioneller Amino-Terminus der GTPase jedoch für diese Prozesse absolut notwendig ist (Adolf et al., 2013; Bielli et al., 2005). Außerdem konnte festgestellt werden, dass Sar1 in Säugetieren für die Formation von COPII-Vesikeln absolut notwendig ist und bei siRNA-Depletion beider Isoformen die zelluläre Verteilung der COPII-Untereinheiten sowie Zusammenbau des COPII-Mantels, Abschnürung der Vesikel und Sekretion COPII-spezifischer Cargo-Moleküle gestört sind (Cutrona et al., 2013; Saito et al., 2017). Die starke Reduktion von HBV-SVPs im Überstand sowie die Akkumulation in

den Zellen bei Beeinträchtigung der GTPase lassen vermuten, dass Sar1 - stellvertretend für die gesamte Transportmaschinerie - von essentieller Bedeutung für die HBV-Pathogenese ist.

Im weiteren Verlauf wurden die COPII-Proteine bzw. -Isoformen Sec24A, Sec24B, Sec23A, Sec23B, Sec13, Sar1A und Sar1B mittels siRNA-Depletion hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Sekretion subviraler Partikel im Kontext beider Hepatitisviren untersucht. Sowohl für HBV- als auch HDV-SVPs ergab sich das deutliche Bild, dass deren Sekretion in spezifischer Abhängigkeit der inneren Mantelproteine Sec24A und Sec23B sowie der kleinen GTPase Sar1 steht, da die Proteinlevel von HBV.S und HDV.L in den Überständen der KD-Experimente stark reduziert waren. Die Kontrollexperimente mittels der AFP-ELISA-Methode bestätigten, dass diese Interaktion zwischen Proteinen des COPII-Signalweges und viralen Komponenten spezifisch ist und die generelle Sekretion der Zellen nicht durch einzelne Depletionen der Vesikelproteine beeinflusst ist. Lediglich im Falle des Sec23B-KD war die AFP-Sekretion um etwa 20 % reduziert. Da die Freisetzung beider subviraler Partikeltypen von den COPII-Komponenten Sec24A, Sec23B und Sar1 abhängig zu sein scheint, ist naheliegend, dass diese zellulären Proteine morphogenetische Funktionen bei der Partikel-Formierung ausüben. Die Schlüsselrolle scheint hier in der Interaktion des kleinen HBV-Hüllproteins mit Sec24A zu liegen. Bisherige Ergebnisse innerhalb dieser Arbeit sprechen dementsprechend dafür, dass das S-Hüllprotein von HBV ein Klient des Sec24A/Sec23B-Komplexes ist und unter funktionellem Sar1 die Funktionen der COPII-Maschinerie für die Morphogenese und Sekretion subviraler HBV- sowie HDV-Partikel nutzt.

Charakterisierungen möglicher funktioneller Aufgaben der äußeren Hüllproteine Sec13 und Sec31 erwiesen sich als schwierig aufgrund zellulärer Letalität nach Einsatz von siSec13 bzw. Ineffizienz der siRNA-Oligomere von Sec31B. Während der innere COPII-Komplex vorwiegend für die Cargo-Selektion zuständig ist, ist die äußere Hülle wichtig für die strukturellen Eigenschaften der Vesikel (Stagg et al., 2006). Der alleinige KD des Sec31A-Paralogs führte zu einer tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Veränderung der HBV.S-Level im Vergleich zur Kontrolle, möglicherweise weil Sec31B die Depletion von Sec31A ausgleichen kann. Zwar teilen sich die beiden Isoformen nur eine Sequenzübereinstimmung von 47,3 %, dennoch konnte ermittelt werden, dass sie sich in ihren beiden Bindedomänen für Sec13 und Sec23/24 stark ähneln und dementsprechend funktionelle Redundanz

aufweisen (Stankewich et al., 2006; Tang et al., 2000). Titrationsversuche der Sec13-spezifischen siRNA konnten weitere Aufklärung verschaffen, nachdem die höchste Depletionseffizienz unter geringster Zelltoxizität ermittelt wurde. Das äußere COPII-Hüllprotein scheint sowohl morphogenetisch als auch sekretorisch von großer Relevanz für HBV.S zu sein, da dessen Depletion zu einer vollständigen Reduktion des HBV-Proteins in den Lysaten und entsprechend nicht detektierbaren SVP-Levels in den Überständen führte. Die zelltoxische Wirkung der Sec13-Depletion könnte unter anderem dadurch zu erklären sein, dass das Protein in Säugern in nur einer Isoform vorliegt, also keine funktionelle Kompensation stattfinden kann. Dies steht im Gegensatz zu allen anderen COPII-Untereinheiten, die in jeweils zwei oder vier Paralogen auftreten, die oft Gewebe-spezifisch exprimiert werden (Jensen und Schekman, 2011). Strukturelle Studien konnten zeigen, dass Sec13 hauptsächlich für die Formierung der Käfig-ähnlichen Struktur des äußeren Mantels zuständig ist, während Sec31 an das innere Mantelprotein Sec23 bindet. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Sec13 auch ohne das Vorhandensein von Sec31, ähnlich wie das Vesikelprotein Clathrin, in der Lage ist, Dimere und Tetramere zu bilden (Stagg et al., 2006; Lederkremer et al., 2001; Musacchio et al., 1999). Sec13 erfüllt außerdem nicht nur bei COPII, sondern ebenfalls bei einem anderen essentiellen Komplex eine wichtige Funktion. Durch die Interaktion mit dem Nukleoporin NUP96 ist es als Teil des „nuclear pore complex“ (NPC) aus insgesamt ca. 30 verschiedenen Proteinen an dem Cargo-Transport zwischen Zytosol und Nukleus beteiligt. Mehreren NPC-Komponenten konnten wesentliche Rollen bei unterschiedlichsten Entwicklungsprozessen wie der Oogenese, Gastrulation und Neurogenese zugewiesen werden. Im Zebrafisch und in humanen Zellen wurde gezeigt, dass Sec13 für die Stabilität der COPII-Vesikel und den Transport der Cargo-Moleküle essentiell ist, aber auch unabhängig von COPII für das zelluläre Überleben während der retinalen Entwicklung benötigt wird (Schmidt et al., 2013; Niu et al., 2014). Nach Ausschluss der zytotoxischen Wirkung durch verschiedene Titrations war dennoch ein großer Einfluss der Sec13-Depletion auf Stabilität bzw. Transport des HBV.S-Proteins innerhalb der Zelle ersichtlich. Hierbei wies das ER-Markerprotein Calnexin nach Depletion des COPII-Proteins keine quantitativen Veränderungen auf, was für eine normale Funktionalität des HBV.S-Syntheseortes spricht. Auch für andere Cargo-Moleküle wie Kollagen und Rhodopsin konnte eine derartige Abhängigkeit von Sec13 festgestellt werden (Schmidt et al., 2013). Durch die Intaktheit der inneren

COPII-Hülle ist zu vermuten, dass das S-Protein als Sec24A-Cargo weiterhin gebunden und verpackt wird. Die resultierende Instabilität der COPII-Vesikel durch Depletion des strukturell wichtigen Sec13-Proteins in der äußeren Hülle würde allerdings in fehlerhaftem Transport, begrenzter Lebensdauer und dem letztendlichen Abbau dieser Vesikel mitsamt der Cargo-Moleküle resultieren und könnte diesen extremen Phänotyp erklären.

Da diese bisherigen funktionellen Untersuchungen an COPII im Kontext subviraler HBV- und HDV-Partikel nahelegten, dass die Maschinerie mittels der Sec24A-HBV.S-Interaktion direkt an den entsprechenden Morphogenese-Prozessen beteiligt ist, wurde dies des Weiteren auf zellulärer Ebene mittels Immunfluoreszenz-Studien und Detektionen von Protein-Kolokalisationen näher beleuchtet. Hierbei konnte festgestellt werden, dass der KD der kleinen GTPase Sar1 zu einer Dislokation des kleinen HBV-Hüllproteins vom ER-Golgi-Zwischenkompartiment („ER-Golgi intermediate compartment“; ERGIC) in die peripheren, zytosolischen Bereiche der Zelle führte. Dies spricht dafür, dass das S-Protein ohne funktionelle COPII-Maschinerie nicht entsprechend der benötigten Voraussetzungen für die Generierung von HBV- und HDV-SVPs von ER zu Golgi transportiert und stattdessen fehlgeleitet wird. Im Zytosol, entfernt vom natürlichen Ort der Morphogenese, scheint es wahrscheinlich gebunden an zelluläre Lipide zu aggregieren (s. Abb. 42). Hierbei ist besonders bemerkenswert, dass bereits die Depletion seines Interaktionspartners Sec24A ausreichend ist, um diesen Effekt hervorzurufen, obwohl die COPII-Maschinerie der Zelle funktionell noch aktiv ist. Unter KD der Isoform Sec23B konnte Gleiches beobachtet werden, und es wurde zudem deutlich, dass die Kolokalisation von HBV.S und Sec24A unter Abwesenheit von Sec23B nicht mehr zu beobachten ist. Dies spricht dafür, dass die hoch spezifische Bindung von S an Sec24A in Abhängigkeit von Sec23B ist und der Sec24A/Sec23B-Komplex dem S-Protein den Zugang zum benötigten Transport mittels COPII-ummantelter Vesikel eröffnet. Hierbei scheint die Bindung der COPII-Untereinheit an das virale Protein so spezifisch zu sein, dass die Depletion einer Isoform des zellulären Proteins Sec24 oder des Dimer-Partners Sec23B ausreicht, HBV.S den Zugang zum COPII-vermittelten Transport zu verwehren und entsprechend eine erhebliche Störung dessen intrazellulären Transports und der Morphogenese subviraler Partikel von sowohl HBV als auch HDV zu verursachen. Dies bestätigt sich erneut darin, dass

dieser Phänotyp nicht unter Beeinträchtigung der Isoformen Sec24B oder Sec23A beobachtet werden konnte.

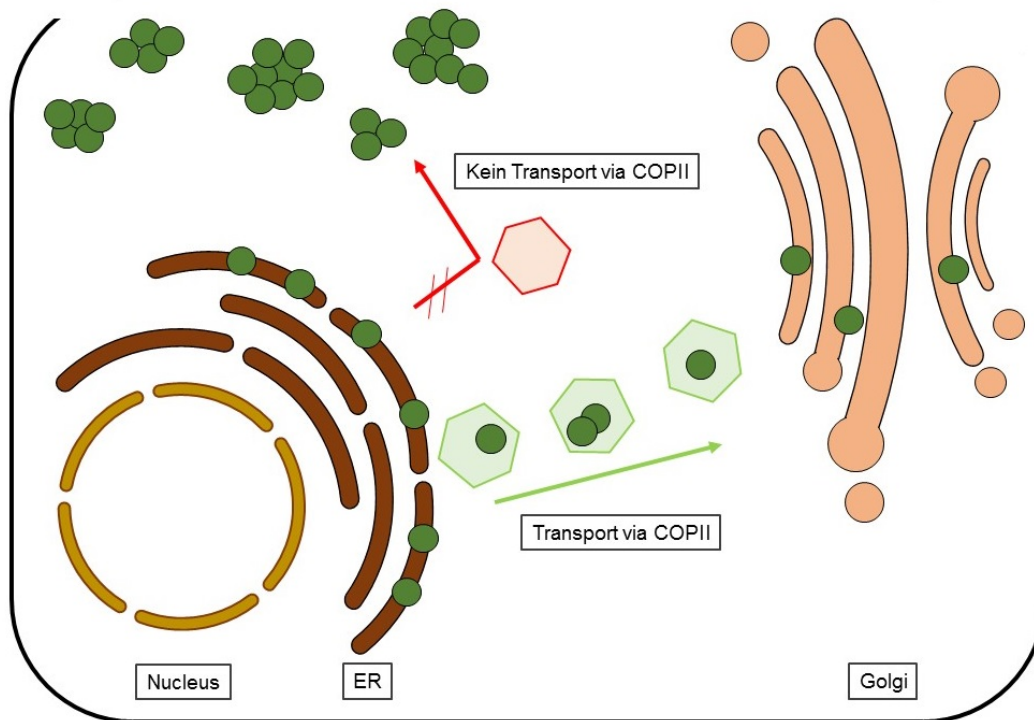


Abb. 42: Modell der funktionellen Rolle von COPII bei der Morphogenese von HBV- und HDV-SVPs. Dargestellt ist das vereinfachte Modell der funktionellen Rolle des COPII-vermittelten Vesikeltransports bei der Morphogenese subviraler HBV- und HDV-Partikel. Das kleine HBV-Hüllprotein S (grün), das wesentlicher Bestandteil beider SVPs ist, wird natürlicherweise am ER generiert und zum Golgi transportiert, entweder als einzelnes virales Protein oder bereits als Partikel zusammengebaut. Für diesen Transport ist die COPII-Maschinerie unentbehrlich und bei Blockade des Zugangs von HBV.S zu diesem Transportmechanismus durch Depletion seines Interaktionspartners Sec24A, dessen Dimer-Partners Sec23B oder Inhibierung der gesamten Maschinerie mittels Sar1-KD findet eine Dislokation des viralen Proteins statt. Dieses ist in diesem Fall in aggregierten Komplexen im Zytosol zu finden und die Morphogenese und Sekretion der SVPs gestört.

Die Bildung von Aggregaten wie diesen und die sogenannte Dislokation ins Zytosol sind im Kontext der ER-ständigen Cargo-Proteine nicht ungewöhnlich. Falsch oder unvollständig gefaltete Glykoproteine kommen relativ häufig vor und können nach Qualitätskontrolle für die ER-assoziierte Protein-Degradation (ERAD) markiert werden, beispielsweise mithilfe des Mannose-bindenden, löslichen Proteins EDEM1 („ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 1“). Kleinere Proteine werden anschließend im Zytoplasma von Proteasomen degradiert (Zuber et al., 2007; Bagola et al., 2011). Die Funktion ERADs beschränkt sich allerdings nicht nur auf die Eliminierung falsch gefalteter ER-Proteine, im Gegenteil werden auch große luminaire Proteine oder ein Überschuss an kleinen Cargos ins Zytosol umgeleitet, um

ER-Stress durch potentiell schädliche Akkumulation zu vermeiden (Zuber et al., 2007; Le Fourn et al., 2013). In einem von COPII unabhängigen Transportweg mit aus dem ER generierten Vesikeln werden außerdem größere, zu degradierende Proteine vom ER wegtransportiert und ins Zytosol der Zelle geleitet, wo sie aggregieren („Aggresomen“). Dies geschieht beispielsweise, wenn die Kapazität der Proteasomen ausgelastet ist oder die falsch gefalteten Moleküle für den Ubiquitin-proteasomalen Abbau aufgrund ihrer Größe oder Konformation nicht geeignet sind (Le Fourn et al., 2013; Johnston et al., 1998). Zytosolische Aggregate bzw. Vesikel können außerdem in Detergenzien unlöslich und deutlich größer als COPII-Vesikel sein. Sie werden nach bisherigen Erkenntnissen via selektiver Autophagie degradiert (Le Fourn et al., 2013). Nach ähnlichem Bild wäre dies auch für das HBV-Hüllprotein vorstellbar. Dementsprechend würde das Blockieren der spezifischen Interaktion von S und Sec24A oder dessen Bindepartner Sec23B alleine ausreichend sein, dem viralen Protein den Zugang zur COPII-Maschinerie und den Transport von ER zu Golgi zu verwehren. Gleiches wird dadurch erreicht, dass das Initiator-Protein Sar1 depletiert ist, wobei in diesem Fall der gesamte Transportmechanismus gestört ist. Es ist vorstellbar, dass die S-Hüllproteine ohne den Transportweg zwischen ER und Golgi in der ER-Membran akkumulieren und entsprechend anderer fehlgefalteter oder überschüssiger Cargos mittels ERAD ins Zytosol der Zelle umgeleitet werden. Dort würde das Protein - möglicherweise in Verbindung mit zellulären Lipiden - Aggregate bilden, die zu der Morphogenese sowohl subviraler HBV- als auch HDV-Partikel nicht fähig sind. Hierbei würde für die Pathogenese beider Viren zwar die gesamte COPII-Maschinerie benötigt, jedoch scheint die Interaktion von S mit der Isoform Sec24A, in Verbindung mit Sec23B, der Schlüsselkontakt zu sein. Das spezifische Blockieren dieser Protein-Bindung bzw. das Eliminieren der Sec24A-Isoform könnte demnach ausreichend sein, die Produktion und Sekretion subviraler Partikel beider Viren stark zu reduzieren.

4.5 Analyse spezifischer Funktionen von Sec24A und Sec23B im Infektionszyklus von HBV

Bisherige Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit haben ergeben, dass ein funktionell intakter COPII-abhängiger Vesikeltransport von ER zu Golgi für die

Morphogenese und Sekretion subviraler Partikel der Hepatitisviren B und D unabdinglich ist. Hierbei wurde gezeigt, dass diese Abhängigkeit im Transport des HBV-Hüllproteins S begründet ist, das für beide Partikeltypen benötigt wird. Das spezifische Blockieren der beiden COPII-Untereinheiten Sec24A oder Sec23B ist hierbei ausreichend, dem S-Protein den Zugang zur Maschinerie zu verwehren und es stattdessen ins Zytosol zu dislokalisieren, wo es zu Aggregate-ähnlichen Strukturen zu akkumulieren scheint. Dies lässt die Annahme zu, dass der direkte Interaktionspartner Sec24A an der natürlichen Lokalisation des Hüllproteins innerhalb der Zelle direkt beteiligt ist und damit einen essentiellen Faktor innerhalb der viralen Morphogenese darstellt.

Zur Identifizierung möglicher Änderungen der intrazellulären Verteilung von HBV.S im Fall der Sec24A-Depletion wurden mehrere Ansätze subzellulärer Fraktionierungen nach siRNA-KD des COPII-Proteins und Transfektion des S.HA-Konstrukts durchgeführt. Generell sind Dichtegradienten eine weit verbreitete und erprobte Möglichkeit, Organellen, Proteine oder Zellen zu separieren. Die Auftrennung Membran-enthaltender Partikel wird hierbei durch unterschiedliche Eigenschaften wie Inhalt, Größe, Form und das Verhältnis zwischen Lipiden und Protein bestimmt, die Stärke der Separation durch das Medium, aus dem die Dichtegradienten gegossen werden (De Araújo et al., 2015; Graham, 2015). Gradienten, die mit Cäsiumchlorid (CsCl) generiert sind, werden unter anderem für die Reinigung unterschiedlicher Viren und Bakterienzellen verwendet, Sucrose-Gradienten meist für die Fraktionierung von Organellen oder Proteinen (Nasukawa et al., 2017; Pollard und Grady, 1967; Clayton und Shadel, 2014; Bermejo et al., 2014). Mithilfe von CsCl-Gradienten wurden die HBV-SVPs, damals „Dane-Partikel“ genannt, aus Patienten-Seren gereinigt und mit einer Dichte von 1,2 g/ml charakterisiert. Mittels Sucrose-Gradienten wurden HBV-Virionen bereits isoliert und aufgereinigt, um für weitere Experimente verwendet werden zu können. Auch HDV-Partikel konnten mithilfe von CsCl-Dichtegradienten erstmalig aus den Seren von HBV-Infizierten isoliert werden (Gerin et al., 1975; Diao et al., 2013; Bonino et al., 1981). Diese Methoden ermöglichen demnach die Detektion unterschiedlicher Vesikeltypen und wurden hier verwendet, um festzustellen, ob nach KD der COPII-Komponenten weiterhin HBV-SVPs gebildet werden können, die den kompositionellen Eigenschaften gemäß aktueller Literatur entsprechen. Sowohl mittels Cäsiumchlorid- als auch mittels Sucrose-Dichtegradienten und

Ultrazentrifugation konnten hierbei jedoch keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Sec24A-depletierten Zellen festgestellt werden. In beiden Fällen wurde durch Interpretation der Dichte bzw. der jeweiligen Konzentration gezeigt, dass subvirale S-Partikeltypen auch nach Sec24A-KD weiterhin generiert werden und in ihrem Lipid-Protein-Verhältnis nicht verändert zu sein scheinen.

Subzelluläre Fraktionierungsmethoden mithilfe des Iodixanol-Reagenz OptiPrep können ebenfalls verwendet werden, um biologische Partikel gemäß ihrer Dichte zu separieren. Dieses Reagenz wird vielfach aufgrund seiner einfachen Handhabung, der flexiblen Einsatzmöglichkeiten, der hohen Kompatibilität mit biologischen Partikeln und der starken Reproduzierbarkeit der Dichtegradienten-Profile eingesetzt (Graham, 2015). Iodixanol-Gradienten konnten beispielsweise die zelluläre Verteilung des HIV-Korezeptors GRP15 an ER, ERGIC und Golgi zeigen. Mithilfe des sogenannten Membran-Flotationsassays, das dreistufige Iodixanol-Gradienten beinhaltet, konnte unter anderem die zelluläre Verteilung des HBV-Core-Proteins hinsichtlich zytosolischer und Membran-ständiger Fraktionen untersucht werden (Graham, 2002; Okamoto et al., 2013; Döring et al., 2018). Die Verwendung zweier unterschiedlich aufgebauter Iodixanol-Gradienten lieferte die Erkenntnis, dass das S-Protein unter KD von Sec24A nicht mehr an den natürlichen zellulären Bereichen akkumuliert zu sein scheint und stattdessen in diffuser Verteilung vorliegt. Dieses Bild stimmt mit den Immunfluoreszenz-Aufnahmen überein, in denen das Protein nach Depletion von Sec24A, Sec23B oder Sar1 nicht mehr zwischen ER und Golgi (ERGIC) akkumuliert ist, sondern sich im Zytosol der Zelle in Aggregaten anzusammeln scheint. Diese Beobachtungen könnten zudem Hinweise darauf liefern, warum die Dichtegradienten aus Cäsiumchlorid oder Sucrose keine Unterschiede zwischen Kontrollen und siRNA-Zellen aufwiesen. Aggregate aus ER-Cargo-Molekülen zeichneten sich in vorherigen Studien durch Unlöslichkeit in Detergenzien und deutliche Größenunterschiede im Vergleich zu herkömmlichen COPII-Vesikeln aus (Le Fourn et al., 2013). In beiden Fällen könnten daher anfängliche Zentrifugationsschritte und unzureichender chemischer Zellaufschluss dafür gesorgt haben, dass die HBV.S-Aggregate im Zytosol aufgrund ihrer Größe und ihrer makromolekularen Beschaffenheit gar nicht erst auf die Gradienten aufgetragen, sondern bereits vorher entfernt wurden. Auch bei den Iodixanol-Gradienten ist davon auszugehen, dass der Großteil des veränderten S-Proteins durch Zentrifugation verloren gegangen ist. Einen Hinweis darauf bietet auch die

Reduktion des viralen Proteinlevels nach Depletion von Sec24A bei einem der beiden Gradienten, während in anderen Versuchen mit NP-40-Lyse eine Akkumulation des viralen Proteins festgestellt werden konnte. Dennoch liefern die Iodixanol-Gradienten Hinweise auf die diffuse Verteilung von S ohne das Vorhandensein seines Interaktionspartners Sec24A. Entsprechend aktueller Literatur könnte es sich bei den beobachteten Strukturen um Lipid-Protein-Verbindungen handeln, und eine Charakterisierung dieser sogenannten Aggresomen mittels Dichtegradienten würde sich entsprechend als schwierig erweisen. Hier könnten andere proteinbiochemische Methoden wie die Elektronenmikroskopie (EM) weiterer Aufklärung in Zukunft dienlich sein.

Vorherige Versuche deuteten bereits die hohe Spezifität des S-Proteins für einzelne Isoformen der COPII-Untereinheiten an. Die bevorzugte Bindung an einzelne Paraloge ist zwar mehrfach zuvor beschrieben wurden, jedoch ist es unüblich, dass im Falle der Depletion dieser bevorzugten Isoform keine der nah verwandten diesen Effekt ausgleichen kann (Yamayoshi et al., 2008; Tao et al., 2012; Baines et al., 2013). Bemerkenswerterweise sind die jeweiligen, hier beobachteten Phänotypen nur unter Depletion der beiden Isoformen Sec24A und Sec23B ersichtlich, nicht jedoch bei KD ihrer entsprechenden Paraloge Sec24B und Sec23A. Sec24 hat im Gegensatz zu allen anderen COPII-Komponenten vier Isoformen, die teilweise Gewebe-spezifisch exprimiert werden, aber meist redundant funktionieren. Insbesondere konnte eine gegenseitige funktionelle Kompensation der Isoformen Sec24A/Sec24B bzw. Sec24C/Sec24D festgestellt werden, die jeweils in etwa 50 % ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmen (Wendeler et al., 2007; Tang et al., 1999). Unter Verwendung Paralog-spezifischer siRNAs von Sec24 konnte im weiteren Verlauf dieser Arbeit festgestellt werden, dass der Phänotyp reduzierter SVP-Sekretion lediglich unter KD von Sec24A detektiert werden kann. Dementsprechend kann angenommen werden, dass die Interaktion von Sec24A und HBV.S als Teil des viralen Lebenszyklus derart spezifisch und essentiell ist, dass sie durch keines der nah verwandten Paraloge ausgeglichen werden kann. Bereits für andere Virusproteine und Cargo-Moleküle wurde gezeigt, dass diese an bestimmte Paraloge der inneren COPII-Mantelproteine binden. So interagiert das Ebolavirus-Protein VP40 spezifisch mit Sec24C in einem Komplex mit Sec23A, um die COPII-Maschinerie für dessen Transport zu rekrutieren. In Übereinstimmung mit den Daten dieser Arbeit konnte auch dort die inhibierte Produktion von VLPs entweder durch

spezifischen KD von Sec24C oder von Sar1 beobachtet werden (Yamayoshi et al., 2008). Auch der Serotonin-Transporter (SERT) stellte sich als exklusiver Klient der COPII-Komponente Sec24C heraus, ausgezeichnet durch eine hohe Spezifität dieser Interaktion, die nicht durch andere Sec24-Paraloge kompensiert werden konnte (Sucic et al., 2011). Unter dem Krankheitsbild der Leberfibrose konnte festgestellt werden, dass in perizytischen Leberzellen die Expressionslevel der Untereinheiten Sec23A und Sec24D spezifisch hochreguliert werden (Tomoishi et al., 2017). Untersuchungen dieser Art legen nahe, dass die jeweiligen Isoformen der inneren Mantelproteine für jeweils andere Cargo-Moleküle zuständig sind. Die enorme Spezifität des S-Proteins für die Isoform Sec24A ist ein weiteres Beispiel für die Cargo-Selektion von COPII und außerdem eine potentiell starke Möglichkeit, zwischen Virus-Wirt-Interaktionen zu intervenieren und dadurch die virale Pathogenese zu stören.

Typische Export-Signale der zytosolischen Bereiche von ER-Cargo-Molekülen, die mit dem COPII-Protein Sec24 oder direkt mit Sar1 interagieren, enthalten meist Bindemotive aus zwei hydrophilen, zwei sauren oder basischen („di-acidic“, „di-basic“) Aminosäuren (AS). Beispielsweise interagieren Glykosyltransferasen und das *Drosophila*-Protein Crumbs direkt mithilfe der di-basischen Motive RKXRK bzw. RNKR mit Sar1 (Kumichel et al., 2015; Miller et al., 2003; Giraudo und Maccioni, 2003). Das G-Protein des Vesikulären Stomatitisvirus benötigt unter anderem das di-saure Transportmotiv DXE und das humane ERGIC-53-Protein das di-hydrophobe FF-Motiv für den erfolgreichen ER-Export. Mehrfach konnte gezeigt werden, dass sich diese Motive insofern stark in ihren Ansprüchen unterscheiden, als dass einzelne Komponenten durch anders gruppierte AS teilweise komplett ersetzt werden können, ohne dass dies funktionelle Nachteile mit sich bringt. Andererseits führt in einigen Fällen die Veränderung einer einzelnen Aminosäure dieser Binderegion bereits zu maßgeblichen Fehlfunktionen (Nishimura und Balch, 1997; Sevier et al., 2000; Nufer et al., 2002). Mittels Immunpräzipitations-Experimente wurde die Interaktion zwischen dem HBV-Hüllprotein S und der COPII-Untereinheit Sec24A auf ein Bindemotiv von S kartiert, das die beiden AS-Reste R78 und R79 in der zytosolischen Schleife (CL) des Proteins beinhaltet. In beiden Fällen führte ein Austausch des basischen Arginins mit einem anderen Rest zu einer dramatischen Reduktion der Protein-Protein-Interaktion. Dieser Phänotyp war davon unabhängig, ob durch eine saure oder basische AS ersetzt wurde. Mutationen dieser beiden

Residuen alleine hatten außerdem den extremen Phänotyp, die Sekretion von HBV-SVPs gänzlich zu unterbinden, insbesondere wenn die beiden Arginine durch Lysine ersetzt worden waren. Dementsprechend kann angenommen werden, dass das Bindemotiv von HBV.S, das den ER-Export und den Zugang zur COPII-Maschinerie erlaubt, R78 und R79 beinhaltet (s. Abb. 43).

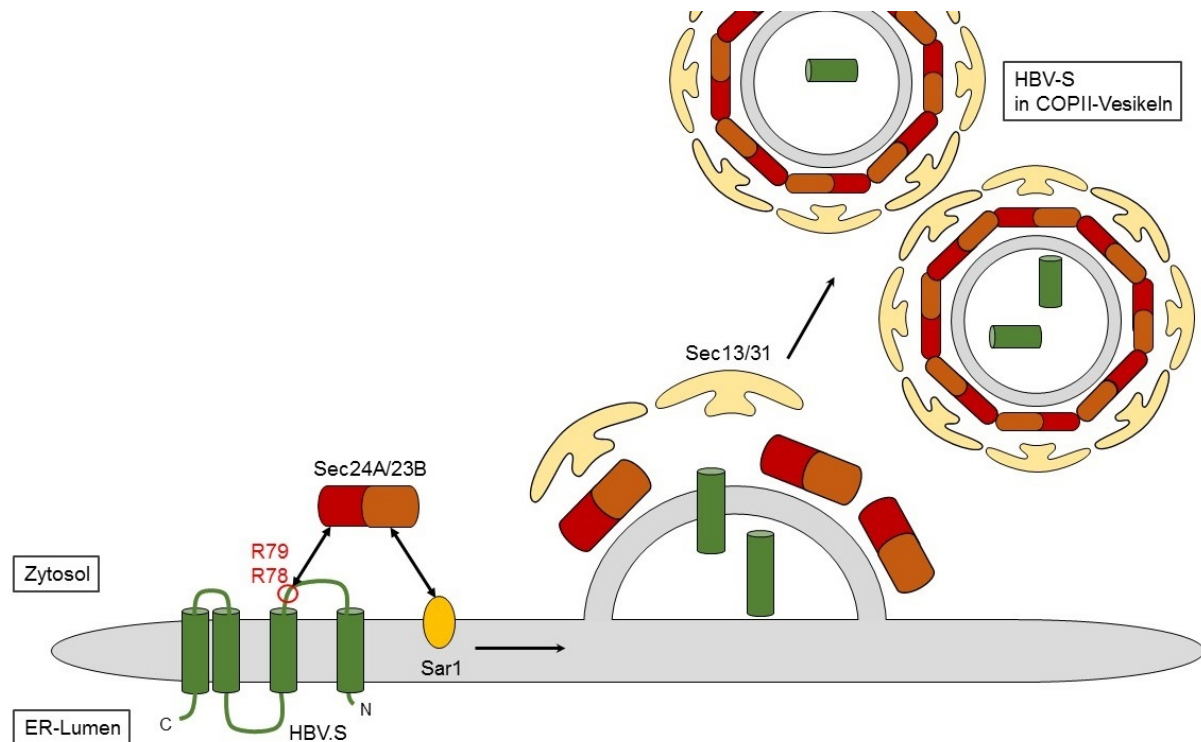


Abb. 43: Modell der Verpackung von HBV.S in COPII-Vesikel durch Interaktion mit Sec24A/Sec23B. Dargestellt ist das vereinfachte Modell der Sec24A-spezifischen Interaktion in Abhängigkeit von Sec23B und mittels des Bindemotivs in HBV.S (grün), das die AS-Reste 78 und 79 (R78/R79) involviert. Sec23B interagiert wahrscheinlich direkt mit der GTPase Sar1 (gelb), die die COPII-Vesikelbildung initiiert. Durch spezifische Interaktion mit Sec24A/Sec23B erlangt das virale Protein Zugang zur COPII-Maschinerie und wird in entsprechenden Vesikeln mit äußerer Hülle aus Sec13/Sec31 (hellgelb) verpackt und zum Golgi-Apparat transportiert.

Bisherige Studien konnten ebenfalls belegen, dass die große zytosolische Schleife von S (CYT-I) mit den AS-Resten von 28 - 80 für verschiedenste morphogenetische und sekretorische Schritte in der HBV-Pathogenese von großer Wichtigkeit ist, während die zweite, kleinere zytosolische Schleife (CYT-II) nach bisherigen Erkenntnissen für die HBV-Morphogenese nicht essentiell ist (Blanchet und Sureau, 2006). Mutanten mit Depletionen oder Substitutionen in den Bereichen 35 - 39, 40 - 46, 50 - 56 und 56 - 59 von CYT-I zeigten gehemmte Virionen-Sekretion, und Punktmutationen an den AS 65 und 79 waren ausreichend, die Formation von HBV-SVPs oder -Virionen effektiv zu unterbinden (Löffler-Mary et al., 2000; Suffner et al., 2018).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass HBV.S und Sec24A scheinbar auf extrem spezifische Weise miteinander als Teil der Pathogenese von HBV und HDV funktionieren, war zu vermuten, dass diese Protein-Protein-Interaktion hoch konserviert und von entscheidender evolutionärer Bedeutung für die Familie der Hepadnaviridae ist. Zwar ist das humane HBV hierbei der beschriebene Prototyp, jedoch werden andere Mitglieder dieser Virusfamilie als nah verwandte Modellsysteme in der Forschung ebenfalls häufig eingesetzt. Das Enten-Hepatitis-B-Virus (DHBV) hat sich unter diesen bereits vor Jahren durchgesetzt und etabliert, um wertvolle Hinweise auf die HBV-Pathogenese und die Konservierung zwischen Spezies zu liefern (Glebe und Urban, 2007). Generell ist die Forschung an DHBV zwar nicht ohne Weiteres auf die anderen Hepadnaviridae, einschließlich HBV, zu übertragen, dennoch ermöglichte dieses Modell bereits in vergangenen Studien die Generation wertvoller Informationen hinsichtlich der Aufklärung der HBV-Pathogenese wie der Identifikation endozytotischer Abläufe und der Entwicklung eines Inhibitors der HBV-Infektion (Urban und Gripon, 2002; Li und Urban, 2016).

Innerhalb dieser Arbeit wurde daher weiterführend untersucht, ob Sec24A auch für das kleine Hüllprotein von DHBV als Bindepartner dienen könnte und ob dessen Sekretion eine ebenso große Abhängigkeit der COPII-Komponenten aufweist, wie es beim humanen Virus der Fall ist. Unter identischem Versuchsaufbau der Depletion mittels spezifischer siRNAs in HuH-7-Zellen und Transfektion des DHBV.S-Plasmids konnte der gleiche Phänotyp festgestellt werden wie bei den Versuchen mit dem humanen HBV. Auch hier waren unter Sec24A-KD eine Akkumulation von DHBV.S innerhalb der Zelle und eine nahezu vollständige Reduktion des Proteinlevels außerhalb zu beobachten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch andere Vertreter der Hepadnaviridae ihre Lebenszyklen in starker Abhängigkeit der COPII-Maschinerie unter Interaktion mit Sec24A gestaltet haben könnten. Zur genaueren Beleuchtung dessen könnten ähnliche Versuchsansätze mit dem HBV-verwandten Woodchuck-Hepatitisvirus (WHV) und dem Woolly-Monkey-Hepatitis-B-Virus (WMHBV), einem HBV-Subtyp, zukünftig bedeutende evolutionäre Aufklärung verschaffen (Kosinska et al., 2015; Lanford et al., 1998; Guo et al., 2018).

Aufgrund der stark ausgeprägten Phänotypen nach Depletion der beiden inneren COPII-Untereinheiten Sec24A und Sec23B im Kontext beider Hepatitisviren sollte die Funktionalität dieser zellulären Proteine zusätzlich hinsichtlich der Morphogenese und Sekretion vollständiger HBV-Virionen untersucht werden. Zu diesem Zweck

wurden die siRNA-Depletionsversuche mit einem Replikations-fähigen HBV-Plasmid wiederholt und mittels Immunpräzipitation nach Virionen und Nukleokapsiden (NC) detektiert, die anschließend aufgeschlossen und mithilfe von Genom-Extraktion und qPCR analysiert wurden. Diese Experimente ergaben das signifikante Ergebnis reduzierter Virus-Genome in den Überständen nach Depletion einer der beiden COPII-Untereinheiten, während die Quantität intrazellulärer NCs nicht beeinträchtigt war. Dieses Ergebnis erscheint zunächst überraschend, da infektiöse HBV-Virionen andere Sekretionswege verwenden als subvirale Partikel und dementsprechend zu vermuten wäre, dass sich die jeweiligen Ansprüche an intrazelluläre Transportmechanismen unterscheiden könnten (Bruss, 2007; Peiffer et al., 2018). Die innerhalb dieser Projektarbeit generierten Daten sprechen dafür, dass das S-Protein spezifisch mit den inneren Mantelproteinen Sec24A und Sec23B interagiert und diese Protein-Protein-Interaktion sowohl für die Morphogenese und Sekretion subviraler als auch viraler HBV-Partikel unabdingbar und essentiell ist. Weitere Hinweise auf die Rekrutierung der beiden COPII-Untereinheiten als provirale Komponenten der HBV-Pathogenese lieferten Analysen der Expressionslevel von Sec24A und Sec23B nach Transfektion von S.HA oder dem HBV-Plasmid innerhalb dieser Arbeit. Hierbei konnte festgestellt werden, dass diese verglichen mit nicht-transfizierten Zellen auf bis zu 2,5-fache Menge erhöht waren. Dies legt nahe, dass das Virus direkt oder indirekt die Expression der benötigten zellulären Wirtsfaktoren während der Infektion hochreguliert, um deren Funktionen gezielt ausbeuten zu können. Interessanterweise ist das Vorhandensein des S-Hüllproteins alleine für diesen Effekt bereits ausreichend, was erneut dafür spricht, dass die Interaktion zwischen S und COPII ein entscheidender Schlüsselfaktor in der Morphogenese und Sekretion viraler und subviraler HBV-Partikel sowie subviraler HDV-Partikel ist. Zudem scheint S entsprechend dieser Ergebnisse eine Expression-regulierende Funktion dieser proviralen Zellproteine zuzusprechen, die entweder direkt oder indirekt erfolgen könnte.

Die hier beschriebenen Ergebnisse deuten an, dass die Bindung der COPII-Untereinheit an die kleinen HBV-Hüllproteine ein hoch konservierter und evolutionär bedeutender Prozess der viralen Pathogenese ist. Dies ist von besonderem Interesse, da diese Bindung spezifisch für die Isoform Sec24A ist, die nach bisherigen Erkenntnissen für den zellulären Metabolismus entbehrlich ist und *in vivo* funktionell teilweise durch andere Paraloge ersetzt werden könnte (Adams et al.,

2014; Baines et al., 2013). Dies bietet eine neue Möglichkeit der pathogenen Intervention: die Störung der HBV-S-Interaktion mit Sec24A, beispielsweise durch den Einsatz zellpermeabler Peptid-Konstrukte. Fusionsproteine wie diese könnten mithilfe von pTAT-Vektoren generiert werden, die die Sequenz des HIV-Proteins TAT („transactivator of transcription“) enthalten, welches die zelluläre Aufnahme von Molekülen ermöglichen kann (Zou et al., 2017; Saar et al., 2005). Das mögliche Blockieren der Sec24-S-Interaktionsstelle unter Integration der entsprechenden HBV-Sequenz in den pTAT-Vektor könnte nach bisherigen Erkenntnissen ausreichend sein, die Produktion und Sekretion subviraler HBV- und HDV-Partikel sowie die Morphogenese kompletter HBV-Virionen zu blockieren, ohne dem zellulären Metabolismus nachhaltig zu schaden. Diese neue Möglichkeit der gleichzeitigen Inhibition mehrerer Partikeltypen ist von hoher klinischer Relevanz. Die viralen HBV-Partikel vermitteln die Ausbreitung des Virus-Genoms, also die Infektiosität, und wurden daher für lange Zeit als wichtigstes Ziel therapeutischer Maßnahmen betrachtet. Es konnte jedoch mittlerweile gezeigt werden, dass auch subvirale Partikel ohne Genom maßgeblich an der viralen Pathogenese beteiligt sind. Dies liegt unter anderem daran, dass sie weitaus effektiver sekretiert werden als infektiöse HBV-Virionen und durch ihre massive Präsenz in den Seren infizierter Patienten die Immunantwort des Wirtes negativ beeinflussen können, beispielsweise als eine Art Ablenkungsmechanismus für entsprechende Antikörper. Auch scheinen sie in der Lage zu sein, neutralisierende Antikörper gegen HBV zu abzufangen und dadurch herkömmlichen Interventionen mit dem viralen Infektionszyklus entgegen zu wirken (Bruss, 2007; Peiffer et al., 2018; Cornberg et al., 2017). Die Hemmung von HBV-SVPs zusätzlich zur Störung der infektiösen, viralen Partikel mithilfe methodischer Ansätze aus dieser Arbeit könnte demzufolge die Ausbreitung und Lebensdauer des Virus im Wirt sehr effektiv beeinträchtigen und in Zukunft mit der HBV-Pathogenese maßgeblich intervenieren.

5 Zusammenfassung

HBV ist eines der erfolgreichsten Pathogene weltweit, u. a. da keine kurative Therapie verfügbar ist. Das Krankheitsbild einer HBV-Infektion manifestiert sich in akuter und chronischer Hepatitis, Leberzirrhose und Leberzellkarzinomen. Eine Koinfektion mit HDV, das auf die HBV-Hüllproteine angewiesen ist, führt zudem zu einem weitaus drastischeren Krankheitsverlauf. Da sich beide Viren durch auffällig kleine Genome auszeichnen, sind Interaktionen zwischen den Pathogenen und zellulären Wirtsfaktoren obligat. Innerhalb dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Analyse intrazellulärer Transportmechanismen hinsichtlich möglicher Funktionen in der Pathogenese beider Viren gelegt. Zu diesem Zweck wurden subvirale HDV-Partikel generiert und mittels Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz hinsichtlich ihrer morphologischen und sekretorischen Abhängigkeit von HBV.S charakterisiert. Drei Transportmaschinerien, ESCRT, Clathrin- und COPII-vermittelter Vesikeltransport, wurden mittels siRNA-Interferenzen und Hemmung durch Chemikalien oder durch Verwendung dominant-negativer Mutanten mit Methoden der Immunfluoreszenz, Immunpräzipitation und subzellulären Fraktionierung hinsichtlich ihrer Funktionen im Lebenszyklus von HBV und HDV untersucht. ESCRT scheint für die Sekretion von HDV-SVPs nicht benötigt zu sein und zeigte nur tendenziell Einfluss auf die Morphogenese dieser Partikel. Clathrin erwies sich als funktionell wichtig für Morphogenese und Freisetzung subviraler HBV- und HDV-Partikeltypen. Die COPII-Maschinerie, insbesondere ihre Untereinheiten Sec24A und Sec23B, konnte als zelluläre Schlüsselkomponente bei der Sekretion beider Arten subviraler Partikel identifiziert werden. Hierbei konnte HBV.S eine direkte und ausschließliche Interaktion mit der Isoform Sec24A nachgewiesen werden, die von Sec23B abhängig ist und die die zwei basischen AS 78 und 79 in der zytosolischen Schleife von HBV.S involviert. Eine Blockade der Interaktion zwischen HBV.S und Sec24A alleine führte hierbei zu einer Dislokation des viralen Proteins unter Bildung von Aggregat-ähnlichen Strukturen. Die sekretorische Abhängigkeit von Sec24A zeigte sich auch bei dem Hepatitis-Virus der Ente und suggeriert eine hohe Konservierung dieser Interaktion. Sec24A und Sec23B konnten zudem als notwendig für die Sekretion infektiöser HBV-Virionen identifiziert werden. Diese Resultate bieten wertvolle, neue Möglichkeiten der Intervention in den Lebenszyklen beider Viren durch direkte Inhibition der Sec24A-HBV.S-Interaktion.

6 Summary

HBV is one of the most successful pathogens worldwide, partially because there is no curative therapy available. The clinical picture of an HBV infection appears as acute and chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinomas. Co-infection with HDV, which is reliant on the HBV envelope proteins, thereby leads to a much more drastic disease process. Since both viruses are characterized by conspicuously small genomes, interactions between the pathogens and cellular host factors are obligatory. Within this work, the focus has been placed on the analysis of intracellular transport mechanisms for possible functions in the pathogenesis of both viruses. For this purpose, subviral HDV particles were generated and characterized by immunoprecipitation and immunofluorescence for their morphological and secretory dependence on HBV.S. Three transport machineries, ESCRT, Clathrin- and COPII-mediated vesicle transport, were investigated for their functions in the life cycle of HBV and HDV by siRNA interference and inhibition by chemicals or by using dominant negative mutants with immunofluorescence, immunoprecipitation and subcellular fractionation techniques. ESCRT does not appear to be needed for the secretion of HDV SVPs and only tends to affect the morphogenesis of these particles. Clathrin was found to be functionally important in morphogenesis and release of subviral HBV and HDV particle types. The COPII machinery, in particular its subunits Sec24A and Sec23B, could be identified as a key cellular component in the secretion of both types of subviral particles. HBV.S showed direct and exclusive interaction with the isoform Sec24A, which is dependent on Sec23B and which involves the two basic AA 78 and 79 in the cytosolic loop of HBV.S. Blocking the interaction between HBV.S and Sec24A alone resulted in dislocation of the viral protein among formation of aggregate-like structures. The secretory dependence of Sec24A was also demonstrated on subviral particles of the duck hepatitis B virus, suggesting a high conservation of this interaction. In addition, Sec24A and Sec23B were identified as necessary for the secretion of infectious HBV virions. These results provide valuable, new possibilities of invention in the lifecycles of both viruses by direct inhibition of the Sec24A-HBV.S interaction.

7 Literaturverzeichnis

- Adams, E. J.; Chen, X.; O'Shea, K. S.; Ginsburg, D.** (2014): Mammalian COPII Coat Component SEC24C Is Required for Embryonic Development in Mice. In: *Journal of Biological Chemistry* Jul 25;289(30):20858-70.
- Adell, M. A.Y.; Migliano, S. M.; Teis, D.** (2016): ESCRT-III and Vps4: a dynamic multipurpose tool for membrane budding and scission. In: *The Febs Journal* Sep;283(18):3288-302. doi: 10.1111/febs.13688.
- Adolf, F.; Herrmann, A.; Hellwig, A.; Beck, R.; Brügger, B.; Wieland, F. T.** (2013): Scission of COPI and COPII vesicles is independent of GTP hydrolysis. In: *Traffic* Aug;14(8):922-32. doi: 10.1111/tra.12084.
- Alves, C.; Branco, C.; Cunha, C.** (2013): Hepatitis Delta Virus: A Peculiar Virus. In: *Advances in Virology* 2013:560105. doi: 10.1155/2013/560105.
- Angers-Loustau, A.; Rainy, J.; Wartiovaara, K.** (2007): PlasmaDNA: a free, cross-platform plasmid manipulation program for molecular biology laboratories. In: *BMC Molecular Biology* Sep 17;8:77.
- Antony, B.; Madden, D.; Hamamoto, S.; Orci, L.; Schekman, R.** (2001): Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. In: *Nature Cell Biology* Jun;3(6):531-7.
- Araújo, M. E. de; Lamberti, G.; La Huber** (2015): Isolation of Early and Late Endosomes by Density Gradient Centrifugation. In: *Cold Spring Harbor Protocols* Nov 2;2015(11):1013-6. doi: 10.1101/pdb.prot083444.
- Aridor, M.; Weissmann, J.; Bannykh, S.; Nuoffer, C.; Balch, W. E.** (1998): Cargo Selection by the COPII Budding Machinery during Export from the ER. In: *Journal of Cell Biology* Apr 6;141(1):61-70.
- Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K.** (Hg.): *Current Protocols in Molecular Biology*. (2003).
- Awe, K.** (2009): Charakterisierung zellulärer Interaktionspartner des großen Hüllproteins des Hepatitis B - Virus. Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz.
- Bagola, K.; Mehnert, M.; Jarosch, E.; Sommer, T.** (2011): Protein dislocation from the ER. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* Mar;1808(3):925-36. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.06.025.
- Baines, A. C.; Adams, E. J.; Zhang, B.; Ginsburg, D.** (2013): Disruption of the Sec24d Gene Results in Early Embryonic Lethality in the Mouse. In: *PLoS One* Apr 15;8(4):e61114. doi: 10.1371/journal.pone.0061114.
- Bannykh, S.; Rowe, T.; Balch, W. E.** (1996): The organization of endoplasmic reticulum export complexes. In: *Journal of Cell Biology* Oct;135(1):19-35.
- Bardens, A.; Döring, T.; Stieler, J.; Prange, R.** (2011): Alix regulates egress of hepatitis B virus naked capsid particles in an ESCRT-independent manner. In: *Cellular Microbiology* Apr;13(4):602-19. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01557.x.
- Barlowe, C.** (1995): COPII: a membrane coat that forms endoplasmic reticulum-derived vesicles. In: *FEBS Letters* Aug 1;369(1):93-6.

- Barlowe, C.; Orci, L.; Yeung, T.; Hosobuchi, M.; Hamamoto, S.; Salama, N. et al.** (1994): COPII: A membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. In: *Cell* Jun 17;77(6):895-907.
- Bartusch, C.** (2018): Virus-Wirt-Interaktionen während der Morphogenese des Murinen Leukämievirus und des humanen Hepatitis-B-Virus: Die Rollen zellulärer ESCRT- und Rab-Proteine. Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz.
- Bartusch, C.; Prange, R.** (2016): ESCRT Requirements for Murine Leukemia Virus Release. In: *Viruses* Apr 18;8(4):103. doi: 10.3390/v8040103.
- Benedicto, I.; Gondar, V.; Molina-Jiménez, F.; García-Buey, L.; López-Cabrera, M.; Gastamminza, P.; Majano, P. L.** (2015): Clathrin mediates infectious hepatitis C virus particle egress. In: *Journal of Virology* Apr;89(8):4180-90. doi: 10.1128/JVI.03620-14.
- Bermejo, M. K.; Milenkovic, M.; Salahpour, A.; Ramsey, A. J.** (2014): Preparation of synaptic plasma membrane and postsynaptic density proteins using a discontinuous sucrose gradient. In: *Journal of visualized experiments* Sep 3;(91):e51896. doi: 10.3791/51896.
- Bi, X.; Corpina, R. A.; Goldberg, J.** (2002): Structure of the Sec23/24–Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. In: *Nature* Sep 19;419(6904):271-7.
- Bichko, V. V.; Khudyakov, Y. E.; Taylor, J. M.** (1996): A novel form of hepatitis delta antigen. In: *Journal of Virology* May;70(5):3248-51.
- Bielli, A.; Haney, C. J.; Gabreski, G.; Watkins, S. C.; Bannykh, S. I.; Aridor, M.** (2005): Regulation of Sar1 NH2 terminus by GTP binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control COPII vesicle fission. In: *Journal of Cell Biology* Dec 19;171(6):919-24.
- Blanchet, M.; Sureau, C.** (2006): Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. In: *Journal of Virology* Dec;80(24):11935-45.
- Blank, A.; Markert, C.; Hohmann, N.; Carls, A.; Mikus, G.; Lehr, T. et al.** (2016): First-in-human application of the novel hepatitis B and hepatitis D virus entry inhibitor myrcludex B. In: *Journal of Hepatology* Sep;65(3):483-9. doi: 10.1016/j.jhep.2016.04.013.
- Bleck, M.; Itano, M. S.; Johnson, D. S.; Thomas, V. K.; North, A. J.; Bieniasz, P. D.; Simon, S. M.** (2014): Temporal and spatial organization of ESCRT protein recruitment during HIV-1 budding. In: *PNAS* Aug 19;111(33):12211-6. doi: 10.1073/pnas.1321655111.
- Blondot, M.; Bruss, V.; Kann, M.** (2016): Intracellular transport and egress of hepatitis B virus. In: *Journal of Hepatology* Apr;64(1 Suppl):S49-S59. doi: 10.1016/j.jhep.2016.02.008.
- Blumberg, B. S.; Sutnick, A. I.; London, W. T.; Millman, I.** (1970): Australia antigen and hepatitis. In: *The New England Journal of Medicine* Aug 13;283(7):349-54.
- Bonino, F.; Hoyer, B.; Ford, E.; Shih, J. W.; Purcell, R. H.; Gerin, J. L.** (1981): The delta agent: HBsAg particles with delta antigen and RNA in the serum of an HBV carrier. In: *Hepatology* Mar-Apr;1(2):127-31.

- Bruss, V.** (1997): A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. In: *Journal of Virology* Dec;71(12):9350-7.
- Bruss, V.** (2004): Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. In: *Virus Research* Dec;106(2):199-209.
- Bruss, V.** (2007): Hepatitis B virus morphogenesis. In: *World Journal of Gastroenterology* Jan 7;13(1):65-73.
- Bruss, V.; Lu, X.; Thomssen, R.; Gerlich, W. H.** (1994): Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. In: *The EMBO Journal* May 15;13(10):2273-9.
- Cai, H.; Yu, S.; Menon, S.; Cai, Y.; Lazarova, D.; Fu, C. et al.** (2007): TRAPPI tethers COPII vesicles by binding the coat subunit Sec23. In: *Nature* Feb 22;445(7130):941-4.
- Caillat, C.; Maity, S.; Miguet, N.; Roos, W. H.; Weissenhorn, W.** (2019): The role of VPS4 in ESCRT-III polymer remodeling. In: *Biochemical Society Transactions* Feb 28;47(1):441-448. doi: 10.1042/BST20180026.
- Carlson, L. A.; Hurley, J. H.** (2012): In vitro reconstitution of the ordered assembly of the endosomal sorting complex required for transport at membrane-bound HIV-1 Gag clusters. In: *PNAS* Oct 16;109(42):16928-33. doi: 10.1073/pnas.1211759109.
- Cervera, L.; Gòdia, F.; Tarrés-Freixas, F.; Aquilar-Gurrieri, C.; Carrillo, J.; Blanco, J.; Gutiérrez-Granados, S.** (2019): Production of HIV-1-based virus-like particles for vaccination: achievements and limits. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* Sep;103(18):7367-7384. doi: 10.1007/s00253-019-10038-3.
- Chain, B. M.; Myers, R.** (2005): Variability and conservation in hepatitis B virus core protein. In: *BMC Microbiology* May 27;5:33.
- Chao, M.; Hsieh, S. Y.; Taylor, J.** (1990): Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. In: *Journal of Virology* Oct;64(10):5066-9.
- Chao, M.; Lin, C.; Lin, F.; Li, H.; lang, S.** (2015): Whole-genome analysis of genetic recombination of hepatitis delta virus: molecular domain in delta antigen determining trans-activating efficiency. In: *Journal of General Virology* Dec;96(12):3460-9.
- Chen, Y. H.; Wu, J. C.; Wang, K. C.; Chiang, Y. W.; Lai, C. W.; Chung, Y. C.; Hu, Y. C.** (2005): Baculovirus-mediated production of HDV-like particles in BHK cells using a novel oscillating bioreactor. In: *Journal of Biotechnology* Aug 4;118(2):135-47.
- Chioran, A.; Duncan, S.; Catalano, A.; Brown, T. J.; Ringuette, M. J.** (2017): Collagen IV trafficking: The inside-out and beyond story. In: *Developmental Biology* Nov 15;431(2):124-133. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.09.037.
- Chou, S. F.; Tsai, M. L.; Huang, J. Y.; Chang, Y. S.; Shih, C.** (2015): The Dual Role of an ESCRT-0 Component HGS in HBV Transcription and Naked Capsid Secretion. In: *PLOS Pathogens* Oct 2;11(10):e1005123. doi: 10.1371/journal.ppat.1005123.

- Christ, L.; Raiborg, C.; Wenzel, E. M.; Campsteijn, C.; Stenmark, H.** (2017): Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery. In: *Trends in Biochemical Sciences* Jan;42(1):42-56. doi: 10.1016/j.tibs.2016.08.016.
- Christ, L.; Wenzel, E. M.; Liestol, K.; Raiborg, C.; Campsteijn, C.; Stenmark, H.** (2016): ALIX and ESCRT-I/II function as parallel ESCRT-III recruiters in cytokinetic abscission. In: *Journal of Cell Biology* Feb 29;212(5):499-513. doi: 10.1083/jcb.201507009.
- Clayton, D. A.; Shadel, G. S.** (2014): Purification of mitochondria by sucrose step density gradient centrifugation. In: *Cold Spring Harbor Protocols* Oct 1;2014(10):pdb.prot080028. doi: 10.1101/pdb.prot080028.
- Cornberg, M.; Wong, V. W.; Locarnini, S.; Brunetto, M.; Janssen, H. L.A.; Chan, H. L.** (2017): The role of quantitative hepatitis B surface antigen revisited. In: *Journal of Hepatology* Feb;66(2):398-411. doi: 10.1016/j.jhep.2016.08.009.
- Craene, J. de; Bertazzi, D. L.; Bär, S.; Friant, S.** (2017): Phosphoinositides, Major Actors in Membrane Trafficking and Lipid Signaling Pathways. In: *International Journal of Molecular Sciences* Mar 15;18(3). pii: E634. doi: 10.3390/ijms18030634.
- Crowther, R. A.; Pinch, J. T.; Pearse, B. M.** (1976): On the structure of coated vesicles. In: *Journal of molecular biology* Jun 5;103(4):785-98.
- Cutrona, M. B.; Beznoussenko, G. V.; Fusella, A.; Martella, O.; Moral, P.; Mironov, A. A.** (2013): Silencing of mammalian Sar1 isoforms reveals COPII-independent protein sorting and transport. In: *Traffic* Jun;14(6):691-708. doi: 10.1111/tra.12060.
- Dacks, J. B.; Robinson, M. S.** (2017): Outerwear through the ages: evolutionary cell biology of vesicle coats. In: *Current Opinion in Cell Biology* Aug;47:108-116. doi: 10.1016/j.ceb.2017.04.001.
- D'Arcangelo, J. G.; Stahmer, K. R.; Miller, E. A.** (2013): Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* Nov;1833(11):2464-72. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.02.003.
- Dastgerdi, E. S.; Herbers, U.; Tacke, F.** (2012): Molecular and clinical aspects of hepatitis D virus infections. In: *World Journal of Virology* Jun 12;1(3):71-8. doi: 10.5501/wjv.v1.i3.71.
- Denolly, S.; Mialon, C.; Bourlet, T.; Amirache, F.; Penin, F.; Lindenbach, B. et al.** (2017): The amino-terminus of the hepatitis C virus (HCV) p7 viroporin and its cleavage from glycoprotein E2-p7 precursor determine specific infectivity and secretion levels of HCV particle types. In: *PLOS Pathogens* Dec 18;13(12):e1006774. doi: 10.1371/journal.ppat.1006774.
- Diao, Z.; Ding, J.; Yin, C.; Wang, L.; Liu, W.** (2013): Purified hepatitis B virus induces human mesangial cell proliferation and extracellular matrix expression in vitro. In: *Virology Journal* Oct 4;10:300. doi: 10.1186/1743-422X-10-300.
- Döring, T.; Zeyen, L.; Bartusch, C.; Prange, R.** (2018): Hepatitis B Virus Subverts the Autophagy Elongation Complex Atg5-12/16L1 and Does Not Require Atg8/LC3 Lipidation for Viral Maturation. In: *Journal of Virology* Mar 14;92(7). pii: e01513-17. doi: 10.1128/JVI.01513-17.

- Douam, F.; Lavillette, D.; Cosset, F.** (2015): The mechanism of HCV entry into host cells. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 129:63-107. doi: 10.1016/bs.pmbts.2014.10.003.
- Dutta, D.; Williamson, C. D.; Cole, N. B.; Donaldson, J. G.** (2012): Pitstop 2 is a potent inhibitor of clathrin-independent endocytosis. In: *PLoS One* 7(9):e45799. doi: 10.1371/journal.pone.0045799.
- Eddleston, A.** (1990): Modern vaccines. Hepatitis. In: *The Lancet* May 12;335(8698):1142-5.
- Eller, C.; Heydmann, L.; Colpitts, C. C.; Verrier, E. R.; Schuster, C.; Baumert, T. F.** (2018): The functional role of sodium taurocholate cotransporting polypeptide NTCP in the life cycle of hepatitis B, C and D viruses. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* Nov;75(21):3895-3905. doi: 10.1007/s00018-018-2892-y.
- Farci, P.; Niro, G. A.** (2012): Clinical Features of Hepatitis D. In: *Seminars in Liver Disease* Aug;32(3):228-36. doi: 10.1055/s-0032-1323628.
- Freitas, N.; Cunha, C.; Menne, S.; Gudima, S. O.** (2014): Envelope proteins derived from naturally integrated hepatitis B virus DNA support assembly and release of infectious hepatitis delta virus particles. In: *Journal of Virology* May;88(10):5742-54. doi: 10.1128/JVI.00430-14.
- Fromme, J. C.; Orci, L.; Schekman, R.** (2008): Coordination of COPII vesicle trafficking by Sec23. In: *Trends in Cell Biology* Jul;18(7):330-6. doi: 10.1016/j.tcb.2008.04.006.
- Ganem, D.** (1991): Assembly of Hepadnaviral Virions and Subviral Particles. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology* 168:61-83.
- Gatta, A. T.; Carlton, J. G.** (2019): The ESCRT-machinery: closing holes and expanding roles. In: *Current Opinion in Cell Biology* Aug;59:121-132. doi: 10.1016/j.ceb.2019.04.005.
- Gehring, A.; Bertoletti, A.; Tavis, J. E.** (2014): Host Factor-Targeted Hepatitis B Virus Therapies. In: *Intervirology* 57(3-4):158-62. doi: 10.1159/000360938.
- Geier, A.; Martin, IV; Dietrich, C. G.; Balasubramaniyan, N.; Strauch, S.; Suchy, F. J. et al.** (2008): Hepatocyte nuclear factor-4 α is a central transactivator of the mouse Ntcp gene. In: *American Journal of Physiology* Aug;295(2):G226-33. doi: 10.1152/ajpgi.00012.2008.
- Gerin, J. L.; Ford, E. C.; Purcell, R. H.** (1975): Biochemical characterization of Australia antigen. Evidence for defective particles of hepatitis B virus. In: *The American Journal of Pathology* Dec;81(3):651-68.
- Gerlich, W. H.** (2013): Medical Virology of Hepatitis B: how it began and where we are now. In: *Virology Journal* Jul 20;10:239. doi: 10.1186/1743-422X-10-239.
- Gerlich, W. H.** (2015): Prophylactic vaccination against hepatitis B: achievements, challenges and perspectives. In: *Medical Microbiology and Immunology* Feb;204(1):39-55. doi: 10.1007/s00430-014-0373-y.
- Giersch, K.; Dandri, M.** (2015): Hepatitis B and Delta Virus: Advances on Studies about Interactions between the Two Viruses and the Infected Hepatocyte. In: *Journal of Clinical and Translational Hepatology* Sep 28;3(3):220-9. doi: 10.14218/JCTH.2015.00018.

- Gilbert, R. J.C.; Beales, L.; Blond, D.; Simon, M. N.; Lin, B. Y.; Chisari, F. V. et al.** (2005): Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral. In: *PNAS* Oct 11;102(41):14783-8.
- Giordano, F.** (2018): Non-vesicular lipid trafficking at the endoplasmic reticulum–mitochondria interface. In: *Biochemical Society Transactions* Apr 17;46(2):437-452. doi: 10.1042/BST20160185.
- Giraud, C. G.; Maccioni, H. J.** (2003): Endoplasmic reticulum export of glycosyltransferases depends on interaction of a cytoplasmic dibasic motif with Sar1. In: *Molecular Biology of the Cell* Sep;14(9):3753-66.
- Glebe, D.; Urban, S.** (2007): Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. In: *World Journal of Gastroenterology* Jan 7;13(1):22-38.
- Glenn, J. S.; Watson, J. A.; Havel, C. M.; White, J. M.** (1992): Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. In: *Science* May 29;256(5061):1331-3.
- Goyal, A.; Murray, J. M.** (2016): Dynamics of in vivo hepatitis D virus infection. In: *Journal of Theoretical Biology* Jun 7;398:9-19. doi: 10.1016/j.jtbi.2016.03.018.
- Graham, J. M.** (2002): OptiPrep density gradient solutions for mammalian organelles. In: *The Scientific World Journal* May 29;2:1440-3.
- Graham, J. M.** (2015): Fractionation of Subcellular Organelles. In: *Current Protocols in Cell Biology* Dec 1;69:3.1.1-22. doi: 10.1002/0471143030.cb0301s69.
- Greco-Stewart, V.; Pelchat, M.** (2010): Interaction of Host Cellular Proteins with Components of the Hepatitis Delta Virus. In: *Viruses* Jan;2(1):189-212. doi: 10.3390/v2010189.
- Griffin, B. L.; Chasovskikh, S.; Dritschilo, A.; Casey, J. L.** (2014): Hepatitis delta antigen requires a flexible quasi-double-stranded RNA structure to bind and condense hepatitis delta virus RNA in a ribonucleoprotein complex. In: *Journal of Virology* Jul;88(13):7402-11. doi: 10.1128/JVI.00443-14.
- Gudima, S.; Chang, J.; Moraleda, G.; Azvolinsky, A.; Taylor, J.** (2002): Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA. In: *Journal of Virology* Apr;76(8):3709-19.
- Guo, J.; Pugh, J. C.** (1997): Topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus suggests a mechanism for membrane translocation during particle morphogenesis. In: *Journal of Virology* Feb;71(2):1107-14.
- Guo, W. N.; Zhu, B.; Ai, L.; Yang, D. L.; Wang, B. J.** (2018): Animal models for the study of hepatitis B virus infection. In: *Zoological Research* Jan 18;39(1):25-31. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2018.013.
- Gürkan, C.; Stagg, S. C.; LaPointe, P.; Balch, W. E.** (2006): The COPII cage: unifying principles of vesicle coat assembly. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Oct;7(10):727-38.
- Hadler, S. C.; Monzon, M. de; Ponzetto, A.; Anzola, E.; Rivero, D.; Mondolfi, A. et al.** (1984): Delta Virus Infection and Severe Hepatitis: An Epidemic in the Yucpa Indians of Venezuela. In: *Annals of Internal Medicine* Mar;100(3):339-44.

- Hartmann-Stühler, C.; Prange, R.** (2001): Hepatitis B virus large envelope protein interacts with gamma2-adaptin, a clathrin adaptor-related protein. In: *Journal of Virology* Jun;75(11):5343-51.
- Helenius, A.; Kartenbeck, J.; Simons, K.; Fries, E.** (1980): On the entry of semliki forest virus into BHK-21 cells. In: *Journal of Cell Biology* 84 (2): 404.
- Henne, W. M.; Buchkovich, N. J.; Emr, S. D.** (2011): The ESCRT Pathway. In: *Developmental Cell* Jul 19;21(1):77-91. doi: 10.1016/j.devcel.2011.05.015.
- Hill, E.; Olusanya, O.; van der Kaay, J.; Downes, C. P.; Andrews, P. D.; Swedlow, JR; Smythe, E.** (2001): Regulation of clathrin-coated vesicle formation. In: *Biochemical Society Transactions* Aug;29(Pt 4):375-7.
- Hirsch, R. C.; Lavine, J. E.; Chang, L.; Varmus, H. E.; Ganem, D.** (1990): Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. In: *Nature* Apr 5;344(6266):552-5.
- Hoffmann, J.; Boehm, C.; Himmelsbach, K.; Donnerhak, C.; Roettger, H.; Weiss, T. S. et al.** (2013): Identification of α -taxilin as an essential factor for the life cycle of hepatitis B virus. In: *Journal of Hepatology* Nov;59(5):934-41. doi: 10.1016/j.jhep.2013.06.020.
- Hourieux, C.; Touzé, A.; Coursaget, P.; Roingeard, P.** (2000): DNA-containing and empty hepatitis B virus core particles bind similarly to envelope protein domains. In: *Journal of General Virology* Apr;81(Pt 4):1099-101.
- Hsu, V. W.; Lee, S. Y.; Yang, J. S.** (2009): The evolving understanding of COPI vesicle formation. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* May;10(5):360-4. doi: 10.1038/nrm2663.
- Hu, B.; Jiang, D.; Chen, Y.; Wei, L.; Zhang, S.; Zhao, F, Ni, R et al.** (2015): High CHMP4B expression is associated with accelerated cell proliferation and resistance to doxorubicin in hepatocellular carcinoma. In: *Tumor Biology* Apr;36(4):2569-81. doi: 10.1007/s13277-014-2873-1.
- Hu, J.; Liu, K.** (2017): Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles: Formation, Function, and Application. In: *Viruses* Mar 21;9(3). pii: E56. doi: 10.3390/v9030056.
- Huang, C.; Chang, S. C.; Yang, H. C.; Chien, C. L.; Chang, M. F.** (2009): Clathrin-mediated post-Golgi membrane trafficking in the morphogenesis of hepatitis delta virus. In: *Journal of Virology* Dec;83(23):12314-24. doi: 10.1128/JVI.01044-09.
- Huang, C.; Chang, S. C.; Yu, IC, Tsay, YG; Chang, M. F.** (2007): Large hepatitis delta antigen is a novel clathrin adaptor-like protein. In: *Journal of Virology* Jun;81(11):5985-94.
- Huang, H.; Lee, C.; Liu, H.; Chang, M.; Lai, Y.; Lee, Y.; Huang, C.** (2016): Cellular Nuclear Export Factors TAP and Aly Are Required for HDAG-L-mediated Assembly of Hepatitis Delta Virus. In: *Journal of Biological Chemistry* Dec 9;291(50):26226-26238.
- Huang, H.; Lu, H.; Lai, Y.; Lee, C.; Liu, H.; Huang, C.** (2018): Tat-enhanced delivery of the C terminus of HDAG-L inhibits assembly and secretion of hepatitis D virus. In: *Antiviral Research* Feb;150:69-78. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.12.009.

- Huang, H. C.; Chen, C. C.; Chang, W.; Tao, M.; Huang, C.** (2012): Entry of Hepatitis B Virus into Immortalized Human Primary Hepatocytes by Clathrin-Dependent Endocytosis. In: *Journal of Virology* Sep;86(17):9443-53. doi: 10.1128/JVI.00873-12.
- Huovilla, A. P.; Am Eder; Fuller, S. D.** (1992): Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. In: *Journal of Cell Biology* Sep;118(6):1305-20.
- Ishida, Y.; Yamasaki, C.; Yanagi, A.; Yoshizane, Y.; Fujikawa, K.; Watashi, K. et al.** (2015): Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. In: *The American Journal of Pathology* May;185(5):1275-85. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.01.028.
- Jayan, G. C.; Casey, J. L.** (2002): Inhibition of Hepatitis Delta Virus RNA Editing by Short Inhibitory RNA-Mediated Knockdown of ADAR1 but Not ADAR2 Expression. In: *Journal of Virology* Dec;76(23):12399-404.
- Jenna, S.; Sureau, C.** (1999): Mutations in the carboxyl-terminal domain of the small hepatitis B virus envelope protein impair the assembly of hepatitis delta virus particles. In: *Journal of Virology* Apr;73(4):3351-8.
- Jensen, D.; Schekman, R.** (2011): COPII-mediated vesicle formation at a glance. In: *Journal of Cell Science* Jan 1;124(Pt 1):1-4. doi: 10.1242/jcs.069773.
- Jiang, B.; Himmelsbach, K.; Ren, H.; Boller, K.; Hildt, E.** (2015): Subviral Hepatitis B Virus Filaments, like Infectious Viral Particles, Are Released via Multivesicular Bodies. In: *Journal of Virology* Dec 30;90(7):3330-41. doi: 10.1128/JVI.03109-15.
- Johannsdottir, H. K.; Mancini, R.; Kartenbeck, J.; Amato, L.; Helenius, A.** (2009): Host Cell Factors and Functions Involved in Vesicular Stomatitis Virus Entry. In: *Journal of Virology* Jan;83(1):440-53. doi: 10.1128/JVI.01864-08.
- Johnston, J. A.; Ward, C. L.; Kopito, R. R.** (1998): Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. In: *Journal of Cell Biology* Dec 28;143(7):1883-98.
- Julithe, R.; Abou-Jaoudé, G.; Sureau, C.** (2014): Modification of the hepatitis B virus envelope protein glycosylation pattern interferes with secretion of viral particles, infectivity, and susceptibility to neutralizing antibodies. In: *Journal of Virology* Aug;88(16):9049-59. doi: 10.1128/JVI.01161-14.
- Jürgens, M. C.; Vörös, J.; Rautureau, G. J.; Shepherd, D. A.; Pye, V. E.; Muldoon, J. et al.** (2013): The hepatitis B virus preS1 domain hijacks host trafficking proteins by motif mimicry. In: *Nature Chemical Biology* Sep;9(9):540-7. doi: 10.1038/nchembio.1294.
- Kann, M.; Schmitz, A.; Rabe, B.** (2007): Intracellular transport of hepatitis B virus. In: *World Journal of Gastroenterology* Jan 7;13(1):39-47.
- Kelly, B. T.; Owen, D. J.** (2011): Endocytic sorting of transmembrane protein cargo. In: *Current Opinion in Cell Biology* Aug;23(4):404-12. doi: 10.1016/j.ceb.2011.03.004.
- Khoriaty, R.; Hesketh, G. G.; Bernard, A.; Weyand, A. C.; Mellacheruvu, D.; Zhu, G. et al.** (2018): Functions of the COPII gene paralogs SEC23A and SEC23B are interchangeable in vivo. In: *PNAS* Aug 14;115(33):E7748-E7757. doi: 10.1073/pnas.1805784115.
- Kirchhausen T** (2000): Clathrin. In: *Annual Review of Biochemistry* 69:699-727.

- Kirchhausen T** (2000): Three ways to make a vesicle. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Dec;1(3):187-98.
- Kirchhausen T; Harrison, S. C.** (1981): Protein organization in clathrin trimers. In: *Cell* Mar;23(3):755-61.
- Kirchhausen T; Owen, D.; Harrison, S. C.** (2014): Molecular Structure, Function, and Dynamics of Clathrin-Mediated Membrane Traffic. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* May 1;6(5):a016725. doi: 10.1101/cshperspect.a016725.
- Kleist, L. von; Stahlschmidt, W.; Bulut, H.; Gromova, K.; Puchkov, D.; Robertson, M. J. et al.** (2011): Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. In: *Cell* Aug 5;146(3):471-84. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.025.
- Kodera, C.; Yorimitsu, T.; Sato, K.** (2014): Sec23 Homolog Nel1 Is a Novel GTPase-activating Protein for Sar1 but Does Not Function as a Subunit of the Coat Protein Complex II (COPII) Coat. In: *Journal of Biological Chemistry* Aug 1;289(31):21423-32. doi: 10.1074/jbc.M114.553917.
- Komla-Soukha, I.; Sureau, C.** (2006): A Tryptophan-Rich Motif in the Carboxyl Terminus of the Small Envelope Protein of Hepatitis B Virus Is Central to the Assembly of Hepatitis Delta Virus Particles. In: *Journal of Virology* May;80(10):4648-55.
- Kosinska, A. D.; Liu, J.; Lu, M.; Roggendorf, M.** (2015): Therapeutic vaccination and immunomodulation in the treatment of chronic hepatitis B: preclinical studies in the woodchuck. In: *Medical Microbiology and Immunology* Feb;204(1):103-14. doi: 10.1007/s00430-014-0379-5.
- Kramvis, A.; Kew, M. C.** (1999): The core promoter of hepatitis B virus. In: *Journal of Viral Hepatitis* Nov;6(6):415-27.
- Krause, A.; Haberkorn, U.; Mier, W.** (2018): Strategies for the treatment of HBV/HDV. In: *European Journal of Pharmacology* Aug 15;833:379-391. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.06.030.
- Krepstakies, M.; Lucifora, J.; Nagel, C. H.; Zeisel, M. B.; Holstermann, B.; Hohenberg, H. et al.** (2012): A new class of synthetic peptide inhibitors blocks attachment and entry of human pathogenic viruses. In: *The Journal of Infectious Diseases* Jun;205(11):1654-64. doi: 10.1093/infdis/jis273.
- Kuge, O.; Dascher, C.; Orci, L.; Rowe, T.; Amherdt, M.; Plutner, H. et al.** (1994): Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments. In: *Journal of Cell Biology* Apr;125(1):51-65.
- Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P. D.** (2018): Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. In: *Cold Spring Harbor Protocols* Jun 1;2018(6). doi: 10.1101/pdb.prot095497.
- Kumichel, A.; Kapp, K.; Knust, E.** (2015): A Conserved Di-Basic Motif of Drosophila Crumbs Contributes to Efficient ER Export. In: *Traffic* Jun;16(6):604-16. doi: 10.1111/tra.12273.
- Laemmli, U. K.** (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. In: *Nature* Aug 15;227(5259):680-5.
- Lai, M. M.C.** (1995): The molecular biology of hepatitis delta virus. In: *Annual Review of Biochemistry* 64:259-86.

- Lambert, C.; Döring, T.; Prange, R.** (2007): Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. In: *Journal of Virology* Sep;81(17):9050-60.
- Lambert, C.; Mann, S.; Prange, R.** (2004): Assessment of determinants affecting the dual topology of hepadnaviral large envelope proteins. In: *Journal of General Virology* May;85(Pt 5):1221-5.
- Lambert, C.; Prange, R.** (2001): Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation. In: *Journal of Biological Chemistry* Jun 22;276(25):22265-72.
- Lambert, C.; Prange, R.** (2003): Chaperone action in the posttranslational topological reorientation of the hepatitis B virus large envelope protein: Implications for translocational regulation. In: *PNAS* Apr 29;100(9):5199-204.
- Lamontagne, R. J.; Bagga, S.; Bouchard, M. J.** (2016): Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. In: *Hepatoma Research* 2:163-186. doi: 10.20517/2394-5079.2016.05.
- Lanford, R. E.; Chavez, D.; Brasky, K. M.; Burns III; RB; Rico-Hesse, R.** (1998): Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. In: *PNAS* May 12;95(10):5757-61.
- Lauber, C.; Seitz, S.; Mattei, S.; Suh, A.; Beck, J.; Herstein, J. et al.** (2017): Deciphering the Origin and Evolution of Hepatitis B Viruses by Means of a Family of Non-enveloped Fish Viruses. In: *Cell Host & Microbe* Sep 13;22(3):387-399.e6. doi: 10.1016/j.chom.2017.07.019.
- Le Fourn, V.; Park, S.; Jang, I.; Gaplovska-Kysela, K.; Guhl, B.; Lee, Y. et al.** (2013): Large protein complexes retained in the ER are dislocated by non-COPII vesicles and degraded by selective autophagy. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* Jun;70(11):1985-2002. doi: 10.1007/s00018-012-1236-6.
- Lederkremer, G. Z.; Cheng, Y.; Petre, B. M.; Vogan, E.; Springer, S.; Schekman, R. et al.** (2001): Structure of the Sec23p/24p and Sec13p/31p complexes of COPII. In: *PNAS* Sep 11;98(19):10704-9.
- Lee, A. T.; Lee, C. G.** (2007): Oncogenesis and transforming viruses: the hepatitis B virus and hepatocellularcarcinoma--the etiopathogenic link. In: *Frontiers in Bioscience* Jan 1;12:234-45.
- Lee, M.C.S.; Miller, E. A.** (2007): Molecular mechanisms of COPII vesicle formation. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology* Aug;18(4):424-34.
- Lehmann, C.; Falk, J. J.; Büscher, N.; Penner, I.; Zimmermann, C.; Gogesch, P. et al.** (2019): Dense Bodies of a gH/gL/UL128/UL130/UL131 Pentamer-Repaired Towne Strain of Human Cytomegalovirus Induce an Enhanced Neutralizing Antibody Response. In: *Journal of Virology* Aug 13;93(17). pii: e00931-19. doi: 10.1128/JVI.00931-19.
- Lempp, F.; Urban, S.** (2016): Hepatitis delta virus: insights into a peculiar pathogen and novel treatment options. In: *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* Oct;13(10):580-9. doi: 10.1038/nrgastro.2016.126.
- Lev, S.** (2010): Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Oct;11(10):739-50. doi: 10.1038/nrm2971.

- Li, H.; Sheng, C.; Wang, S.; Yang, L.; Liang, Y.; Huang, Y. et al.** (2017): Removal of Integrated Hepatitis B Virus DNA Using CRISPR-Cas9. In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* Mar 22;7:91. doi: 10.3389/fcimb.2017.00091.
- Li, J.; Liu, Y.; Wang, Z.; Liu, K.; Wang, Y.; Liu, J. et al.** (2011): Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment. In: *Journal of Virology* Jul;85(13):6319-33. doi: 10.1128/JVI.02627-10.
- Li, W.** (2015): The hepatitis B virus receptor. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 31:125-47. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100814-125241.
- Li, W.; Urban, S.** (2016): Entry of hepatitis B and hepatitis D virus into hepatocytes: Basic insights and clinical implications. In: *Journal of Hepatology* Apr;64(1 Suppl):S32-S40. doi: 10.1016/j.jhep.2016.02.011.
- Liashkovich, I.; Pasrednik, D.; Prystopiuk, V.; Rosso, G.; Oberleithner, H.; Shahin, V.** (2015): Clathrin inhibitor Pitstop-2 disrupts the nuclear pore complex permeability barrier. In: *Scientific Reports* May 6;5:9994. doi: 10.1038/srep09994.
- Lin, B.; Anderson, D. A.** (2000): A Vestigial X Open Reading Frame in Duck Hepatitis B Virus. In: *Intervirology* 43(3):185-90.
- Lin, B. C.; Defenbaugh, D. A.; Casey, J. L.** (2010): Multimerization of hepatitis delta antigen is a critical determinant of RNA binding specificity. In: *Journal of Virology* Feb;84(3):1406-13. doi: 10.1128/JVI.01723-09.
- Lin, C.; Kao, J.** (2017): Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants. In: *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* Jun;31(3):249-255. doi: 10.1016/j.bpg.2017.04.010.
- Lin, C.; Lee, C.; Lin, S.; Huang, P.; Li, H.; Chang, Y. et al.** (2017): RNA recombination in Hepatitis delta virus: Identification of a novel naturally occurring recombinant. In: *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* Dec;50(6):771-780. doi: 10.1016/j.jmii.2015.10.013.
- Liu, Y.; Nie, H.; Mao, R.; Mitra, B.; Cai, D.; Yan, R. et al.** (2017): Interferon-inducible ribonuclease ISG20 inhibits hepatitis B virus replication through directly binding to the epsilon stem-loop structure of viral RNA. In: *PLOS Pathogens* Apr 11;13(4):e1006296. doi: 10.1371/journal.ppat.1006296.
- Löffler-Mary, H.; Dumortier, J.; Klentsch-Zimmer, C.; Prange, R.** (2000): Hepatitis B virus assembly is sensitive to changes in the cytosolic S loop of the envelope proteins. In: *Virology* May 10;270(2):358-67.
- Lord, C.; Bhandari, D.; Menon, S.; Ghassemian, M.; Nycz, D.; Hay, J. et al.** (2011): Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic. In: *Nature* May 12;473(7346):181-6. doi: 10.1038/nature09969.
- Lucifora, J.; Protzer, U.** (2016): Attacking hepatitis B virus cccDNA – The holy grail to hepatitis B cure. In: *Journal of Hepatology* Apr;64(1 Suppl):S41-S48. doi: 10.1016/j.jhep.2016.02.009.
- Lütgehetmann, M.; Mancke, L. V.; Volz, T.; Helbig, M.; Allweiss, L.; Bornscheuer, T. et al.** (2012): Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation. In: *Hepatology* Mar;55(3):685-94. doi: 10.1002/hep.24758.

- Macnaughton, T. B.; Lai, M. M.** (2002): Genomic but not antigenomic hepatitis delta virus RNA is preferentially exported from the nucleus immediately after synthesis and processing. In: *Journal of Virology* Apr;76(8):3928-35.
- Matsuoka, K.; Orci, L.; Amherdt, M.; Bednarek, S. Y.; Hamamoto, S.; Schekman, R.; Yeung, T.** (1998): COPII-Coated Vesicle Formation Reconstituted with Purified Coat Proteins and Chemically Defined Liposomes. In: *Cell* Apr 17;93(2):263-75.
- Maxfield, F. R.; Menon, A. K.** (2006): Intracellular sterol transport and distribution. In: *Current Opinion in Cell Biology* Aug;18(4):379-85.
- McCullough, J.; La Colf; Sundquist, W. I.** (2013): Membrane Fission Reactions of the Mammalian ESCRT Pathway. In: *Annual Review of Biochemistry* 82:663-92. doi: 10.1146/annurev-biochem-072909-101058.
- McNaughton, A.; D'Arienzo, V.; Ansari, M. A.; Lumley, S. F.; Littlejohn, M.; Revill, P. et al.** (2019): Insights From Deep Sequencing of the HBV Genome—Unique, Tiny, and Misunderstood. In: *Gastroenterology* Jan;156(2):384-399. doi: 10.1053/j.gastro.2018.07.058.
- Meng, W.; Bai, B.; Bai, Z.; Li, Y.; Yue, P.; Li, X.; Qiao, L.** (2016): The immunosuppression role of alpha-fetoprotein in human hepatocellular carcinoma. In: *Discovery Medicine* Jun;21(118):489-94.
- Mercer, J.; Schelhaas, M.; Helenius, A.** (2010): Virus Entry by Endocytosis. In: *Annual Review of Biochemistry* 79:803-33. doi: 10.1146/annurev-biochem-060208-104626.
- Miller, E. A.; Beilharz, T. H.; Malkus, P. N.; Lee, M. C.S.; Hamamoto, S.; Orci, L.; Schekman, R.** (2003): Multiple Cargo Binding Sites on the COPII Subunit Sec24p Ensure Capture of Diverse Membrane Proteins into Transport Vesicles. In: *Cell* Aug 22;114(4):497-509.
- Minarovits, J.; Niller, H. H.** (2019): Truncated oncoproteins of retroviruses and hepatitis B virus: A lesson in contrasts. In: *Infection, Genetics and Evolution* Sep;73:342-357. doi: 10.1016/j.meegid.2019.05.020.
- Mitra, B.; Thapa, R. J.; Guo, H.; Block, T. M.** (2018): Host functions used by hepatitis B virus to complete its life cycle: Implications for developing host-targeting agents to treat chronic hepatitis B. In: *Antiviral Research* Oct;158:185-198. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.08.014.
- Mohsen, M. O.; Zha, L.; Cabral-Miranda, G.; Bachmann, M. F.** (2017): Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. In: *Seminars in Immunology* Dec;34:123-132. doi: 10.1016/j.smim.2017.08.014.
- Morita, E.** (2012): Differential requirements of mammalian ESCRTs in multivesicular body formation, virus budding and cell division. In: *The Febs Journal* Apr;279(8):1399-406. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08534.x.
- Morita, E.; Sandrin, V.; McCullough, J.; Katsuyama, A.; Hamilton, I. B.; Sundquist, W. I.** (2011): ESCRT-III Protein Requirements for HIV-1 Budding. In: *Cell Host & Microbe* Mar 17;9(3):235-242. doi: 10.1016/j.chom.2011.02.004.
- Moyo, B.; Bloom, K.; Scott, T.; Ely, A.; Arbuthnot, P.** (2018): Advances with using CRISPR/Cas-mediated gene editing to treat infections with hepatitis B virus and hepatitis C virus. In: *Virus Research* Jan 15;244:311-320. doi: 10.1016/j.virusres.2017.01.003.

- Musacchio, A.; Smith, C. J.; Am Roseman; Harrison, S. C.; Kirchhausen T; Pearse, B. M.F.** (1999): Functional Organization of Clathrin in Coats: Combining Electron Cryomicroscopy and X-Ray Crystallography. In: *Molecular Cell Jun*;3(6):761-70.
- Nagashima, S.; Jirintai, S.; Takahashi, M.; Kobayashi, T.; Tanggis, Nishizawa, T.; Kouki, T. et al.** (2014): Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. In: *Journal of General Virology Oct*;95(Pt 10):2166-75. doi: 10.1099/vir.0.066910-0.
- Nasukawa, T.; Uchiyama, J.; Taharaguchi, S.; Ota, S.; Ujihara, T.; Matsuzaki, S. et al.** (2017): Virus purification by CsCl density gradient using general centrifugation. In: *Archives of Virology Nov*;162(11):3523-3528. doi: 10.1007/s00705-017-3513-z.
- Nguyen, D. H.; Ludgate, L.; Hu, J.** (2008): Hepatitis B Virus-Cell Interactions and Pathogenesis. In: *Journal of Cellular Physiology Aug*;216(2):289-94. doi: 10.1002/jcp.21416.
- Ni, Y.; Lempp, FA.; Mehrle, S.; Nkongolo, S.; Kaufman, C.; Fälth, M. et al.** (2014): Hepatitis B and D Viruses Exploit Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide for Species-Specific Entry into Hepatocytes. In: *Gastroenterology Apr*;146(4):1070-83. doi: 10.1053/j.gastro.2013.12.024.
- Nishimura, N.; Balch, W. E.** (1997): A Di-Acidic Signal Required for Selective Export from the Endoplasmic Reticulum. In: *Science Jul 25*;277(5325):556-8.
- Niu, X.; Hong, J.; Zheng, X.; Melville, D. B.; Knapik, E. W.; Meng, A.; Peng, J.** (2014): The Nuclear Pore Complex Function of Sec13 Protein Is Required for Cell Survival during Retinal Development. In: *Journal of Biological Chemistry Apr 25*;289(17):11971-85. doi: 10.1074/jbc.M114.547190.
- Nufer, O.; Guldbrandsen, S.; Degen, M.; Kappeler, F.; Paccaud, J. P.; Tani, K.; Hauri, H. P.** (2002): Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export. In: *Journal of Cell Science Feb 1*;115(Pt 3):619-28.
- Okamoto, Y.; Bernstein, J. D.; Shikano, S.** (2013): Role of C-terminal membrane-proximal basic residues in cell surface trafficking of HIV coreceptor GPR15 protein. In: *Journal of Biological Chemistry Mar 29*;288(13):9189-99. doi: 10.1074/jbc.M112.445817.
- Olmos, Y.; Hodgson, L.; Mantell, J.; Verkade, P.; Carlton, J. G.** (2015): ESCRT-III controls nuclear envelope reformation. In: *Nature Jun 11*;522(7555):236-9. doi: 10.1038/nature14503.
- Pagant, S.; Wu, A.; Edwards, S.; Diehl, F.; Miller, EA.** (2015): Sec24 Is a Coincidence Detector that Simultaneously Binds Two Signals to Drive ER Export. In: *Current Biology Feb 16*;25(4):403-12. doi: 10.1016/j.cub.2014.11.070.
- Paran, N.; Geiger, B.; Shaul, Y.** (2001): HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment. In: *The EMBO Journal Aug 15*;20(16):4443-53.
- Pascarella, S.; Negro, F.** (2010): Hepatitis D virus: an update. In: *Liver International Jan*;31(1):7-21. doi: 10.1111/j.1478-3231.2010.02320.x.
- Patient, R.; Hourieux, C.; Roingeard, P.** (2009): Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. In: *Cellular Microbiology Nov*;11(11):1561-70. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01363.x.

- Patient, R.; Hourieux, C.; Sizaret, P.; Trassard, S.; Sureau, C.; Roingeard, P.** (2007): Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. In: *Journal of Virology* Apr;81(8):3842-51.
- Pearse, B. M.** (1975): Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. In: *Journal of molecular biology* Sep 5;97(1):93-8.
- Peiffer, K.; Kuhnenn, L.; Jiang, B.; Mondorf, A.; Vermehren, J.; Knop, V. et al.** (2018): Divergent preS Sequences in Virion-Associated Hepatitis B Virus Genomes and Subviral HBV Surface Antigen Particles From HBV e Antigen-Negative Patients. In: *The Journal of Infectious Diseases* Jun 5;218(1):114-123. doi: 10.1093/infdis/jiy119.
- Perez-Vargas, J.; Amirache, F.; Boson, B.; Mialon, C.; Freitas, N.; Sureau, C. et al.** (2019): Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo. In: *Nature Communications* May 8;10(1):2098. doi: 10.1038/s41467-019-10117-z.
- Perlman, D.; Hu, J.** (2003): Duck hepatitis B virus virion secretion requires a double-stranded DNA genome. In: *Journal of Virology* Feb;77(3):2287-94.
- Pollard, E. C.; Grady, L. J.** (1967): CsCl density gradient centrifugation studies of intact bacterial cells. In: *Biophysical Journal* Mar;7(2):205-13.
- Ponzetto, A.; Cote, P. J.; Popper, H.; Hoyer, B. H.; London, W. T.; Ford, E. C. et al.** (1984): Transmission of the hepatitis B virus-associated delta agent to the eastern woodchuck. In: *PNAS* Apr;81(7):2208-12.
- Prange, R.** (2012): Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. In: *Medical Microbiology and Immunology* Nov;201(4):449-61. doi: 10.1007/s00430-012-0267-9.
- Prange, R.; Streeck, R. E.** (1995): Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. In: *The EMBO Journal* Jan 16;14(2):247-56.
- Prange, R.; Werr, M.; Löffler-Mary, H.** (1999): Chaperones involved in hepatitis B virus morphogenesis. In: *Biological Chemistry* Mar;380(3):305-14.
- Price, J.** (2014): An update on hepatitis B, D, and E viruses. In: *Topics in Antiviral Medicine* Jan;21(5):157-63.
- Prinz, W. A.** (2007): Non-vesicular sterol transport in cells. In: *Progress in Lipid Research* Nov;46(6):297-314.
- Raiborg, C.; Stenmark, H.** (2009): The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. In: *Nature* Mar 26;458(7237):445-52. doi: 10.1038/nature07961.
- Rall, L. B.; Standring, D. N.; Laub, O.; Rutter, W. J.** (1983): Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II. In: *Molecular and Cellular Biology* Oct;3(10):1766-73.
- Raote, I.; Bellido, M. O.; Pirozzi, M.; Zhang, C.; Melville, D.; Parashuraman, S. et al.** (2017): TANGO1 assembles into rings around COPII coats at ER exit sites. In: *Journal of Cell Biology* Apr 3;216(4):901-909. doi: 10.1083/jcb.201608080.

- Raymond, C. K.; Howald-Stevenson, I.; Vater, C. A.; Stevens, T. H.** (1992): Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. In: *Molecular Biology of the Cell* Dec;3(12):1389-402.
- Rizzetto, M.** (2009): Hepatitis D: Thirty years after. In: *Journal of Hepatology* May;50(5):1043-50. doi: 10.1016/j.jhep.2009.01.004.
- Rizzetto, M.** (2016): The adventure of delta. In: *Liver International* Jan;36 Suppl 1:135-40. doi: 10.1111/liv.13018.
- Rizzetto, M.; Canese, M. G.; Aricò, S.; Crivelli, O.; Trepo, C.; Bonino, F.; Verme, G.** (1977): Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. In: *Gut* Dec;18(12):997-1003.
- Roberg, K. J.; Crotwell, M.; Espenshade, P.; Gimeno, R.; Kaiser, C. A.** (1999): LST1 Is a SEC24 Homologue Used for Selective Export of the Plasma Membrane ATPase from the Endoplasmic Reticulum. In: *Journal of Cell Biology* May 17;145(4):659-72.
- Robinson, D. G.; Pimpl, P.** (2014): Clathrin and post-Golgi trafficking: a very complicated issue. In: *Trends in Plant Science* Mar;19(3):134-9. doi: 10.1016/j.tplants.2013.10.008.
- Robinson, M. S.** (2015): Forty Years of Clathrin-coated Vesicles. In: *Traffic* Dec;16(12):1210-38. doi: 10.1111/tra.12335.
- Romeo, R.; Del Ninno, E.; Rumi, M.; Russo, A.; Sangiovanni, A.; Franchis, R. de et al.** (2009): A 28-Year Study of the Course of Hepatitis Δ Infection: A Risk Factor for Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. In: *Gastroenterology* May;136(5):1629-38. doi: 10.1053/j.gastro.2009.01.052.
- Rost, M.; Mann, S.; Lambert, C.; Döring, T.; Thomé, N.; Prange, R.** (2006): Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation. In: *Journal of Biological Chemistry* Sep 29;281(39):29297-308.
- Rout, M. P.; Field, M. C.** (2017): The Evolution of Organellar Coat Complexes and Organization of the Eukaryotic Cell. In: *Annual Review of Biochemistry* Jun 20;86:637-657. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044643.
- Rust, M. J.; Lakadamyali, M.; Zhang, F.; Zhuang, X.** (2004): Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. In: *Nature Structural & Molecular Biology* Jun;11(6):567-73.
- Ryu, W. S.; Bayer, M.; Taylor, J.** (1992): Assembly of hepatitis delta virus particles. In: *Journal of Virology* Apr;66(4):2310-5.
- Ryu, W. S.; Netter, H. J.; Bayer, M.; Taylor, J.** (1993): Ribonucleoprotein complexes of hepatitis delta virus. In: *Journal of Virology* Jun;67(6):3281-7.
- Saar, K.; Lindgren, M.; Hansen, M.; Eiríksdóttir, E.; Jiang, Y.; Rosenthal-Aizman, K. et al.** (2005): Cell-penetrating peptides: a comparative membrane toxicity study. In: *Analytical Biochemistry* Oct 1;345(1):55-65.
- Saito, K.; Chen, M.; Bard, F.; Chen, S.; Zhou, H.; Woodley, D. et al.** (2009): TANGO1 Facilitates Cargo Loading at Endoplasmic Reticulum Exit Sites. In: *Cell* Mar 6;136(5):891-902. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.025.

- Saito, K.; Maeda, M.; Katada, T.** (2017): Regulation of the Sar1 GTPase Cycle Is Necessary for Large Cargo Secretion from the Endoplasmic Reticulum. In: *Frontiers in Cell and Developmental Biology* Aug 23;5:75. doi: 10.3389/fcell.2017.00075.
- Saksena, S.; Emr, S. D.** (2009): ESCRTs and human disease. In: *Biochemical Society Transactions* Feb;37(Pt 1):167-72. doi: 10.1042/BST0370167.
- Sandrin, V.; Sundquist, W. I.** (2013): ESCRT requirements for EIAV budding. In: *Retrovirology* Oct 9;10:104. doi: 10.1186/1742-4690-10-104.
- Saracco, G.; Rosina, F.; Brunetto, Amoroso, P.; Caredda, F.; Farci, P. et al.** (1987): Rapidly progressive HBsAg-positive hepatitis in Italy: The role of hepatitis delta virus infection. In: *Journal of Hepatology* Dec;5(3):274-81.
- Saraste, J.; Lahtinen, U.; Goud, B.** (1995): Localization of the small GTP-binding protein rab1p to early compartments of the secretory pathway. In: *Journal of Cell Science* Apr;108 (Pt 4):1541-52.
- Sato, K.; Nakano, A.** (2007): Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. In: *FEBS Letters* May 22;581(11):2076-82.
- Schmid, S.** (1997): Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. In: *Annual Review of Biochemistry* 66:511-48.
- Schmidt, K.; Cavodeassi, F.; Feng, Y.; Stephens, D. J.** (2013): Early stages of retinal development depend on Sec13 function. In: *Biology Open* Mar 15;2(3):256-66. doi: 10.1242/bio.20133251.
- Schmidt, O.; Teis, D.** (2012): The ESCRT machinery. In: *Current Biology* Feb 21;22(4):R116-20. doi: 10.1016/j.cub.2012.01.028.
- Sevier, C. S.; Weisz, O. A.; Davis, M.; Machamer, C. E.** (2000): Efficient Export of the Vesicular Stomatitis Virus G Protein from the Endoplasmic Reticulum Requires a Signal in the Cytoplasmic Tail That Includes Both Tyrosine-based and Di-acidic Motifs. In: *Molecular Biology of the Cell* Jan;11(1):13-22.
- Shen, J.; Liu, Y.; Song, Y.; Li, L.; Duan, C.; Zhou, Y.; Ke, K.** (2015): CHMP4B, ESCRT-III associating protein, associated with neuronal apoptosis following intracerebral hemorrhage. In: *Brain Research* Feb 9;1597:1-13. doi: 10.1016/j.brainres.2014.11.043.
- Shih, H. H.; Jeng, K.; Syu, W.; Huang, Y.; Su, C.; Peng, W. et al.** (2008): Hepatitis B Surface Antigen Levels and Sequences of Natural Hepatitis B Virus Variants Influence the Assembly and Secretion of Hepatitis D Virus. In: *Journal of Virology* Mar;82(5):2250-64.
- Shirvani-Dastgerdi, E.; Tacke, F.** (2015): Molecular interactions between hepatitis B virus and delta virus. In: *World Journal of Gastroenterology* May 12;4(2):36-41. doi: 10.5501/wjv.v4.i2.36.
- Siegler, V. D.; Bruss, V.** (2013): Role of transmembrane domains of hepatitis B virus small surface proteins in subviral-particle biogenesis. In: *Journal of Virology* Feb;87(3):1491-6. doi: 10.1128/JVI.02500-12.
- Slavin, I.; García, I. A.; Monetta, P.; Martinez, H.; Romero, N.; Alvarez, C.** (2011): Role of Rab1b in COPII dynamics and function. In: *European Journal of Cell Biology* Apr;90(4):301-11. doi: 10.1016/j.ejcb.2010.10.001.

- Stagg, S. M.; Gürkan, C.; Fowler, D. M.; LaPointe, P.; Foss, T. R.; Potter, C. S. et al.** (2006): Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. In: *Nature* Jan 12;439(7073):234-8.
- Stankewich, M. C.; Stabach, P. R.; Morrow, J. S.** (2006): Human Sec31B: a family of new mammalian orthologues of yeast Sec31p that associate with the COPII coat. In: *Journal of Cell Science* Mar 1;119(Pt 5):958-69.
- Stevens, C. E.; Taylor, P. E.; Tong, M. J.; Toy, P. T.; Vyas, G. N.; Nair, P. V. et al.** (1987): Yeast-Recombinant Hepatitis B Vaccine Efficacy With Hepatitis B Immune Globulin in Prevention of Perinatal Hepatitis B Virus Transmission. In: *JAMA* May 15;257(19):2612-6.
- Stieler, J. T.; Prange, R.** (2014): Involvement of ESCRT-II in hepatitis B virus morphogenesis. In: *PLoS One* Mar 10;9(3):e91279. doi: 10.1371/journal.pone.0091279.
- Sucic, S.; El-Kasaby, A.; Kudlacek, O.; Sarker, S.; Sitte, H. H.; Marin, P.; Freissmuth, M.** (2011): The serotonin transporter is an exclusive client of the coat protein complex II (COPII) component SEC24C. In: *Journal of Biological Chemistry* May 6;286(18):16482-90. doi: 10.1074/jbc.M111.230037.
- Suffner, S.; Gerstenberg, N.; Patra, M.; Ruibal, P.; Orabi, A.; Schindler, M.; Bruss, V.** (2018): Domains of the Hepatitis B Virus Small Surface Protein S Mediating Oligomerization. In: *Journal of Virology* May 14;92(11). pii: e02232-17. doi: 10.1128/JVI.02232-17.
- Suh, A.; Weber, C. C.; Kehlmaier, C.; Braun, E. L.; Green, R. E.; Fritz, U. et al.** (2014): Early Mesozoic Coexistence of Amniotes and Hepadnaviridae. In: *PLoS Genetics* Dec 11;10(12):e1004559. doi: 10.1371/journal.pgen.1004559.
- Summers, J.; Mason, W. S.** (1982): Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. In: *Cell* Jun;29(2):403-15.
- Sureau, C.** (2006): The Role of the HBV Envelope Proteins in the HDV Replication Cycle. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology* 307:113-31.
- Sureau, C.; Guerra, B.; Lanford, R. E.** (1993): Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. In: *Journal of Virology* Jan;67(1):366-72.
- Sureau, C.; Negro, F.** (2016): The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. In: *Journal of Hepatology* Apr;64(1 Suppl):S102-S116. doi: 10.1016/j.jhep.2016.02.013.
- Suzuki, M.; Kondo, S.; Yamasaki, M.; Matsuda, N.; Nomoto, A.; Suzuki, T. et al.** (2017): Efficient genome replication of hepatitis B virus using adenovirus vector: a compact pregenomic RNA-expression unit. In: *Scientific Reports* Feb 3;7:41851. doi: 10.1038/srep41851.
- Syed, G. H.; Khan, M.; Yang, S.; Siddiqui, A.** (2017): Hepatitis C Virus Lipoviroparticles Assemble in the Endoplasmic Reticulum (ER) and Bud off from the ER. to the Golgi Compartment in COPII Vesicles. In: *Journal of Virology* Jul 12;91(15). pii: e00499-17. doi: 10.1128/JVI.00499-17.

- Tahtouh, R.; Azzi, A.; Alaaeddine, N.; Chamat, S.; Bouharoun-Tayoun, H.; Wardi, L. et al.** (2015): Telomerase Inhibition Decreases Alpha-Fetoprotein Expression and Secretion by Hepatocellular Carcinoma Cell Lines: In Vitro and In Vivo Study. In: *PLoS One* Mar 30;10(3):e0119512. doi: 10.1371/journal.pone.0119512.
- Takahashi, Y.; He, H.; Tang, Z.; Hattori, T.; Liu, Y.; Young, M. M. et al.** (2018): An autophagy assay reveals the ESCRT-III component CHMP2A as a regulator of phagophore closure. In: *Nature Communications* Jul 20;9(1):2855. doi: 10.1038/s41467-018-05254-w.
- Tang, B. L.; Kausalya, J.; Low, D. Y.; Lock, M. L.; Hong, W.** (1999): A family of mammalian proteins homologous to yeast Sec24p. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* May 19;258(3):679-84.
- Tang, B. L.; Zhang, T.; Low, D. Y.; Wong, E. T.; Horstmann, H.; Hong, W.** (2000): Mammalian homologues of yeast sec31p. An ubiquitously expressed form is localized to endoplasmic reticulum (ER) exit sites and is essential for ER-Golgi transport. In: *Journal of Biological Chemistry* May 5;275(18):13597-604.
- Tao, J.; Zhu, M.; Wang, H.; Afelik, S.; Vasievich, M. P.; Chen, X. W. et al.** (2012): SEC23B is required for the maintenance of murine professional secretory tissues. In: *PNAS* Jul 17;109(29):E2001-9. doi: 10.1073/pnas.1209207109.
- Taylor, J.** (2015): Hepatitis D Virus Replication. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* Nov 2;5(11). pii: a021568. doi: 10.1101/cshperspect.a021568.
- Tisdale, E. J.; Bourne, JR; Khosravi-Far, R.; Der, C. J.; Balch, W. E.** (1992): GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. In: *Journal of Cell Biology* Nov;119(4):749-61.
- Tomoishi, S.; Fukushima, S.; Shinohara, K.; Katada, T.; Saito, K.** (2017): CREB3L2-mediated expression of Sec23A/Sec24D is involved in hepatic stellate cell activation through ER-Golgi transport. In: *Scientific Reports* Aug 11;7(1):7992. doi: 10.1038/s41598-017-08703-6.
- Tong, S.; Revill, P.** (2016): Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. In: *Journal of Hepatology* Apr;64(1 Suppl):S4-S16. doi: 10.1016/j.jhep.2016.01.027.
- Urban, S.; Gripon, P.** (2002): Inhibition of duck hepatitis B virus infection by a myristoylated pre-S peptide of the large viral surface protein. In: *Journal of Virology* Feb;76(4):1986-90.
- Valenzuela, P.; Medina, A.; Rutter, W. J.; Ammerer, G.; Hall, B. D.** (1982): Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. In: *Nature* Jul 22;298(5872):347-50.
- Venditti, R.; Wilson, C.; Matteis, M. A. de** (2014): Exiting the ER: what we know and what we don't. In: *Trends in Cell Biology* Jan;24(1):9-18. doi: 10.1016/j.tcb.2013.08.005.
- Venereo-Sánchez, A.; Fulton, K.; Koczka, K.; Twine, S.; Chahal, P.; Ansorge, S. et al.** (2019): Characterization of influenza H1N1 Gag virus-like particles and extracellular vesicles co-produced in HEK-293SF. In: *Vaccine* Jul 26. pii: S0264-410X(19)30955-7. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.07.057.

- Wang, C. J.; Chen, P. J.; Wu, J. C.; Patel, D.; Chen, D. S.** (1991): Small-form hepatitis B surface antigen is sufficient to help in the assembly of hepatitis delta virus-like particles. In: *Journal of Virology* Dec;65(12):6630-6.
- Wang, J.; Shen, T.; Huang, X.; Kumar, G. R.; Chen, X.; Zeng, Z. et al.** (2016): Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound. In: *Journal of Hepatology* Oct;65(4):700-710. doi: 10.1016/j.jhep.2016.05.029.
- Wang, K. S.; Choo, Q. L.; Weiner, A. J.; Ou, J.; Najarian, R. C.; Thayer, R. M. et al.** (1986): Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (δ) viral genome. In: *Nature* Oct 9-15;323(6088):508-14.
- Wang, X.; Grammatikakis, N.; Hu, J.** (2002): Role of p50/CDC37 in Hepadnavirus Assembly and Replication. In: *The Journal of Biological Chemistry* Jul 5;277(27):24361-7.
- Wang, Y. C.; Huang, C. R.; Chao, M.; Lo, S. J.** (2009): The C-terminal sequence of the large hepatitis delta antigen is variable but retains the ability to bind clathrin. In: *Virology Journal* Mar 16;6:31. doi: 10.1186/1743-422X-6-31.
- Wang, Z.; Yu, G.; Liu, Y.; Liu, S.; Aridor, M.; Huang, Y. et al.** (2018): Small GTPases SAR1A and SAR1B regulate the trafficking of the cardiac sodium channel Nav1.5. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* Nov;1864(11):3672-3684. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.09.003.
- Watanabe, T.; Sorensen, E. M.; Naito, A.; Schott, M.; Kim, S.; Ahlquist, P.** (2007): Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. In: *PNAS* Jun 12;104(24):10205-10.
- Wei, Y.; Tavis, J. E.; Ganem, D.** (1996): Relationship between viral DNA synthesis and virion envelopment in hepatitis B viruses. In: *Journal of Virology* Sep;70(9):6455-8.
- Weiner, A. J.; Choo, Q. L.; Wang, K. S.; Govindarajan, S.; Redeker, A. G.; Gerin, J.L.; Houghton, M.** (1987): 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. In: *Journal of Virology* Feb;62(2):594-9.
- Wendeler, M. W.; Paccaud, J.; Hauri, H.** (2007): Role of Sec24 isoforms in selective export of membrane proteins from the endoplasmic reticulum. In: *EMBO Reports* Mar;8(3):258-64.
- Whittaker, G. R.; Kann, M.; Helenius, A.** (2000): Viral Entry into the Nucleus. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16:627-51.
- Willox, A. K.; Sahraoui, Y. M.; Royle, S. J.** (2014): Non-specificity of Pitstop 2 in clathrin-mediated endocytosis. In: *Biology Open* Apr 4;3(5):326-31. doi: 10.1242/bio.20147955.
- Woodman, P.** (2016): ESCRT-III on endosomes: new functions, new activation pathway. In: *Biochemical Journal* Jan 15;473(2):e5-8. doi: 10.1042/BJ20151115.
- Wounderlich, G.; Bruss, V.** (1996): Characterization of early hepatitis B virus surface protein oligomers. In: *Archives of Virology* 141(7):1191-205.
- Wynne, S. A.; Crowther, R. A.; Leslie, A. G.** (1999): The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. In: *Molecular Cell* Jun;3(6):771-80.

- Yamayoshi, S.; Noda, T.; Ebihara, H.; Goto, H.; Morikawa, Y.; Lukashevich, I. S. et al.** (2008): Ebola virus matrix protein VP40 uses the COPII transport system for its intracellular transport. In: *Cell Host & Microbe* Mar 13;3(3):168-77. doi: 10.1016/j.chom.2008.02.001.
- Yan, H.; Zhong, G.; Xu, G.; He, W.; Jing, Z.; Gao, Z. et al.** (2012): Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. In: *eLife* Nov 13;3. doi: 10.7554/eLife.00049.
- Yan, R.; Cai, D.; Liu, Y.; Guo, H.** (2016): Detection of Hepatitis B Virus Particles Released from Cultured Cells by Particle Gel Assay. In: *Methods in Molecular Biology* 1540:193-202.
- Ybe, J. A.** (2014): Novel clathrin activity: developments in health and disease. In: *Biomolecular Concepts* May;5(2):175-82. doi: 10.1515/bmc-2013-0040.
- Yorimitsu, T.; Sato, K.; Takeuchi, M.** (2014): Molecular mechanisms of Sar/Arf GTPases in vesicular trafficking in yeast and plants. In: *Frontiers in Plant Science* Aug 21;5:411. doi: 10.3389/fpls.2014.00411.
- Yuen, M. F.; Lai, C. L.** (2015): Hepatitis B in 2014: HBV research moves forward--receptors and reactivation. In: *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* Feb;12(2):70-2. doi: 10.1038/nrgastro.2014.226.
- Zanetti, G.; Pahuja, K. B.; Studer, S.; Shim, S.; Schekman, R.** (2011): COPII and the regulation of protein sorting in mammals. In: *Nature Cell Biology* Dec 22;14(1):20-8. doi: 10.1038/ncb2390.
- Zeyen, L.; Prange, R.** (2018): Host Cell Rab GTPases in Hepatitis B Virus Infection. In: *Frontiers in Cell and Developmental Biology* Nov 19;6:154. doi: 10.3389/fcell.2018.00154.
- Zhang, Z.; Zehnder, B.; Damrau, C.; Urban, S.** (2016): Visualization of hepatitis B virus entry – novel tools and approaches to directly follow virus entry into hepatocytes. In: *FEBS Letters* Jul;590(13):1915-26. doi: 10.1002/1873-3468.12202.
- Zhen, Y.; Spangenberg, H.; Munson, M. J.; Brech, A.; Schink, K. O.; Tan, K. et al.** (2019): ESCRT-mediated phagophore sealing during mitophagy. In: *Autophagy* Aug 1:1-16. doi: 10.1080/15548627.2019.1639301.
- Zhou, S.; Standring, D. N.** (1992): Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. In: *PNAS* Nov 1;89(21):10046-50.
- Zhou, Y.; Bennett, T. M.; Shiels, A.** (2019): A charged multivesicular body protein (CHMP4B) is required for lens growth and differentiation. In: *Differentiation* Jul 31;109:16-27. doi: 10.1016/j.diff.2019.07.003.
- Zhu, M.; Tao, J.; Vasievich, M. P.; Wei, W.; Zhu, G.; Khoriaty, R. N.; Zhang, B.** (2015): Neural tube opening and abnormal extraembryonic membrane development in SEC23A deficient mice. In: *Scientific Reports* Oct 23;5:15471. doi: 10.1038/srep15471.
- Zuber, C.; Cormier, J. H.; Guhl, B.; Santimaria, R.; Hebert, D. N.; Roth, J.** (2007): EDEM1 reveals a quality control vesicular transport pathway out of the endoplasmic reticulum not involving the COPII exit sites. In: *PNAS* Mar 13;104(11):4407-12.
- Zuccola, H. J.; Rozzelle, J. E.; Lemon, S. M.; Erickson, B. W.; Hogle, J. M.** (1998): Structural basis of the oligomerization of hepatitis delta antigen. In: *Structure* Jul 15;6(7):821-30

