

Vergleichende Charakterisierung
der Oberflächenproteine von verschiedenen
Hepatitis-B-Virus-Genotypen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

im Promotionsfach Chemie

dem Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaft

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Matthias Hassemer

geboren am 30.05.1986 in Bingen (Rhein)

Langen 2016

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.2016

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2013 bis Juli 2016 am Paul-Ehrlich-Institut in Langen im Labor der Abteilung Virologie durchgeführt.

Danksagung

quidquid agis, prudenter agas et respice finem

(nach Äsops Fabel mit den zwei Fröschen; #78)

Inhalt

DANKSAGUNG	II
INHALT	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 DAS HEPATITIS-B-VIRUS.....	1
1.1.1 <i>Entdeckung des Virus</i>	1
1.1.2 <i>Taxonomie</i>	1
1.1.3 <i>Evolution des Hepatitis-B-Virus</i>	1
1.1.4 <i>Epidemiologie</i>	3
1.2 MOLEKULARE VIROLOGIE.....	4
1.2.1 <i>Aufbau der viralen und subviralen Partikel</i>	4
1.2.2 <i>Genomorganisation</i>	6
1.2.3 <i>Virale Proteine</i>	7
1.2.3.1 <i>Virale Polymerase und HBx</i>	7
1.2.3.2 <i>Das core-Protein und HBeAg</i>	7
1.2.3.3 <i>Die viralen Oberflächenproteine</i>	8
1.2.4 <i>Der virale Lebenszyklus</i>	11
1.3 DIE HBV-GENOTYPEN.....	14
1.4 PATHOGENESE.....	16
1.4.1 <i>Akute Infektion</i>	17
1.4.2 <i>Fulminante Hepatitis</i>	18
1.4.3 <i>Chronische Infektion</i>	18
1.4.4 <i>HBV-vermittelte HCC</i>	19
1.4.5 <i>Genotypen-spezifische Eigenschaften</i>	20
1.5 TRANSMISSION UND ENDEMIZITÄT.....	22
1.6 PRÄVENTION UND BEHANDLUNG.....	24
1.7 DETEKTION UND DIAGNOSTISCHE TESTS.....	26
2 ZIELSETZUNG	29
3 MATERIAL	30
3.1 BAKTERIENSTÄMME UND ZELLINIEN.....	30
3.1.1 <i>Bakterienstämme</i>	30
3.1.2 <i>Zelllinien</i>	30
3.2 PLASMIDE.....	30
3.3 OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER).....	32
3.4 GRÖßENSTANDARDS.....	33
3.5 ANTIKÖRPER.....	34

3.5.1	<i>Primär-Antikörper</i>	34
3.5.2	<i>Sekundär-Antikörper</i>	34
3.6	ENZYME	35
3.7	INHIBITOREN	35
3.8	ZELLKULTUR-REAGENZIEREN	35
3.9	CHEMIKALIEN	36
3.10	PUFFER UND LÖSUNGEN	38
3.10.1	<i>Individuelle Puffer</i>	38
3.10.2	<i>Kommerzielle Puffer</i>	41
3.11	VERWENDETE KITS	41
3.12	GERÄTE	42
3.12.1	<i>Elektrophorese- und Blotsysteme</i>	42
3.12.2	<i>Mikroskope</i>	42
3.12.3	<i>Imaging</i>	42
3.12.4	<i>PCR Cycler</i>	43
3.12.5	<i>Zentrifugen</i>	43
3.12.6	<i>Sonstiges</i>	43
3.13	VERBRAUCHSMATERIALIEN	44
3.14	SOFTWARE	45
4	METHODEN	46
4.1	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	46
4.1.1	<i>Arbeiten mit Bakterienkulturen</i>	46
4.1.2	<i>Arbeiten mit Zellen</i>	46
4.1.2.1	Kultivierung der Zellen	46
4.1.2.2	Herstellen von Kryostocks	47
4.1.2.3	Bestimmung der Zellzahl	47
4.1.2.4	Transfektion	48
4.1.2.5	Ernte von Zellkultur-Überständen	49
4.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	49
4.2.1	<i>Isolierung plasmidischer DNA</i>	49
4.2.2	<i>Phenol-/Chloroform-Extraktion von RNA</i>	49
4.2.3	<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen</i>	50
4.2.4	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	50
4.2.5	<i>cDNA-Synthese</i>	50
4.2.6	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	51
4.2.6.1	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	51
4.2.6.2	Qualitative PCR	53
4.2.7	<i>Reinigung subviraler und viraler Partikel</i>	54
4.2.7.1	PEG-Präzipitation	54

4.2.7.2	Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation (SDGZ).....	54
4.2.7.3	Bestimmung des Brechungsindex	55
4.3	PROTEIN-BIOCHEMISCHE METHODEN	55
4.3.1	<i>Herstellung von Zelllysaten</i>	55
4.3.2	<i>Bradford-Assay</i>	56
4.3.3	<i>SDS-PAGE</i>	56
4.3.3.1	Eindimensionale SDS-PAGE	56
4.3.3.2	Zweidimensionale SDS-PAGE	57
4.3.4	<i>Protein-Färbung in Polyacrylamid-Gelen</i>	58
4.3.4.1	Silber-Färbung.....	58
4.3.4.2	Coomassie-Färbung.....	59
4.3.4.3	SYPRO® Ruby-Färbung	59
4.4	IMMUNOLOGISCHE METHODEN	60
4.4.1	<i>Western Blot</i>	60
4.4.1.1	Blotting.....	60
4.4.1.2	Immundetektion	60
4.4.2	<i>Indirekte Immunfluoreszenz</i>	61
4.4.3	<i>HBsAg-ELISA</i>	61
4.5	MIKROSKOPIE.....	62
4.5.1	<i>Konfokale Laserscan-Mikroskopie</i>	62
4.5.1	<i>Transmissionselektronenmikroskopie</i>	63
4.6	STATISTISCHE ANALYSEN.....	63
5	ERGEBNISSE	64
5.1	VERGLEICHENDE ANALYSEN VERSCHIEDENER HBV-GENOTYPEN HINSICHTLICH HBsAg SPEZIFISCHER EIGENSCHAFTEN	64
5.1.1	<i>HBV-Genotypen unterscheiden sich hinsichtlich der intra- und extrazellulären HBsAg Level</i>	64
5.1.2	<i>Zusammensetzung der extra- und intrazellulären HBsAg verschiedener Genotypen weist Unterschiede auf</i>	65
5.1.3	<i>Analoge Glykosylierungsmuster zwischen den analysierten HBV Genotypen</i>	67
5.1.4	<i>HBV-Genotyp G zeigt deutliche Veränderungen hinsichtlich der subzellulären HBsAg-Verteilung</i> . 73	
5.1.4.1	Mutationen in der PreS1-Domäne verursachen veränderte Lokalisation der HBsAg bei Genotyp G ..	82
5.1.5	<i>HBsAg-spezifische mRNA-Mengen der verschiedenen HBV-Genotypen weisen keine signifikanten Unterschiede auf</i>	84
5.2	HERSTELLUNG STABILER HBV-POSITIVER ZELLINIEN MIT HILFE VON ZINKFINGERNUKLEASEN	85
5.3	SUBVIRALE PARTIKEL KÖNNEN IM REKOMBINANTEN SYSTEM ERFOLGREICH VON VIRALEN PARTIKELN GETRENNT WERDEN .	86
5.3.1	<i>Anreicherung und Auftrennung der verschiedenen Partikel kann stabil reproduziert werden</i>	86
5.3.2	<i>Dichte der freigesetzten subviralen und viralen Partikel zeigt analoges Verhalten zwischen den analysierten HBV-Genotypen</i>	88
5.3.3	<i>Gereinigtes rekombinantes HBsAg eignet sich zur Testung und Kalibrierung von ELISA-Systemen</i>	92
5.3.4	<i>Qualitative HBsAg-ELISAs weisen Genotypen-spezifische Detektionsunterschiede auf</i>	93

5.4	EINFLUSS VON A-TAXILIN AUF DIE FREISETZUNG VON HBV IN NICHT-HUMANEN ZELLINIEN.....	95
5.4.1	<i>Expression von humanem α-Taxilin beeinflusst extrazelluläre HBsAg-Menge.....</i>	95
5.4.2	<i>Expression von humanem α-Taxilin beeinflusst die Menge an freigesetzter viraler DNA.....</i>	97
5.4.3	<i>Humanes α-Taxilin kolokalisiert mit HBV-Oberflächenproteinen in nicht-humanen Zelllinien</i>	98
6	DISKUSSION.....	101
6.1	VERGLEICHENDE ANALYSEN DER MOLEKULAREN VIROLOGIE VERSCHIEDENER HBV-GENOTYPEN	102
6.2	GEREINIGTES REKOMBINANTES HBSAG ALS REFERENZMATERIAL FÜR DIE TESTUNG VON HBSAG-GESTÜTZTEN DIAGNOSE- VERFAHREN	106
6.3	EINFLUSS VON A-TAXILIN AUF DIE SEKRETION VON HBV	109
7	ZUSAMMENFASSUNG	112
8	LITERATURVERZEICHNIS	114
9	ANHANG	II
9.1	PLASMIDKARTEN	II
9.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
	CURRICULUM VITAE.....	XI
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	XIII

1 EINLEITUNG

1.1 Das Hepatitis-B-Virus

1.1.1 *Entdeckung des Virus*

Im Jahr 1965 beschrieb B. S. Blumberg zum ersten Mal ein bis dato unbekanntes Antigen, welches er aus dem Serum eines australischen Aborigines isolierte und daher *Australia Antigen* (AuAg) benannte (BLUMBERG et al. 1965). Dieses konnte in weiteren Studien mit einer schwerwiegenden Lebererkrankung in Verbindung gebracht werden (London und Millman 1969). Für diese Arbeiten erhielt Blumberg im Jahre 1976 zusammen mit D. C. Gadjusek den Nobelpreis für Physiologie und Medizin (Blumberg 2002). Weitere Untersuchungen von D. S. Dane identifizierten letztlich im Jahre 1970 mittels Elektronenmikroskopie das 42 nm große Virus-Partikel, welches für diese Lebererkrankungen verantwortlich war. Das Virus konnte letztlich als Hepatitis-B-Virus und somit als Mitglied der Familie der *Hepadnaviridae* klassifiziert werden. Zu Ehren des Entdeckers wurde das vollständig assemblierte Virus-Partikel „Dane-Partikel“ getauft (Dane et al. 1970). Letzten Endes konnte das zuvor beschriebene AuAg als Oberflächenantigen des Dane-Partikels identifiziert werden und wurde folglich HBsAg (*HBV surface antigen*) genannt.

1.1.2 *Taxonomie*

Die Familie der *Hepadnaviridae* umfasst umhüllte DNA-Viren mit einer Größe von 42–50 nm. Diese Viren zeichnen sich durch ein partiell doppelsträngiges, ca. 3.2 kB großes DNA-Genom und eine hohe Wirts- und Gewebespezifität aus (Burns und Thompson 2014). Man untergliedert die *Hepadnaviren* in zwei Gattungen, welche sich hinsichtlich ihres Vorkommens in Vögeln (*Avihepadnaviridae*) bzw. in Säugetieren (*Orthohepadnaviridae*) differenzieren. Die einzelnen Gattungen lassen sich zudem in weitere speziesbezogene Mitglieder auftrennen.

1.1.3 *Evolution des Hepatitis-B-Virus*

Die Evolution des Hepatitis-B-Virus konnte bis jetzt nicht abschließend geklärt werden. Untersuchungen an Fossilien lassen jedoch den Schluss zu, dass bereits vor 40 Millionen Jahren Vorläuferformen des Virus in Vögeln existiert haben. Diese und weitere Studien weisen auf eine

geschichtliche Entwicklung des Virus von bis zu 80 Millionen Jahren hin (Gilbert und Feschotte 2010; Cui und Holmes 2012; Suh et al. 2014). Die Auftrennung in *Avi*- und *Orthohepadnaviridae* erfolgte dabei vor etwa 80.000–300.000 Jahren (van Hemert et al. 2011). Dabei scheint die erste Übertragung auf den Menschen durch fledermausspezifische Viren (BtHV) erfolgt zu sein (Drexler et al. 2013; He et al. 2013). Dies ist auf eine Vielzahl an Faktoren zurückzuführen, welche Fledermäuse als optimales Reservoir für virale Erreger charakterisiert. Eigenschaften wie Langlebigkeit, starke migratorische Aktivität, große und dicht nistende Gemeinschaften und der enge soziale Kontakt spielen hierbei eine große Rolle. Darüber hinaus besitzt die PreS1-Domäne der BtHV ein Motiv, welches bei humanem HBV die Bindung an den für die Aufnahme in die Zelle notwendigen Rezeptor ermöglicht (Ni et al. 2014; Yan et al. 2012). Zusätzlich konnte in *in vitro*-Studien nachgewiesen werden, dass BtHV humane Hepatozyten infizieren kann, was das zoonotische Potential und somit die von BtHV ausgehende Gefahr bestätigte (Drexler et al. 2013).

Mit Einsetzen der ersten Migrationsbewegungen des Menschen verteilte sich das humane Hepatitis-B-Virus auf der ganzen Welt. Aufgrund der nicht vorhandenen Korrekturlese-Funktion der viralen Polymerase treten Mutationen im HBV-Genom verglichen mit anderen DNA-Viren häufiger auf, dabei wurde die mittlere Häufigkeit von Nukleotid-Substitutionen pro Stelle pro Jahr mit $1,5\text{--}3,0 \times 10^{-6}$ beziffert (Paraskevis et al. 2013). Im Laufe der Zeit bildeten sich daher spezielle Unterarten des Virus, welche als Genotypen klassifiziert wurden. Möglicherweise lässt sich so die Genotypen-spezifische globale Verteilung des Hepatitis-B-Virus in seiner Form durch das Migrationsverhalten erklären (siehe auch Abb. 1). Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind acht Genotypen beschrieben (GtA-GtH), zwei weitere (GtI und GtJ) sind noch nicht abschließend als eigenständige Genotypen bestätigt worden (Pourkarim et al. 2014).

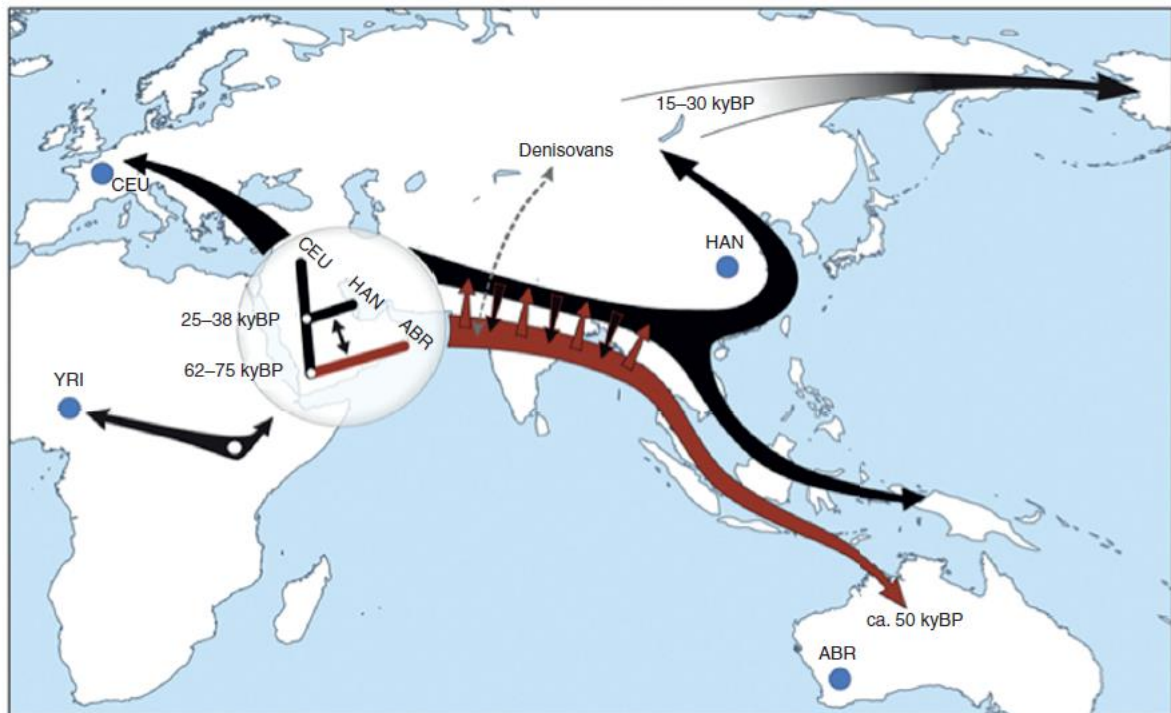


Abb. 1: Rekonstruktion der frühmenschlichen Migrationsbewegungen; YRI: Yoruba-Urstamm; ABR: Australische Aborigines; CEU: Europäer; HAN: Han-Chinesische Linie; kyBP: thsd. years before present (nach Littlejohn et al. 2016).

1.1.4 Epidemiologie

Zu Ehren des Entdeckers, aber vor allem um die Gefahr in Erinnerung zu rufen, welche von dem Hepatitis-B-Virus ausgeht, ernannte die WHO im Jahr 2008 den 28. Juli zum Welt-HBV-Tag. Trotz der Zulassung eines kommerziell erhältlichen Impfstoffes im Jahre 1982, welcher in 95 % aller Fälle zu einem erfolgreichen Impfschutz gegen HBV führt, ist die Gefahr einer Infektion immer noch sehr hoch. Die WHO schätzt, dass bis zu 2 Milliarden Menschen mit HBV infiziert wurden. Obwohl es in den meisten Fällen zu einer vollständigen Ausheilung kommt, kann man dennoch davon ausgehen, dass etwa 250–350 Millionen Menschen eine chronische HBV-Infektion entwickelten (Littlejohn et al. 2016; Lavanchy 2005; WHO 2015). Durch HBV verursachte Krankheiten finden sich an neunter Stelle auf der weltweiten Liste der häufigsten Todesursachen und führen bei etwa einer Million Patienten pro Jahr letztlich zum Tod, was HBV zur fünftgefährlichsten Infektionskrankheit macht (Szmaragd und Balloux 2007). Aufgrund des großen Reservoirs chronisch infizierter Personen und des ungleichen Zugangs zu Impfstoffen ist die Auslöschung des Virus stark erschwert (Pourkarim und van Ranst 2011). Dies spiegelt sich auch in den regional sehr unterschiedlichen Prävalenzen chronischer HBV-Infektionen wider. So finden sich die höchsten Prävalenzen im südostasiatischen Raum, in

Subsahara Afrika, im Amazonasbecken in Südamerika und in einigen nördlichen Regionen Kanadas, Alaskas und Grönlands. Hier sind etwa 80 % der Bevölkerung bis zum 40. Lebensjahr einer HBV-Infektion ausgesetzt, wobei ca. 8–20 % eine chronische Hepatitis entwickeln (Gerlich 2013). In Gebieten mit niedrigen Prävalenz-Raten wie z. B. Nordamerika, Australien und Nord-/West-Europa sind hingegen weniger als 20 % der Bevölkerung infiziert, weniger als 2 % chronisch (siehe dazu auch Abb. 2).

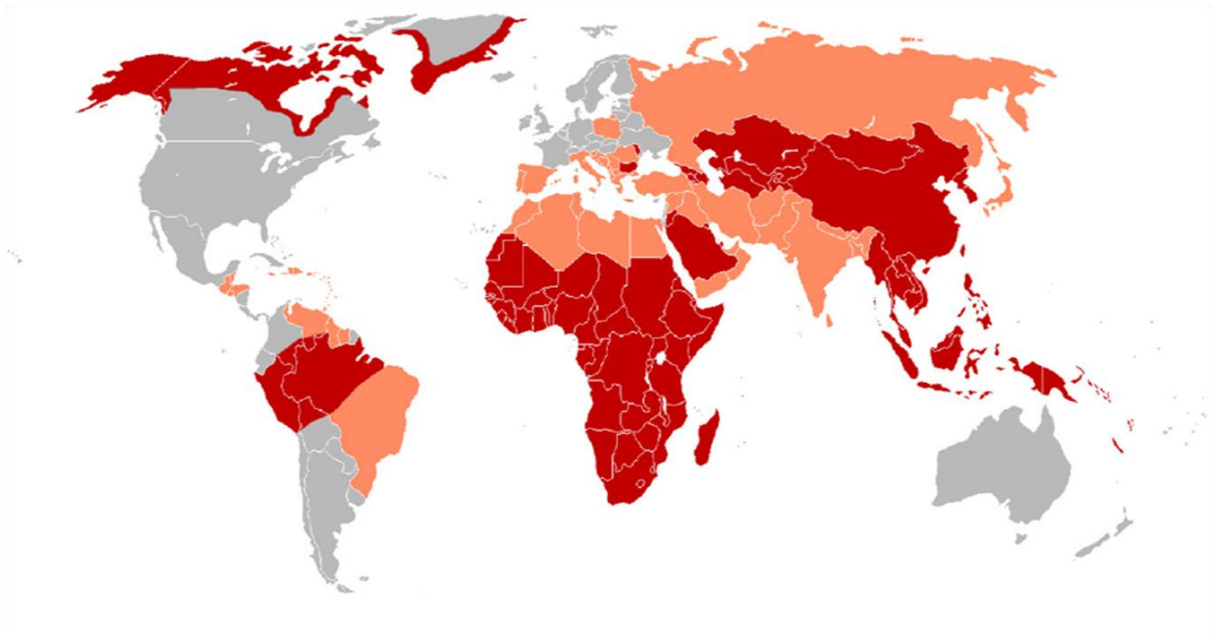


Abb. 2: Weltweite HBV-Prävalenzen; dunkelrot: hohes Risiko – Prävalenz > 8 %; hellrot: moderates Risiko – Prävalenz zw. 2 und 7 %; grau: niedriges Risiko – Prävalenz < 2 % (nach Gerlich 2013).

1.2 Molekulare Virologie

1.2.1 Aufbau der viralen und subviralen Partikel

Das Hepatitis-B-Virus ist ein Prototyp der Familie der DNA-Viren, wobei das Genom eine Länge von etwa 3,2 kB umfasst und partiell doppelsträngig vorliegt (Pourkarim et al. 2014). Das virale Genom liegt im Virus kovalent gebunden mit der viralen DNA-Polymerase vor, welche eine reverse Transkriptase-Funktion besitzt (Schaedler und Hildt 2009; Bartenschlager und Schaller 1988). Das Genom und die Polymerase werden von einem Nukleokapsid umschlossen, welches sich aus 120 Dimeren des *core*-Proteins (HBc) zusammensetzt (Crowther et al. 1994). Zuletzt folgt eine Lipiddoppelschicht-Hüllmembran, in welcher die viralen Oberflächenproteine

eingebettet sind. Diese Proteine werden unterteilt anhand deren Größe in das große, das mittlere und das kleine Oberflächenprotein (*large/middle/small hepatitis B surface protein; L-/M-/SHBs* \equiv HBsAg). Das Virus besitzt eine Größe von 42 nm und wurde zuerst im Jahr 1970 von D. S. Dane mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen (Dane et al. 1970). Die Größe wurde noch nach oben korrigiert auf 52 nm, unter Berücksichtigung der hydratisierten Virus-Hülle und den unterschiedlichen Oberflächenproteinen (Gerlich 2013). Zusätzlich zu diesen vollständig assemblierten Viren werden von infizierten Zellen darüber hinaus große Mengen an nicht-infektiösen Partikeln mit geringerer Größe sekretiert. Diese sog. subviralen Partikel (SVPs) bestehen lediglich aus einer Lipidhülle, in welcher die verschiedenen Oberflächenproteine eingebettet sind (Bruns et al. 1998). Die SVPs selbst unterteilen sich entsprechend ihrer Form in Filamente und Sphären, wobei die Sphären mit einem Durchmesser von etwa 24 nm den größten Anteil (ca. 98 %) ausmachen und außer SHBs nur geringe Mengen an MHBs besitzen. Die Filamente besitzen ebenfalls eine Dicke von etwa 24 nm, variieren jedoch in ihrer Länge und tragen alle viralen Oberflächenproteine in deren Lipidhülle (Heermann et al. 1984; Gerlich 2013). Eine schematische bzw. eine mikroskopische Darstellung der viralen und subviralen Partikel sind in Abb. 3 zu finden. Die Funktion der nicht-infektiösen SVPs ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch wird angenommen, dass die große Menge an HBsAg neutralisierende Antikörper des infizierten Wirts binden und so den Zugang der Viren zu geeigneten Zielzellen erleichtern (Ganem, D. 1991). Zudem wurde beobachtet, dass subvirale Partikel die virale Replikation und Genexpression beeinflussen und möglicherweise sogar eine andauernde Infektion fördern (Bruns et al. 1998; Glebe et al. 2005; Mauss et al. 2015).

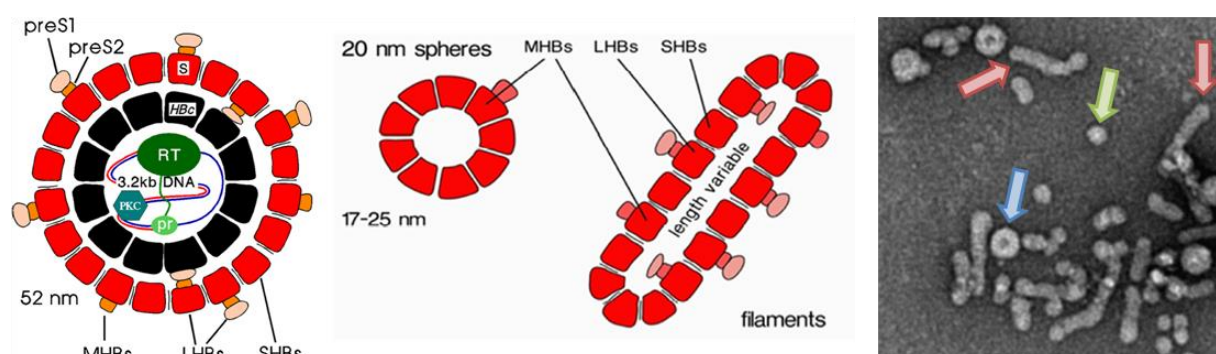


Abb. 3: **links:** Schematische Darstellung der viralen und subviralen Partikel; im Vergleich zu den SVPs beinhaltet das Virion zusätzlich die virale DNA (kovalent verknüpft mit der viralen Polymerase), verpackt in eine Kapsidhülle (nach Gerlich 2013); **rechts:** elektronenmikroskopische Aufnahme von HBV-Viren (blauer Pfeil), Filamenten (rote Pfeile) und Sphären (grüner Pfeil).

1.2.2 Genomorganisation

Wie schon beschrieben, liegt das virale DNA-Genom partiell doppelsträngig vor und hat eine Länge von etwa 3,2 kB (siehe Abb. 4). Hierbei liegt der kodierende (-)-Strang komplett, der nicht-kodierende (+)-Strang nur zu etwa zwei Dritteln bezogen auf die Genomgröße vor.

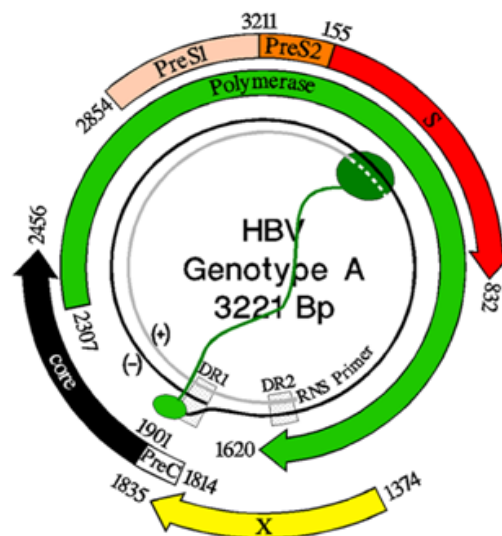


Abb. 4: Genom-Organisation am Beispiel des HBV-Genotyps A: das ca. 3,2 kB lange, partiell doppelsträngige Genom ((+) und der (-) Strang, schwarze und graue Linie) sind kovalent gebunden und kodieren für die virale Polymerase (grüner Pfeil, grüne Schlangenlinie). Zusätzlich ist die relative Position der weiteren offenen Leseraster (HBC und HBe (preC), schwarzer Pfeil); LHBs/MHBs/SHBs (PreS1, PreS2, S, roter Pfeil); HBx (gelber Pfeil) grafisch dargestellt (nach Gerlich 2013).

Die virale reverse Transkriptase ist – mittels einer Phospho-Tyrosin-Bindung – kovalent an den (-)-Strang gebunden. Eingeleitet wird die Polymerisation durch ein kurzes RNA-Fragment, welches am 5'-Ende des (+)-Strang kovalent gebunden ist (Beck und Nassal 2007). Der kodierende (-)-Strang beinhaltet vier teilweise überlappende offene Leseraster (*open reading frames*, ORF). Diese kodieren für 1) die virale Polymerase (P), 2) das core (HBCAg) bzw. das pre-core (HBeAg)-Protein, 3) das regulatorisch aktive X-Protein (HBx) und 4) für die drei verschiedenen viralen Oberflächen-Proteine (L-/M-/SHBs; HBsAg) (Schaedler und Hildt 2009). Nach erfolgter Infektion wird die virale DNA in den Zellkern transportiert und dort mittels zelleigener DNA-Reparatur komplettiert. Die so erhaltene cccDNA (*covalently closed circular DNA*) fungiert nun als stabile Plasmid-ähnliche Matrize für sowohl die pgRNA (*pre genomic RNA*) als auch die vier verschiedenen viralen mRNAs (Jilg und Gerlich 2013). Letztere werden von der Wirts-RNA-Polymerase II transkribiert und mit einer Cap-Struktur und einem Poly-Adenylierungssignal versehen (Beck und Nassal 2007; Schaedler und Hildt 2009). Mittels Translation kann letztlich

aus der 3,5 kB mRNA die virale Polymerase, wie auch HBcAg und HBeAg, gebildet werden. Die 2,4 kB mRNA dient als Matrize für das LHBs, die 2,1 kB mRNA für MHBs und SHBs. Die kleinste mRNA mit einer Länge von 0,7 kB wird für die Produktion des HBx-Proteins genutzt (Seeger und Mason 2000; Nassal 2008).

1.2.3 Virale Proteine

1.2.3.1 Virale Polymerase und HBx

Die aus drei funktionellen Domänen bestehende virale Polymerase stellt das einzige Enzym da, welches im viralen Genom kodiert wird und eine Größe von etwa 94 kDa aufweist (Block et al. 2007). Für die Bindung an den RNA-Primer und somit für die reverse Transkription (s. o.) wichtig ist die N-terminale Domäne. Über einen Spacer ist diese mit der Polymerase-Domäne verknüpft, an welche sich die RNaseH-Domäne anschließt. Die virale Polymerase und die replizierte RNA liegen während der Replikation in gleichen Konzentrationen vor (Beck und Nassal 2007; Bartenschlager et al. 1992; Bartenschlager und Schaller 1992).

Das HBx-Protein ist lediglich – mit Ausnahme des DHBV (*duck hepatitis B virus*) (Chang et al. 2001) – in den *Orthohepadnaviren* konserviert. Die Funktion des 145 Aminosäuren langen und ca. 16 kDa schweren Proteins ist bislang nicht abschließend geklärt. Dennoch werden ihm regulatorische Funktionen zugeschrieben, so soll es mit Transkriptionsfaktoren wie NFκB interagieren und einen Einfluss auf den Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg haben (Wollersheim et al. 1988; Su und Schneider 1996; Bouchard et al. 2003). Des Weiteren wurde ein regulatorischer Effekt bezüglich der viralen Replikation beschrieben (Melegari et al. 2005; Lucifora et al. 2011). Dies wird jedoch bislang kontrovers diskutiert. Darüber hinaus wurde für HBx eine Bindung an das Tumorsuppressor-Gen p53 beschrieben, was die Entstehung eines hepato-zellulären Karzinoms (*hepatocellular carcinoma*, HCC) fördert (Kew 2011).

1.2.3.2 Das core-Protein und HBeAg

Das virale *core*-Protein besteht aus 183–185 Aminosäuren, hat folglich eine Größe von 21 kDa und zeichnet sich durch seine α -helikale Struktur aus (Block et al. 2007; Chain und Myers 2005). Durch Dimerisierung entstehen vier Helix-Bündel, welche dem Komplex in Verbindung mit einer Disulfid-Bindung eine große Stabilität verleihen (Nassal et al. 1992). Aufgrund des Arginin-reichen, positiv geladenen C-Terminus wird die Verpackung des pgRNA-Polymerase-

Komplexes ermöglicht, sodass aus 120 Dimeren ein ikosaedrisches Kapsid mit einem Durchmesser von ca. 34 nm gebildet wird (Bruss 2004). Durch gezielte Phosphorylierungen wird nicht nur die Verpackung des pgRNA/Polymerase-Komplexes, sondern auch die notwendige DNA-Synthese gesteuert. Im Anschluss an die Synthese des viralen DNA-Genoms führen Dephosphorylierungsschritte zur Reifung des fertigen viralen Partikels durch Interaktion von *core*-Proteinen mit der PreS1-Domäne des LHBs (Bruss 2007). So werden ausschließlich gereifte Nukleokapside umhüllt und sekretiert (Roseman et al. 2005).

Im Jahre 1972 konnte zusätzlich zu den bekannten viralen Proteinen erstmals ein weiterer Infektionsmarker in Seren HBV-positiver Patienten detektiert werden, welcher von seinem Entdecker als „enigmatisches“ Protein betitelt wurde, daher der Name: HBeAg (Magnius und Espmark 1972). Diesen Charakter sollte das Protein auch für mehrere Jahre beibehalten, bis durch die Entwicklung künstlicher Expressionssysteme nachgewiesen werden konnte, dass das HBeAg eine nicht-partikulär sekretierte Form des HBc darstellt, welches für die Virus-Replikation nicht notwendig ist (Standring et al. 1988; Bruss und Gerlich 1988; Carman et al. 1989). Letztlich wurde und wird HBeAg als serologischer Marker im Verlauf einer HBV-Infektion verwendet.

1.2.3.3 Die viralen Oberflächenproteine

Die Gruppe der viralen Oberflächenproteine umfasst drei verschiedene Mitglieder, welche typisch für Membranproteine am endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert werden. Das kleinste Protein der Gruppe ist das SHBs, welches 226 Aminosäuren besitzt, die zusammengenommen die sog. S-Domäne darstellen. Die S-Domäne besitzt drei bzw. vier Transmembran-Domänen (TM1–4), welche dem Protein zu einer charakteristischen Struktur verhelfen (siehe auch Abb. 5). Hinsichtlich TM3 und TM4 ist jedoch bislang nicht genau geklärt, ob es sich um eine oder zwei individuelle Transmembran-Domänen handelt (Eble et al. 1987; Short et al. 2009). Schließlich zeigt die N-terminale Region in das Zytosol der Wirtszelle, wohingegen der N-Terminus und die C-terminale Schleife (AS 99–169) in das Lumen des ER ragen (Eble et al. 1990; Schaedler und Hildt 2009; Julithe et al. 2014). Darüber hinaus beinhaltet die luminale Schleife ein Epitop, welches hauptsächlich für die Immundetektion verantwortlich ist. Dieses Epitop ragt nach der Reifung des Virus aus der Oberfläche der Virionen heraus und wird aufgrund seiner immunologisch wichtigen Eigenschaften als „a-Determinante“ bezeichnet (Seitz

et al. 2007; Julithe et al. 2014). Etwa die Hälfte des SHBs wird am Asparagin 146 posttranslational N-glykosyliert, sodass Proteine mit Größen von 24 kDa (SHBs) und 27 kDa (glykosyliertes SHBS, gSHBs) detektiert werden können (Bruss 2007). Hierzu bleibt zu erwähnen, dass nicht-glykosyliertes Asn 146 einen Einfluss auf die Infektiosität zu besitzen scheint, wohingegen glykosyliertes Asn 146 wichtig bei der Entstehung der Viren wie auch der Abschirmung der α -Determinante gegen wirtseigene Antikörper ist (Julithe et al. 2014).

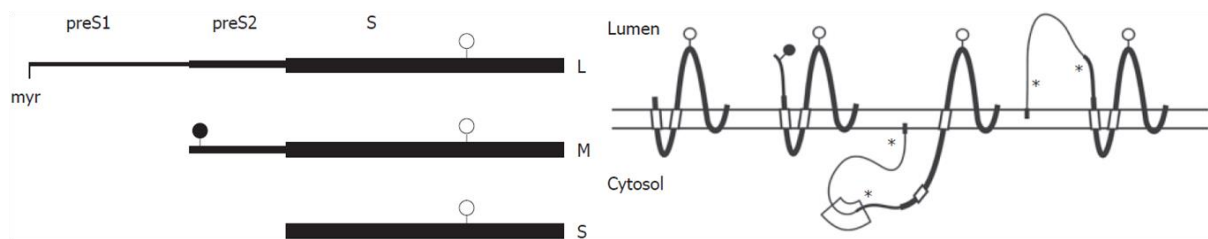


Abb. 5: Schematische Darstellung der verschiedenen HBV-Oberflächenproteine (links) und deren Transmembran-Topologie (rechts). LHbs (bestehend aus PreS1, PreS2 und S-Domäne) ist N-terminal myristoyliert und partiell N-glykosyliert (offene Kreise). MHbs besitzt zusätzlich zur S-Domäne die PreS2-Domäne und ist sowohl O-glykosyliert (gefüllte Kreise) als auch partiell N-glykosyliert. Die S-Domäne bestimmt die Struktur des SHBs, welches partiell N-glykosyliert ist (nach Bruss 2007).

Verglichen mit SHBs ist das mittlere Oberflächenprotein MHbs um 55 Aminosäuren verlängert. Es setzt sich zusammen aus der S-Domäne und der sog. PreS2-Domäne, welche sich N-terminal anschließt (Ganem, D. und Schneider, R.J.). Da die zusätzliche PreS2-Domäne in das Lumen des ERs ragt, wird das Asparagin 4 posttranslational N-glykosyliert. Das Asn 146 wird ebenfalls, analog zu SHBs, zu etwa 50 % N-glykosyliert. Durch ein Tyrosin an Stelle 37 besteht darüber hinaus die Möglichkeit einer O-Glykosylierung, welche jedoch erst im Golgi-Apparat erfolgen kann (Julithe et al. 2014). Die Nutzung dieser Glykosylierungsstelle findet allerdings in sehr heterogener Weise bei den HBV-Genotypen Verwendung (Schmitt et al. 2004; Schmitt et al. 1999). Letzten Endes befindet sich in der assemblierten Virushülle das einfach und das zweifach glykosylierte MHbs (gMHbs mit 33 kDa, ggMHbs mit 36 kDa). Die in verschiedenen Tumorentegren gefundene C-terminal verkürzte Form des MHbs (MHbs^t) weist darüber hinaus eine regulatorische Funktion auf (Hildt et al. 1995). So wird ein Einfluss auf den cRaf/Mek/Erk-Signalweg beschrieben, da die PreS2-Domäne des MHbs mit der Proteinkinase C α (PKC) interagieren kann. Auf diesem Wege erfolgt eine Modulation des Phosphorylierungsmusters und somit eine Aktivierung der PKC. Aufgrund einer gesteigerten Zellproliferation

führt dies möglicherweise zu einer höheren Wahrscheinlichkeit der Ausbildung eines Karzinoms (Hildt et al. 2002).

Als Letztes folgt das größte Oberflächenprotein LHBS, welches zusätzlich zur PreS2- und S-Domäne an seinem N-Terminus um eine 108–119 AS lange PreS1-Domäne verlängert ist (Ganem, D. und Schneider, R.J. 2001). Durch Myristylierung an Glycin 2 ist der N-Terminus des Proteins in der ER-Membran verankert (Persing et al. 1987; Prange et al. 1991). Zu Beginn der Translation verbleiben die PreS1- und PreS2-Domäne auf der zytosolischen Seite, ab der TM2-Domäne ist die Struktur des Proteins jedoch analog zu MHBS und SHBS. Wiederum wird in 50 % aller Fälle die Aminosäure Asn 146 N-glykosyliert (LHBS mit 39 kDa, gLHBS mit 42 kDa), während Asn 4 unverändert vorliegt (Bruss und Vieluf 1995). Bei etwa der Hälfte der LHBS-Proteine erfolgt posttranslational eine Translokation der PreS1-/PreS2-Domäne, was zu einer dualen Membrantopologie führt (Niedre-Otomere et al. 2013; Bruss et al. 1994). Durch diese duale Topologie kann das LHBS auf zwei Wegen seine zusätzliche regulatorische Funktion übernehmen. PreS1/PreS2, das in das ER-Lumen ragt, findet sich letztlich an der Oberfläche der Virionen und übernimmt dort eine Funktion bei der Bindung des Virus an die Wirtszelle bzw. den entsprechenden Rezeptor (Urban und Gripon 2002; Gripon et al. 2005). Zytosolisch verortetes PreS1/PreS2 ist nach der Reifung im Inneren des Virus zu finden, wo es für die Virusmorphogenese durch Interaktion mit dem Nukleokapsid verantwortlich ist (Bruss 1997). Zusätzlich hat es wie MHBS^t durch Aktivierung der PKC und des C-Raf Signalwegs als transkriptioneller Aktivator Einfluss auf mehrere verschiedene Promoter-Elemente (Hildt et al. 1995; Liu et al. 2011; Hildt et al. 1996).

Neben der Inkorporation der verschiedenen Oberflächenproteine in die Virus-Hülle werden zusätzlich extrem große Mengen nicht-infektiöser Partikel in der infizierten Zelle gebildet und über das ER und den Golgi-Apparat sekretiert (Patient et al. 2009; Huovila et al. 1992; Patzer et al. 1986). Die Zahl dieser subviralen Partikel kann die der Virionen um bis zu einem Faktor von 10^4 übersteigen. Hauptsächlich bestehen diese Partikel aus sphärischen Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 24 nm. Diese setzen sich zum größten Teil aus SHBS und wenigen MHBS-Proteinen zusammen. Filamentöse subvirale Partikel beinhalten zusätzlich deutlich gesteigerte Mengen an LHBS (Heermann et al. 1984) und werden analog zu viralen, infektiösen Partikeln mittels MVBs sekretiert (Jiang et al. 2015). Dies beruht möglicherweise auch auf Interaktionen des LHBS mit dem zellulären Faktor α -Taxilin (Hoffmann et al. 2013). Auf Basis der

aktuellen Forschung konnte bislang noch nicht abschließend geklärt werden, warum ein solches Übermaß an nicht-infektiösem Material gebildet wird, jedoch wird eine Ablenkung des Immunsystems als wahrscheinlichster Grund vermutet (Prange 2012; Patient et al. 2009).

1.2.4 *Der virale Lebenszyklus*

Alle *Hepadnaviridae* zeichnen sich durch eine hohe Spezies- und Gewebsspezifität aus, weswegen im menschlichen Körper ausschließlich Leberzellen infiziert werden. Das Virus interagiert zuerst durch unspezifische Bindung mit Heparinsulfat-Proteoglykanen, welche aus der Plasmamembran von Hepatozyten ragen (Schulze et al. 2007; Leistner et al. 2008). Im Anschluss kommt es zur Bindung der PreS1-Domäne des viralen LHBs an den zell-spezifischen Rezeptor NTCP (*Na⁺-Taurochlorat co-transporting polypeptide*), welcher in der Membran differenzierter Hepatozyten zu finden ist (Yan et al. 2012). Der genaue Vorgang der Rezeptor-vermittelten Endozytose konnte bislang nicht abschließend geklärt werden, jedoch scheint der zelluläre Faktor α -Taxilin dabei einen essentiellen Einfluss zu haben (Hoffmann et al. 2013). Aufgrund der endosomalen sauren Umgebung erfolgt eine strukturelle Änderung der PreS2-Domäne in den HBV-Oberflächenproteinen, welche letztlich ein Translokationsmotiv (TLM) freilegt (Stoeckl et al. 2006). Durch Fusion der Virus-Hülle mit der endosomalen Membran wird das Nukleokapsid in das Zytosol der Wirtszelle entlassen (Schaedler und Hildt 2009; Oess und Hildt 2000). Nach dem Transport des Nukleokapsids zum Zellkern erfolgt die Einschleusung des viralen Genoms durch den Kernporen-Komplex in das Nukleoplasma (Rabe et al. 2006). Dieser zielgerichtete Transport wird durch das NLS-Signal des HBc-Proteins vermittelt, nach der Entpackung des Kapsids am Kernporen-Komplex (Kann et al. 1999; Schmitz et al. 2010). Der Import des kovalent an die virale Polymerase gebundenen Genoms erfolgt zuletzt aufgrund eines zweiteiligen NLS der viralen Polymerase (Lupberger et al. 2013). Im Zellkern wird die rcDNA mit Hilfe von zellulären DNA-Reparatur-Mechanismen zur kovalent-geschlossenen zirkulären Form (cccDNA) konvertiert, welche dort als äußerst stabiles episomales Minichromosom verbleibt (Lucifora und Protzer 2016; Nassal 2015). Mit Hilfe der zellulären RNA-Polymerase II wird anhand der cccDNA die für die virale Replikation essentiellen prä- und subgenomischen RNAs gebildet. Nach erfolgtem Transport der pgRNA in das Zytosol erfolgt die Translation und somit die Synthese der viralen Polymerase und des *core*- und *precore*-Proteins (Gerlich 2013). Kürzere mRNA-Varianten dienen als Matrize für die viralen Oberflächenproteine und das HBx. Mit Hilfe des ϵ -Signals wird die Bindung der viralen Polymerase an die pgRNA

realisiert. Dies geschieht in Verbindung mit der Assemblierung des Nukleokapsids, wonach im Innern des geschlossenen Kapsids die reverse Transkription der pgRNA in das partiell doppelsträngige DNA-Genom erfolgt (Bruss 2007; Schaedler und Hildt 2009). Nach erfolgter Reifung des Nukleokapsids können zwei verschiedene Wege desselben innerhalb des viralen Lebenszyklus beobachtet werden. Zum einen kann ein erneuter Rücktransport zum Kernporen-Komplex erfolgen, um die Menge an cccDNA im Zellkern zu erhöhen. Zum anderen kommt es durch Interaktion mit der PreS1-Domäne des LHBs zur Umhüllung des Kapsids und somit zur Bildung des vollständigen Virions an der zytosolischen Seite des ERs (Gerelsaikhan et al. 1996). Von dort aus erfolgt der Transport zum Golgi-Apparat, wo letzte Modifikationen der Oberflächenproteine stattfinden. Die Ausschleusung des Virus aus der Zelle wird letzten Endes mit Hilfe des wirtseigenen ESCRT-abhängigen (*endosomal sorting complex required for transport*) Export-Mechanismus verwirklicht, welcher endosomale Vesikel (MVBs; *multivesicular bodies*) zum Transport zur Zelloberfläche nutzt (Kian et al. 2006; Lambert et al. 2007; Watanabe et al. 2007; Hoffmann et al. 2013). Eine erste schematische Darstellung des frühen viralen Lebenszyklus findet sich in Abb. 6.

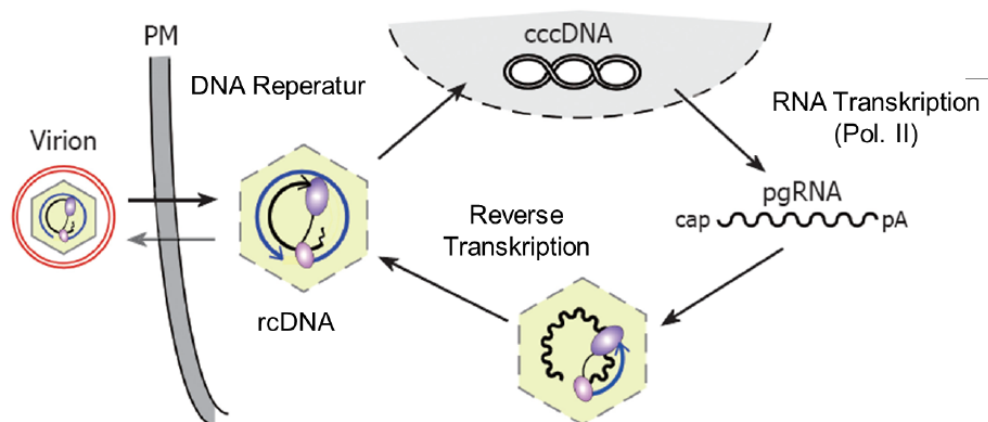


Abb. 6: Schematische Darstellung des HBV-Lebenszyklus; nach dem receptor-vermittelten Eintritt der Viren an der Zellmembran erfolgt die Einschleusung der viralen DNA in den Zellkern. Dort wird aus der rcDNA (relaxed circular DNA) die cccDNA (covalently closed circular DNA) gebildet. Die im Verlauf der Replikation gebildete pgRNA (pregenomische RNA) wird schließlich im Zytoplasma mit Hilfe der core-Proteine zum viralen Kapsid verpackt und nach der Umhüllung mit den viralen Oberflächenproteinen und Reifung des Viruspartikels aus der Zelle transportiert (nach Beck und Nassal 2007).

Hierbei muss erneut auf den Einfluss des zellulären Faktors α -Taxilin hingewiesen werden. Die regulatorisch aktiven viralen Proteine HBx und LHBs vermitteln eine Steigerung der α -Taxilin-Expression (Hoffmann et al. 2013; Barthel, SR et al. 2016). Als Folge dessen bindet α -Taxilin vermehrt an freie Syntaxine und verhindert auf diesem Wege die Formierung von t-SNARE-

Komplexen (Nogami et al. 2003a; Nogami et al. 2003b), was somit zu einer Beeinträchtigung des intrazellulären Vesikel-Transports führt. Darüber hinaus übernimmt α -Taxilin bei der Freisetzung von Viren eine Adapter-Funktion durch die Bindung einerseits an LHBs (bzw. die PreS2-Domäne) und andererseits mittels der proteineigenen *late*-Domänen an Komponenten des ESCRT-Komplexes und ermöglichen so die Ausschleusung von viralen Partikeln (Hoffmann et al. 2013). So beeinflusst α -Taxilin die Sekretion von viralen und subviralen Partikeln in zweifacher Weise. Dies beruht darauf, dass Viren und subvirale Partikel (im Allgemeinen sphärische Partikel) auf unterschiedlichen Routen die Zelle verlassen. So findet die Sekretion von vollständig assemblierten Virionen MVB-abhängig mittels des ESCRT-vermittelten Transportwegs statt (Patient et al. 2009; Lambert et al. 2007). Im Gegensatz dazu erfolgt die Ausschleusung von sphärischen subviralen Partikeln über den konstitutiven sekretorischen Pfad via ER/Golgi und ERGIC (Patient et al. 2009; Patient et al. 2007; Prange 2012). Eine schematische Darstellung des späten viralen Lebenszyklus mit besonderem Bezug auf die Sekretion von subviralen bzw. viralen Partikeln ist in Abb. 7 dargestellt.

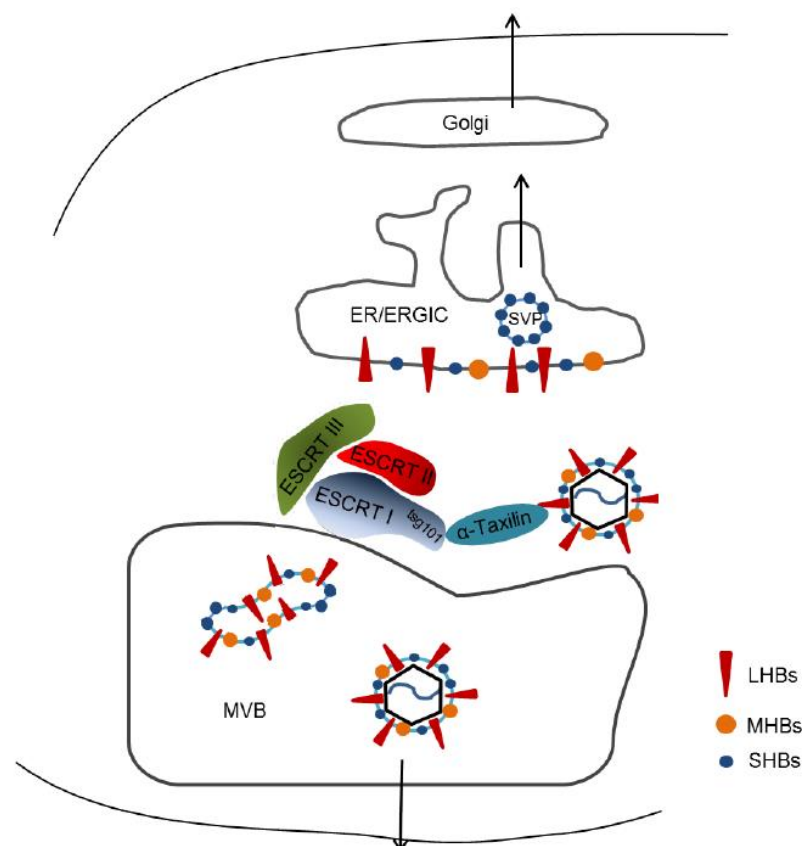


Abb. 7: Schematische Darstellung der Sekretionswege von viralen und subviralen Partikeln; nach vollständiger Assemblierung werden die viralen Partikel MVB-vermittelt sekretiert. Dies geschieht aufgrund der Interaktion von LHBs mit α -Taxilin und schließlich mittels des ESCRT-abhängigen Signalwegs mit Hilfe der MVBs. Neueste Studien haben ergeben, dass die Sekretion von filamentösen SVPs ebenfalls mit Hilfe des MVB/ESCRT-Komplexes stattfindet (Jiang et al. 2015). Sphären werden ER/ERGIC-vermittelt sekretiert (nach Diss. J. Hoffmann 2013).

1.3 Die HBV-Genotypen

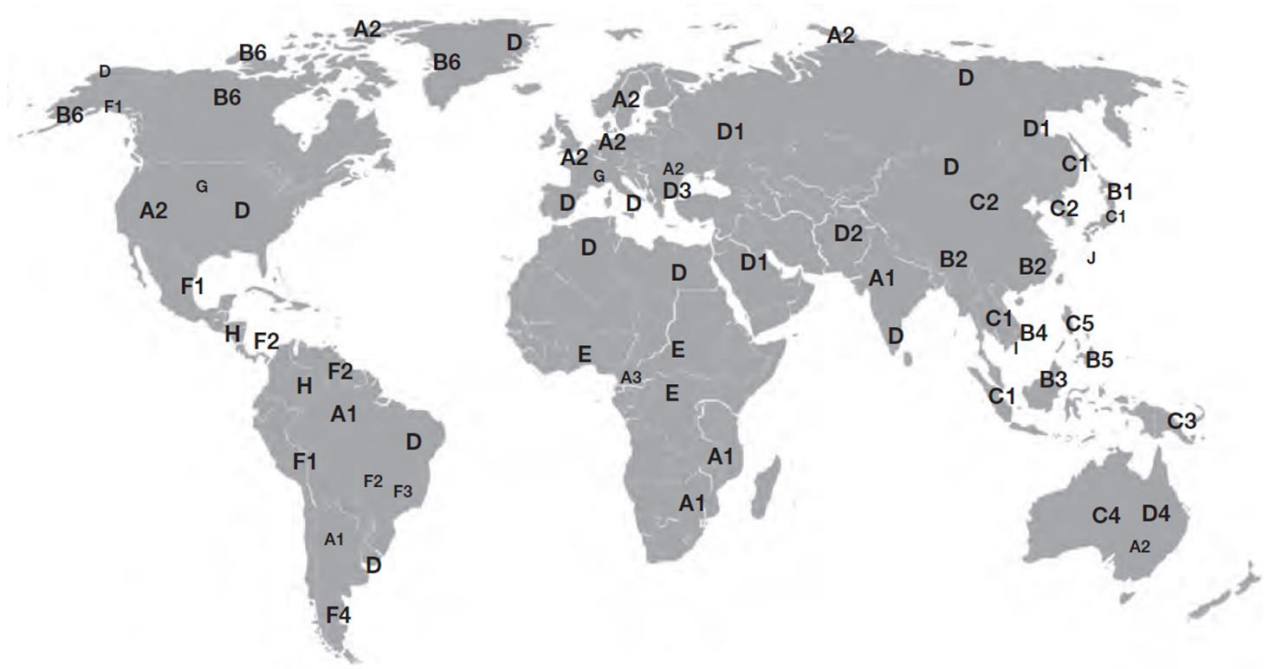
Mutationen im Genom des Hepatitis-B-Virus entstehen aufgrund der fehlenden Korrekturlese-Funktion der viralen Polymerase mit einer höheren Wahrscheinlichkeit – verglichen mit anderen DNA-Viren (Orito et al. 1989). Ein restriktiver Faktor bei der Entstehung solcher Mutationen stellt jedoch die zirkuläre Form des Genoms dar, da die vier ORFs überlappend vorliegen. Somit können Mutationen nur in einer limitierten Ausprägung einen vollen und funktionsfähigen Lebenszyklus garantieren (Mizokami et al. 1997; Yang et al. 1995). Dennoch konnten sich seit der Anpassung des Virus auf den Menschen eine Vielzahl an HBV-Subtypen ausprägen, deren globale Verteilung in signifikanter Art und Weise den frühmenschlichen Migrationswellen zugeordnet werden kann (Paraskevis et al. 2013; Norder et al. 2004).

Vor der umfangreichen Nutzung der Sequenzierung ganzer Genome erfolgte eine Kategorisierung von HBV anhand seines produzierten HBsAg und hier speziell mittels charakteristischer Aminosäure-Sequenzen in der immunologisch wichtigen α -Determinante. Die Aminosäuren 100–164 der S-Domäne werden auf der Oberfläche sekretierter Virionen präsentiert und bilden durch Disulfidbrückenbindungen eine selbst zwischen den HBV-Stämmen konservierte Struktur aus, welche das primäre Ziel für neutralisierende Antikörper darstellt (Julithe et al. 2014; Zanetti et al. 2008). Durch diese Eigenschaften wurde die α -Determinante ebenfalls Namensgeber für alle HBV-spezifischen „serologischen Subtypen“ bzw. „Serotypen“ (Le Bouvier 1976; Francois et al. 2001). Die weitere Bezeichnung basiert auf den Aminosäuren an Position 122 und 160 der S-Domäne. So führt ein Lysin an Position 122 zum Serotyp *d*, ein Arginin zu einem *y*, des Weiteren bestimmen die gleichen Aminosäuren den dritten Buchstaben des Serotyps (K 160 → *w*; R 160 → *r*) (Schaefer 2005; Weber 2004). Durch tiefgreifende Analysen wurde die Anzahl der Serotypen bis heute auf mindestens neun erhöht (*ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4q*⁻, *adrq*⁺, *adrq*⁻) (Kramvis und Kew 2005; Norder et al. 2004).

Mit der erweiterten Nutzung von Sequenzierungstechniken erfolgte eine detailliertere Einstufung der HBV-Stämme in sog. Genotypen, welche sich in mindestens 8 % der Nukleotide des gesamten Genoms unterscheiden müssen. Die HBV-Genotypen wurden mit Buchstaben abgekürzt. Darüber hinaus wurden zusätzlich Subgenotypen mit einer Sequenz-Divergenz von mehr als 4 % benannt. Diese wurden durch arabische Ziffern in Verbindung mit dem Genotyp-spezifischen Buchstaben markiert (Shi et al. 2013; Kramvis et al. 2005). Bis zum heutigen Tage

wurden so acht Genotypen (A–H) identifiziert, wobei bei fast allen weitere Subgenotypen bestimmt wurden (A1–7, B1–9, C1–16, D1–9, F1–4) (Gerlich 2013). Offensichtlich bei allen Genotypen und Subgenotypen ist deren charakteristische globale Verteilung, wobei dies bei HBV-Serotypen wie auch hinsichtlich der Genotypen in analoger Weise erkennbar ist. Auf der Basis einer Vielzahl an Bestimmungen des HBV-Genotyps in infizierten Patienten können folgende Aussagen zur weltweiten Verteilung gemacht werden (Tab. 1 + Abb. 8):

Genotyp	Geografische Region	Bemerkungen
GtA1	Subsahara-Afrika, Südamerika	HCC oft bei jüngeren Männern (jedoch ohne Zirrhosen); HBeAg-Serokonversion ereignet sich früher Möglicherweise durch Sklaverei nach Südamerika importiert
GtA2	Europa, USA, Australien	HCC und Zirrhosen in älteren Patienten („Genotyp der Industrienationen“)
GtA3	West-Afrika	(Noch nicht ausreichend studiert)
GtB+GtC	Asien	Typische Genotypen im asiatischen/ozeanischen Raum
GtB1	Japan	HCC und Zirrhosen in älteren Patienten
GtB2–5	Ost-Asien	HCC und Zirrhosen bei jüngeren Personen HBeAg-Serokonversion in höherem Alter Höheres Risiko für HCC und BCP-Mutationen als bei GtB1
GtC	Süd-Ost-Asien	Höheres Risiko für HCC und Zirrhosen als bei GtB HBeAg-Serokonversion zwischen 1–3 Jahrzehnte später als bei GtA, GtB, GtD und GtF
GtD	Weltweit	HCC und Zirrhosen in älteren Patienten Höhere Wahrscheinlichkeit für precore-Mutationen Möglicherweise ältester HBV-Stamm
GtE	Ost-Afrika	Gehäuft precore- und BCP-Mutationen (basal core promoter) Möglicherweise jüngster HBV-Stamm (regional sehr begrenzt)
GtF	Süd-/Zentral-Amerika	Assoziiert mit HCC (bei jüngeren Personen) Assoziiert mit fulminanter Hepatitis (bei HDV-Koinfektion) Bei indigenen Völkern Süd-Amerikas
GtG	Europa/USA	Häufig bei homosexuellen Männern Meistens bei Koinfektion mit GtA2
GtH	Zentr.-Amerika, Amazonas-Reg.	(Noch nicht ausreichend studiert)



Tab. 1 und Abb. 8: Geografische Verteilung der wichtigsten HBV Genotypen und deren besondere Eigenschaften (nach Kim et al. 2011).

1.4 Pathogenese

Die virale Hepatitis stellt – gemessen an den auftretenden Fallzahlen – unter den entzündlichen Lebererkrankungen die größte Gefahr dar. Die klinischen Symptome können sich nach einer Inkubationszeit von 1–6 Monaten ausprägen und treten (je nach Schwere des Verlaufs) in charakteristischer Weise in Form von Unwohlsein und Müdigkeit bis hin zu grippalen Erscheinungen (Übelkeit, Erbrechen, Appetitlosigkeit, etc.) auf. Im weiteren Verlauf kann ein hepatischer Ikterus auftreten und es kommt zu einer Schwellung der Leber, was oft sehr schmerzhaft sein kann (*Hepatitis B Foundation* 2014). Hierbei verursacht nicht das Virus an sich die schädigende Wirkung, sondern als Folge der im Körper hervorgerufenen Immunreaktion gegen infizierte Zellen kann es zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Hepatitis kommen. Je nach Krankheitsverlauf, abhängig von Faktoren wie Alter des Patienten, Geschlecht, Virusstamm und anderem, kann sich so aus einer akuten Infektion in 5–10 % der Fälle eine chronische Infektion entwickeln. Dies kann letztlich neben der kompletten Ausheilung in einer fulminanten Hepatitis und in der Entstehung eines Leberkarzinoms (*hepatocellular carcinoma*, HCC) enden (Lupberger und Hildt 2007; Rehermann und Nascimbeni 2005).

1.4.1 Akute Infektion

Im weitaus größten Teil (65–80 %) der HBV-Infektionen erfolgt eine komplette Ausheilung ohne Ausbildung von offensichtlichen Krankheitssymptomen und folglich ohne Behandlung (Chang und Lewin 2007; Tugendheim 2016). Jedoch bilden sich in etwa 20–35 % aller Fälle typische Symptome aus, welche im Regelfall nach einer Inkubationszeit von 4–12 Wochen auftreten. Dies beginnt mit der Nachweisbarkeit von HBsAg und HBeAg im Blut des Patienten. Aufgrund der geringen Nachweisgrenzen der aktuell verwendeten PCR-basierten Methoden kann auch schon in diesem Frühstadium Virus-DNA nachgewiesen werden (Mauss et al. 2015; Tugendheim 2016). Die Viruslast steigt nun meist sehr stark an, auch werden Symptome stärker sichtbar. Aufgrund des nicht-zytopathischen Effekts erfolgt die Immunabwehr nicht in Folge von Interferon-abhängigen Entzündungserscheinungen, sodass die Ausbildung von ersten Antikörpern recht spät vonstattengeht (Wieland et al. 2004; Wieland und Chisari 2005). So können in der Frühphase der Infektion große Mengen an Virus-DNA nachgewiesen werden, sodass Leberzellen in großem Ausmaß infiziert werden können (Chisari et al. 2010; Oh und Park 2015). Diese akute Phase dauert üblicherweise zwischen zwei Wochen und drei Monaten. Durch die Bildung körpereigener Antikörpern gegen das HBV *core*-Protein bzw. das HBeAg erreicht das Immunsystem eine Verringerung der viralen DNA-Mengen. Des Weiteren können in der Folgezeit ebenfalls vermehrte Mengen an HBs-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Dies wird als „postakute Phase“ bezeichnet. Nach selbstständiger Ausheilung innerhalb von ca. sechs Monaten erfolgt durch die Bildung der HBc-, HBe- und HBs-spezifischen Antikörper (der Immunglobulin-Klasse G) ein meist lebenslanger Schutz gegen eine erneute Infektion (Liang 2009). Eine Übersicht der verschiedenen serologischen Marker ist in Abb. 9 dargestellt.

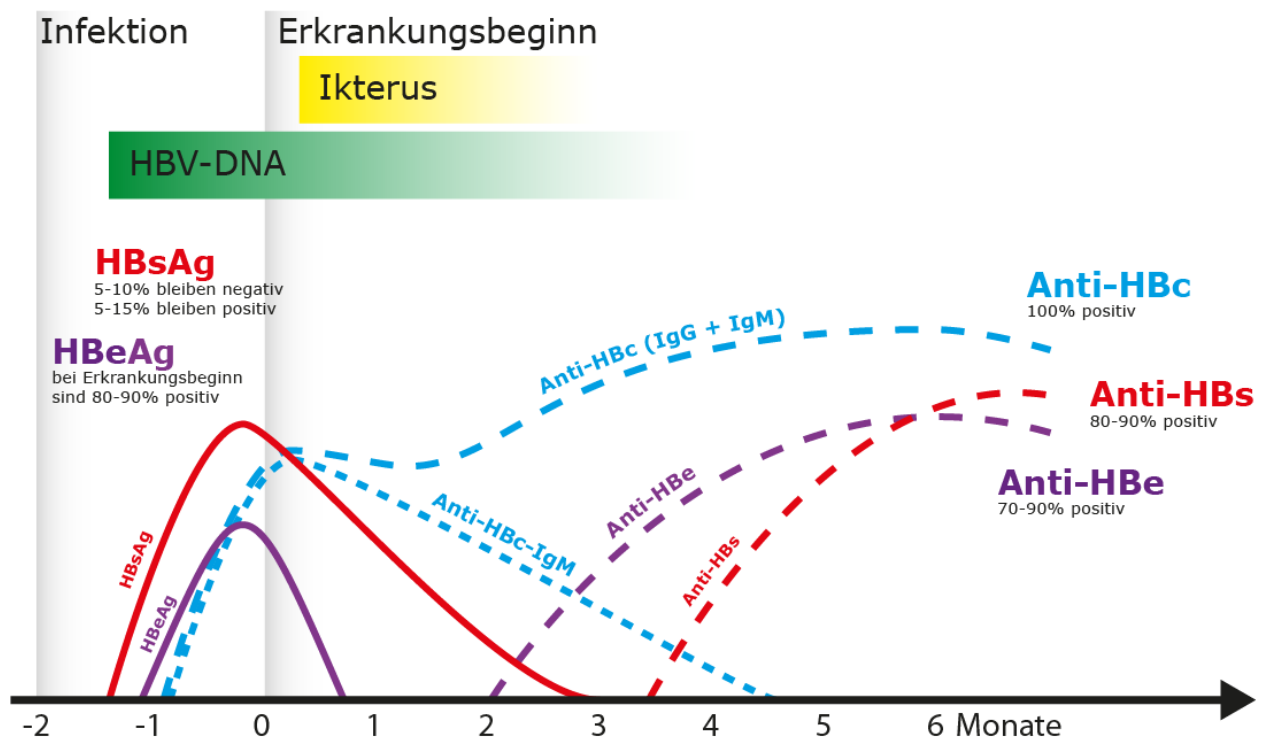


Abb. 9: Klassischer Verlauf einer akuten HBV-Infektion. Der erste Nachweis erfolgt durch die Detektion von HBsAg bzw. viraler DNA und HBeAg. Im weiteren Verlauf erfolgt ein Anstieg der Serumspiegel von anti-HBc, anti-HBe und anti-HBs (nach Tugendheim 2016).

1.4.2 Fulminante Hepatitis

Bei einem sehr geringen Teil der Fälle (0,5–1 %) erfolgt als Folge der Ausbildung einer akuten HBV-Infektion eine sogenannte fulminante Hepatitis, welche im schlimmsten Fall durch ein Leberversagen im Tod enden kann (Tugendheim 2016). Eine fulminante Hepatitis wird durch ein frühes Absinken des HBsAg-Niveaus charakterisiert. Aufgrund von deutlich vermehrten nekrotischen Vorgängen in der Leber endet diese Form der Hepatitis zumeist tödlich, wobei die Prognose für den Ausgang einer fulminanten Hepatitis im Kindesalter etwas besser ist (Tillmann et al. 2012). Patienten, die einen solchen Krankheitsverlauf überstehen, haben in den meisten Fällen die Aussicht auf eine vollständige Ausheilung.

1.4.3 Chronische Infektion

10–30 % der Personen, die eine akute HBV-Infektion durchleben, entwickeln in der Folge einen chronisch-infizierten Zustand (Tugendheim 2016). Hierbei ist zu beachten, dass die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer solchen chronischen Infektion stark vom Alter des Betroffenen abhängt. Erfolgt der erste Kontakt mit HBV bereits im Mutterleib, so entwickelt sich

in bis zu 90 % der Fälle ein chronischer Krankheitsverlauf (Kim et al. 2011). Diese Zahl fällt mit höherem Infektionsalter stark ab. So bildet sich nur noch in 30–50 % der Fälle eine chronische Infektion aus, falls der Erstkontakt im Alter von 1 bis 5 Jahren stattfindet, und sinkt für Erwachsene auf weniger als 5 % (Yuen und Lai 2007; WHO 2015). Eine chronische HBV-Infektion wird durch die Nachweisbarkeit von HBV-DNA, HBsAg und HBeAg im Blut für mehr als sechs Monate nach dem Auftreten der ersten Symptome charakterisiert. Sogenannte „inaktiv“-chronisch infizierte Patienten (*healthy carrier*), welche einen großen Teil aller chronisch HBV-Infizierten ausmachen, weisen ein dauerhaft gesteigertes messbares Niveau an HBsAg auf; jedoch sind die Werte für HBeAg negativ und es können HBeAg-spezifische Antikörper und nur sehr geringe Mengen HBV-DNA detektiert werden (Sharma et al. 2005). Die klinische Prognose für solche Patienten ist leicht optimistischer einzustufen, jedoch besteht weiterhin das gesteigerte Risiko einer Reaktivierung der virusinduzierten Hepatitis (Tong und Trieu 2013). Dazu bleibt zu erwähnen, dass das Risiko, ein HCC auszubilden, in chronisch HBV-positiven Patienten im Vergleich zu Nicht-Infizierten um das 100-fache gesteigert ist (Yuen et al. 2009). Die Fortdauer einer HBV-Infektion beruht auf einer Vielzahl von Faktoren – sowohl virusassoziiert als auch wirtsspezifisch – sodass das Risiko von onkogenen Mutationen durch die andauernden Zyklen verbunden mit Entzündungserscheinungen, gezieltem Zelltod infizierter Hepatozyten und anschließender Leberregeneration stark ansteigt (Chisari et al. 2010; Rehermann und Nascimbeni 2005; You et al. 2014).

1.4.4 *HBV-vermittelte HCC*

Hinsichtlich der jährlichen Fallzahlen stellt das HCC – nach Lungenkrebs – die zweitgrößte Gefahr einer tumor-assoziierten Sterblichkeit dar und rangiert unter den häufigsten Krebstypen weltweit an fünfter Stelle (WHO 2015). Etwa 50 % der Leberkrebsfälle weltweit und ungefähr 70–80 % der HCCs in hochendemischen Gebieten können mit chronischen HBV-Infektionen in Verbindung gebracht werden (Nguyen et al. 2009). Hierbei konnte in fast allen Fällen eine Integration von viraler DNA in das Wirtsgenom infizierter maligner Zellen beobachtet werden (Lupberger und Hildt 2007). Es wird vermutet, dass die Integration in zellzyklusrelevante Gene in einer malignen Zelldifferenzierung enden kann (Riviere et al. 2014). Diese Hypothese wird als „cis-Hypothese“ bezeichnet, wobei der Ort der Integration auch den Ort der Funktion markiert. Nachgewiesenermaßen beinhalten die meisten Integrate viraler DNA die ORFs für die

viralen Proteine HBx und PreS2, bei welchen ebenfalls bereits regulatorische Funktionen bekannt sind. Ausgehend von den analysierten DNA-Integraten wurden darüber hinaus Verbindungen zu Tumorpromotor-Funktionen bestätigt (Lupberger und Hildt 2007). Sowohl von HBx als auch von MHBs^t und LHBs wurden Einflüsse in regulatorische Signalkaskaden beschrieben. Dieser Ansatz wird als „trans-Hypothese“ bezeichnet. Darüber hinaus stellt die permanente Inflammation in betroffenen Zellen einen dritten Erklärungsansatz der Tumor-Entstehung dar, sodass man abschließend sagen kann, dass die HBV-assoziierte Hepatokarzinogenese sowohl direkt als auch indirekt mit malignen Zellveränderungen in Verbindung gebracht werden kann (Hildt et al. 2002; Hildt et al. 1995; Lupberger und Hildt 2007; Hafner et al. 2003).

1.4.5 *Genotypen-spezifische Eigenschaften*

Zu den genotypischen Aspekten hinsichtlich des Krankheitsverlaufs und die damit verbundene Transmission, Prävention oder Therapierbarkeit gibt es bereits eine Vielzahl an Studien. Besonders in hochendemischen Regionen wie dem asiatischen Raum oder dem Nahen Osten, sind Wissenschaftler vermehrt daran interessiert, Verbindungen zu den jeweils vorhandenen HBV-Genotypen zu knüpfen. In afrikanischen Regionen zum Beispiel bleibt jedoch noch viel Raum für weitere Untersuchungen. Für tiefergehende Informationen hier eine kurze Auflistung verschiedener Übersichtsartikel und nachfolgend ein kurzer Einblick in die bereits publizierten Genotypen-spezifischen Eigenarten (Kim et al. 2011; Kramvis 2014; Kramvis et al. 2005; Gerlich 2013; Tong und Revill 2016; Norder et al. 2004; Pourkarim et al. 2014; Littlejohn et al. 2016; Mauss et al. 2015; Schaefer 2007; Cooksley 2010):

Die Subgenotypen des Genotyps A verhalten sich sehr unterschiedlich (Kramvis und Kew 2005). So kommt es in Afrika durch den GtA1 vermehrt zur Ausbildung von HCCs in jungen Männern (Kew et al. 2005). Der hauptsächlich in den Industrienationen prädominante GtA2 führt eher bei älteren Personen zum HCC, aber seltener (Tanaka et al. 2004). Über den Subgenotyp A3, welcher hauptsächlich in West-Afrika vorkommt, ist recht wenig bekannt. HBV-GtB ist in Kombination mit GtC der prävalenteste Genotyp im asiatischen Raum und wird in zwei größere Untergruppen aufgeteilt. Die Japan-spezifischen Subgenotypen GtB1 und GtB6 und die im Rest Asiens häufigeren Genotypen B2–B5, welche als Rekombination des GtC mit der *core*-Region des GtB angesehen werden können (Schaefer 2007). Der japanische GtB6 findet sich des Weiteren in indigenen Bewohnern Kanadas, Alaskas und Grönlands und ist bislang nicht besonders gut erforscht (Sakamoto et al. 2007). Der GtB1 führt hauptsächlich in älteren

Personen zur Ausbildung von HCCs, wohingegen die Genotypen B2–B5 eher in jüngeren Patienten Leberkarzinome nachgewiesen werden (Kobayashi et al. 2005; Sugauchi et al. 2003). Der Krankheitsverlauf dieser Subgenotypen verläuft zusätzlich schwerwiegender, verglichen mit den „japanischen“ Subgenotypen (Kim et al. 2011). Der HBV-Genotyp C wird im Allgemeinen als der vielleicht problematischste Genotyp bezeichnet und ist ebenfalls im asiatischen Raum prävalent (Kramvis und Kew 2005). Gegenüber den Genotypen A2, B1 + B6, B2–B5 oder D besteht bei einer Infektion mit dem GtC ein gesteigertes Risiko zur Ausbildung eines Leberkarzinoms (Chu und Liaw 2005). Bis zum Auftreten einer Serokonversion für HBeAg dauert es um 10 bis 30 Jahre länger, verglichen mit den anderen Genotypen (Livingston et al. 2007). Im asiatischen Raum unterscheidet man mittlerweile fünf verschiedene Subgenotypen mit regional unterschiedlichen Prävalenzen. Der als der möglicherweise älteste beschriebene Genotyp D weist die bislang größte globale Distribution auf und lässt sich daher hinsichtlich der Eigenschaften im Krankheitsverlauf nicht besonders eindeutig einordnen (Kim et al. 2011). Jedoch wurde beschrieben, dass es häufig zu *precore*-Mutationen kommen kann und dass eher ältere Patienten ein HCC entwickeln (Westland et al. 2003; Grandjacques et al. 2000). HBV-GtD wird mit einer höheren Wahrscheinlichkeit mit der Entwicklung einer schweren Leberschädigung in Verbindung gebracht – verglichen mit GtA2. Bislang sind wenige Studien mit dem noch recht jungen Genotypen E durchgeführt worden, weshalb sich noch sehr wenig über diesen in West- und Zentral-Afrika beheimateten HBV-Stamm aussagen lässt. Er weist hinsichtlich der virologischen Eigenschaften eine größere Ähnlichkeit mit dem GtD auf (Te und Jensen 2010). Der hauptsächlich in Süd- und Zentralamerika prävalente HBV-Genotyp F wurde in einigen Untersuchungen mit einer gesteigerten Wahrscheinlichkeit (verglichen mit GtA, GtB und GtD) der Entwicklung eines HCCs und mit einer höheren Sterblichkeitsrate in Verbindung gebracht, wobei dies in höherem Ausmaß jüngere Personen (vom Kindesalter bis unter 30 Jahren) betraf (McMahon 2009b; Livingston et al. 2007). Darüber hinaus wurde auch in Fallstudien beschrieben, dass es speziell in Verbindung mit diesem Genotyp trotz zuverlässigem Impfschutz zu HBV-Infektionen kommen konnte (Tacke et al. 2007; O'Halloran et al. 2011). Der möglicherweise ungewöhnlichste Genotyp stellt bei HBV wohl der Genotyp G dar, welcher in Frankreich und den USA zuerst entdeckt und nachgewiesen wurde (Stuyver et al. 2000). Aufgrund eines defektiven *precore*-ORFs ist dieser nicht in der Lage, HBeAg zu prozessieren, des Weiteren ist eine Sekretion von subviralen Partikeln nicht möglich, obwohl deren Produktion unbeein-

trächtig vonstattengeht. Dies resultiert in einem gesteigerten ER-Stress-Zustand der betroffenen Zellen und könnte so zu der Genotypen-spezifischen Pathogenese beitragen (Peiffer et al. 2015). Zu Beginn wurde stets eine Koinfektion mit dem GtA2 aufgefunden, weswegen man davon ausging, dass die fehlenden Einflüsse durch Strukturen des anderen Genotyps übernommen werden konnten (Kato et al. 2002). Im Gegensatz dazu konnten jedoch im Laufe der Zeit auch Monoinfektionen mit diesem Genotyp nachgewiesen werden, was daher schwieriger zu detektieren war, da in diagnostischen Prüfungen kein HBsAg nachweisbar ist (Chudy et al. 2006). Der Genotyp G ist unter HBV-infizierten homosexuellen Männern stark vertreten. Genotyp H ist sehr verwandt mit GtF und von daher ebenfalls im südamerikanischen Raum anzutreffen. Im Speziellen findet man diese beiden unter den Infizierten der indigenen Bevölkerung, weshalb man davon ausgeht, dass diese sich mit den Wanderungsbewegungen des Menschen aus Asien aus dem GtC entwickelt haben und daher gewisse Ähnlichkeiten aufweisen (Arauz-Ruiz et al. 2002; Devesa und Pujol 2007). Bislang können klare Verbindungen der regionalen Prävalenzen der verschiedenen HBV-Genotypen und den aufgezeichneten Migrationsbewegungen hergestellt werden (Paraskevis et al. 2013). In hochendemischen Gegenden kommt es in bis zu 10 % aller HBV-Infektionen zu Koinfektionen verschiedener Genotypen bzw. Subgenotypen (Pourkarim et al. 2014). Mit zunehmender Migrationsbereitschaft und Globalisierung kann dies eine größere Gefahr der Entstehung neuer (möglicherweise gefährlicherer) Virus-Varianten führen, weswegen eine zuverlässige Detektierbarkeit von HBV-Infektionen und ein weltweit verfügbarer und möglicherweise Genotypen-spezifischer Impfschutz ein prädominantes Ziel der Forschung darstellen sollte.

1.5 Transmission und Endemizität

Das Hepatitis-B-Virus wird generell durch viral kontaminierte Körperflüssigkeiten von infizierten Personen auf andere übertragen. Hierbei wurden verschieden Routen der Übertragung identifiziert und konnten darüber hinaus auch den unterschiedlichen Genotypen zugeordnet werden. Die beschriebenen Übertragungswege umfassen Transfusionen mit Blut infizierter Personen (meistens wegen schlechten bzw. fehlenden Nachweises der Infektion), die Übertragung durch sexuellen Kontakt, die Nutzung unsteriler Materialien für Injektionen und die Übertragung von der Mutter auf das ungeborene Kind (Pourkarim et al. 2014). In neuerer Zeit wurden auch Tränen, Urin, Speichel, Bisse und die Übertragung über Hautwunden der Liste

der möglichen Transmissionswege hinzugefügt (van Damme et al. 2010). Da das Hepatitis-B-Virus bis zu einer Woche auf Oberflächen stabil ist, könnte eine Übertragung auch durch Personen stattfinden, die häufig Kontakt mit Infizierten haben – dies trifft meistens für medizinisches Personal und pflegeleistende Angehörige zu (Shepard et al. 2006). Die Tatsache, dass der Übertragungsweg von der regionalen Prävalenz chronischer Infektionen abhängig ist und dass Genotypen-assoziierte Charakteristika der Neuinfektionen beschrieben wurden, verkompliziert die Sachlage umso mehr (Allain 2006). Der Vergleich von lokaler HBV-Prävalenz und der damit verbundenen geographischen Verteilung mit regionalen und sozialen kulturellen Aspekten helfen dabei, Rückschlüsse hinsichtlich der Transmissionswege verschiedener HBV-Genotypen zu ziehen (Pourkarim und van Ranst 2011). So ist der perinatale Übertragungsweg (von der Mutter auf das ungeborene Kind) im hochprävalenten asiatischen Raum in Verbindung mit den Genotypen B und C dominant, da hier eine sehr späte Serokonversion von HBeAg zu anti-HBe üblich ist (speziell für GtC). So ist eine familiäre HBV-Übertragung für diese Genotypen sehr charakteristisch (Roingeard et al. 1993). Studien konnten belegen, dass bei HBeAg-positiven Schwangeren in nahezu 100 % aller Fälle eine Infektion des Neugeborenen nachgewiesen werden kann und 90 % dieser Kinder später einen chronischen Verlauf durchleben müssen (McMahon 2009a; Okada et al. 1976). Bei HBeAg-negativen Schwangeren sinken diese Zahlen auf weniger als 25 % für eine Infektion bzw. auf ca. 10–15 % für einen chronischen Krankheitsverlauf des Neugeborenen (Beasley und Hwang 1983). Im Allgemeinen sinkt die Wahrscheinlichkeit der Ausprägung einer chronischen HBV-Erkrankung mit steigendem Infektionsalter. Bei Kindern im Alter von 1–5 Jahren beträgt diese 30–50 % und lediglich 5 % im Falle einer Infektion im Erwachsenenalter (Yuen und Lai 2007). In der europäischen Region, die mit den dominierenden Genotypen A2 und D eine recht geringe Prävalenz-Rate (< 2 %) aufweist, sind die sexuelle Übertragung und nicht-sterile Injektionspraktiken der häufigste Grund einer HBV-Infektion. Dabei stellen die nosokomiale Transmission und unsaubere Injektionen etwa 60 % der HBV-Infektionen in Zentraleuropa dar (Custer et al. 2004). Die meisten Infektionen finden daher im Erwachsenenalter bzw. in der späten Jugend statt (Fattovich et al. 2008). Im afrikanischen Raum wird der dominierende HBV-Genotyp E (und A1) zumeist horizontal durch sexuellen Kontakt übertragen. Zudem erfolgen viele Infektionen durch Schnitte und offene Wunden bereits im Kindesalter (Hoffmann und Thio 2007; McMahon 2009b). Genotyp G wurde vor allem in den USA (aber auch in West-Europa und Teilen Kanadas) als HBV-Stamm identifiziert, der zumeist durch homosexuellen Kontakt unter Männern übertragen

wird (Tamada et al. 2012; Vieth et al. 2002). Hinsichtlich anderer HBV-Genotypen können bislang nicht viele Aussagen gemacht werden, da größere Studien noch nicht in ausreichender Zahl durchgeführt wurden.

1.6 Prävention und Behandlung

Eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus kann sehr erfolgreich durch eine prophylaktische passive oder aktive Immunisierung verhindert werden. Im Speziellen erfolgt die Verwendung eines passiven Impfstoffes bei Neugeborenen von infizierten Schwangeren als Postexpositionsprophylaxe direkt nach der Geburt bzw. bei immungeschwächten Personen nach Kontakt mit HBV-kontaminiertem Material (Jilg und Gerlich 2013). Eine aktive Immunisierung erfolgt durch die Gabe von rekombinant hergestelltem und aufgereinigtem SHBs (bzw. HBsAg) des Genotyps A2, wobei erwähnt werden muss, dass dieser Genotyp lediglich in entwickelten Ländern – verbunden mit niedrigen HBV-Prävalenzen – auftritt und so weniger als 1 % aller HBV-Infektionen verursacht (Gerlich 2013). In etwa 95 % der geimpften Personen bildet sich nach drei Impfdosen ein ausreichender Impfschutz aus, wobei Alter und Gesundheitszustand eine entscheidende Rolle spielen (Tosun et al. 2011; Grosso et al. 2012). Neben dem Problem, das sogenannte *non-responder* (Impfung resultiert nicht in Antikörper-Produktion) darstellen, mussten bereits auch Fälle beobachtet werden, in denen es trotz bestehendem Impfschutz zu einer HBV-Infektion kam (Cassidy et al. 2011). Hier ist besonders der HBV-Genotyp F auffällig gewesen (O'Halloran et al. 2011; Tacke et al. 2007). Mutationen in der a-Determinante der S-Domäne stellen die größte Gefahr dar (speziell in den Aminosäuren an Stelle 125–129 und 140–149), besonders häufig wurde der Wechsel von Glycin zu Arginin an Stelle 145 detektiert (Zuckerman 2000; Carman 1997). Fälle wie diese sollten als Mahnung für Schwachstellen im aktuellen Impfprogramm gelten und dazu führen, bestehende Impfstoffe hinsichtlich der schützenden Wirkung – unabhängig von HBV-Genotypen – weiterzuentwickeln. So wurden bisher drei Impfstoffgenerationen verwendet. Die erste Generation (ab 1969) umfasste lediglich Hitze-inaktivierte Viren aus dem Blut infizierter Patienten. Dies wurde dahingehend optimiert, dass in der zweiten Generation (ab 1981) denaturierte und Proteinase-behandelte inaktive Virosomen als Impfstoff verwendet wurden. Durch Produktion von rekombinantem HBsAg in Hefen wurde die Entwicklung der dritten Impfstoffgeneration ermöglicht (ab 1986) und war der weltweit erste zugelassene rekombinante Impfstoff.

Die Behandlung einer Hepatitis-B-Infektion stützt sich im Allgemeinen auf zwei Medikamenten-Klassen: 1) Interferon alpha (IFN α)-Präparate – zum Teil in Verbindung mit Polyethylenglykol (PEG-IFN α) – wirken immunmodulatorisch, verringern dadurch die Virus-Produktion und stimulieren die Immun-Antwort. Und 2) Nukleosid/Nukleotid-Analoga, welche nachgewiesenermaßen als Inhibitoren der reversen Transkriptase wirken und so die Virus-Produktion beeinflussen. So wird die Umwandlung von pgRNA zum DNA-Genom durch die virale Polymerase verhindert (Mauss et al. 2015; Jilg und Gerlich 2013). Ziel der Behandlung ist generell die Inhibition der Virus-Replikation auf lange Zeit, sodass es nicht zur Ausbildung zirrhotischer Leberveränderungen und malignen Mutationen von Hepatozyten kommen kann. Der Erfolg einer solchen Behandlung kann somit durch Verringerung der HBsAg, HBeAg und HBV-DNA-Mengen im Blut diagnostiziert werden und führt im optimalen Fall zu Serokonversion und somit zur Bildung von HBs- bzw. HBe-spezifischen Antikörpern (Halegoua-De und Hann 2014). Hinsichtlich der verschiedenen HBV-Genotypen wurden schon mehrere Studien mit besonderem Augenmerk auf die Therapierbarkeit durchgeführt und z. B. in folgenden Reviews gelistet (Kim et al. 2011; Tong und Revill 2016; Mauss et al. 2015; Cooksley 2010; Kao und Chen 2002; Gerlich 2013). So zeigen die Genotypen A und B eine bessere Behandelbarkeit mit IFN- α -Präparaten, wohingegen GtC, GtD und speziell GtG schlechtere Resultate mit dieser Behandlungsweise erlauben. Bei der Behandlung von HBV-positiven Patienten mit Nukleosid-/Nukleotid-Analoga konnten bislang vergleichbare Ergebnisse im Hinblick auf die unterschiedlichen Genotypen erzielt werden. Generell muss jedoch beachtet werden, dass virale Mutationen in nicht geringem Maße die langzeitliche Behandlung sowohl mit IFN- α -Präparaten als auch mit Nukleosid/Nukleotid-Analoga beeinflussen und somit im schlimmsten Fall zum kompletten Verlust des therapeutischen Potentials führen können (Kim et al. 2011; Liu und Kao 2013). Das Vorkommen solcher Mutationen ist in manchen Genotypen häufiger anzutreffen verglichen mit anderen. So ist z. B. der Erfolg einer IFN- α -gestützten Therapie im asiatischen Raum deutlich schlechter, wohingegen GtA2 im europäischen und nordamerikanischen Raum deutlich besser therapiert werden kann. Vergleichbares kann bei der Behandlung von HBV-infizierten Personen mit Nukleosid-/Nukleotid-Analoga festgestellt werden. Ein weiteres Problem stellt die virale cccDNA im Zellkern dar und darüber hinaus die ungesteuerte Aufnahme viraler DNA-Fragmente in das Genom der Wirtszelle. Da dies medikamentös nicht direkt beeinflusst werden kann, ist auf diese Weise eine komplette Ausheilung sehr stark erschwert, da mit Absetzen

von Inhibitoren der viralen Replikation stets neue Viren produziert werden können (Yang und Kao 2014; Lupberger und Hildt 2007).

1.7 Detektion und Diagnostische Tests

Da aufgrund klinischer Untersuchungen eine HBV-Infektion nicht eindeutig von anderen viralen Infektionen unterschieden werden kann, ist eine laborgestützte Diagnose von essentieller Bedeutung. Mit Hilfe einer Vielzahl an Testsystemen, basierend auf Blutuntersuchungen, ist es möglich, eine Erkrankung mit HBV zu detektieren und darüber hinaus zwischen akuter und chronischer Infektion zu unterscheiden. Der Hauptfokus dieser Untersuchung liegt auf der Detektion des HBsAg; hierzu empfiehlt die WHO eine HBsAg-spezifische Testung aller Blutspenden, um die Blutsicherheit und damit die Verhinderung von vermeidbaren Transmissionen zu gewährleisten (WHO 2015). Zur Diskriminierung von chronisch bzw. akut infizierten Personen schreibt die WHO, dass die akute Phase durch Detektion von HBsAg in Verbindung mit anti-HBcAg (anfangs zuzüglich hoher HBeAg-Spiegel, auch als Hinweis hoher Infektiosität) identifiziert werden kann, während ein chronischer Verlauf bei Nachweisbarkeit von HBsAg im Zeitraum von mehr als sechs Monaten auftritt. Auf diese Weise stellt die Detektion von HBsAg den wichtigsten klinischen Marker dar, wenn Aussagen bezüglich des Risikos einer chronischen Lebererkrankung bzw. eines HCCs gemacht werden sollen. Im März 2015 verfasste die WHO ein Empfehlungsschreiben, in dem speziell darauf hingewiesen wurde, einfache, nicht-invasive diagnostische Verfahren verstärkt zu nutzen, um den Status der Leberschädigung und eine optimierte Behandlung zu bestimmen (WHO 2015). Eine Auflistung der diagnostischen Marker und deren Auftreten sind in Tab. 2 ersichtlich.

Tab. 2: Auflistung der serologischen HBV-Marker und deren Bedeutung (nach Liang 2009).

Diagnostischer Marker	Bemerkungen
HBsAg	Marker für akute/chronische Infektion
HBeAg	Marker für hohe Replikation und hohe Infektiosität
HBV-DNA	Marker für Replikation
Anti-HBcAg (IgM)	Marker für akute HBV-Infektion
Anti-HBcAg (IgG)	Marker für ausgeheilte/chronische Infektion
Anti-HBsAg	Marker für ausgeheilte Infektion/erfolgreiche Impfung
Anti-HBeAg	Marker für niedrige Replikation/Behandlungserfolg
Anti-HBcAg (IgG) + anti-HBsAg	Marker für abgeschlossene Infektion
Abti-HBcAg (IgG) + HBsAg	Marker für chronische Infektion
Anti-HBcAg (IgG) w/wo anti-HBsAg + HBV-DNA	Marker für verborgene (okkulte) Infektion

Obwohl die Detektion von HBV-DNA im Blut von infizierten Personen als „Gold-Standard“ in der Diagnostik gilt, ist die Messung von HBsAg aufgrund der geringen Kosten, der kurzen und einfachen Testung und der guten Verfügbarkeit der zumeist erste Aspekt der klinischen Analyse (Lee und Ahn 2011). Nachdem im Jahr 1970 das erste System zur Detektion von HBsAg vorgestellt wurde, ist man bis heute bereits sehr erfolgreich in der Lage, die Menge an HBsAg in Blutproben quantitativ mit Hilfe von ELISAs (*enzyme-linked immunosorbent assays*) zu detektieren. So dauerte es nicht lange, bis die ersten Vergleichsstudien zwischen HBsAg- und HBV-DNA-Spiegel erstellt wurden. Dies hatte zur Folge, dass sowohl Nachweise für eine Korrelation beider Marker (Deguchi et al. 2004; Chen et al. 2004; Kohmoto et al. 2005; Manesis et al. 2007; Moucari et al. 2009) als auch keine entsprechende Analogie in manchen Fällen auftrat (Kuhns et al. 2004; Wiegand et al. 2008; Ganji et al. 2011). Nichtsdestotrotz wird die quantitative Messung der HBsAg-Menge häufig als Hinweis für eine vorhandene bzw. nichtvorhandene Reaktion auf die antivirale Therapie verwendet (Brunetto et al. 2009; Chan et al. 2007; Lau und Bleibel 2008; Lee und Ahn 2011). Durch weiterführende Studien konnte so eine optimierte Behandlungsregel ausgegeben werden (Martinot-Peignoux et al. 2014; Martinot-Peignoux et al. 2015).

Um kommerziell erhältliche HBsAg-gestützte ELISA-Systeme hinsichtlich deren Sensitivität und Reproduzierbarkeit sinnvoll zu analysieren, wurde durch das Paul-Ehrlich-Institut (PEI, als

Kollaborationspartner der WHO) im Jahr 2013 das erste internationale HBV-Genotypen-spezifische Referenz-System für HBsAg-ELISAs erstellt (Chudy et al. 2013). Hierbei wurden durch Plasmaspenden chronisch infizierter und genotypisierter Patienten in Verbindung mit verschiedenen Reinigungsmethoden eindeutig quantifizierte Standards hergestellt, mit deren Hilfe eine qualitative und quantitative Validierung vorhandener Assays möglich ist. Die darauf basierenden Messungen lassen Aussagen hinsichtlich der gemessenen HBsAg-Menge jedoch nur in willkürlich definierten Einheiten (sog. IUs; *international units*) zu, da das Test-Material auf Patienten-Seren mit sehr unterschiedlichen HBV-Titern beruht. Bereits mit diesen Standards konnten signifikante Unterschiede in den verschiedenen kommerziell erhältlichen Test-Systemen von Mitarbeitern des PEI nachgewiesen werden (Chudy et al. 2013; Scheiblauer et al. 2006; Scheiblauer et al. 2010). Darüber hinaus sind bereits einige Mutationen in der immunologisch wichtigen a-Determinante bekannt, welche zu falsch-negativen Ergebnissen in solchen Testungen führen können (Gerlich et al. 2010; Gerlich 2013). Somit lässt sich abschließend sagen, dass eine Analyse der marktüblichen diagnostischen HBsAg-ELISAs bislang nicht absolut zuverlässig möglich ist und somit Handlungsbedarf besteht. Mit Hilfe von eindeutig sequenziell bestimmtem, rekombinant hergestelltem HBsAg ließen sich nach erfolgreicher Aufreinigung und Quantifizierung sowohl notwendige als auch hinreichende Aussagen über die qualitative und quantitative Sensitivität wie auch die Reproduzierbarkeit der vorhandenen Testsysteme machen. Letztlich könnten mit dieser Herangehensweise darüber hinaus bereits etablierte ELISA-Kits verbessert und weiterentwickelt werden.

2 ZIELSETZUNG

Das Hepatitis-B-Virus ist mit 250–350 Millionen chronisch Infizierten und etwa 600.000–800.000 jährlichen Todesfällen eine der gefährlichsten Viruserkrankungen weltweit. Darüber hinaus konnten bislang acht verschiedene HBV-Genotypen mit Unterschieden im viralen Genom von mindestens 8 % definitiv beschrieben werden, welche sich im Hinblick auf deren geografische Prävalenz, Pathogenese, Transmission und Krankheitsverlauf in eindeutiger Art und Weise unterscheiden. Aufgrund dieser Tatsachen ist eine HBV-Genotypen-spezifische angepasste Vorgehensweise sowohl im Hinblick auf Impfverfahren als auch in Bezug auf Diagnostik und Therapie von entscheidender Bedeutung. Im Besonderen steht hierbei die Sicherheit von Blutprodukten im Fokus, bei der der zuverlässige Nachweis aller HBV-Genotypen höchste Priorität haben sollte.

Ziel dieser Arbeit war die Optimierung der aktuellen Prüfmethode von kommerziell erhältlichen Nachweisverfahren, basierend auf der Detektion von HBsAg (HBsAg-ELISA). Dies sollte durch Herstellung eines rekombinanten, Genotypen-spezifischen HBsAg-basierten Referenzpanels zur Analyse und Eichung der verschiedenen diagnostischen ELISA-Systemen erfolgen. Hauptziel für diesen Ansatz war eine erfolgreiche und reproduzierbare Reinigung von rekombinant hergestelltem HBsAg aus dem Zellkultur-Überstand von HBV-positiven Zellen. Im Zuge der Herstellung von rekombinantem HBsAg durch Transfektion sollten darüber hinaus vergleichende Analysen zwischen den verschiedenen HBV-Genotypen hinsichtlich deren HBsAg-Produktion, der speziellen posttranslationalen Modifikationen und der intrazellulären Verteilung der gebildeten Oberflächenproteine durchgeführt werden. Diese Untersuchungen zwischen den verschiedenen HBV-Genotypen sollte das Verständnis der unterschiedlichen Charakteristika in Bezug auf die globalen Unterschiede bei HBV-Erkrankungen verbessern. Mit Hilfe der Reinigung von rekombinant hergestelltem HBsAg sollte zudem die vermehrt auftretenden genotypisch-bedingten Abweichungen innerhalb der etablierten Prüfverfahren untersucht werden. Dies kann letzten Endes zu einer Optimierung der aktuellen Nachweisverfahren von HBV-Infektionen mit besonderer Rücksicht auf die verschiedenen Genotypen führen. Darüber hinaus bietet sich so die Möglichkeit, aktuelle Impfverfahren entsprechend der unterschiedlichen Genotypen-spezifischen globalen Gegebenheiten anzupassen und adäquat zu verbessern.

3 MATERIAL

3.1 Bakterienstämme und Zelllinien

3.1.1 Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5α	F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ fU169 recA1 endA1 hsdR17 phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -	Life Technologies GmbH, Darmstadt
<i>E. coli</i> TOP10	F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ -	Life Technologies GmbH, Darmstadt

3.1.2 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
CHO	Immortalisierte Zelllinie aus Ovarial-Zellen des chinesischen Hamsters (TJIO und PUCK 1958; Gluzman 1981)
COS-7	Fibroblasten-ähnliche Zelllinie, von Nieren-Zellen der äthiopischen Grünmeerkatze (<i>Chlorocebus aethiops</i>) abstammend (JENSEN et al. 1964)
HepAD38	Humane Hepatoblastom-Zelllinie, entstammt der HepG2-Zelllinie, hat 1,2-faches HBV-Genom (Serotyp ayw, Genotyp D) stabil integriert (Ladner et al. 1997)
HepG2	Humane Hepatoblastom-Zelllinie (Knowles et al. 1980)
Huh7.5	Humane Hepatoblastom-Zelllinie, von Huh7-Zellen abstammend (Blight et al. 2002)

3.2 Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Herkunft
GalT-YFP	YFP-gekoppeltes trans-Golgi Marker-Konstrukt	Zur Verfügung gestellt durch Dr. AK R. Duden, Lübeck
GRASP65-YFP	YFP-gekoppeltes cis-Golgi Marker-Konstrukt	Zur Verfügung gestellt durch Dr. AK R. Duden, Lübeck

pCEP-GtA1.1	1,1-faches HBV-Genom (CMV-Promotor; Genotyp A)	Diss. A. Geipel 2011
pCEP-GtA1.5	1,5-faches HBV-Genom (natürl. Promotor; Genotyp A)	Diss. H. Nienkamp 2014
pCEP-GtB1.5	1,5-faches HBV-Genom (natürl. Promotor; Genotyp B)	Zur Verfügung gestellt durch AK Dr. D. Glebe, Gießen
pCEP-GtC1.5	1,5-faches HBV-Genom (natürl. Promotor; Genotyp C)	Bereitgestellt durch AK Dr. D. Glebe, Gießen
pCEP-GtG1.1	1,1-faches HBV-Genom (CMV-Promotor; Genotyp G)	Diss. A. Geipel 2011
pCEP-GtG1.5	1,5-faches HBV-Genom (natürl. Promotor; Genotyp G)	Diss. H. Nienkamp 2014
pCEP-ZFN-GtA1.5	HBV-Genotyp-A-Donor-Konstrukt, angepasst für ZFN-gesteuerte Insertion (natürl. Promotor)	AK Dr. D. Glebe, Gießen (nach Moehle et al. 2007)
pCEP-ZFN-GtD1.5	HBV-Genotyp-D-Donor-Konstrukt, angepasst für ZFN-gesteuerte Insertion (natürl. Promotor)	AK Dr. D. Glebe, Gießen (nach Moehle et al. 2007)
pDEST26-TXLNA	α -Taxilin-Expressionsplasmid	ImaGenes GmbH, Berlin
pEGFP-N1	eGFP-Expressionsvektor	Clontech Laboratories Inc., Heidelberg
pEGFP-TGN49	EGFP-gekoppeltes trans-Golgi Marker-Konstrukt	AG Dr. E. Hildt (nach Waguri et al. 2003)
pEYFP-RAB7	EYFP-gekoppeltes MVB Marker-Konstrukt	Zur Verfügung gestellt durch AK Dr. R. Duden, Lübeck
pJO19	1,2-faches HBV-Genom (Genotyp D Serotyp <i>ayw</i>)	(nach Lupberger et al. 2013)
pmCherry-Tax	mCherry-gekoppeltes α -Taxilin-Konstrukt	AG Dr. E. Hildt (Diss. M. Heilmann 2015)
pUC18	Kontrollvektor	Life Technologies GmbH, Darmstadt
pUC19	Kontrollvektor	Life Technologies GmbH, Darmstadt

pYFP-CI-M6PR	YFP-gekoppeltes trans-Golgi Marker-Konstrukt	AG Dr. E. Hildt (nach Waguri et al. 2003)
Sec22-YFP	YFP-gekoppeltes ER Marker-Konstrukt	Zur Verfügung gestellt durch AK Dr. R. Duden, Lübeck
VPS4-YFP	YFP-gekoppeltes ESCRT-Komplex Marker-Konstrukt	Zur Verfügung gestellt durch AK Dr. R. Prange, Mainz
ZFN-L/R	ZFN-Heterodimer-Konstrukte, angepasst für AAVS1 Locus	AK Dr. D. Glebe, Gießen (nach Miller et al. 2007)

3.3 Oligonukleotide (Primer)

Listen-Nr.	Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'
#042	GAPDH_forward	GAC CCC TTC ATT GAC CTC AAC
#043	GAPDH_reverse	TGG ACT GTG GTC ATG AGT CC
#185	hbv_S_forward	AAC ATG GAG AAC ATC ACA TCA G
#186	hbv_S_reverse	TAT ACC CAA AGA CAA AAG AAA ATT GG
#405	HBV 3.5kb_LC_fwd	CTC CAA GCT GTG CCT TGG G
#406	HBV 3.5kb_LC_rev	CCC ACC CAG GTA GCT AGA G
#650	AAVS1 I reverse	GGA ACG GGG CTC AGT CTG
#669	HBV ZFN I forward	GCA CCT GTA TTC CCA TCC CA
#676	HBV ZFN II reverse	GCA GAG GAG CCA CAA AGG T
#677	HBV ZFN II forward	GCT TCA CCT CTG CAC GTT G
#678	AAVS1 II forward	GCT GCA GCT TCC TTA CAC TTC
#679	AAVS1 I forward	GCC ATT GTC ACT TTG CGC TG
#765	AAVS1 II reverse	AGA TGG CTC CAG GAA ATG GG
#766	AAVS1 III reverse	GGA ATC TGC CTA ACA GGA GG
#767	AAVS1 IV reverse	TAG GAA GGA GGA GGC CTA AG
#768	HBV ZFN III forward	AGT GGT TCG TAG GGC TTT CC
#769	HBV ZFN IV forward	CTC AGT CCG TTT CTC TTG GC
#779	AAVS1 III forward	CAG GAC AGC ATG TTT GCT GC

#780	AAVS1 IV forward	GCT GGG ACC ACC TTA TAT TCC
#781	HBV ZFN III reverse	TAT AGC TGA AAG CCA AAC AGT GG
#782	HBV ZFN IV reverse	AGC CCT ACG AAC CAC TGA AC
#835	hRPL27cDNA forward	AAA GCT GTC ATC GTG AAG AAC
#836	hRPL27cDNA reverse	GCT GCT ACT TTG CGG GGG TAG
#927	Gts 1.1 forward	ACT AGG AGG CTG TAG GCA TA
#928	Gts 1.1 reverse	AGA CTC TAA GGC TTC CCG
#955	HBV-Sonde forward	CAA CCT TCC ACC AAA CTC TGC A
#956	HBV-Sonde reverse	CAA ACG GGC AAC ATA CCT TGA T
#961	HBV-Sonde forward2	CTG CCT TCC ACC AAG CTC TAC A
#962	AAVS1-Sonde forward2	CCC ATT CCT GCA CCC CAA TT
#963	AAVS1-Sonde reverse2	TCC CCA TTC AAC CCA GGA GG

3.4 Größenstandards

Typ	Bezeichnung	Hersteller
DNA-Standard	Gene Ruler™ 1 kb DNA ladder	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
DNA-Standard	Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Protein-Standard	PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Protein-Standard	Protein-MW-Marker	VWR Life Science Competence Center, Erlangen

3.5 Antikörper

3.5.1 Primär-Antikörper

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung (WB/IF)	Hersteller
Anti-core (K46)	Kaninchen	polyklonal	1:5000/-	AK R. Prange, Uni Mainz
Anti-HBs (HB01)	Maus	monoklonal	1:500/1:100	AK D. Glebe, Uni Gießen
Anti-LHBs (Ma18/7)	Maus	monoklonal	1:1000/1:100	Uni Göttingen (Heermann et al. 1984)
Anti-Taxilin (H66)	Kaninchen	monoklonal	1:500/1:80	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg
Anti-β-Aktin	Maus	monoklonal	1:10000/-	Sigma-Aldrich, Seelze

3.5.2 Sekundär-Antikörper

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung (WB/IF)	Hersteller
Anti-Kanin.-IgG-IRDye800CW	Esel	polyklonal	1:10000/-	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Anti-Kaninchen-IgG-Alexa488	Esel	polyklonal	-/1:1000	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Anti-Kaninchen-IgG-HRP	Esel	polyklonal	1:2000/-	GE Healthcare, Freiburg
Anti-Maus-IgG-cy3	Esel	polyklonal	-/1:400	Jackson ImmunoResearch; UK
Anti-Maus-IgG-HRP	Esel	polyklonal	1:2000/-	GE Healthcare, Freiburg
Anti-Maus-IgG-IRDye800CW	Esel	polyklonal	1:10000/-	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
DAPI (0,1 mg/ml in PBS)			-/1:300	Sigma-Aldrich, Seelze

3.6 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
O-Glycosidase & Neuraminidase Bundle	NEB, Frankfurt am Main
PNGase F	NEB, Frankfurt am Main
Proteinase K	Roche, Basel (CH)
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	NEB, Frankfurt am Main
RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
RQ1 DNase I	Promega GmbH, Mannheim

3.7 Inhibitoren

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Aprotinin (1 µM)	Serin-Protease-Inhibitor	AppliChem, Darmstadt
EDTA (2,5 mM)	Metalloprotease-Inhibitor	PEI (Lösungsmittellabor)
Leupeptin (4 µM)	Serin-/Cystein-Protease-Inhibitor	AppliChem, Darmstadt
Pepstatin (1 µM)	Aspartat-Protease-Inhibitor	AppliChem, Darmstadt
PMSF (1 mM)	Serin-Protease-Inhibitor	AppliChem, Darmstadt

3.8 Zellkultur-Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
DMEM (4,5 g/l Glucose, w/o L-Glutamin)	Lonza, Basel (CH)
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom GmbH, Berlin
G418	Merck-Millipore, Darmstadt
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Seelze
Insulin, human/recombinant (50 mg in ddH ₂ O)	Sigma-Aldrich, Seelze
L-Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin
Puromycin	Sigma-Aldrich, Seelze
Trypsin/EDTA	Biochrom GmbH, Berlin

3.9 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
6-Aminohexansäure (Kapronsäure)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Seelze
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich, Seelze
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich, Seelze
Butanol	VWR International GmbH
CHAPS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Coomassie® Brilliantblau R250	AppliChem, Darmstadt
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Seelze
D(+)- Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Merck, Darmstadt
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Seelze
Desoxycholsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Genaxxon BioScience GmbH, Ulm
dNTPs (dATP/dCTP/dGTP/dTTP, 10 mM)	NEB, Frankfurt am Main
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Formaldehyd (37 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
GenAgarose LE	Genaxxon BioScience GmbH, Ulm
Glycerol	Gerbu Biotechnik, Heidelberg
Harnstoff	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Immobilon Western HRP Substrate	Merck-Millipore, Darmstadt
Luminata Western HRP Substrat	Merck-Millipore, Darmstadt
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Mowiol	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumacetat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumthosulfat-Pentahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natronlauge	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
peqGold TriFast	PeqLab, Erlangen
Phenol-Rot	Sigma-Aldrich, Seelze
Polyethylenglycol (PEG)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences, Eppelheim
Random Hexamer Primer (0,2 µg/µl)	Fermentas, St. Leon-Rot
Rotiphorese Gel 40 (29:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Silbernitrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SuperSignal Western Pico HRP Substrat	Thermo Scientific, Karlsruhe
SYPRO® Ruby Protein Gel Stain	Thermo Scientific, Karlsruhe
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Merck, Darmstadt
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) Base	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Fluka, Deisenhofen
Tween 20	Genaxxon, Biberach
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Seelze

3.10 Puffer und Lösungen

3.10.1 Individuelle Puffer

Bezeichnung	Hersteller
2D-PAGE-Lyse-Puffer	2 % CHAPS (w/v) 8 M Harnstoff
4 x SDS-Ladepuffer	4 % SDS (w/v) 10 % Glycerol (v/v) 10 % β -Mercaptoethanol (v/v) 0,02 % Bromphenolblau (w/v) 125 mM TRIS-HCl, pH 6,8
6 x DNA-Ladepuffer	60 % Glycerol (v/v) 0,03 % Bromphenolblau (w/v) 60 mM EDTA 10 mM TRIS/HCl, pH 7,6
Ampicillin-Gebrauchslösung	100 mg/ml (w/v)
Anoden-Puffer I	20 % Ethanol (v/v) 300 mM TRIS Base
Anoden-Puffer II	20 % Ethanol (v/v) 25 mM TRIS Base
APS-Gebrauchslösung	10 % (w/v) APS
Coomassie-Lösung	0,5 % Brilliantblau R250 (w/v) 25 % EtOH (v/v) 10 % HAc (v/v)
Einfriermedium für Zellkulturen	DMEM (4,5 g/l Glucose) 20 % FKS 10 % DMSO 100 U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin
Entwicklerlösung	2,5 % Na_2CO_3 (w/v) 2,6 mM Formaldehyd
Ethidiumbromid-Gebrauchslösung	10 μ g/ml Ethidiumbromid (w/v) in 1 x TAE-Puffer

Fixierlösung (Silber-Färbung)	25 % EtOH (v/v)
Entfärbelösung (Coomassie-Färbung)	10 % HAc (v/v)
Fixierlösung (SYPRO® Ruby)	50 % MeOH (v/v)
Entfärbelösung (SYPRO® Ruby)	17 % HAc (v/v)
Formaldehyd-Lösung	4 % Formaldehyd (v/v) gelöst in PBS
IF-Blockierlösung	10 % BSA (w/v) gelöst in TBST
Kathoden-Puffer	20 % (v/v) Ethanol 40 mM 6-Aminohexansäure
Konditionierlösung	20 % Natriumacetat (w/v) 30 % EtOH (v/v) 1 g/l $\text{Na}_2\text{O}_3\text{S}_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (w/v) HAc, pH 6,0
LB-Agar (bereitgestellt durch PEI-Lösungsmittellabor)	1 % Trypton (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) 1 % NaCl (w/v) 1,5 % Agar-Agar (w/v)
LB-Medium (bereitgestellt durch PEI-Lösungsmittellabor)	1 % Trypton (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) 1 % NaCl (w/v)
Medium für HepAD38-Zellen	DMEM (4,5 g/l Glucose) 10 % FKS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 25 µg Hydrochortison 5 µg Insulin
Medium für Huh7.5-/HepG2-Zellen	DMEM (4,5 g/l Glucose) 10 % FKS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin
Milchpulver-Lösung	10 % Magermilchpulver (w/v) gelöst in TBST

Mowiol-Gebrauchslösung	10 % Mowiol (w/v) 25 % Glycerol (v/v) 2,5 % DABCO 100 mM TRIS/HCl, pH 8,5
PBS (<i>phosphat buffered saline</i>) (bereitgestellt durch PEI-Lösungsmittellabor)	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 1,42 g Na ₂ HPO ₄ 0,27 g KH ₂ PO ₄ Pro Liter Lösung; pH 7,1
PEG-Lösung	50 % PEG 8000 (w/w) in TNE-Puffer - vor Gebrauch autoklaviert -
RIPA-Puffer	150 mM NaCl 0,1 % SDS (w/v) 1 % Natriumdesoxycholat (w/v) 1 % Triton X-100 50 mM TRIS/HCl, pH 7,2
Sammelgel-Puffer (4 x)	0,4 % SDS (w/v) 0,5 M TRIS/HCl, pH 6,7
SDS-Laufpuffer (10 x) (bereitgestellt durch PEI-Lösungsmittellabor)	2 M Glycin 1 % SDS (w/v) 0,25 M TRIS/HCl, pH 8,3
Silbernitrat-Lösung	0,1 % AgNO ₃ (w/v) 1 mM Formaldehyd
Stripping-Puffer	2 % SDS (w/v) 100 mM β-Mercaptoethanol 62,5 mM TRIS/HCl, pH 6,8
Sucrose-Lösungen	60/45/35/25/15/5 % D(+) Saccharose (w/w) in TNE-Puffer - vor Gebrauch autoklaviert -
TAE-Puffer (50 x) (bereitgestellt durch PEI-Lösungsmittellabor)	250 mM Natriumacetat (w/v) 50 mM EDTA (v/v) 2 M TRIS/HCl, pH 8,0
TBST (bereitgestellt durch PEI-Lösungsmittellabor)	150 mM NaCl (w/v) 0,05 % Tween 20 (v/v) 20 mM TRIS/HCl, pH 7,4

TNE-Puffer	140 mM NaCl (w/v) 1 mM EDTA (v/v) 20 mM TRIS/HCl, pH 7,8 - vor Gebrauch autoklaviert -
Trenngel-Puffer (4 x)	0,4 % SDS (w/v) 1,5 M TRIS/HCl, pH 8,8

3.10.2 Kommerzielle Puffer

Bezeichnung	Hersteller
5 x Q5® High-Fidelity DNA Pol. High GC Enhancer	NEB, Frankfurt am Main
5 x Q5® High-Fidelity DNA Pol. Reaction Buffer	NEB, Frankfurt am Main
COULTER® ISOTON® III Diluent	Beckman Coulter, Krefeld
SYBR® Green Real-Time PCR Master Mix	Thermo Scientific, Karlsruhe

3.11 Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
Architect® HBsAg quant	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
COBAS® TaqMan® HBV Test	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DPC IMMULITE® HBsAg	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn
Elecsys® HBsAg II quant	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Enzygnost HBsAg 6.0 ELISA	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn
HBsAg ELISA Kit (SURASE B-96)	General Binding Corporation, USA
High Pure Viral Nucleic Acid Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lumipulse® G HBsAg-Quant	Fujirebio Germany GmbH, Hannover
Qiagen Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
RealTime HBV Amplification Kit	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden

3.12 Geräte

3.12.1 *Elektrophorese- und Blotsysteme*

Bezeichnung	Hersteller
Hoefer Elektrophorese Power Supply-EP301	GE HealthcareEurope GmbH, Freiburg
Horizontales Elektrophorese-System HE33	GE HealthcareEurope GmbH, Freiburg
Mighty small II Laufkammer	GE HealthcareEurope GmbH, Freiburg
Mighty small Multiple Gel Caster SE200 Series	GE HealthcareEurope GmbH, Freiburg
Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen
TE77 ECL-Semi-Dry Transfer Unit	GE HealthcareEurope GmbH, Freiburg
Triple Wide Mini-Vertical gel system	VWR International GmbH, Darmstadt

3.12.2 *Mikroskope*

Bezeichnung	Hersteller
Axio Observer.Z1	Carl Zeiss AG, Jena
Axiovert 40C	Carl Zeiss AG, Jena
EM 109	Carl Zeiss AG, Jena
Leica, Leitz DM RBE	Leica, Wetzlar
LSM 510 META (CLSM)	Carl Zeiss AG, Jena

3.12.3 *Imaging*

Bezeichnung	Hersteller
AGFA Curix60 Film Entwickler	AGFA, Köln
INTAS-Imaging System	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

3.12.4 PCR Cycler

Bezeichnung	Hersteller
LightCycler® 1.5 Instrument	Roche, Mannheim
LightCycler® 480 Instrument II	Roche, Mannheim
Mastercycler nexus gradient	Eppendorf GmbH, Hamburg
Mastercycler gradient	Eppendorf GmbH, Hamburg
UnoCycler	VWR International GmbH

3.12.5 Zentrifugen

Bezeichnung	Hersteller
Avanti J26 XPI	Beckman Coulter, Krefeld
Hereaus Fresco 17	Thermo Scientific, Karlsruhe
Hereaus Fresco 21	Thermo Scientific, Karlsruhe
Microzentrifuge	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Multifuge 1 S-R	Hereaus, Osterode
Optima™ L-70 Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Optima™ L-80 XP Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Optima™ MAX-XP Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
RC 5C Plus	Sorvall, Langenselbold
Varifuge RF	Hereaus, Osterode

3.12.6 Sonstiges

Bezeichnung	Hersteller
Analysefeinwaage - VWR 153	Sartorius AG, Göttingen
Analysewaage - VWR 1502	Sartorius AG, Göttingen
Belichtungskassette - Hypercassette™	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Elektroporator - Gene Pulser Mxcell™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kipptisch - Promax 1020	Heidolph Instruments, Schwabach

Kipptisch - Rocking Platform	Biometra GmbH, Göttingen
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
pH-Meter - 766 Calimatic	Knick, Berlin
Photometer - DU^o730	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Photometer - Ultrospec 3000	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Pippettierhilfe - Accu-Jet	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Refraktometer	Bausch & Lomb GmbH, Berlin
Rollinkubator - Stuart Roller Mixer SRT9	Bibby Scientific, UK
Schüttelinkubator - Innova 44	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Sonifiziergerät - Sonopuls HD 2200	Bandelin GmbH, Berlin
Sterilwerkbank - SterilGard^o III Advance	The Baker Company, ME, USA
Tecan Infinite M1000	Tecan Group Ltd. Schweiz
VortexGenie 2	Scientific Industries Inc., NY, USA
Wasserbad - TW12	Julabo GmbH, Seelbach
Wasserreinigungsanlage - Milli-Q A10	Merck Millipore, Schwalbach
Zellzähler - Z1TM Coulter^o Particle Counter	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

3.13 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
10 % CriterionTM XT Bis-Tris Gel	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Deckgläser (rund, 12 mm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Elektroporationsküvetten, 4mm	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Entwicklerlösung (Typ E 1-3)	C & L GmbH, Planegg
Fixierlösung (Typ F 1+2)	C & L GmbH, Planegg
Hyperfilm	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Kryogefäße (1,8 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
LightCycler Kapillaren (Polycarbonat)	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
Messpipetten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Objektträger SuperFrost	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Phase Lock Gel Heavy, 2 ml	5 PRIME GmbH, Hilden
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Pipettenspitzen (mit Filter)	4titude Ltd., Berlin
PVDF Membran (0,45 µm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
ReadyStrip™ IPG Strips, pH 3-10	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reaktionsgefäße (1,5/2,0 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
RotiLabo® Spritzenfilter (0,22/0,45 µm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Whatman-Filterpapier 3MM CHR	VWR International GmbH, Darmstadt
Zellkulturflaschen (T25/T75/T175)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-Lochplatten)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkultur-Schalen (100/150 mm)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zellschaber	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Zellzähler-Küvetten	VWR International GmbH, Darmstadt
Zentrifugenröhrchen (15 ml/50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

3.14 Software

Bezeichnung	Hersteller
AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss AG, Jena
GraphPad Prism 5.0/6.0	GraphPad, USA
Image Studio Lite	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
INTAS GDS	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
iTEM	Olympus Corp., Tokyo, Japan
LightCycler® 480 SW 1.5	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler® Software 3.5	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LSM Image Browser	Carl Zeiss AG, Jena
MS Office	Microsoft, USA
Photoshop CS6	Adobe, San Jose, USA
Vector NTI Suite 11	Life Technologies GmbH, Darmstadt
ZEN 2009/Zen Lite 2012	Carl Zeiss AG, Jena

4 METHODEN

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 *Arbeiten mit Bakterienkulturen*

Bakterien-Kulturen wurden standardmäßig für ca. 16 h bei 37 °C bei aeroben Verhältnissen inkubiert. Zur Transformation von kompetenten Bakterien wurden in der Regel 50–100 ng Plasmid-DNA unter Zuhilfenahme folgenden Protokolls verwendet:

- 30 min Inkubation auf Eis
- Hitzeschock bei 42 °C für 90 s (DH5 α), bzw. 30 s (TOP10)
- 5 min Inkubation auf Eis
- Zugabe von 500 μ l vorgewärmten LB-Medium; 60 min Inkubation bei 37 °C im Schüttelinkubator
- Ausplattieren der transformierten Zellen auf LB-Agar-Platten (unter Antibiotikaselektion)
- 16 h Inkubation der Platten bei 37 °C

Danach erfolgte die Selektion von Bakterienkolonien mittels steriler Pipetten-Spitzen und Überführung in vorgewärmtes LB-Medium (einschl. Antibiotikum) und erneuter Inkubation für 16 h bei 37 °C. Je nach Bedarf wurden so Plasmid-Präparationen (mit ca. 250 ml Bakterienkultur) und Kryostocks (End-Konzentration: 30 % Glycerol, Lagerung bei -80 °C) hergestellt.

4.1.2 *Arbeiten mit Zellen*

4.1.2.1 *Kultivierung der Zellen*

Alle Arbeiten mit infektiösem Material wurde unter der Labor-Sicherheitsstufe 2 (BSL 2; *Biosafety Level*) durchgeführt.

Die Kultivierung der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Zelllinien erfolgte in Zellkulturinkubatoren bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem Luftgehalt an CO₂ von 5 % (nach Ploen et al. 2013). Je nach Zelllinie wurde ein spezielles Zellkulturmedium verwendet (siehe Kap. 3.8). Die Passagierung der Zellen erfolgte 2–3-mal wöchentlich mittels Ablösen durch Trypsin/EDTA-Lösung,

nachdem der Zellrasen kurz mit PBS gewaschen wurde. Nach Abstoppen der Trypsin-Aktivität durch Zugabe von vorgewärmtem Zellkultur-Medium und Resuspendierung der Zellen in der Flüssigkeit wurde ein Teil davon entfernt, um so erneut optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen. Danach wurde entsprechend des Zellkultur-Gefäßes ausreichend Medium nachgefüllt.

Zur Selektion von stabilen Zelllinien wurde dem Nährmedium das geeignete Antibiotikum zugesetzt (G418: 0,75 mg/ml bzw. Puromycin: 5 µg/ml). Nach der Selektion erhaltene Zellkolonien wurden mittels steriler Pipetten-Spitzen vom Boden des Wachstumsgefäßes gelöst und dann in ein neues Gefäß überführt. So konnten nach Transfektion bzw. Elektroporation stabile monoklonale Zelllinien erhalten werden.

4.1.2.2 Herstellen von Kryostocks

Adhärenz wachsende Zellen wurden nach dem Ablösen vom Zellkulturgefäß in Wachstumsmedium resuspendiert und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation für 10 min bei 500 x g wurde das überstehende Medium entfernt und das Zellpellet mit gekühltem PBS gewaschen. Nun erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt und anschließend wurde der Waschprozess erneut wiederholt. Das so erhaltene Zellpellet wurde in Einfriermedium (siehe Kap. 3.10.1) resuspendiert, in geeignete Kryo-Gefäße überführt und in sog. Einfrierhilfen langsam auf -80 °C abgekühlt. Hierbei konnte durch die Verwendung von Isopropanol als Temperaturbrücke eine sehr schonende Kühlung der Zellen auf die gewünschte Lagertemperatur erreicht werden. Die dauerhafte Lagerung erfolgte im Anschluss bei -196 °C in Flüssigstickstoff.

4.1.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Um für Transfektionen, Elektroporationen u. a. eine zuverlässige Bestimmung der Zellzahl zu gewährleisten, wurden Zellsuspensionen wie folgt analysiert:

4.1.2.3.1 Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahl konnte durch visuelles Auszählen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Dazu wurden ca. 20 µl der Suspension aufgetragen, worauf im Anschluss mindestens

4 Zählkammer-spezifische Großquadrate ausgezählt wurden. Der Mittelwert dieser Bestimmungen wurde mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor (10000 x) multipliziert, wodurch man die Anzahl der Zellen pro Milliliter Suspension erhalten konnte.

4.1.2.3.2 Zell-Zähler

100 µl der Zellsuspension wurden mit 9,9 ml Isoton-Lösung in einer geeigneten Küvette versetzt und in den Zellzähler gestellt. Durch korrekte Wahl der Einstellungen wurde im Anschluss die Anzahl der Zellen pro Milliliter Suspension ausgegeben.

4.1.2.4 Transfektion

4.1.2.4.1 Transfektion mittels Polyethylenimin (PEI)

Die Transfektion von eukaryotischen Zellen erfolgte mit Hilfe von linearem Polyethylenimin (Ehrhardt et al. 2006). Die verwendete Stammlösung hatte eine Konzentration von 1 µg/µl und wurde vor der Nutzung mittels 0,22 µm Spritzenfilter steril filtriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

24 h vor der Transfektion wurden (je nach Zelltyp) $1,5\text{--}2,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgelegt und mit Nährmedium im Inkubator kultiviert. Die zu transfizierende DNA wurde in PBS gelöst und mit der 6-fachen Menge (w/v) an PEI versetzt. Der Ansatz wurde für mind. 20 s stark durchmischt (vortexen). Darauf folgte eine Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur. Der komplette Ansatz wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Transfektion erfolgte dann während der Inkubation für 16 h im Brutschrank. Im Anschluss wurden die Zellen vorsichtig zweimal gewaschen und das Nährmedium gewechselt.

4.1.2.4.2 Transfektion mittels Elektroporation

Für eine Elektroporation wurden adhärente Zellen vom Kulturgefäß gelöst (siehe Kap. 4.1.2.1) und wie in Kap. 4.1.2.2 beschrieben zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Pro Elektroporationsansatz wurden 4×10^6 Zellen in 800 µl PBS gelöst und in eine Küvette überführt. Im Anschluss wurde die entsprechende Menge Plasmid zugegeben, wonach der Elektropuls erfolgte (300 V, 950 µF). Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mit vorgewärmtem Nährmedium versetzt und in ein geeignetes Zellkulturgefäß überführt. Nach

ca. 4 h erfolgte ein Wechsel des Mediums, um bei der Elektroporation abgestorbene Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

Für die Herstellung stabiler Zelllinien unter Zuhilfenahme von Zinkfingerendonukleasen (ZFN) wurden die Plasmide wie folgt eingesetzt (nach Merkert et al. 2014):

- a. 10 µg Insert-Plasmid + jeweils 1 µg ZFN-Plasmid (R/L); Verhältnis 1:10
- b. 4 µg Insert-Plasmid + jeweils 2 µg ZFN-Plasmid (R/L); Verhältnis 1:4

4.1.2.5 Ernte von Zellkultur-Überständen

Zellkultur-Überstände (ÜS) wurden in der Regel 48 h bzw. 72 h nach erfolgter Transfektion geerntet. Hierzu wurde der gesamte ÜS abgenommen und in ein adäquates Gefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 500 x g für 10 min wurde ca. 1 ml abgenommen und für spätere Analysen bei 4 °C bzw. -20 °C gelagert. Der Zellrasen wurde zweimal mit PBS gewaschen, wonach die Zellen in der 6-Loch-Platte bei -80 °C bzw. -20 °C für weitere Analysen gelagert wurden.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Isolierung plasmidischer DNA

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des QIAGEN *Plasmid Maxi Kits* entsprechend der Hersteller-Angaben. Lediglich die Zentrifugationszeiten wurden gegebenenfalls verlängert, sofern die Abtrennung von unlöslichen Verunreinigungen noch nicht eindeutig war. Eingesetzt wurden ca. 250 ml einer Übernachtskultur (siehe Kap. 4.1.1), welche im Vorfeld der Aufreinigung für 20 min bei 10000 x g zentrifugiert wurde. Die isolierten Plasmide wurden dauerhaft bei -20 °C gelagert (Birnboim und Doly 1979).

4.2.2 Phenol-/Chloroform-Extraktion von RNA

Die Aufreinigung von RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe von PEQLAB peqGOLD TriFast™ entsprechend der Hersteller-Angaben. Zur besseren Trennung von wässriger und chloroformhaltiger Phase wurden sog. *PhaseLock-Tubes* verwendet. Nach der Trocknung des RNA-Pellets wurde dieses in DEPC-Wasser gelöst und seine Reinheit und Konzentration weitergehend analysiert (siehe Kap. 4.2.3). Die RNA-Proben wurden für weitere Analysen bei -20 °C gelagert.

4.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen

Die Bestimmung von Konzentrationen verschiedener Nukleinsäure-Lösungen erfolgte photometrisch mit Hilfe eines Spektrophotometers (Beckman Coulter DU®730). Diese Quantifizierungsmethodik basiert auf dem spezifischen Absorptionsverhalten von DNA bzw. RNA und evtl. Verunreinigungen aufgrund ihrer heteroaromatischen Struktur. Durch die Berechnung von Extinktionskoeffizienten lassen sich so sowohl die Konzentration als auch die Reinheit verschiedener Proben bestimmen.

Zusätzlich zur maschinellen Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen bzw. deren Reinheit wurde eine elektrophoretische Analyse durchgeführt.

4.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA bzw. RNA können anhand ihrer Größe mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Hierzu wurden 0,7–2,0 % Agarose in 1 x TAE Puffer aufgekocht und in eine Gelkammer zum Aushärten gegossen. Der abgekühlten, aber noch flüssigen Lösung wurde 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt, welches mit Nukleinsäuren interagiert und so eine Visualisierung mittels UV-Licht ermöglicht. Nach dem Aushärten des Gels wurde es mit Laufpuffer überschichtet, die Proben mit der geeigneten Menge 6 x-Laufpuffer versetzt und in die Taschen des Gels aufgetragen (inkl. entsprechender Marker-Proben, siehe Kap. 3.4). Nach ausreichender Auftrennung bei 100 V in der Apparatur erfolgte die Dokumentation mittels eines Transilluminators (254/365 nm) am INTAS Imaging System.

4.2.5 cDNA-Synthese

Nach der Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen konnte mit der cDNA-Synthese fortgeföhren werden. Hierzu erfolgte im ersten Schritt ein Verdau verbleibender DNA-Kontaminationen für 1 h bei 37 °C. Hier beispielhaft ein Reaktionsansatz:

Tab. 3: Pipettierschema für einen DNase-Verdau-Ansatz im Verlauf der Synthese von cDNA aus isolierter zellulärer RNA. Die Menge des verwendeten DEPC-Reinstwassers richtete sich nach dem Volumen der eingesetzten RNA.

5 µg	RNA
1 µl	10 x RQ1 DNase I Reaktionspuffer
1 µl	RQ1 DNase I
ad 10 µl	ddH ₂ O-DEPC (0,01 %)

Danach wurde die DNase inaktiviert durch Zugabe von 1 µl RQ1 DNase-Stopplösung und Inkubation bei 65 °C für 10 min. Im Anschluss erfolgte eine Prä-Hybridisierung mit 1 µl Random Hexamer Primer bei 65 °C für 15 min. Durch Zugabe des folgenden Ansatzes zur Reaktionsmischung schloss sich die reverse Transkriptase an:

Tab. 4: Pipettierschema für die im Verlauf der cDNA-Synthese benötigten Lösungen bezüglich des Schrittes der reversen Transkription. Pro cDNA-Synthese wurde ein Mastermix dieser Lösungen angesetzt, welcher den verschiedenen Reaktionsgefäßen nach erfolgtem DNase-Verdau zugesetzt wurde.

4 µl	5x Reverse Transkriptase-Puffer
2 µl	dNTP-Mix (10 mM)
1 µl	Revert Aid™ H Minus Reverse Transkriptase
1 µl	ddH ₂ O-DEPC (0,01 %)

Die kombinierten Ansätze wurden zuerst bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert, bevor die Transkription für 1 h bei 42 °C folgte. Die Reaktion wurde im Anschluss für 10 min bei 72 °C abgestoppt. Die so erhaltene cDNA wurde bei -20 °C für weitere Analysen gelagert. Als Kontrolle wurde eine zusätzliche Probe mitgeführt, welcher keine reverse Transkriptase zugesetzt wurde, diese sollte in der PCR stets negative Ergebnisse liefern. Andernfalls wäre auf DNA-Verunreinigungen zu schließen.

4.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

4.2.6.1 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Durch Interkalation von fluoreszenzmarkierten, DNA-bindenden Stoffen (z. B. SYBR Green) kann eine quantitative Analyse von DNA-Sequenzen erreicht werden. Hierzu wird die Zunahme der Fluoreszenz im Verlauf einer Polymerase-Kettenreaktion gemessen und in Relation zur Anzahl der Reaktionszyklen gesetzt. Unter Zuhilfenahme von Standards mit definierter DNA-Konzentration kann so die Menge an DNA in den zu analysierenden Proben sehr exakt berechnet werden. Für eine gewöhnliche qRT-PCR wurde folgender Ansatz gewählt (zu analysierende Proben wurden ggf. mit ddH₂O vorverdünnt):

Tab. 5: Pipettierschema für eine standardmäßige qRT-PCR. Die Menge der eingesetzten Probe richtete sich nach dem zu untersuchenden Material und wurde gegebenenfalls mit Reinstwasser verdünnt.

5 µl	2 x Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix
0,25 µl (jeweils)	forward/reverse primer (10 µM)
3 µl	Probe
ad 10 µl	ddH ₂ O

Die computerbasierte Auswertung erfolgte durch Nutzung gerätespezifischer Software (LightCycler® 480 SW 1.5 bzw. LightCycler® Software Version 3.5). Für eine reguläre qRT-PCR wurde folgendes Programm gewählt:

Tab. 6: Schematische Darstellung des PCR-Programms für eine qRT-PCR in Verbindung mit der Schmelzpunkt-Analyse der verwendeten Primer. Nach initialer Denaturierung und anschließenden 45 PCR-Zyklen erfolgte die Analyse der Primer-Schmelzkurven. Zuletzt folgte die Lagerung im Gerät bei 40 °C (bis Raumtemperatur).

Programm	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	600 s	1
Denaturierung	95 °C	15 s	
Anlagerung	56 °C	30 s	45
Elongation	72 °C	30 s	
	95 °C	30 s	
Schmelzkurve	56 °C	30 s	1
	72 °C	0 s	
Abkühlen	40 °C	30 s	

Des Weiteren wurden quantitative PCR-Experimente mit automatisierten Systemen durchgeführt, welche strikt nach den Vorgaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt wurden (siehe auch Kap. 3.11).

4.2.6.2 Qualitative PCR

Falls qualitative Aussagen über DNA-haltige Proben ausreichend sind, kann dieser Sachverhalt auch in einer herkömmlichen PCR getestet werden. Die nach der PCR erhaltenen Proben wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und visualisiert (siehe Kap. 4.2.4). Hier beispielhaft ein Ansatz einer qualitativen PCR:

Tab. 7: Pipettierschema für eine standardmäßige qualitative PCR. Die Menge der eingesetzten Probe richtete sich nach dem zu untersuchenden Material und wurde gegebenenfalls mit Reinstwasser verdünnt.

5 µl	5 x Q5 [®] Reaction Buffer
5 µl (optional)	5 x Q5 [®] High GC Enhancer
0,5 µl	dNTP-Mix (10 mM)
1,25 µl (jeweils)	<i>forward/reverse primer</i>
0,25 µl	Q5 [®] High-Fidelity DNA Polymerase
3 µl	Probe
ad 25 µl	ddH ₂ O

Die Menge eingesetzter DNA richtete sich hierbei nach den Angaben des Herstellers. Auch bei folgendem PCR-Programm ist zu beachten, dass sowohl die Annealing-Temperatur hinsichtlich der Schmelztemperaturen der verwendeten Primer als auch die Elongationszeit hinsichtlich des erwarteten Amplifikats variierten (siehe Tab. 8).

Tab. 8: Übersicht eines standardmäßigen PCR-Programms einer qualitativen PCR. Die Anlage-temperatur richtete sich nach den Schmelztemperaturen der verwendeten Primer. Nach initialer Denaturierung erfolgten zw. 20 und 30 PCR-Zyklen. Nach finaler Elongation erfolgte die Lagerung im PCR-Gerät bzw. Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung.

Programm	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	60 s	1
Denaturierung	98 °C	10 s	
Anlagerung	50–72 °C	30 s	20–30
Elongation	72 °C	30–60 s	
Finale Elongation	72 °C	120 s	1
Lagerung	4 °C	∞ s	

4.2.7 *Reinigung subviraler und viraler Partikel*

Das Protokoll zur Reinigung viraler und subviraler Partikel wurde basierend auf folgenden Publikationen (Glebe und Gerlich 2004; Chai et al. 2008) an die eigenen Gegebenheiten angepasst und verbessert. Allgemein setzt es sich zusammen aus einer initialen Anreicherung mittels Präzipitation mit Polyethylenglycol (PEG 8000; ca. 8000 g/mol) und anschließender Auftrennung hinsichtlich der Dichte der verschiedenen Partikel. Dies wurde mit der Zentrifugation gegen einen geeigneten Sucrose-Dichte-Gradienten realisiert. Die so gewonnenen Fraktionen wurden im Anschluss weiter hinsichtlich des Brechungsindex, der HBsAg-Gehalts, der Menge an viraler DNA, der Gesamtproteinmenge und der spezifischen HBs-Zusammensetzung analysiert. (siehe Kap. 4.2.7.3, Kap. 4.4.3, Kap. 4.2.6.1, Kap. 4.3.4 und Kap. 4.4.1)

4.2.7.1 *PEG-Präzipitation*

Zur Anreicherung viraler und subviraler Partikel wurde Zellkulturüberstand wie in Kapitel 4.1.2.5 beschrieben gesammelt und mit PEG-Lösung versetzt, sodass sich ein PEG-Gehalt von 10 % (w/v) ergab (nach POLSON et al. 1964). Die Mischung wurde für mind. 16 h bei 4 °C auf einem Rollinkubator homogenisiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation mit 4000 x g für 1 h bei 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in TNE-Puffer (1/100 der Ausgangsmenge) gelöst.

4.2.7.2 *Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation (SDGZ)*

Im Anschluss an die Voranreicherung mittels PEG-Präzipitation wurde das so erhaltene Material auf einen nichtlinearen Sucrose-Dichtegradienten aufgetragen. Hierzu wurden ca. 80 % des Volumens des Zentrifugenbehälters für den Gradienten selbst verwendet, sodass bis zu 20 % mit Probenmaterial beschickt werden konnten. Der Gradient setzte sich wie folgt zusammen:

Tab. 9: Auflistung der verschiedenen, für den Aufbau eines diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten benötigten Zucker-Lösungen. Das Volumen des Gradienten wurde jeweils an die verwendeten Zentrifugenbehälter angepasst (80 % der absoluten Füllmenge).

20 % (v/v)	5 % D (+) Saccharose (w/w) in TNE-Puffer
20 % (v/v)	15 % D (+) Saccharose (w/w) in TNE-Puffer
20 % (v/v)	25 % D (+) Saccharose (w/w) in TNE-Puffer
16 % (v/v)	35 % D (+) Saccharose (w/w) in TNE-Puffer
16 % (v/v)	45 % D (+) Saccharose (w/w) in TNE-Puffer
8 % (v/v)	60 % D (+) Saccharose (w/w) in TNE-Puffer

Die Dauer und die Geschwindigkeit der Zentrifugation richteten sich im Folgenden nach den Werten für den SW28Ti-Rotor (Beckman Coulter, Krefeld; 85500 x g, 15 h, 4 °C, Vakuum) und wurden mit Hilfe eines Umrechnungsprogramms (siehe www.beckmancoulter.com) an andere Rotor-Typen angepasst.

4.2.7.3 Bestimmung des Brechungsindex

Der Brechungsindex von zuckerhaltigen Lösungen wurde mittels Refraktometer nach der Methode von Abbé bestimmt. Die Genauigkeit der so erhaltenen Werte konnte mit verschiedenen Standard-Lösungen überprüft werden. Die Ergebnisse waren in guter Übereinstimmung mit den Literatur-Werten.

4.3 Protein-Biochemische Methoden

4.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden im Vorfeld Zellen in 6-Loch-Platten kultiviert, transfiziert und für die folgenden Schritte vorbereitet. Solche Platten wurden bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert (siehe Kap. 4.1.2.4.1). Alle anschließenden Schritte erfolgten bei möglichst 0–4 °C. Pro Vertiefung wurden 200 µl Zell-Lyse-Puffer (siehe Kap. 3.10.1) zugegeben, in welchem die dann abgekratzten Zellen resuspendiert wurden. Danach erfolgte der Aufschluss der Zellen mittels Sonifikation (15 s, 15–20 % Intensitätsstärke). Verbleibende Zelltrümmer und

unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 21000 x g abgetrennt, woraufhin der Überstand (Zelllysats) abgenommen und für weitere Analysen bei 20 °C gelagert wurde.

4.3.2 *Bradford-Assay*

Die Methode der Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) beruht auf der Änderung der Absorptionseigenschaften des Farbstoffes Coomassie-Brilliant Blau G250, welcher durch Bindung an Proteine sein Absorptionsmaximum von sichtbarem Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 470$ nm nach $\lambda = 595$ nm verschiebt. Die Änderung dieser Absorptionseigenschaften können photometrisch vermessen werden und mit Hilfe von Standardproben mit wohldefinierten Proteinmengen kann so der Proteingehalt von unbestimmten Proben ausreichend genau berechnet werden. Für eine Messung wurden in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte 8 μ l ddH₂O pro Vertiefung vorgelegt, in welchen 2 μ l des zu analysierenden Zelllysats (s. o.) pipetiert wurden. Im Anschluss wurden 100 μ l Bradford-Reagenz zugegeben. Nach einer kurzen Inkubation (ca. 5 min) bei Raumtemperatur erfolgte die Vermessung am Analyse-Gerät (Tecan Infinite M1000). Für eine Eichung der Methode wurden BSA-Lösungen, bestehend aus 20 % RIPA-Puffer und 80 % wässrigem Anteil mit unterschiedlicher Proteinkonzentration (0,0–5,0 μ g/ μ l) hergestellt.

4.3.3 *SDS-PAGE*

4.3.3.1 *Eindimensionale SDS-PAGE*

Eine Methodik um Proteine anhand ihrer Größe aufzutrennen wird durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli beschrieben (Laemmli 1970). Hierbei werden denaturierte, durch Anlagerung von SDS negativ geladene Proteine im elektrischen Feld entsprechend ihres Molgewichts aufgetrennt. Dies geschieht in einem sog. Trenngel mit unterschiedlichem Vernetzungsgrad (je nach Größe der zu analysierenden Proteine), nachdem die Gesamtheit der Proteine in einem Sammelgel aufkonzentriert wurden (siehe hierzu Tab. 10). Die Proben wurden vor der SDS-PAGE mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 15 min auf 95 °C erhitzt. Nach dem Auftragen der Proben erfolgte die Elektrophorese bei 80–120 V in einer vertikalen Laufkammer. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde mit dem Blotting (Kap. 4.4.1.1) und der Immun-Detektion (Kap. 4.4.1.2) fortgefahren.

Tab. 10: Pipettierschema für SDS Sammel- bzw. Trenngele. Für diese Arbeit wurden sowohl 10 %- als auch 12 %-Trenngele verwendet. Die Nutzung richtete sich hierbei nach der gewünschten Auftrennung der zu analysierenden Proteine.

Sammelgel (4 %)		Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)
4 x SGP	15 ml	4 x TGP	20 ml
Roti 40	6 ml	Roti 40	24 ml
ddH₂O	39 ml	ddH₂O	40 ml
TEMED	60 µl	TEMED	80 µl
10 % APS-Lsg.	600 µl	10 % APS-Lsg.	800 µl

4.3.3.2 Zweidimensionale SDS-PAGE

Für eine zweidimensionale Auftrennung von Proteinen in einem Polyacrylamid-Gel wurden Zellen wie in Kap. 4.3.1 beschrieben lysiert, jedoch mit der Einschränkung, dass ein spezieller 2D-PAGE-Lyse-Puffer verwendet wurde. Die Proteinmenge wurde durch lineare Regression berechnet, indem das 2D-Zelllysate mit einer Verdünnungsreihe an herkömmlichen Proteinlysaten auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und im Anschluss mittels Coomassie-Färbung (siehe Kap. 4.3.4.2) die Gesamtheit der Proteine detektiert, vermessen und in Relation gesetzt wurde. Die Durchführung der 2D-PAGE basiert auf einem modifizierten Protokoll (Goerg et al. 2000) und wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Proteomik am PEI durchgeführt (Dr. Andreas Reuter). Für eine gewöhnliche 2D-PAGE wurden 100 µg Protein eingesetzt, mit 100 mM β-Mercaptoethanol versetzt, für 15 min bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und in 200 µl Rehydrationspuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, 20 mM TRIS, 65 mM DTT, und 0,2 % Biolyte 3–10) verdünnt. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte im Anschluss in einer Protean IEF-Reaktionszelle auf Plastik-Streifen (*ReadyStrip IPG 11 cm, linear pH 3–10, Bio-Rad Laboratories*) mit immobilisiertem pH-Gradienten. Die Parameter der isoelektrischen Fokussierung sind in Tab. 11 aufgeführt. Vor der Elektrophorese und zweiten Dimension wurden in Equilibrierungspuffer 1 (6 M Harnstoff, 0,375 M TRIS-HCl, 2 % SDS, 20 % Glycerol, 65 mM DTT, pH 8.8) für 15 min reduziert und anschließend für weitere 15 min in Equilibrierungspuffer 2 (6 M Harnstoff, 0,375 M TRIS-HCl, 2 % SDS, 20 % Glycerol, 260 mM Iodacetamid, pH 8.8) bei Raumtemperatur alkyliert. Im Anschluss erfolgte die eigentliche Elektrophorese mit vorgegossenen Gelen (*Criterion XT Bis-Tris precast polyacrylamide gels, 13.3 × 8.7 cm, Bio-Rad Laboratories*) in einer geeigneten Lauf-Kammer (*Criterion cell, Bio-Rad*

Laboratories) unter Verwendung des MOPS-Puffers (NuPAGE® MOPS SDS, Novex by Life Technologies) bei 200 V für 50 min. Die Proteingrößen konnten mittels des verwendeten Markers (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fisher Scientific GmbH) analysiert werden.

Tab. 11: Auflistung der verschiedenen Schritte der isoelektrischen Fokussierung von Proteinen auf einem IPG-Streifen. Die Stromstärke wurde jeweils in Verbindung mit der entsprechenden Inkubationszeit angegeben (Schritt 6 endete jedoch nach genau 30000 Vh).

Schritt	Spannung	Zeit	Temperatur
1	50 V	12 h	20 °C
2	150 V	1 h	20 °C
3	500 V	1 h	20 °C
4	1200 V	1 h	20 °C
5	4000 V	2 h	20 °C
6	8000 V	30000 Vh	20 °C
7	1000 V	1 h	20 °C
8	1000 V	2 h	20 °C

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde mit dem Blotting (Kap. 4.4.1.1) und der Immun-Detektion (Kap. 4.4.1.2) fortgefahren. Proteine, die nach dem Blotting im Gel verblieben, konnten mittels SYPRO®Ruby Färbung nachgewiesen werden.

4.3.4 Protein-Färbung in Polyacrylamid-Gelen

4.3.4.1 Silber-Färbung

Die Methode der Silberfärbung von Proteinen in biochemischen Analysemethoden wurde 1973 von Kerényi und Gallyas entwickelt und seitdem für SDS-PAGEs weiterentwickelt (Kerényi und Gallyas 1973; Rabilloud et al. 1988). Hierbei lagern sich Silber-Ionen unspezifisch an positiv-geladene Seitenketten von Proteinen an. Nach Reduktion zu metallischem Silber werden diese Proteine im Gel sichtbar. Die Nachweisgrenze liegt dieser Methode liegt bei etwa 1 ng pro Bande. Die Durchführung eines solchen Experiments kann der Tab. 12 entnommen werden. Alle Inkubationsschritte erfolgten in geeigneten Schalen auf einem Kipptisch bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss. Nach ausreichender Reduktion der Silber-Ionen

und somit Färbung der Protein-Banden wurde die Reaktion durch Zugaben von Essigsäure abgestoppt.

Tab. 12: Protokoll für die Silber-Färbung von Proteinen in SDS-Gelen. Die einzelnen Schritte wurden in Verbindung mit der entsprechenden Dauer aufgelistet.

mind. 30 min	Fixierlösung
20 min	Konditionierlösung
3 x 5 min	Waschen mit ddH ₂ O
20 min	Silbernitrat-Lösung
3 x 5 min	Waschen mit ddH ₂ O
1-10 min	Entwicklerlösung

4.3.4.2 Coomassie-Färbung

Eine weitere Methode zu Färbung von Proteinbanden in Polyacrylamid-Gelen basiert auf der unspezifischen Anlagerung des Farbstoffs Coomassie-Brilliant Blau G250 an basische Seitenketten von Aminosäuren (Kang et al. 2002). Die Nachweisgrenze liegt dieser Methode liegt bei etwa 0,5 µg pro Bande. Für eine solche Färbung wurden Gele für ca. 16 h in Coomassie-Lösung geschwenkt, wonach ungebundener Farbstoff mittels Entfärbelösung ausgewaschen wurde.

4.3.4.3 SYPRO® Ruby-Färbung

Eine weitere Methode der Färbung von Proteinen analog der Coomassie-Färbung, jedoch mit der Sensitivität einer Silber-Färbung, kann durch die Anlagerung von speziellen Ruthenium-Chelatkomplexen (SYPRO® Ruby Protein Gel Stain; Thermo Scientific, Karlsruhe) ermöglicht werden (Berggren et al. 1999). SYPRO® Ruby besitzt Absorptionsmaxima bei Wellenlängen von $\lambda = 280$ nm und 450 nm, die Emission liegt bei $\lambda = 610$ nm. So lassen sich Proteine in Polyacrylamid-Gelen mit einer Nachweisgrenze von etwa 1 ng pro Bande detektieren. Hierfür wurden die Proteine zuerst durch Schwenken in Fixierlösung im Gel immobilisiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit SYPRO® Ruby-Lösung für ca. 16 h. Nach dem Waschen mit Entfärbelösung konnten die Proteinbanden im Gel in einem geeigneten Scanner vermessen werden.

4.4 Immunologische Methoden

4.4.1 Western Blot

4.4.1.1 Blotting

Mit Hilfe des Western Blottings ist es möglich, Proteine von einem Polyacrylamid-Gel auf eine Trägermembran mittels Anlegen eines elektrischen Feldes zu überführen. Für diese Arbeit wurde die Variante nach Towbin et al. 1979 verwendet, in Verbindung mit einer Semi-Dry Blotting-Apparatur und einem diskontinuierlichen Puffersystem (Towbin et al. 1979). Hierbei erfolgte der Transfer bei einer Stromstärke von $1,3 \text{ mA/cm}^2$ für die Dauer von einer Stunde. Die korrekte Stapelung der Filterpapiere, des Gels und der PVDF-Membran ist in Abb. 10 dargestellt. Die Filterpapiere wurden kurz in den entsprechenden Puffern getränkt, die Membran wurde vor der Nutzung in Methanol aktiviert. Nach dem Blot-Vorgang konnte die Membran für die Immun-Detektion verwendet werden.

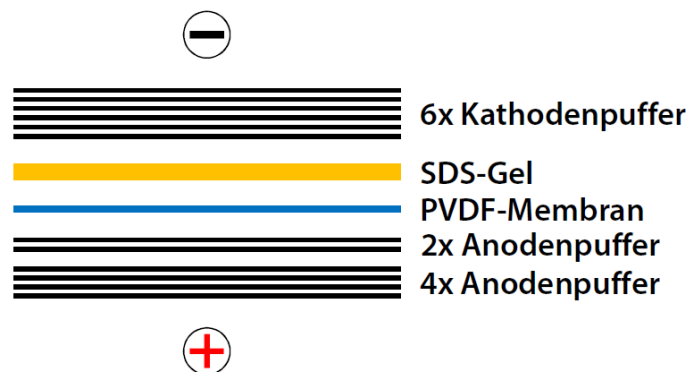


Abb. 10: Schematischer Aufbau des Semi-Dry Blotting-Aufbaus. Die einzelnen Lagen wurden in den entsprechenden Puffern vor-inkubiert und von unten nach oben gestapelt (nach Diss. C. Donnerhak 2015).

4.4.1.2 Immundetektion

Die Membran wurde nach dem Protein-Transfer kurz in TBST gewaschen und anschließend für 1 h in Milchpulver-Lösung inkubiert. So konnten unspezifische Antikörperbindungen verhindert oder zumindest minimiert werden. Die für die Detektion verwendeten Antikörper wurden ebenfalls in Milchpulver-Lösung verdünnt. Nun folgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper, welcher spezifisch an die zu detektierenden Proteine bindet. Dies erfolgte in der Regel über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ auf einem Rollinkubator. Bei manchen Proteinen war

jedoch eine Inkubationszeit von einer Stunde ausreichend. Im Anschluss wurde die Membran kurz mit TBST gewaschen und es schloss sich direkt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper an. Dieser richtete sich gegen den verwendeten primären Antikörper und war Fluorophor- bzw. Peroxidase-gekoppelt, um eine Detektion zu ermöglichen. Diese erfolgte nach ausgiebigen Waschschritten mit TBST am LI-COR Odyssey System für Fluorophor-gekoppelte sekundäre Antikörper und mittels eines geeigneten ECL-Substrats und der Verwendung von photosensitiven Filmen. Letztere wurden in einer Dunkelkammer in Verbindung mit einem entsprechenden automatisierten Entwickler verwendet. Die so erhaltenen Blots konnten mit der LiCor Odyssey Software densitometrisch quantifiziert werden. Hierbei erfolgte eine quantitative Analyse von Zelllysaten immer in Verbindung mit einer Kontrolle und entsprechender Normierung auf β -Aktin.

4.4.2 *Indirekte Immunfluoreszenz*

Mittels der Methode der indirekten Immunfluoreszenz können Proteine hinsichtlich deren intrazellulären Lokalisation analysiert werden. Hierzu werden Zellen auf geeigneten Glasplättchen kultiviert und nach erfolgter Behandlung kurz mit PBS gewaschen und für 30 min mit Formaldehyd-Lösung fixiert. Die Zellen wurden durch Inkubation mit 0,5 % Triton X-100 (in PBS) permeabilisiert und im Anschluss erneut mit TBST gewaschen. Um wiederum unspezifische Antikörper-Bindungen zu verhindern, schloss sich danach eine einstündige Behandlung mit IF-Blockierlösung an. Darauf folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (gelöst in TBST, mit 4 % (w/v) BSA) für 1–2 h. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit dem Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörper (ebenfalls in TBST, mit 4 % (w/v) BSA) inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt, welches ebenfalls der Sekundär-Antikörper-Lösung zugegeben wurde. Nach erneutem Waschen mit TBST wurden die Glasplättchen mit Mowiol-Gebrauchslösung auf Objektträgern fixiert und zum Aushärten bei 37 °C in einen Inkubator überführt. Die Analyse der so behandelten Zellen erfolgte am konfokalen Laserscanning-Mikroskop (CLSM, siehe Kap. 4.5.1).

4.4.3 *HBsAg-ELISA*

Im Zuge der Detektion von HBsAg wurden in dieser Arbeit mehrere verschiedene ELISA-Systeme verwendet. Der manuell durchgeführte Enzygnost 6.0 HBsAg ELISA (Siemens Healthcare

GmbH, Erlangen) soll beispielhaft näher erklärt werden. Mit Hilfe von Mikrotiterplatten, welche mit einem geeigneten Antikörper beschichtet wurden, können Proteine spezifisch gebunden werden und von anderen Stoffen abgetrennt werden. Durch Verwendung eines weiteren Peroxidase-gekoppelten Antikörpers, welcher ebenfalls das zu analysierende Protein bindet, kann schließlich durch Substratzugabe eine Farbreaktion erfolgen. Dies ist in einem gewissen Detektionsrahmen proportional zu gebundener Menge Protein und lässt sich durch Verwendung geeigneter Standards zur definierten Proteinemenge in Relation setzen. Im Allgemeinen erfolgte die Darstellung der Messergebnisse jedoch als Quotient des gemessenen Signals zu einem System-spezifischen *cut-off* (S/co). Der Nachweis von HBsAg und die damit verbundene Auswertung erfolgten hierbei nach den jeweiligen Angaben des Herstellers. Alle weiteren für diese Arbeit relevanten ELISA-Systeme waren für eine automatisierte Durchführung optimiert und wurden ebenfalls strikt nach den Vorgaben der Hersteller durchgeführt. Eine Liste der verwendeten Kits ist in Kap. 3.11 aufgeführt.

4.5 Mikroskopie

4.5.1 *Konfokale Laserscan-Mikroskopie*

Fluoreszenzmarkierte Präparate (Herstellung siehe Kap. 4.4.2) konnten mittels konfokaler Laserscan-Mikroskopie analysiert werden. Die Besonderheit dieser Methodik liegt darin, dass durch eine konfokal zur Fokusebene stehende Lochblende (*pinhole*) Streulicht aus Ebenen über bzw. unter der zu analysierenden Ebene abgetrennt wird. Dies hat eine Optimierung des gemessenen Signals hinsichtlich einer spezifischen Schichtdicke des zu analysierenden Präparats zur Folge. So können genauere Aussagen zur (Ko-)Lokalisation zweier fluoreszenzmarkierter Proteine gemacht werden. Die Anregung der Fluoreszenz-Marker erfolgte durch die Wahl geeigneter Laser und somit durch Licht einer bestimmten Wellenlänge. Die so stimulierte Emission wurde mit Hilfe von Photomultipliern gemessen und für die Analyse am PC verarbeitet. Alle Bilder dieser Arbeit wurden an einem LSM 510 der Firma Zeiss aufgenommen und mit der dafür vorgesehenen Software bearbeitet. Objektive mit einem Vergrößerungsfaktor von 40 x bzw. 100 x wurden verwendet.

4.5.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie wird eine Probe von einem Elektronen-Strahl durchdrungen. Diese Elektronen wurden zuvor mittels Hochspannung beschleunigt und durch Kondensoren fokussiert. Der Strahlengang verläuft in der Regel im Hochvakuum, um Brechungseignisse von Elektronen an Luftmolekülen zu minimieren. Die zu analysierende Probe muss eine geeignete (möglichst geringe) Dicke aufweisen und auf einem leitenden Material aufgebracht sein. Für diese Arbeit wurden mit Graphit bedampfte Kupfer-Gitter (das sog. *grid*) verwendet. Das jeweilige Probenmaterial wurde mit Hilfe von Formaldehyd-Lösung auf dem *grid* fixiert und durch Behandlung mit Uranylacetat-Lösung für eine Negativ-Kontrastierung vorbereitet. Durch Streuung der beschleunigten Elektronen am fixierten Probenmaterial entsteht auf einem Leuchtschirm eine bildliche, stark vergrößerte Darstellung des untersuchten Materials. So sind mit dieser Methode Strukturen von bis zu 5–10 nm eindeutig darzustellen. Durch die Umsetzung der Veränderungen im Elektronenstrahl mittels eines Szintillators und anschließender Verwendung einer CCD-Kamera können ebenfalls digitale Bilder erzeugt werden. Für diese Arbeit wurde das EM 109 (Carl Zeiss AG, Jena) in Verbindung mit einer CCD-Kamera und der passenden Software iTEM (Olympus Corp., Tokyo, Japan) verwendet.

4.6 Statistische Analysen

Die gemessenen Ergebnisse sind im Allgemeinen als Mittelwerte (\pm SEM; *standard error of the mean*) angegeben. Signifikanzen zwischen den Messergebnissen wurden mittels der speziellen Analyse-Software GraphPad Prism (San Diego, USA) unter Berücksichtigung der geeigneten Test-Methoden berechnet. Die in den einzelnen Abbildungen verwendete Symbolik der Signifikanzen erläutert sich wie folgt:

n.s. (nicht signifikant)	$p > 0,05$
*	$0,05 \geq p > 0,01$
**	$0,01 \geq p > 0,001$
***	$0,001 \geq p > 0,0001$
****	$p \leq 0,0001$

5 ERGEBNISSE

5.1 Vergleichende Analysen verschiedener HBV-Genotypen hinsichtlich HBsAg spezifischer Eigenschaften

5.1.1 HBV-Genotypen unterscheiden sich hinsichtlich der intra- und extrazellulären HBsAg Level

Um einen Vergleich der HBV-Genotypen hinsichtlich deren HBsAg-Freisetzung anzustellen, wurden humane Hepatom-Zellen Huh7.5 mit gleichen Mengen eines HBV-Expressionsplasmids liposomal transfiziert (siehe Kap. 4.1.2.4.1). Die verwendeten Plasmide kodieren für das 1,5-fache Genom der HBV-Genotypen A, B, C und G und stehen unter der Kontrolle des autologen HBV-Promotors. Bei HBV-Genotyp D (GtD) beinhaltet das genutzte Plasmid das 1,2-fache des HBV-Genoms, jedoch ebenfalls unter der Kontrolle des autologen Promotors. Durch die Transfektion erhaltene Zelllysate und Zellkultur-Überstände wurden mit einem HBsAg-spezifischen ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*; siehe Kap. 4.4.3) vermessen, um so Aussagen zu den Genotypen-spezifischen HBsAg-Mengen machen zu können. Die Ergebnisse mehrerer unabhängiger Tests (siehe Abb. 11), welche jeweils auf die Werte für HBV-GtA normiert wurden, zeigen, dass signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen sowohl hinsichtlich der sekretierten als auch der intrazellulär gebildeten Mengen an HBsAg vorliegen.

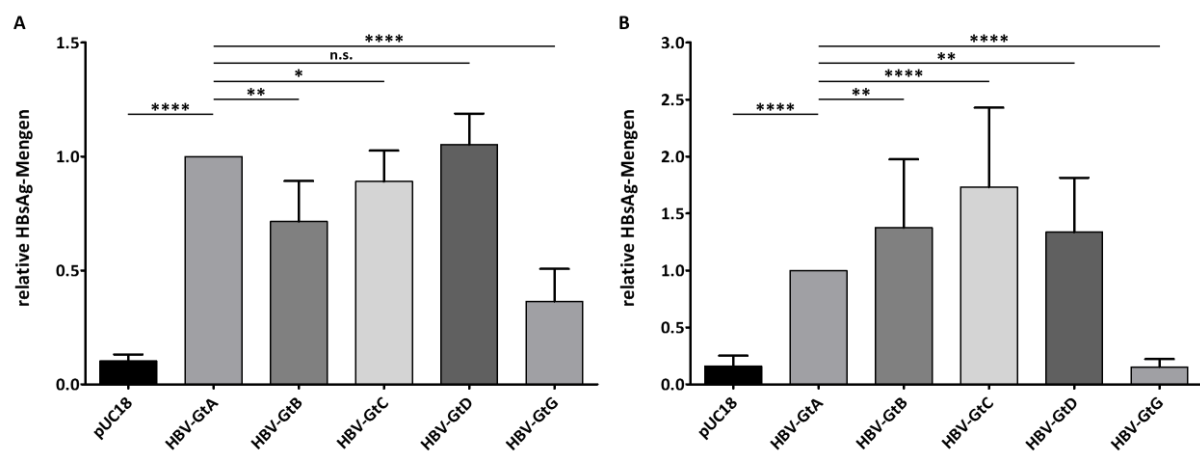


Abb. 11: HBsAg-ELISA-Analysen von (A) Zelllysaten ($n=4$) und (B) Überständen ($n=15$) von transfizierten Huh7.5-Zellen. Die Messungen wurden auf die Werte für HBV-GtA normiert. Die Transfektion erfolgte mit Expressionsplasmiden, die für die in der Grafik angezeigten HBV-Genotypen unter Kontrolle des autologen Promotors kodieren.

So weisen HBV-GtA- und GtD-exprimierende Zellen vergleichbare intrazelluläre HBsAg-Mengen auf, wohingegen in HBV-GtC- und GtB-positiven Zellen signifikant niedrigere HBsAg-Mengen gemessen werden (Abb. 11 A). Im Falle des HBV-GtG können im Vergleich zur Negativkontrolle deutliche Mengen an intrazellulär gebildetem HBsAg nachgewiesen werden, wenn auch in geringerem Maße, verglichen mit den anderen untersuchten Genotypen.

Die parallel zu den Zelllysaten gesammelten Zellkultur-Überstände wurden in analoger Weise vermessen, dies führte jedoch zu veränderten Ergebnissen (Abb. 11 B). So setzen HBV-Genotyp C- (GtC) exprimierende Zellen die größten Mengen an HBsAg frei, GtB- und GtD-exprimierende Zellen zeigen verminderte Mengen im Vergleich zu GtC, jedoch höhere Mengen als bei Zellen, die HBV-GtA-positiv sind. Wie zu erwarten, können nur minimale HBsAg-Mengen bei HBV-GtG-positiven Zellen im Zellkultur-Überstand gemessen werden (Peiffer et al. 2015).

Diese Daten zeigen, dass signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen analysierten HBV-Genotypen in Bezug auf die untersuchten intra- und extrazellulären Mengen an HBsAg vorherrschen.

5.1.2 Zusammensetzung der extra- und intrazellulären HBsAg verschiedener Genotypen weist Unterschiede auf

Für eine detailliertere Analyse der Zelllysate und der korrespondierenden Zellkultur-Überstände von mit HBV-GtA-, -GtB-, -GtC- und -GtG-transfizierten Zellen hinsichtlich der relativen Mengen an SHBs, MHBs und LHBs wurden Western Blot-Experimente (siehe Kap. 4.4.1) unter Verwendung des HBs-spezifischen monoklonalen Antikörpers HB01 durchgeführt (siehe Abb. 12). Da die Reaktivität dieses Antikörpers bei HBV-GtD-positiven Proben aufgrund einer Änderung in der viralen Aminosäure-Sequenz hinsichtlich des spezifischen Epitops verringert war, wurden entsprechende Proben in der vergleichenden Analyse nicht berücksichtigt.

Für alle untersuchten HBV-Genotypen kann beobachtet werden, dass SHBs die dominante sekretierte Form darstellt (außer bei HBV-GtG, welcher als HBsAg-sekretionsdefizient beschrieben wurde (Peiffer et al. 2015)). Hinsichtlich der sekretierten Mengen an L- und MHBs können zusätzlich Unterschiede beobachtet werden, da in HBV-GtB-exprimierenden Zellen – verglichen mit GtA und GtC – eindeutig geringere Mengen an LHBs und vor allem MHBs beobachtet werden können (siehe Abb. 12 B).

Verglichen mit den Zellkultur-Überständen zeigen die parallel geernteten Zelllysate – relativ zu L- und MHBs – deutlich geringere Mengen an SHBs. Zudem werden hinsichtlich des HBV-GtC verglichen mit den anderen Genotypen signifikant größere Mengen an MHBs im Zelllysate beobachtet (Abb. 12 A).

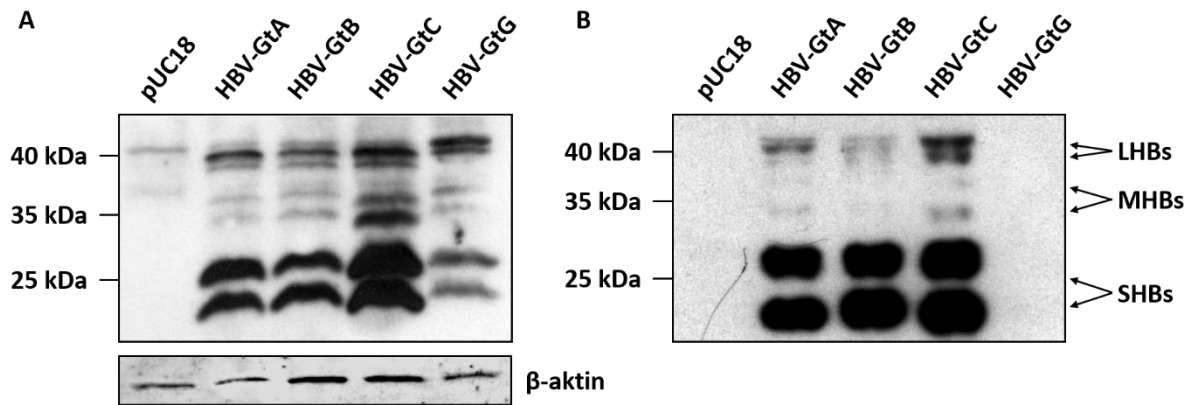


Abb. 12: Western Blot-Analyse von (A) Zelllysaten und (B) den analogen Zellkultur-Überständen von transfizierten Huh7.5-Zellen, welche die angezeigten HBV-Genotypen exprimieren. Jeweils 20 μ g bezogen auf die Gesamt-Proteinmenge der Zelllysate wurden aufgetragen. Die Menge des aufgetragenen Überstands wurde an die Protein-Konzentration der Zelllysate angepasst. Die HBV-Oberflächenproteine wurden mit dem HBs-spezifischen monoklonalen Antikörper HB01 mittels Chemilumineszenz detektiert. Eine Ladekontrolle erfolgte durch Verwendung eines β -Aktin-spezifischen Antikörpers und anschließender Detektion am Licor Odyssey-System.

Vier unabhängige Blots (wie in Abb. 12 gezeigt) wurden mit einer geeigneten Software densitrometrisch quantifiziert (vgl. Kap. 4.4.1.2), um so eindeutigere Aussagen über die relativen Mengen an L-, M- und SHBs machen zu können (siehe Abb. 13). Diese Quantifizierungen konnten die zuvor beschriebenen Ergebnisse bestätigen. Jedoch ist zusätzlich darauf hinzuweisen, dass in Zelllysaten von mit HBV-GtA- und -GtG-transfizierten Zellen eine eindeutig erhöhte Menge an LHBs nachgewiesen werden kann, verglichen mit HBV-GtB- bzw. -GtC-positiven Zellen.

Somit können auch durch diese Analysen eindeutige Unterschiede zwischen den intrazellulär gebildeten und sekretierten Mengen an HBsAg bezüglich der verschiedenen HBV-Genotypen beobachtet werden, insofern dass deutlich mehr M-/LHBs intrazellulär gebildet wird, als extrazellulär messbar ist. Darüber hinaus wird in HBV-GtA- und HBV-GtG-positiven Zellen deutlich mehr LHBs gebildet als bei HBV-GtB und GtC.

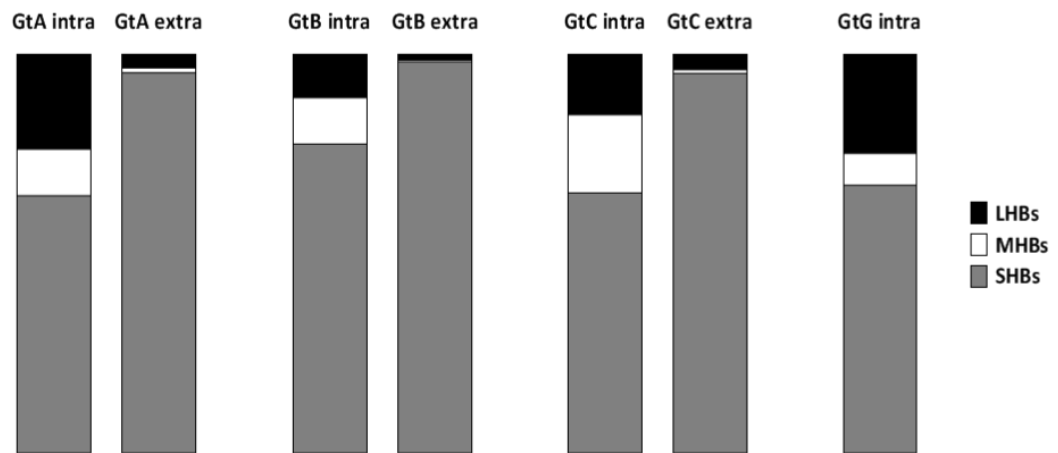


Abb. 13: Balkendiagramm zu den relativen Mengen der L-/M-/SHBs-Mengen unter Berücksichtigung der verschiedenen HBV-Genotypen. Die Analyse basiert auf der Quantifizierung von 4 unabhängigen Western Blots ($n=4$). Ein Balken symbolisiert die Gesamtheit der intrazellulär (*intra*) und extrazellulär (*extra*) gemessenen HBV-Oberflächenproteine (100 %).

5.1.3 Analoge Glykosylierungsmuster zwischen den analysierten HBV Genotypen

Für die HBV-Oberflächenproteine sind Glykosylierungen am Asparagin (Asn) 146 innerhalb der S-Domäne und am Asn4 der PreS2-Domäne bekannt. Letzteres wird nur bei MHBs aufgrund seiner ER-luminalen Lokalisation während der Proteinreifung am Asn4 glykosyliert. Die Glykosylierungsstelle Asn146 wird bei den verschiedenen Oberflächenproteinen zu etwa 50 % genutzt. Um die Genotypen-spezifischen Unterschiede in Bezug auf die Nutzung dieser Glykosylierungsstelle zu untersuchen, wurden Western Blot-Analysen hinsichtlich der verschiedenen detektierten Banden analysiert (siehe Abb. 14, Abb. 15, Abb. 16 und Abb. 17).

Für SHBs weist das Verhältnis von nicht-glykosylierter und einfach glykosylierter Protein-Variante hierbei lediglich sehr geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen HBV-Genotypen auf. Die glykosylierte Variante ist bei allen Genotypen intrazellulär leicht dominant, wohingegen extrazellulär geringere Mengen davon vorliegen, verglichen mit nicht-glykosyliertem SHBs.

Im Falle von MHBs zeigt das Verhältnis von zweifach zu einfach glykosyliertem Typus jedoch auffälligere Unterschiede, zumindest für intrazellulär gebildete Proteinmengen. So zeigt sich im Fall von HBV-GtB eine leicht erhöhte Menge an doppelt glykosyliertem MHBs, wohingegen bei HBV-GtA bzw. GtG kein Unterschied zu detektieren ist. HBV-GtC zeigt sogar gegensätzliche

Eigenschaften. Extrazellulär ist bei allen Genotypen das einfach glykosylierte MHBs in gesteigerter Menge nachweisbar.

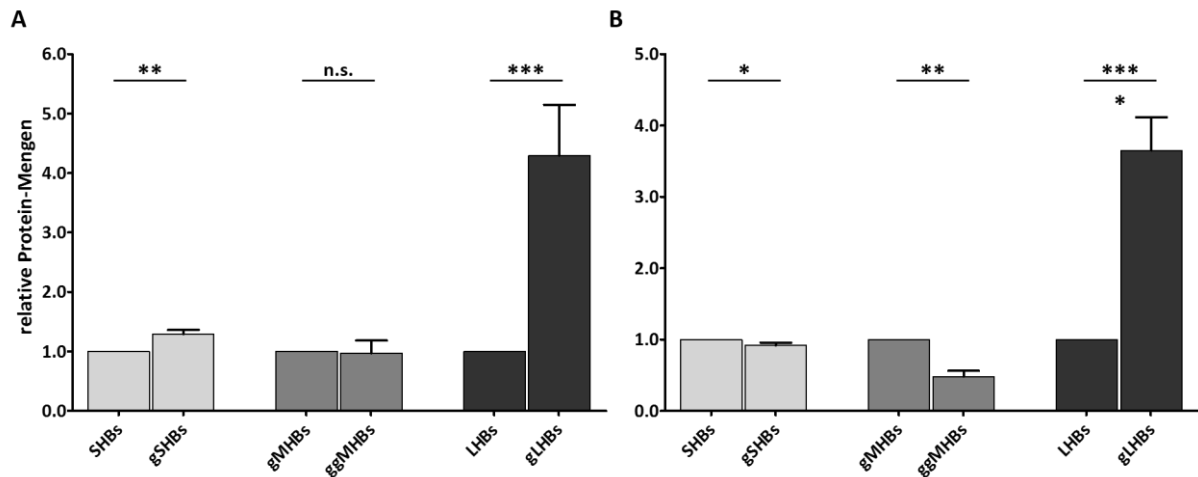


Abb. 14: Quantifizierung der relativen Mengen unterschiedlich glykosylierter HBV-Oberflächenproteine nach Transfektion von Huh7.5-Zellen mit einem **HBV-GtA**-Expressionsplasmid und nachfolgender Western Blot-Analyse mit Hilfe des HBs-spezifischen Antikörpers HB01 (n=6). Der Wert des nicht-glykosylierten Proteins (an Asn146) wurde willkürlich auf einen Wert von 1 gesetzt. Untersucht wurden (A) Zelllysate und (B) Zellkultur-Überstände.

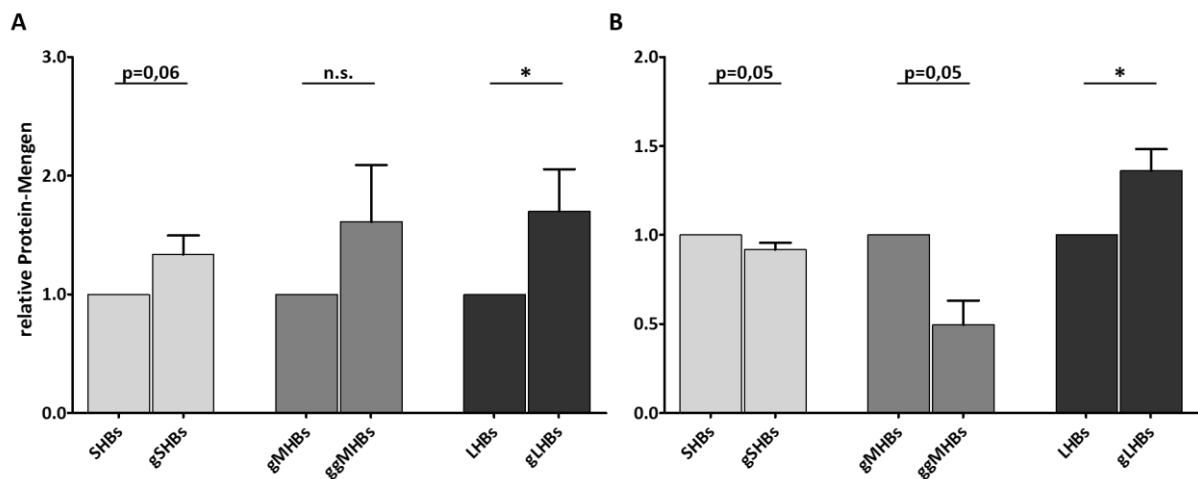


Abb. 15: Quantifizierung der relativen Mengen unterschiedlich glykosylierter HBV-Oberflächenproteine nach Transfektion von Huh7.5-Zellen mit einem **HBV-GtB**-Expressionsplasmid und nachfolgender Western Blot-Analyse mit Hilfe des HBs-spezifischen Antikörpers HB01 (n=6). Der Wert des nicht-glykosylierten Proteins (an Asn146) wurde willkürlich auf einen Wert von 1 gesetzt. Untersucht wurden (A) Zelllysate und (B) Zellkultur-Überstände.

Die Untersuchungen des Verhältnisses von einfach glykosyliertem LHBS zu der nicht-glykosylierten Variante zeigen eine erhöhte Menge an glykosyliertem Protein bei den HBV-Genotypen A und C im direkten Vergleich zu den Genotypen B und G, sowohl intra-, als auch extrazellulär

(Letzteres lässt sich natürlich nur für HBV-GtB definitiv sagen, da GtG HBsAg-sekretionsinkompetent ist und somit keine entsprechenden Zellkultur-Überstände analysiert wurden).

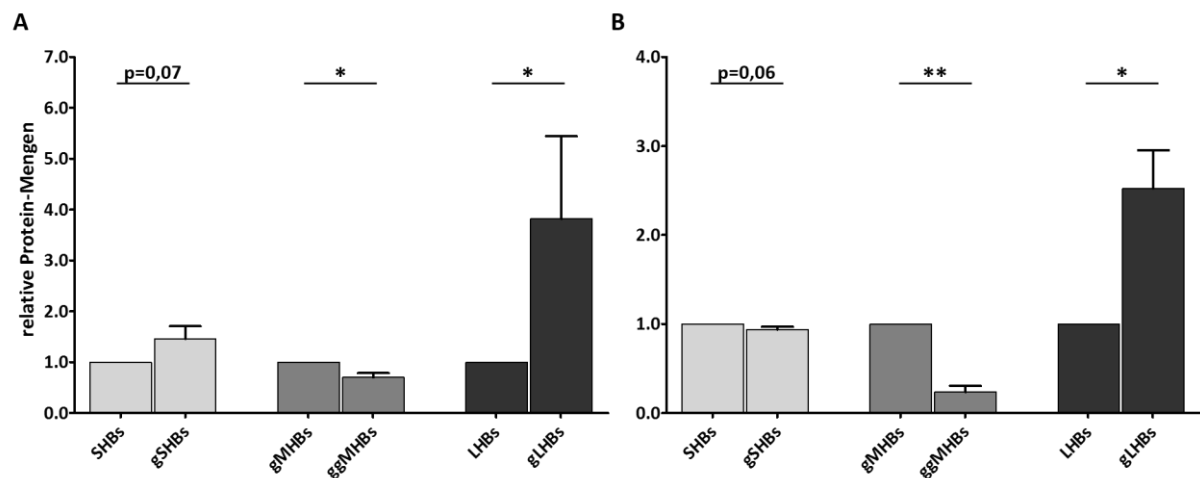


Abb. 16: Quantifizierung der relativen Mengen unterschiedlich glykosylierter HBV-Oberflächenproteine nach Transfektion von Huh7.5-Zellen mit einem **HBV-GtC**-Expressionsplasmid und nachfolgender Western Blot-Analyse mit Hilfe des HBs-spezifischen Antikörpers HB01 (n=6). Der Wert des nicht-glykosylierten Proteins (an Asn146) wurde willkürlich auf einen Wert von 1 gesetzt. Untersucht wurden (A) Zelllysate und (B) Zellkultur-Überstände.

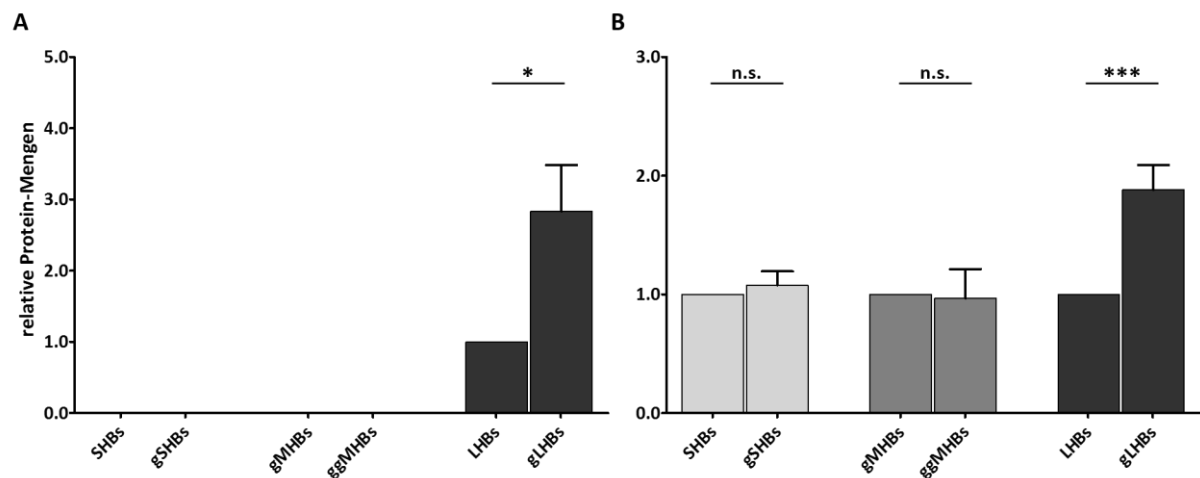


Abb. 17: Quantifizierung der relativen Mengen unterschiedlich glykosylierter HBV-Oberflächenproteine nach Transfektion von Huh7.5-Zellen mit (A) einem **HBV-GtD**- und (B) einem **HBV-GtG**-Expressionsplasmid und nachfolgender Western Blot-Analyse mit Hilfe des (A) LHBS-spezifischen Antikörpers Ma18/7 und (B) des HBs-spezifischen Antikörpers HB01 (n=6). Der Wert des nicht-glykosylierten Proteins (an Asn146) wurde willkürlich auf einen Wert von 1 gesetzt. Untersucht wurden Zelllysate.

Da der HBV-Genotyp D aufgrund der nur eingeschränkten Eignung des entsprechenden Antikörpers lediglich hinsichtlich des intrazellulären Verhältnisses von glykosyliertem zu nicht-glykosyliertem LHBS untersucht werden kann, sind hier nur sehr geringe Aussagen möglich. So ist

das Verhältnis, analog zu HBV-GtA und GtC, eindeutiger in Richtung der glykosylierten Variante verschoben, verglichen mit HBV-GtB und GtG.

Zusätzlich zu der quantitativen Auswertung der verschiedenen Western Blots von unbehandelten Zelllysaten und Überständen wurden Deglykosylierungsexperimente durchgeführt. Dies erfolgte unter Verwendung von PNGase F (N-Glykosidase) und O-Glykosidase (siehe Abb. 18). Jedoch konnten keine Genotypen-spezifische Unterschiede als Resultat auf die Behandlung mit den verwendeten Glykosidasen beobachtet werden. Für alle analysierten Genotypen führt die Behandlung mit PNGase F zur vollständigen Deglykosylierung des jeweiligen HBV-Oberflächenproteins. Die Behandlung mit der O-Glykosidase führt zu keinen eindeutigen Ergebnissen. Eine leichte Kontamination mit PNGase F muss hier diskutiert werden. Darüber hinaus können keine Unterschiede zwischen den verschiedenen untersuchten HBV-Genotypen detektiert werden.

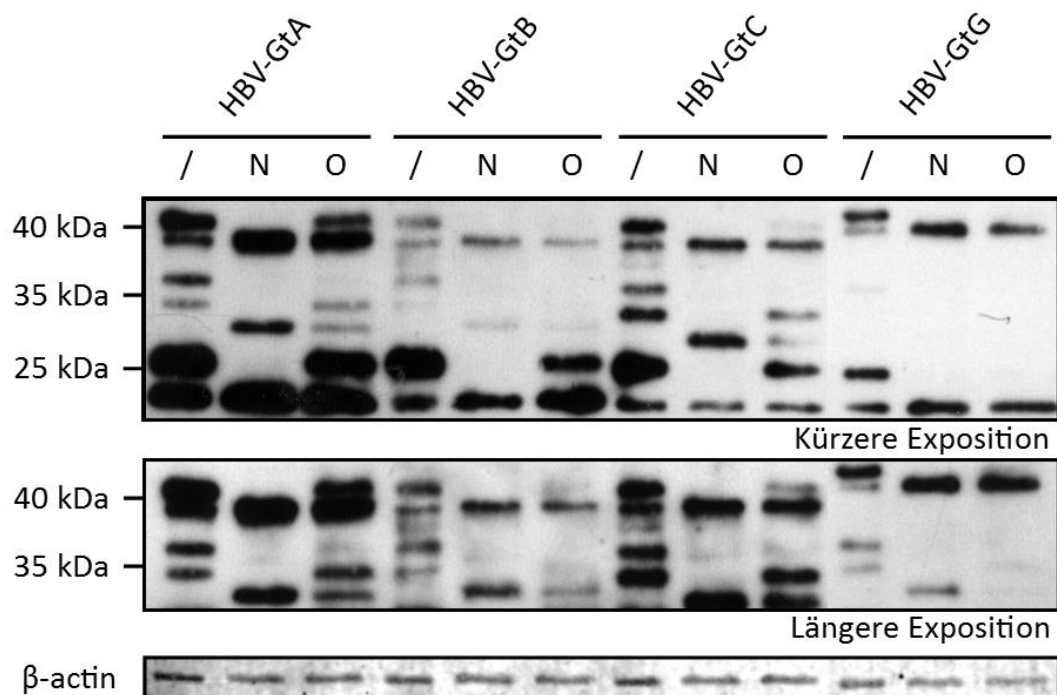


Abb. 18: Western Blot-Analyse von Zelllysaten transfizierter Huh7.5-Zellen. Verwendet wurden Plasmide, welche für HBV-GtA, GtB, GtC und GtG kodieren. Die Lysate wurden einer Behandlung mit verschiedenen Glykosidasen unterzogen (/: keine Behandlung; N: PNGase F-Behandlung; O: O-Glykosidase-Behandlung). Für die Detektion wurde der HBs-spezifische Antikörper HB01 verwendet. Gezeigt wurden zwei unterschiedliche Expositionszeiten desselben Blots. Eine Ladekontrolle erfolgte durch Verwendung eines β -Actin-spezifischen Antikörpers und anschließender Detektion am Licor Odyssey-System.

Im Anschluss erfolgte ein detaillierterer Vergleich zwischen den intra- und extrazellulär nachweisbaren HBV-Oberflächenproteinen (siehe Abb. 19). Hierbei wurden Zelllysate von mit Expressionsplasmiden, kodierend für HBV-GtA, GtB, GtC und GtG, transfizierten Huh7.5-Zellen und den entsprechenden Zellkultur-Überständen auf ein SDS geladen und mittels Western Blot hinsichtlich der verschiedenen Oberflächenproteine analysiert. Hierbei ist bei allen untersuchten Genotypen (außer HBV-GtG) zu erkennen, dass die Banden für die verschiedenen Oberflächenproteine in den Zellkultur-Überständen zu höheren Molekulargewichten verschoben sind. Zusätzlich kann z. B. bei HBV-GtA im Bereich des LHBs eine zusätzliche Bande detektiert werden. Für GtB und GtC kann dies nicht in analoger Weise bestätigt werden. Für GtB und GtC kann dies nicht in analoger Weise bestätigt werden.

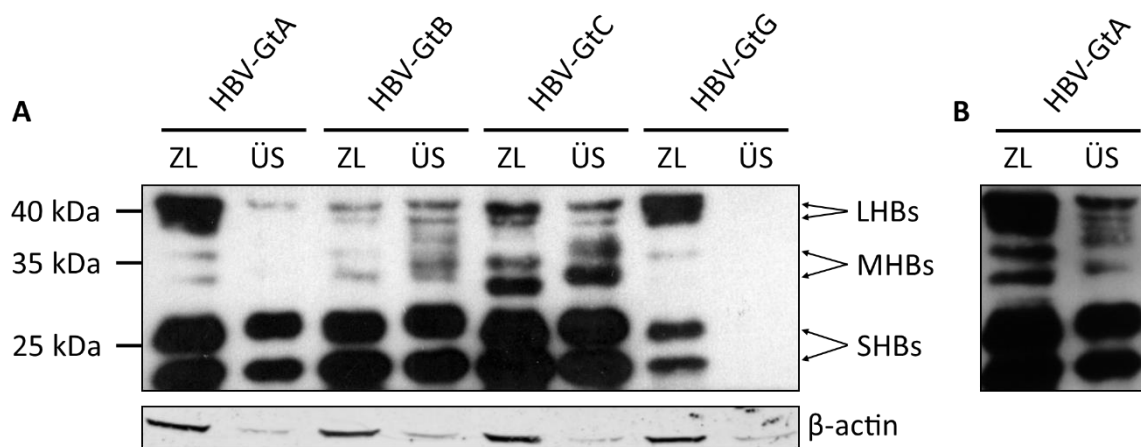


Abb. 19: Western Blot-Vergleich von Zelllysaten (ZL) und den entsprechenden Überständen (ÜS) von mit Expressionsplasmiden, kodierend für HBV-GtA, GtB, GtC und GtG, transfizierten Huh7.5-Zellen. Es wurden jeweils 20 μ g Protein des Zelllysats aufgetragen. Die Überstände wurden der Konzentration des Zelllysats entsprechend angepasst. Die HBV-Oberflächenproteine wurden mit dem HBs-spezifischen Antikörper HB01 detektiert. Transfiziert wurden für die angegebenen HBV-Genotypen kodierende Expressionsplasmide. Gezeigt ist eine kürzere Expositionszeit des gesamten Blots (A) und eine etwas längere Expositionszeit speziell für HBV-GtA (B). Eine Ladekontrolle erfolgte durch Verwendung eines β -Actin-spezifischen Antikörpers und anschließender Detektion am Licor Oddysey-System.

Nach dem direkten Vergleich der Modifikation der HBV-Oberflächenproteine in Zelllysaten und Zellkultur-Überständen konnte zudem unter Verwendung von Patientenseren (von HBV-positiven Patienten nach Detektion des für die Infektion verantwortlichen Genotyps) ein Vergleich von *ex vivo*- und *ex vitro*-Material gezogen werden. Hierzu wurden nach Quantifizierung der HBsAg-Mengen (mittels ELISA) der einzelnen Proben vergleichbare Mengen auf ein Gel aufgetragen. Nach dem Blotten und der Detektion mit Hilfe des HBs-spezifischen Antikörpers HB01 konnten so Aussagen bezüglich der unterschiedlichen Proben gemacht werden (siehe Abb. 20). Zwar können zwischen den verwendeten Patientenseren und den Zellkultur-Über-

ständen geringfügige Unterschiede hinsichtlich der Größe der einzelnen HBV-Oberflächenproteine nachgewiesen werden, jedoch können keine überraschenden bzw. eindeutigen Abweichungen zwischen dem *ex vivo* und *ex vitro* gewonnenen Material beobachtet werden. Es bleibt anzumerken, dass im Fall von HBV-GtC bei den verwendeten Patientenseren sowohl das MHBs und auch das LHBs zu höheren Molekulargewichten verschoben ist.

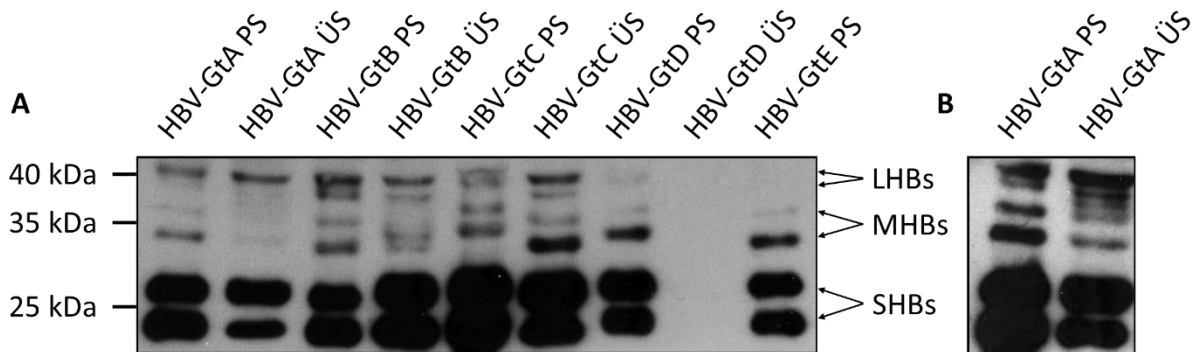


Abb. 20: Western Blot-Analyse von Zellkultur-Überständen (ÜS) und entsprechenden Patientenseren (PS). Die HBV-Oberflächenproteine wurden mit dem HBs-spezifischen Antikörper HB01 detektiert. Transfiziert wurden für die angegebenen HBV-Genotypen kodierenden Expressionsplasmide. Die Patientenseren wurden nach eindeutiger Genotypisierung und mittels HBsAg-ELISA auf vergleichbare HBsAg-Mengen bezogen auf die verwendeten Zellkultur-Überstände eingesetzt. Gezeigt ist eine kürzere Expositionszeit des gesamten Blots (A) und eine etwas längere Expositionszeit speziell für HBV-GtA (B).

Eine tiefere Analyse der posttranslationalen Modifikation des LHBs wurde mithilfe der 2D-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurden Zelllysate von transfizierten Huh7.5-Zellen verwendet, welche die Genotypen A, B, C und G exprimieren. Nach der Präparation der Zelllysate erfolgte eine Reduktion mit β -Mercaptoethanol mit anschließender Hitzedenaturierung. Im Anschluss wurden die Proteine im Zelllysate hinsichtlich deren isoelektrischen Punktes im elektrischen Feld fokussiert, wonach sich eine klassische Auftrennung anhand der Proteingröße anschloss. Nach dem Blotting erfolgte die Detektion der zu untersuchenden Proteine mittels HBV-spezifischer Antikörper. Diese Untersuchungen (siehe Abb. 21) zeigen im Fall der HBV-Genotypen A und G für die nicht-glykosylierte Form des LHBs eine deutliche Verschiebung einer Isoform in Richtung des basischen Milieus hinsichtlich des spezifischen isoelektrischen Punktes. Bei Genotyp B hingegen lässt sich eine deutlich saurere Variante des glykosylierten LHBs erkennen.

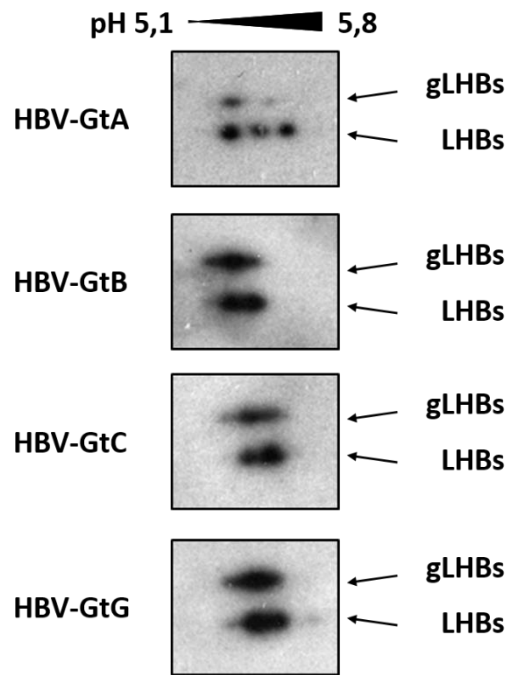


Abb. 21: Western Blot-Analyse von Zelllysaten, welche von mit HBV-GtA-, GtB-, GtC- und GtG-Expressionsplasmiden transfizierten Huh7.5-Zellen extrahiert wurden. Eingesetzt wurden jeweils 100 μ g Gesamtprotein. Nach Reduktion der Lysate und Hitzedenaturierung erfolgte die isoelektrische Fokussierung mit anschließender Größenauftrennung im elektrischen Feld. Nach Blotten des Gels auf PVDF-Membranen wurden die HBV-Oberflächenproteine mit Hilfe des HBs-spezifischen Antikörpers HB01 detektiert.

Zusammenfassend lassen sich keine eindeutigen Unterschiede zwischen den untersuchten HBV-Genotypen hinsichtlich deren Glykosylierungsmuster erkennen. Jedoch gab es deutliche Unterschiede in Bezug auf die Nutzung der verschiedenen Glykosylierungsstellen und darüber hinaus konnten Genotypen-spezifische Abweichungen mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. So kann man bei den verschiedenen detektierten Spots evtl. unterschiedliche Phosphorylierungen in der PreS2-Domäne diskutieren.

5.1.4 HBV-Genotyp G zeigt deutliche Veränderungen hinsichtlich der subzellulären HBsAg-Verteilung

Nach der Analyse der Zusammensetzung der HBV-Oberflächenproteine und deren Glykosylierungsmuster wurde deren subzelluläre Verteilung mit Hilfe der konfokalen Laserscan-Mikroskopie untersucht. Hierzu wurden Huh7.5-Zellen mit Expressionsplasmiden, kodierend für die verschiedenen HBV-Genotypen und verschiedenen Zellkompartiment-Markern, kotransfiziert.

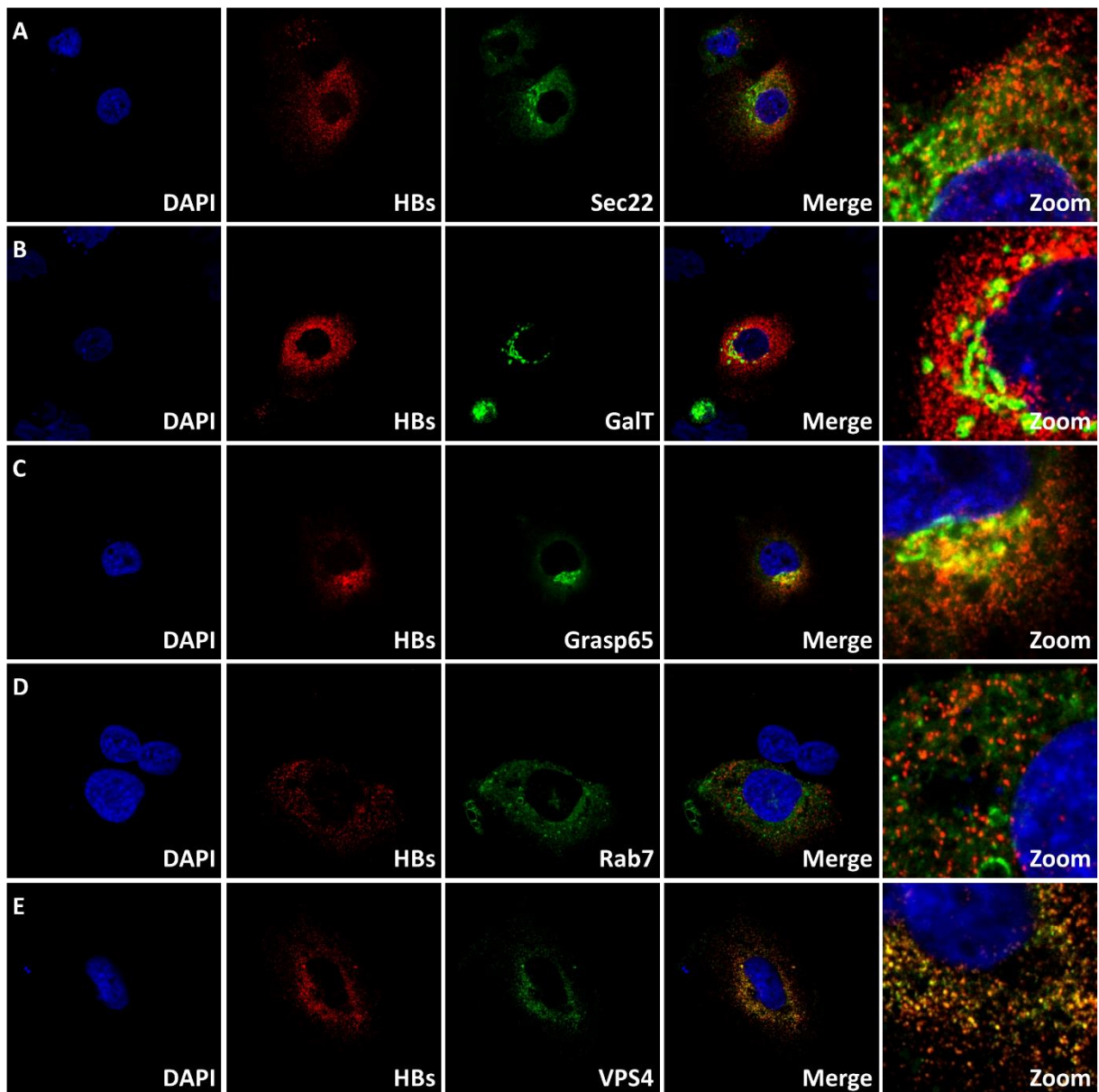


Abb. 22: Konfokale mikroskopische Untersuchung der intrazellulären HBsAg-Verteilung (L-, M- und SHBs) von Huh7.5-Zellen, welche mit einem **HBV-GtA**-Expressionsplasmid transfiziert wurden. HBsAg wurde mit Hilfe des HBs-spezifischen Antikörpers HB01 in Verbindung mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert (rot). Die Zellen wurden kotransfiziert mit Plasmiden, welche für folgende (fluoreszenzmarkierte; grün) Markerproteine kodieren: Sec22-YFP (ER Marker), GalT-YFP (trans-Golgi Marker), Grasp65-YFP (cis-Golgi Marker), Rab7-YFP (MVB/prälysosomal Marker) und VPS4-YFP (MVB/ESCRT Marker). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

Die hier verwendeten Plasmide kodieren für fluoreszenzmarkierte Proteine, welche durch deren typische intrazelluläre Lokalisation eine Anfärbung eines bestimmten Zellkompartiments ermöglicht. In dieser Arbeit wurden hierbei folgende Marker genutzt: Sec22-YFP (ER Marker), GalT-YFP (trans-Golgi Marker), Grasp65-YFP (cis-Golgi Marker), Rab7-YFP (MVB/prälysosomal Marker) und VPS4-YFP (MVB/ESCRT Marker). Die HBV-Oberflächenproteine wurden jeweils mit dem HBs-spezifischen Antikörper HB01, welcher L-, M- und SHBs nachweist und mit

dem LHBs-spezifischen Antikörper MA18/7 unter Verwendung eines Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers detektiert. Durch Behandlung der auf Glasplättchen immobilisierten Zellen mit DAPI konnten auch die Zellkerne visualisiert werden.

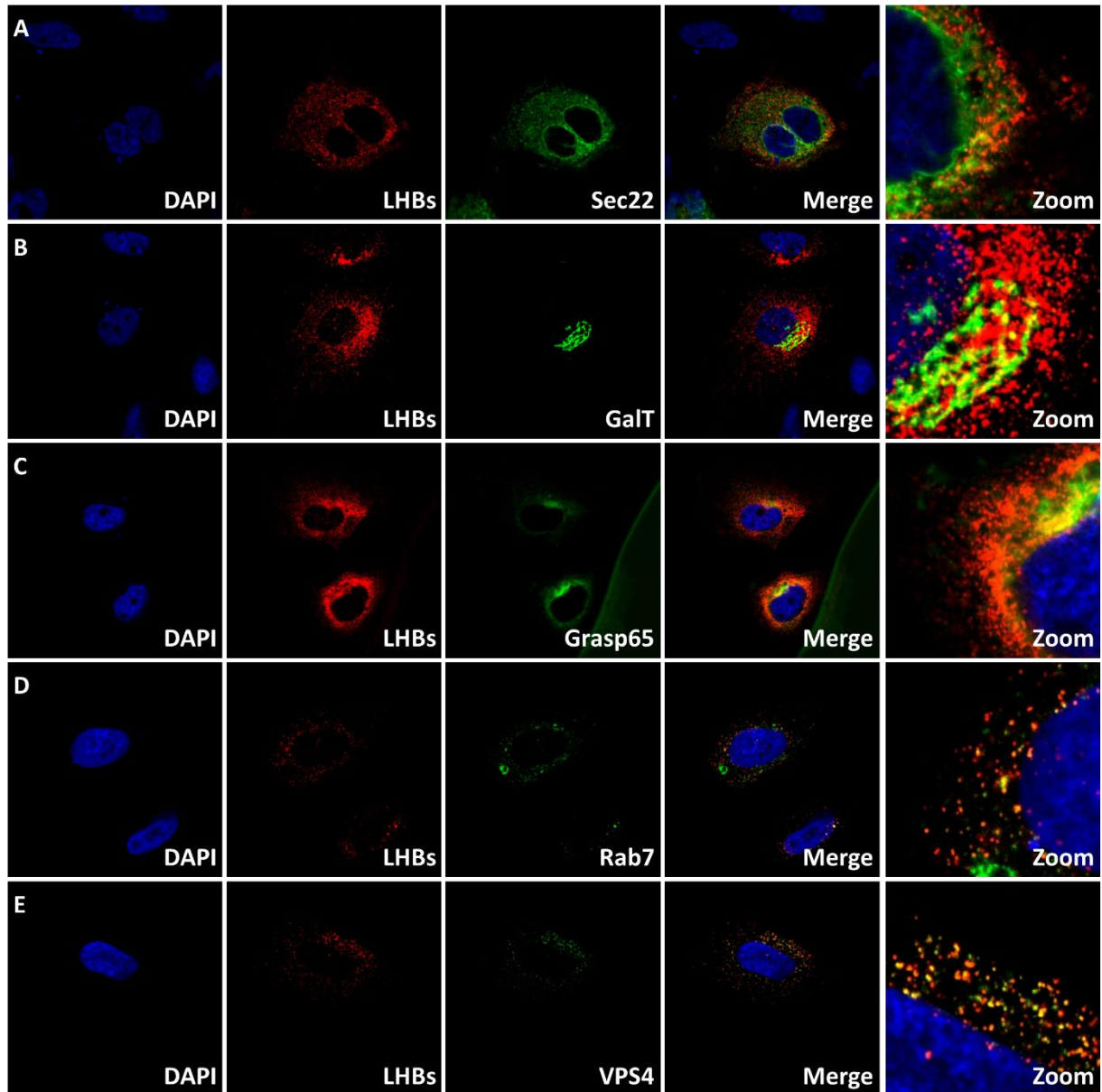


Abb. 23: Konfokale mikroskopische Untersuchung der intrazellulären **LHBs**-Verteilung von Huh7.5-Zellen, welche mit einem **HBV-GtA**-Expressionsplasmid transfiziert wurden. HBsAg wurden mit Hilfe des LHBs-spezifischen Antikörpers Ma18/7 in Verbindung mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert (rot). Die Zellen wurden kotransfiziert mit Plasmiden, welche für folgende (fluoreszenzmarkierte; grün) Markerproteine kodieren: Sec22-YFP (ER Marker), GalT-YFP (trans-Golgi Marker), Grasp65-YFP (cis-Golgi Marker), Rab7-YFP (MVB/prälysosomaler Marker) und VPS4-YFP (MVB/ESCRT Marker). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen führen zu dem Schluss, dass alle HBV-Genotypen, außer Genotyp G, vergleichbare intrazelluläre Verteilungsmuster hinsichtlich der untersuchten HBV-Oberflächenproteine aufweisen. Hierbei sollen daher beispielhaft HBV-

GtA mit GtG verglichen werden (siehe Abb. 22 + Abb. 23 und Abb. 24 + Abb. 25). Die Aufnahmen für die HBV-Genotypen B, C und D sind dann im Anschluss abgebildet (Abb. 26, Abb. 27, Abb. 28, Abb. 29 und Abb. 30).

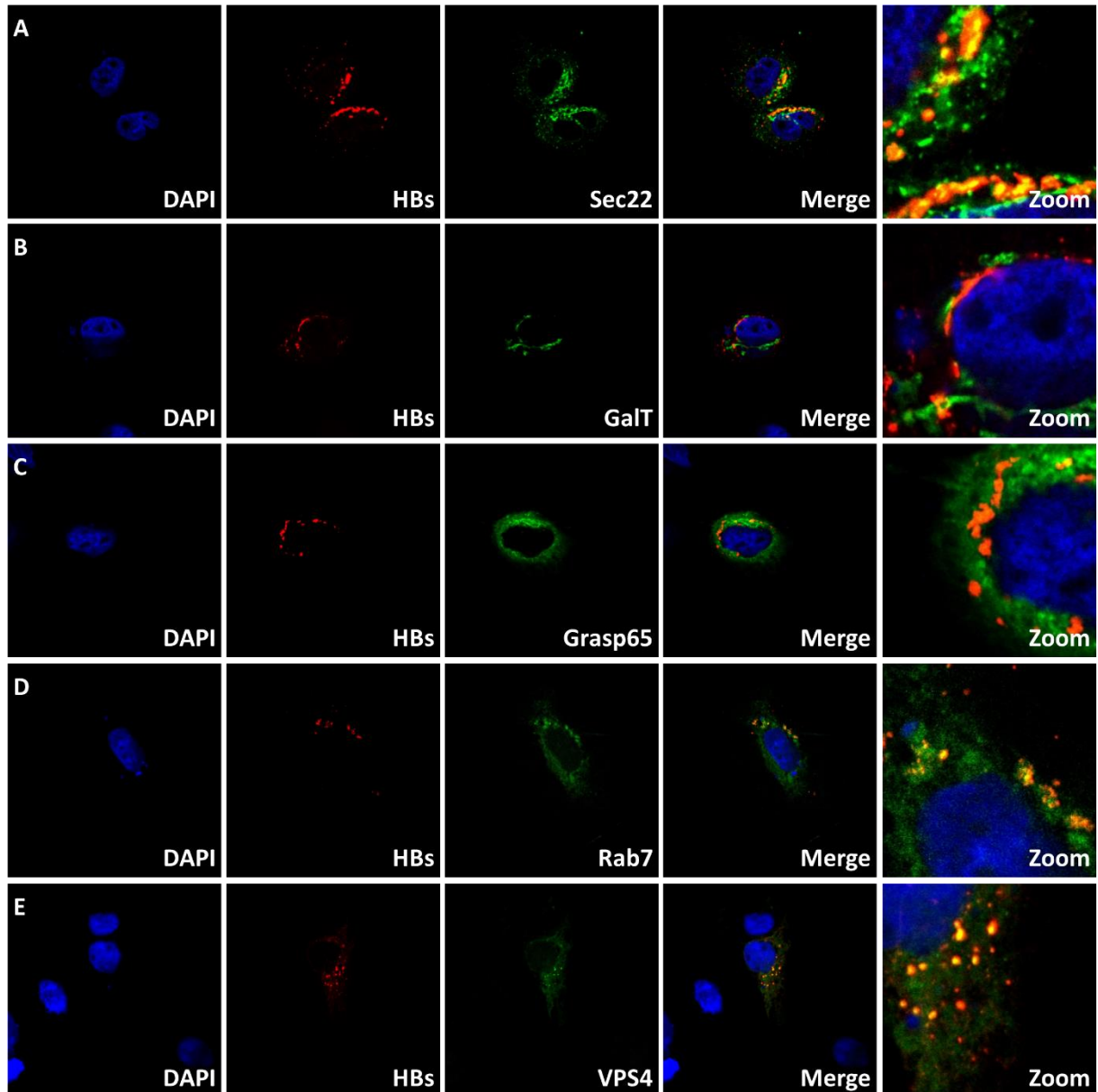


Abb. 24: Konfokale mikroskopische Untersuchung der intrazellulären HBsAg-Verteilung (**L-, M- und SHBs**) von Huh7.5-Zellen, welche mit einem **HBV-GtG**-Expressionsplasmid transfiziert wurden. HBsAg wurden mit Hilfe des HBs-spezifischen Antikörpers HB01, in Verbindung mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundäantikörper detektiert (rot). Die Zellen wurden kotransfiziert mit Plasmiden, welche für folgende (fluoreszenzmarkierte; grün) Markerproteine kodieren: Sec22-YFP (ER Marker), GalT-YFP (trans-Golgi Marker), Grasp65-YFP (cis-Golgi Marker), Rab7-YFP (MVB/prälisosomaler Marker) und VPS4-YFP (MVB/ESCRT Marker). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

Anhand des beispielhaft angeführten HBV-Genotyps A ist eine Kolokalisation mit allen Marker-Proteinen (Abb. 22 + Abb. 23; teilweise besser, teilweise weniger gut) erkennbar. Im Gegensatz dazu ist zu beachten, dass bei Genotyp G (Abb. 24 + Abb. 25) die Oberflächenproteine in einer perinukleären Region zu akkumulieren scheinen und dort hauptsächlich in Kolokalisation mit dem ER (bzw. Golgi). Dies grenzt HBV-GtG in deutlicher Weise von den anderen untersuchten HBV-Genotypen ab.

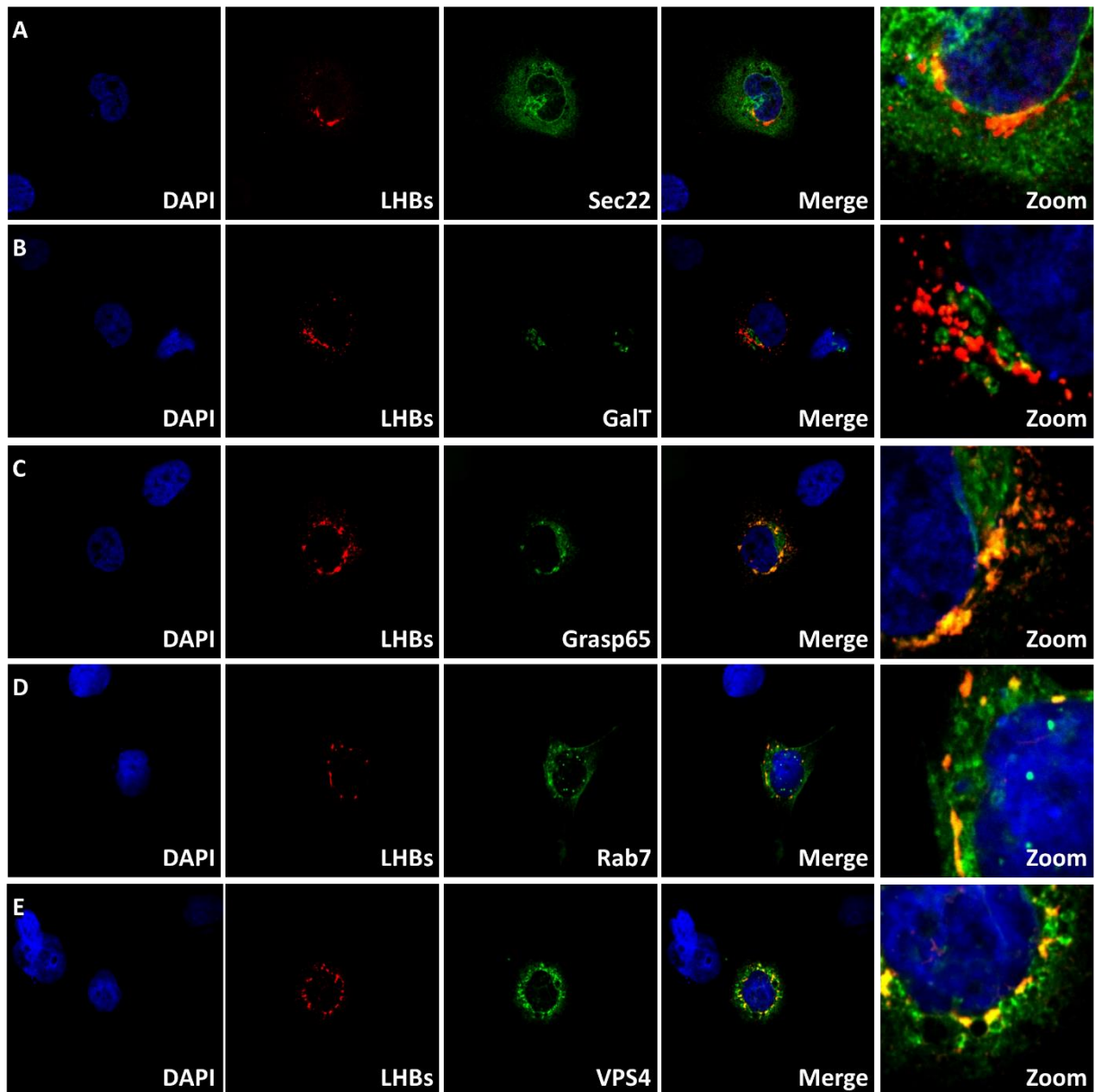


Abb. 25: Konfokale mikroskopische Untersuchung der intrazellulären **LHBs**-Verteilung von Huh7.5-Zellen, welche mit einem **HBV-GtG**-Expressionsplasmid transfiziert wurden. HBsAg wurden mit Hilfe des LHBs-spezifischen Antikörpers Ma18/7, in Verbindung mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert (rot). Die Zellen wurden kotransfiziert mit Plasmiden, welche für folgende (fluoreszenzmarkierte; grün) Markerproteine kodieren: Sec22-YFP (ER Marker), GalT-YFP (trans-Golgi Marker), Grasp65-YFP (cis-Golgi Marker), Rab7-YFP (MVB/prälysosomaler Marker) und VPS4-YFP (MVB/ESCRT Marker). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

Die anderen untersuchten HBV-Genotypen zeigen eine punktuelle Lokalisation der analysierten Proteine im Zytosol der jeweiligen Zelle. Hierbei sind die Signale perinukleär akkumuliert, jedoch ist eine Verteilung im kompletten Zytosol ersichtlich. Dies ist in allen untersuchten HBV-positiven Zellen und bei allen HBV-Genotypen (außer HBV-GtG) analog detektierbar gewesen (siehe Abb. 22, Abb. 23, Abb. 26, Abb. 27, Abb. 28, Abb. 29 und Abb. 30).

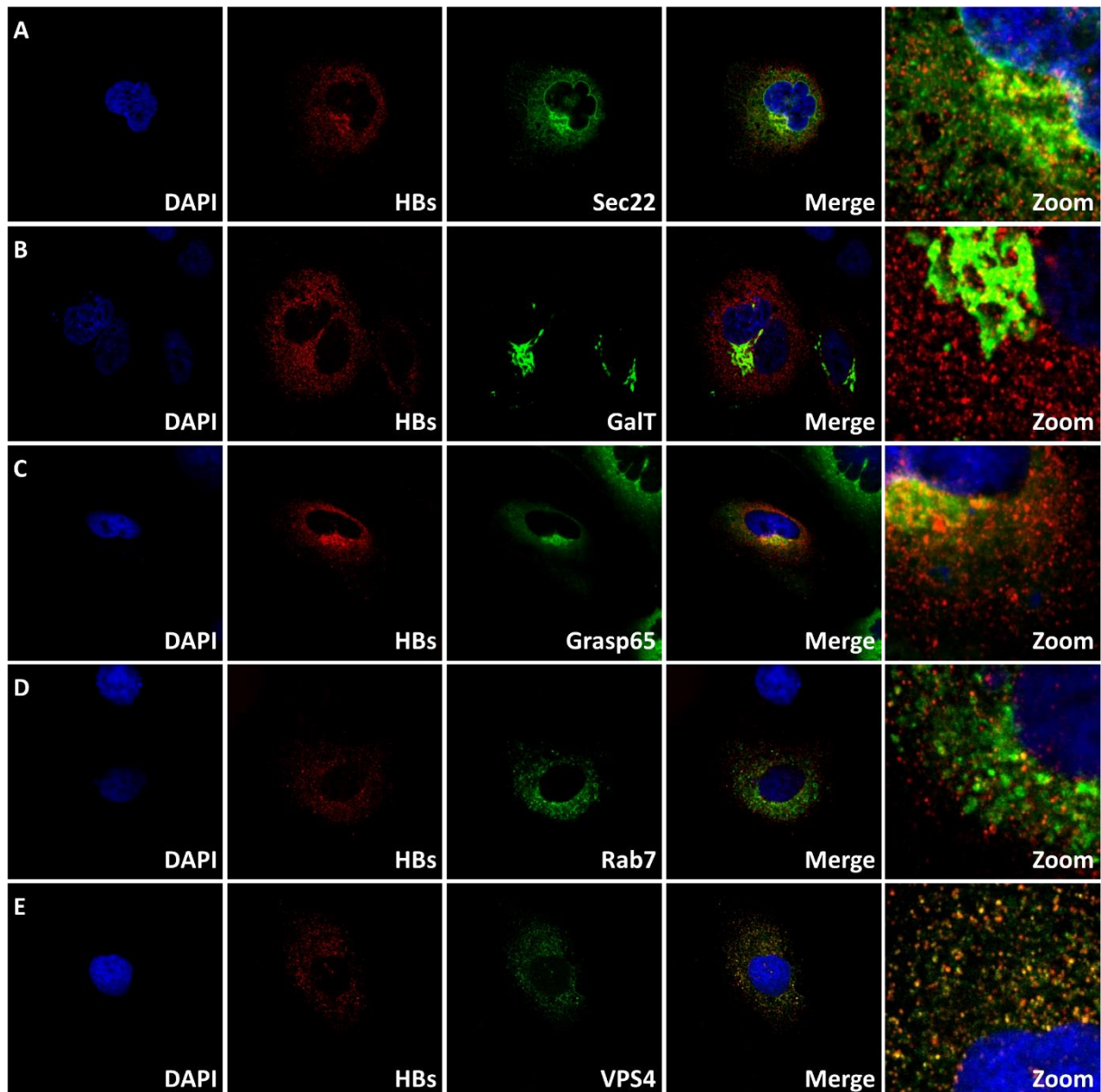


Abb. 26: Konfokale mikroskopische Untersuchung der intrazellulären HBsAg-Verteilung (L-, M- und SHBs) von Huh7.5-Zellen, welche mit einem **HBV-GtB**-Expressionsplasmid transfiziert wurden. HBsAg wurden mit Hilfe des HBs-spezifischen Antikörpers HB01, in Verbindung mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert (rot). Die Zellen wurden kotransfiziert mit Plasmiden, welche für folgende (fluoreszenzmarkierte; grün) Markerproteine kodieren: Sec22-YFP (ER Marker), GalT-YFP (trans-Golgi Marker), Grasp65-YFP (cis-Golgi Marker), Rab7-YFP (MVB/prälysosomaler Marker) und VPS4-YFP (MVB/ESCRT Marker). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

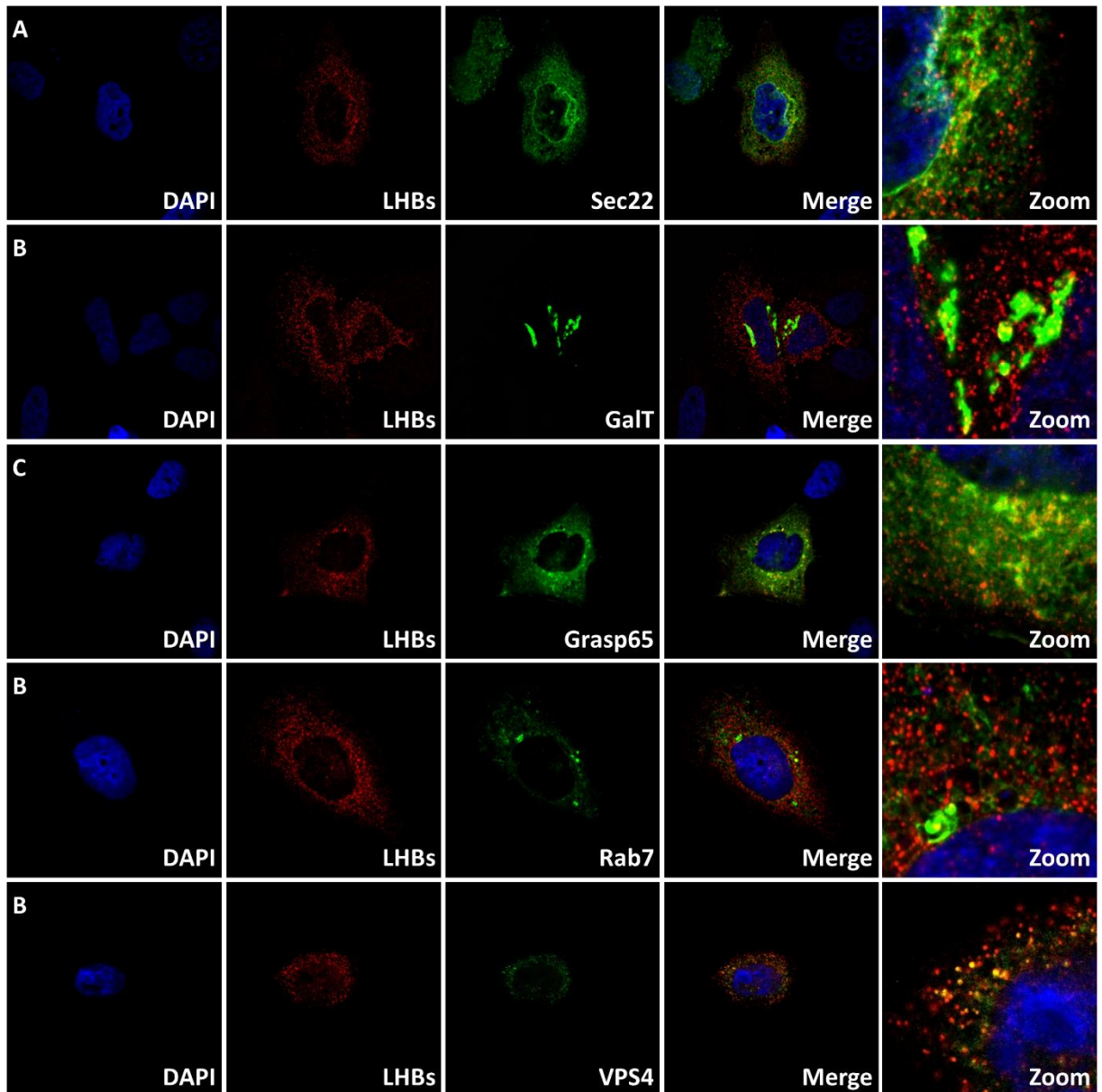


Abb. 27: Konfokale mikroskopische Untersuchung der intrazellulären LHBs-Verteilung von Huh7.5-Zellen, welche mit einem HBV-GtB-Expressionsplasmid transfiziert wurden. HBsAg wurden mit Hilfe des LHBs-spezifischen Antikörpers Ma18/7 in Verbindung mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert (rot). Die Zellen wurden kotransfiziert mit Plasmiden, welche für folgende (fluoreszenzmarkierte; grün) Markerproteine kodieren: Sec22-YFP (ER Marker), GalT-YFP (trans-Golgi Marker), Grasp65-YFP (cis-Golgi Marker), Rab7-YFP (MVB/prälysosomaler Marker) und VPS4-YFP (MVB/ESCRT Marker). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

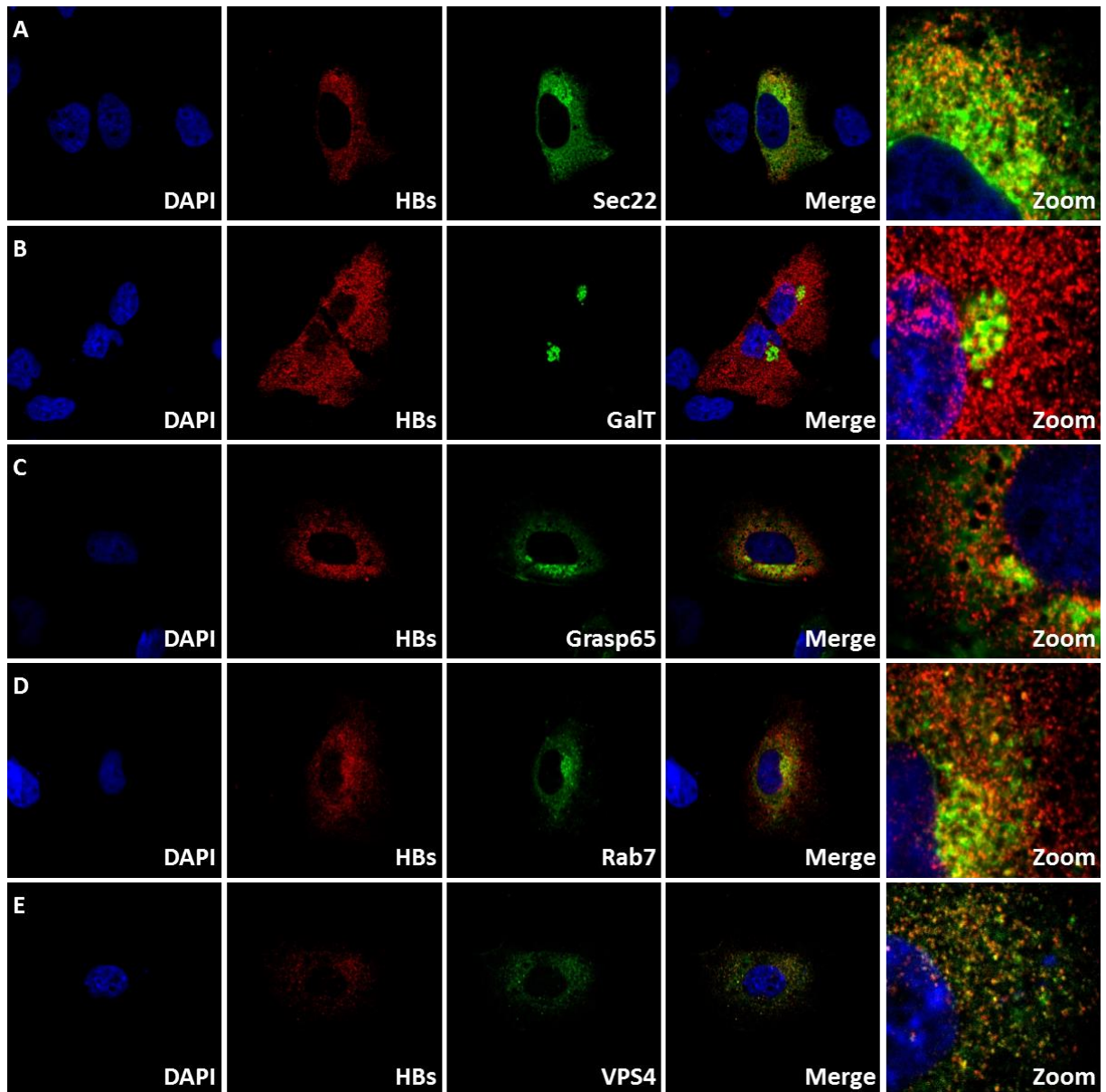


Abb. 28: Konfokale mikroskopische Untersuchung der intrazellulären HBsAg-Verteilung (**L-, M- und SHBs**) von Huh7.5-Zellen, welche mit einem **HBV-GtC**-Expressionsplasmid transfiziert wurden. HBsAg wurden mit Hilfe des HBs-spezifischen Antikörpers HB01 in Verbindung mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert (rot). Die Zellen wurden kotransfiziert mit Plasmiden, welche für folgende (fluoreszenzmarkierte; grün) Markerproteine kodieren: Sec22-YFP (ER Marker), GalT-YFP (trans-Golgi Marker), Grasp65-YFP (cis-Golgi Marker), Rab7-YFP (MVB/prälysosomaler Marker) und VPS4-YFP (MVB/ESCRT Marker). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

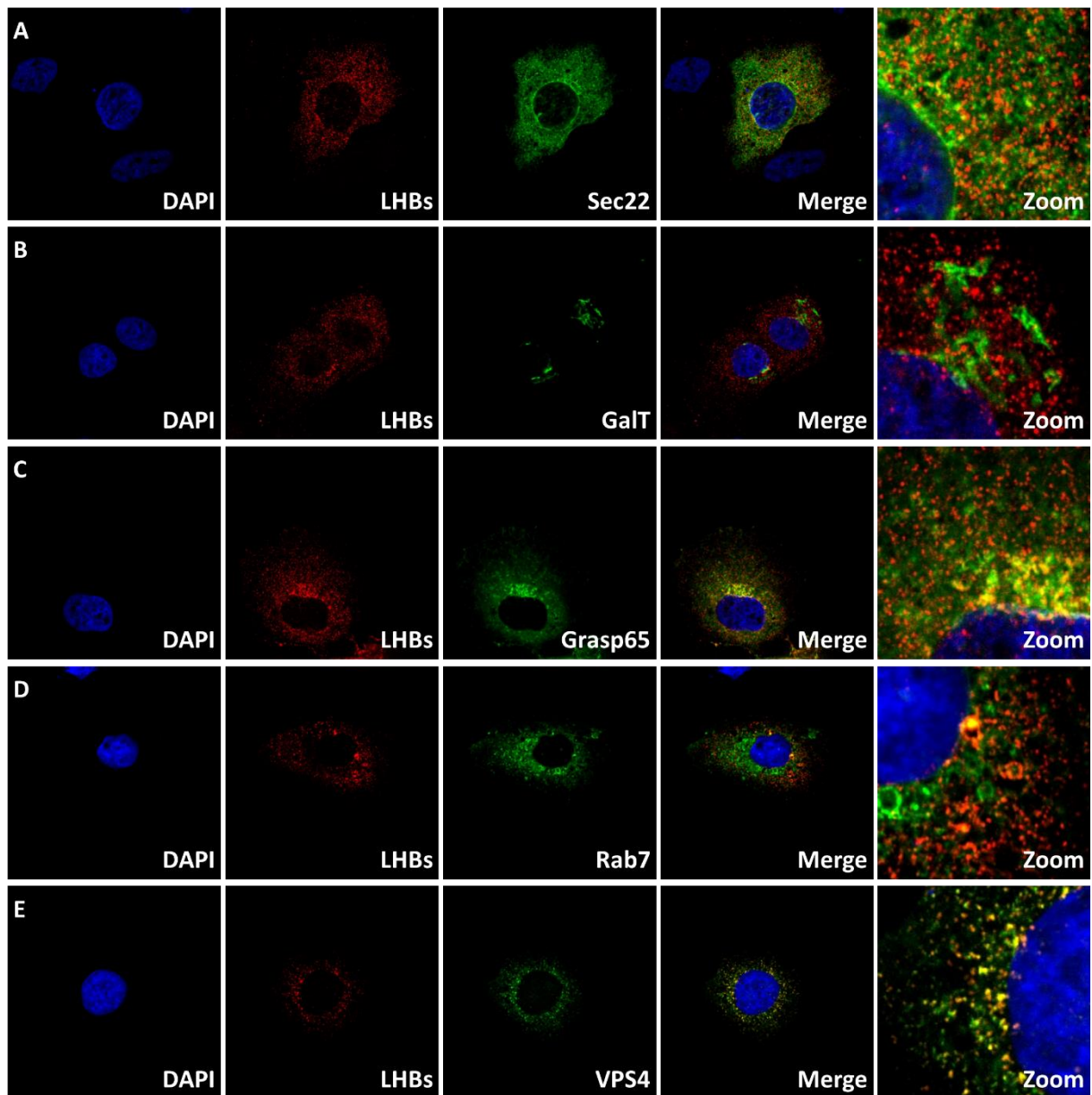


Abb. 29: Konfokale mikroskopische Untersuchung der intrazellulären **LHBs**-Verteilung von Huh7.5-Zellen, welche mit einem **HBV-GtC**-Expressionsplasmid transfiziert wurden. HBsAg wurden mit Hilfe des LHBs-spezifischen Antikörpers Ma18/7 in Verbindung mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert (rot). Die Zellen wurden kotransfiziert mit Plasmiden, welche für folgende (fluoreszenzmarkierte; grün) Markerproteine kodieren: Sec22-YFP (ER Marker), GalT-YFP (trans-Golgi Marker), Grasp65-YFP (cis-Golgi Marker), Rab7-YFP (MVB/prälysosomaler Marker) und VPS4-YFP (MVB/ESCRT Marker). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

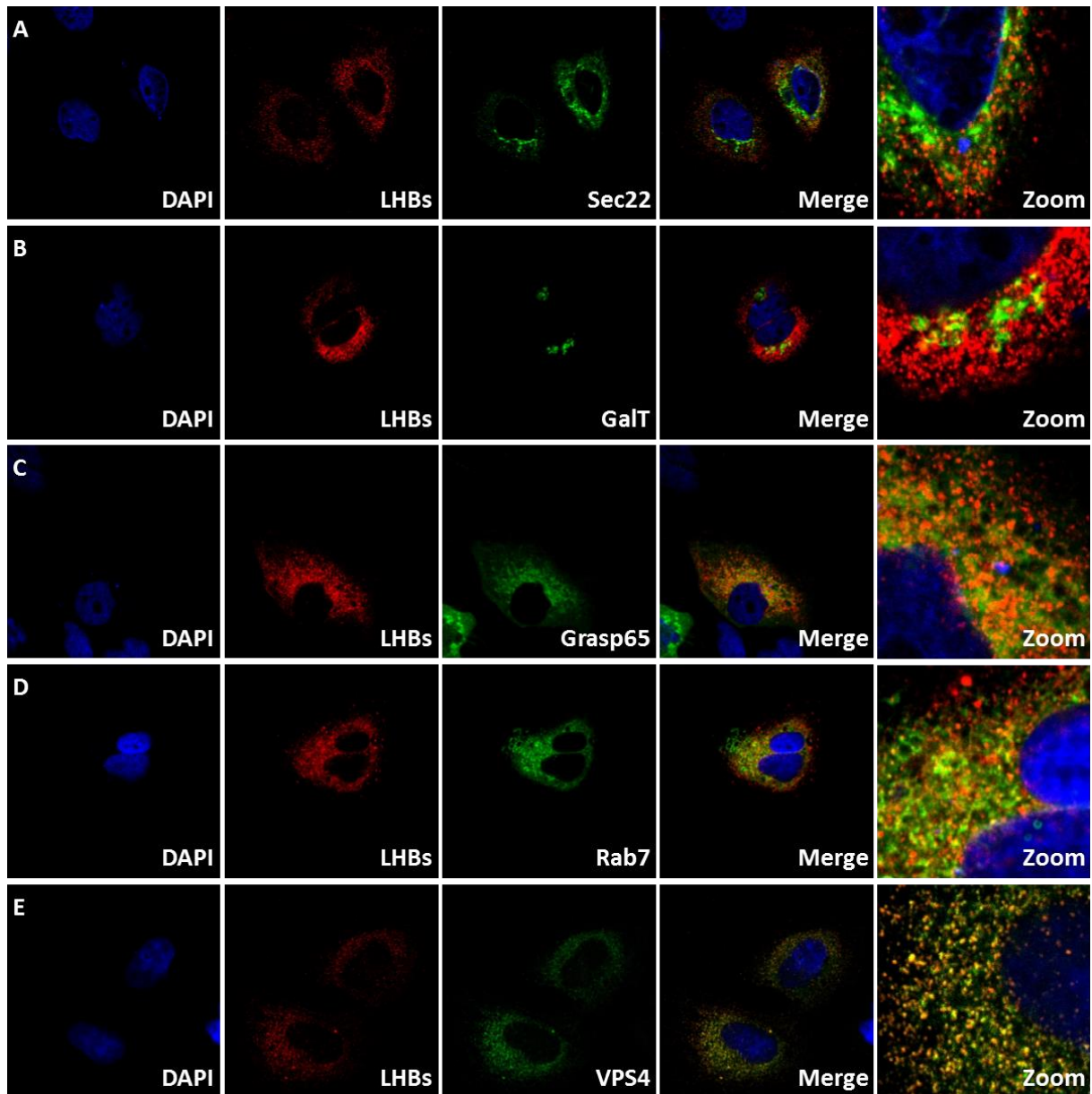


Abb. 30: Konfokale mikroskopische Untersuchung der intrazellulären **LHBs**-Verteilung von Huh7.5-Zellen, welche mit einem **HBV-GtD**-Expressionsplasmid transfiziert wurden. HBsAg wurden mit Hilfe des LHBs-spezifischen Antikörpers Ma18/7 in Verbindung mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert (rot). Die Zellen wurden kotransfiziert mit Plasmiden, welche für folgende (fluoreszenzmarkierte; grün) Markerproteine kodieren: Sec22-YFP (ER Marker), GalT-YFP (trans-Golgi Marker), Grasp65-YFP (cis-Golgi Marker), Rab7-YFP (MVB/prälysosomaler Marker) und VPS4-YFP (MVB/ESCRT Marker). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

5.1.4.1 Mutationen in der PreS1-Domäne verursachen veränderte Lokalisation der HBsAg bei Genotyp G

Die Ergebnisse hinsichtlich der veränderten subzellulären Verteilung der HBV-Oberflächenproteine zwischen Genotyp G und den übrigen untersuchten Genotypen und die Vorergeb-

nisse zu den veränderten Sekretionseigenschaften von HBsAg veranlassten weitere Experimente. Hierzu konnte in der Literatur auf zwei Mutationen (H51P und I84T) innerhalb der PreS1-Domäne geschlossen werden, welche bei sog. okkulten HBV-Infektionen vermehrt nachgewiesen wurden und ebenfalls im Genotyp G beobachtet werden können (Stuyver et al. 2000; Kim et al. 2013). Konfokale Immunfluoreszenz-Untersuchungen nach Rückmutation dieser beiden Aminosäuren (HBV mutGtG) zeigen, dass die typische perinukleäre Akkumulation des HBsAg bei HBV-GtG rückgängig gemacht werden kann (siehe Abb. 31).

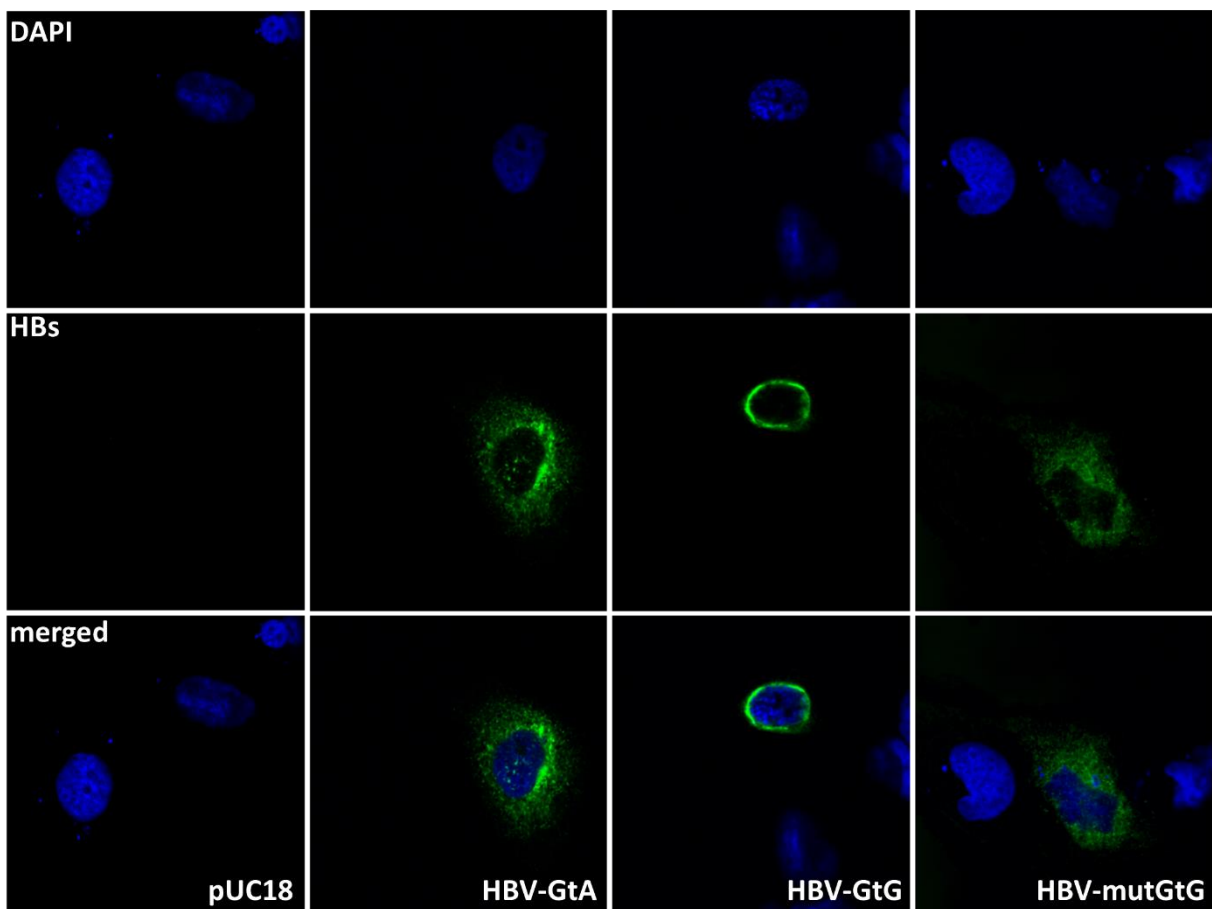


Abb. 31: Konfokale mikroskopische Untersuchung der intrazellulären HBs-Verteilung von transfizierten Huh7.5-Zellen. Die Transfektion erfolgte mit den angegebenen Expressionsplasmiden. Detektion der HBV-Oberflächenproteine erfolgte mit Hilfe des HBs-spezifischen Antikörpers HB01 in Verbindung mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

5.1.5 HBsAg-spezifische mRNA-Mengen der verschiedenen HBV-Genotypen weisen keine signifikanten Unterschiede auf

Zuletzt wurden die Mengen der für die Produktion der HBV-Oberflächenproteine notwendigen mRNAs der verschiedenen HBV-Genotypen quantifiziert. Hierbei wurden alle HBV-spezifischen Konstrukte (3,5 kB, 2,4 kB und 2,1 kB mRNA) vermessen. Dies geschah nach Isolierung der RNA aus transfizierten Huh7.5-Zellen. Nach der cDNA-Synthese erfolgte eine quantitative RealTime PCR (qRT-PCR) mit geeigneten Primern. Somit konnten alle HBsAg-spezifischen mRNAs quantifiziert werden. Die Analyse aus vier unabhängigen Experimenten ist in Abb. 32 dargestellt. Die erhaltenen Werte der einzelnen HBV-Genotypen, nach Messung mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode unter Normierung mit Hilfe des konstitutiv exprimierten GAPDH, weichen geringfügig voneinander ab, jedoch ohne eine statistische Signifikanz. HBV-GtD weist hierbei die höchsten mRNA-Mengen auf, HBV-GtG die niedrigsten.

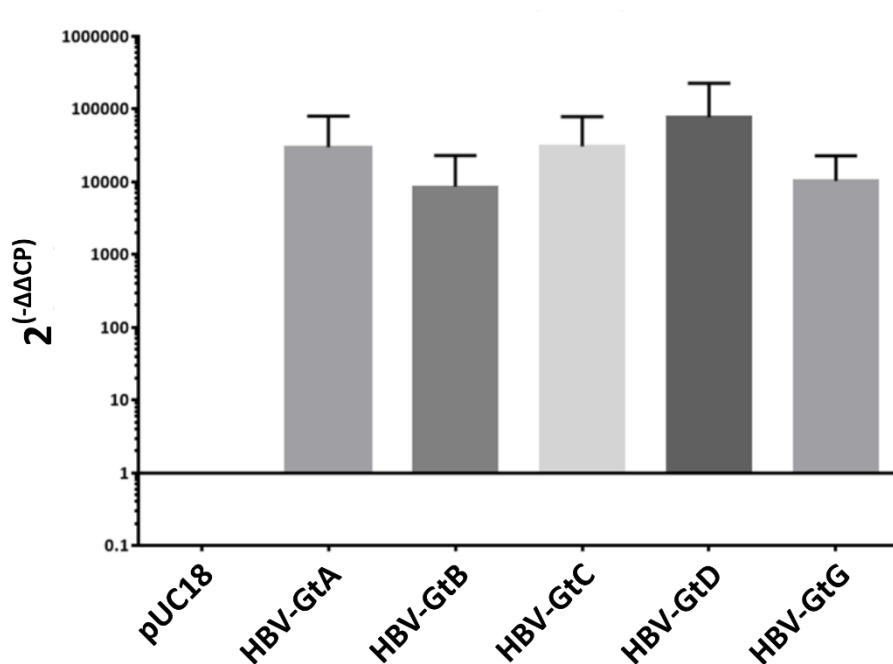


Abb. 32: qRT-PCR der cDNA, welche durch Isolierung von RNA aus transfizierten Huh7.5-Zellen hergestellt wurde. Die Transfektion erfolgte mit den in der Grafik angegebenen Expressionsplasmiden. Durch Messung der GAPDH-spezifischen mRNA-Menge und unter Verwendung einer Negativkontrolle (pUC18) konnten die Niveaus der HBV-spezifischen mRNAs mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode berechnet werden. Für die PCR wurden Primer verwendet, welche an die kodierende Region der S-Domäne binden (#186 + #186). Es wurden vier unabhängige Experimente ausgewertet ($n=4$).

5.2 Herstellung stabiler HBV-positiver Zelllinien mit Hilfe von Zinkfingernukleasen

Um Genotypen-spezifisches rekombinantes HBsAg auch mit Hilfe eines stabil-transfizierten Zellkultur-System zu untersuchen, wurde parallel zur Aufreinigung der viralen und subviralen Partikel mit der Herstellung von entsprechenden stabil-transfizierten HBV-positiven Zelllinien fortgefahren. Durch Kooperation mit dem Labor von Prof. Dr. D. Glebe (Uni Gießen) wurden Plasmide zu Verfügung gestellt, welche die gezielte Insertion von HBV-DNA in eine sog. *safe harbour site* innerhalb des Genoms der behandelten Zelle mittels Zinkfinger-Endonukleasen ermöglichte. Der entsprechende Genlokus ist im humanen Genom auf dem Chromosom 19 zu finden, innerhalb des AAVS1-Gens (*adeno-associated virus integration site 1*), welcher für diese Zwecke optimal geeignet ist – was in vielen Publikationen ebenfalls schon beschrieben wurde. Auf diesem Weg sollte eine gerichtete und somit eindeutig nachweisbare Integration der HBV DNA ermöglicht werden, die eine absolute Vergleichbarkeit hinsichtlich der produzierten viralen Proteine und somit der sekretierten viralen und subviralen Partikel sicherstellt. Die in dieser Arbeit hergestellten Klone konnten nach Elektroporation und anschließender Selektion mit einem geeigneten Antibiotikum (integriertes Material vermittelt Puromycin-Resistenz) monoklonal isoliert werden (nach Merkert et al. 2014). Der Zellkultur-Überstand dieser Einzelklone wurde mittels ELISA und PCR vermessen, um so die Produktion von HBsAg und assemblierten Viren zu überprüfen. Darüber hinaus wurden PCR-Analysen mit genomischer DNA der verschiedenen Linien durchgeführt und es konnte HBV DNA nachgewiesen werden. Aufgrund der Größe des Integrats (ca. 6–7 kB) konnte keine eindeutige PCR durchgeführt werden, die die Integration in die *safe harbour site* eindeutig nachweisen konnte. Jedoch konnten Veränderungen im Vergleich zu unbehandelten Zellen hinsichtlich der Zusammensetzung der genomischen DNA in diesem Bereich nachgewiesen werden. Eine abschließende Analyse der hergestellten Zelllinien soll mittels Southern Blotting zum Nachweis der spezifischen Integration erfolgen.

5.3 Subvirale Partikel können im rekombinanten System erfolgreich von viralen Partikeln getrennt werden

5.3.1 *Anreicherung und Auftrennung der verschiedenen Partikel kann stabil reproduziert werden*

Der Nachweis von HBsAg in Blutproben dient als wichtiger diagnostischer Marker sowohl bei der Erkennung von HBV-Infektionen als auch zur optimalen Anpassung der Therapie im Verlauf der Infektion. Solche Tests müssen demnach strenge Anforderungen erfüllen und daher vor deren gewerblicher Freigabe hinsichtlich deren Detektionsgrenzen bestmöglich getestet werden. Diese Aufgabe wird in Deutschland durch das dem Bundesministerium für Gesundheit zugeordneten Paul-Ehrlich-Institut als Bundesoberbehörde erfüllt. Die Kalibrierung der HBsAg-Testsysteme (ELISA-Systeme) erfolgt hierbei mit aufgereinigtem HBsAg, welches von infizierten Patienten isoliert wurde. Da diese Proben nur in endlicher Verfügbarkeit als Referenz- und Standardmaterial verwendet werden können, stellt die Nutzung von rekombinant hergestelltem und nachfolgend aufgereinigtem HBsAg eine signifikante Verbesserung dieser Kalibrationsprozesse dar. Die Möglichkeit der Herstellung eines auf HBV-Genotypen basierenden Referenz-Systems unter Verwendung von gereinigtem rekombinantem HBsAg stellte ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit dar. Die Experimente hierzu sollen im Folgenden dargestellt werden.

Beispielhaft für alle HBV-Genotypen erfolgten die ersten Experimente jeweils mit Zellkultur-Überstand von Huh7.5-Zellen, welche mit einem Expressionsplasmid transfiziert wurden, das für den HBV-Genotyp A kodiert. Dieser Überstand wurde in einem ersten Schritt mit einer Polyethylenglycol-Lösung (MW = 8000Da) versetzt, um eine Fällung der in Lösung befindlichen Proteine zu erreichen. Auf diese Weise konnte eine 100-fache Aufkonzentrierung des Ausgangsmaterials erreicht werden. Nach Resolubilisierung des gefällten Materials und nachfolgender Dialyse erfolgte die Auftrennung der in Lösung befindlichen Partikel anhand deren Dichte. Dies konnte mit Hilfe eines geeigneten Sucrose-Dichtegradienten und anschließender Zentrifugation erreicht werden. Die im Anschluss fraktionierten Proben wurden mit einer Vielzahl an Methoden hinsichtlich ihrer Zusammensetzung analysiert (siehe dazu Abb. 33). Die Verunreinigung der einzelnen Fraktionen mit Zellkulturmedium-Proteinen konnte durch

Coomassie-Färbung nachgewiesen werden. Die Kontrolle der Separierung der unterschiedlichen viralen und subviralen Partikel erfolgte mit Hilfe eines HBsAg-ELISAs bzw. der qRT-PCR, welche virale DNA nachweisen konnte, und Western Blot-Analysen unter Verwendung eines LHBs-spezifischen und eines HBcAg-spezifischen Antikörpers. Die Stabilität und der Verlauf des Gradienten konnte mittels Refraktometrie nachgewiesen werden.

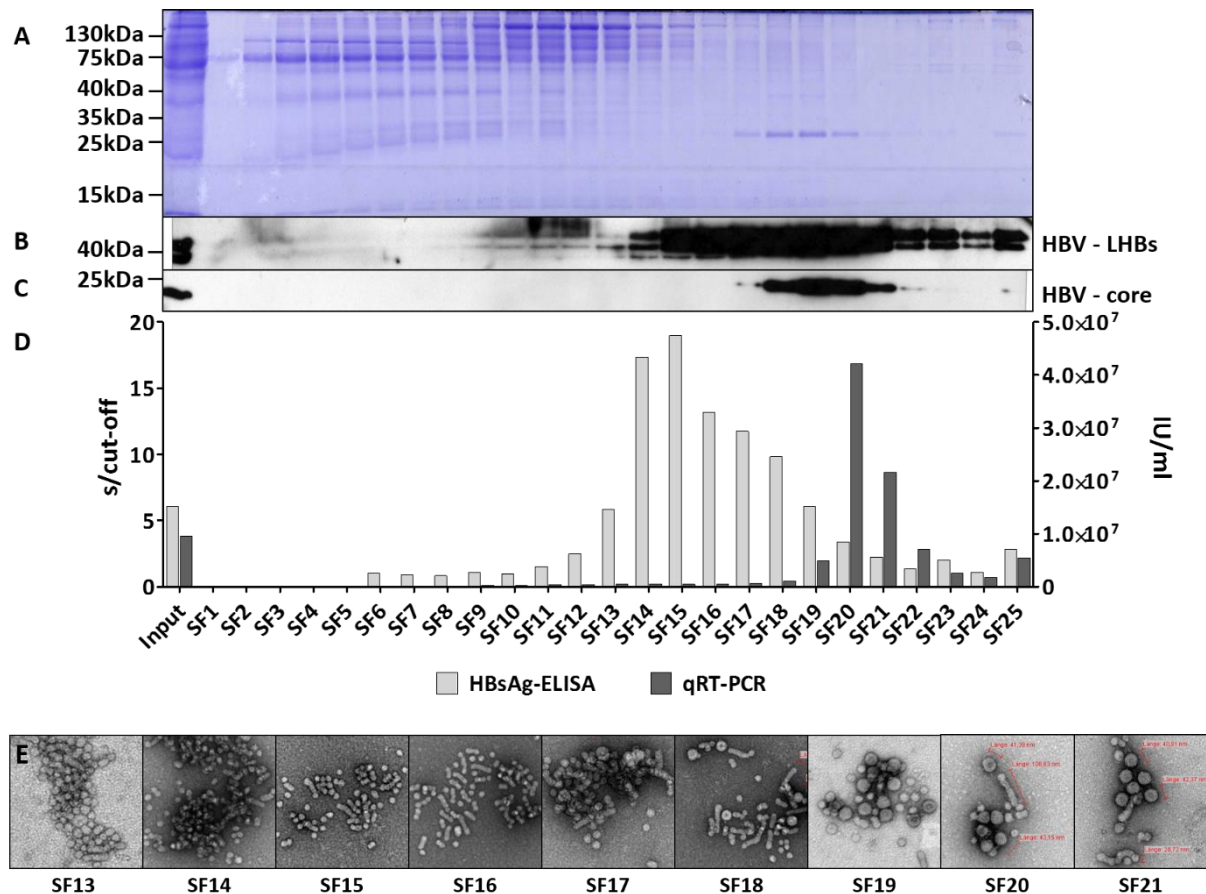


Abb. 33: Zellkultur-Überstände von HBV-GtA exprimierenden Huh7.5-Zellen wurden mittels PEG-Präzipitation und nachfolgender Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Nach dem Zentrifugationsschritt wurden 25 Fraktionen gesammelt und mittels Refraktometrie hinsichtlich der spezifischen Dichte kontrolliert. Die einzelnen Fraktionen wurden via SDS-PAGE und anschließend durch **A)** Coomassie-Färbung und **B)**, **C)** Western-Blot analysiert. Hierbei wurde für **B)** der LHBs-spezifische Antikörper Ma18/7 und für **C)** der core-spezifische Antikörper K46 verwendet. **D)** Zusätzlich wurde bei den Fraktionen mittels RT-PCR die Menge der viralen Genome und via HBsAg-ELISA die HBsAg-Mengen bestimmt. **E)** zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Fraktionen.

Fraktionen mit der höchsten detektierten HBsAg-Menge weisen nur geringe Verunreinigungen auf und beinhalten eine vergleichsweise geringe Menge an LHBs. Zusätzlich dazu kann nahezu keine virale DNA nachgewiesen werden. Darüber hinaus kann kein HBcAg in diesen Proben detektiert werden. Im Gegensatz dazu beinhalten Fraktionen, in welchen die meiste

virale DNA nachgewiesen werden kann, nur vergleichsweise geringe Mengen an HBsAg. Zudem ist in diesen Proben sowohl LHbS als auch HBcAg in deutlichen Mengen nachweisbar. Zwischen diesen Fraktionen ist ein fließender Übergang von HBsAg-Signal zu messbarer HBV-DNA zu beobachten. Auch die Detektion von LHbS mittels Western Blot zeigt ein ansteigendes und bis zum Ende des Gradienten wieder abfallendes Signal. HBcAg ist nur in einer vergleichsweise geringen Anzahl der untersuchten Fraktionen nachweisbar.

Um diese Ergebnisse mikroskopisch zu untermauern, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wurden in Lösung befindliche Partikel auf einem Kupfernetz fixiert und mit Hilfe eines geeigneten Kontrastmittels angefärbt. Die in Abb. 33 E dargestellten Bilder zeigen Aufnahmen, welche den für diese Arbeit interessanten Bereich der untersuchten Fraktionen widerspiegeln. In den früheren Fraktionen sind hauptsächlich kleinere runde Partikel mit Durchmessern zwischen 20 und 25 nm nachweisbar. In späteren Fraktionen können vermehrt filamentöse Strukturen mit einem Durchmesser von ebenfalls 20 bis 25 nm bei variabler Länge detektiert werden. Späte Fraktionen lassen hauptsächlich größere runde Strukturen mit einem Durchmesser von 40 bis 45 nm erkennen.

Da diese Erkenntnisse gut mit den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von viralen und subviralen HBV-spezifischen Partikeln korrelieren, kann von einer erfolgreichen und robusten Trennung dieser in dem hier verwendeten System ausgegangen werden.

5.3.2 Dichte der freigesetzten subviralen und viralen Partikel zeigt analoges Verhalten zwischen den analysierten HBV-Genotypen

Nachdem ein Standardprotokoll für die Reinigung von rekombinantem HBsAg festgesetzt wurde (siehe Kap. 4.2.7 und Kap. 5.3.1), wurde mit Zellkultur-Überstand von transfizierten Huh7.5-Zellen in analoger Weise fortgefahren. Hierbei wurden Plasmide verwendet, welche für die HBV-Genotypen A, B, C, D und G kodieren. Von den so erhaltenen Fraktionen – nach Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation – wurden deren HBsAg- und HBV-DNA-Gehalt analysiert. Hierbei zeigten die Genotypen A–D vergleichbare Eigenschaften, jedoch mit unterschiedlichen Absolutwerten (siehe Abb. 34, Abb. 35, Abb. 36 und Abb. 37). HBV-GtA weist die geringsten Mengen an HBsAg auf, wohingegen die Genotypen B, C und D vergleichbare HBsAg-Mengen besitzen. Bezüglich der HBV-DNA kann das stärkste Signal in den Proben gemessen

werden, welche von mit HBV-GtD transfizierten Zellen stammen. Ein Sonderfall in diesen Untersuchungen stellte erneut der HBV-Genotyp G dar, welcher – wie zu erwarten – keine eindeutig positiven Signale im HBsAg-ELISA liefert, jedoch kann eine signifikante Menge an viraler DNA nachgewiesen werden, welche hinsichtlich der Fraktion mit den anderen Genotypen in Analogie steht (siehe Abb. 38). Insgesamt kann beobachtet werden, dass alle Genotypen vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf die HBsAg-ELISA- und qRT-PCR-Messungen liefern (mit Einschränkung für HBV-GtG, unter Berücksichtigung der Sekretionsinkompetenz von viralen Partikeln).

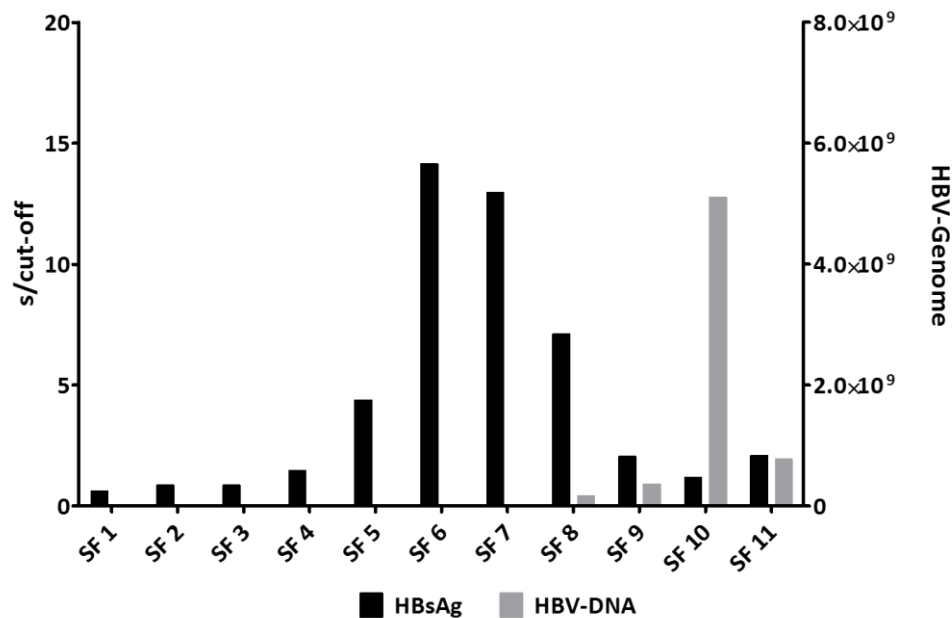


Abb. 34: Der Zellkultur-Überstand von – mit einem Expressionsplasmid kodierend für **HBV-GtA** – transfizierten Huh7.5-Zellen wurde nach PEG-Präzipitation mittels Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation in 11 Fraktionen unterteilt. Die einzelnen Fraktionen wurden hinsichtlich deren Dichte (Refraktometrie), des HBsAg-Gehalts (ELISA) und der Menge an viraler DNA (qRT-PCR) analysiert.

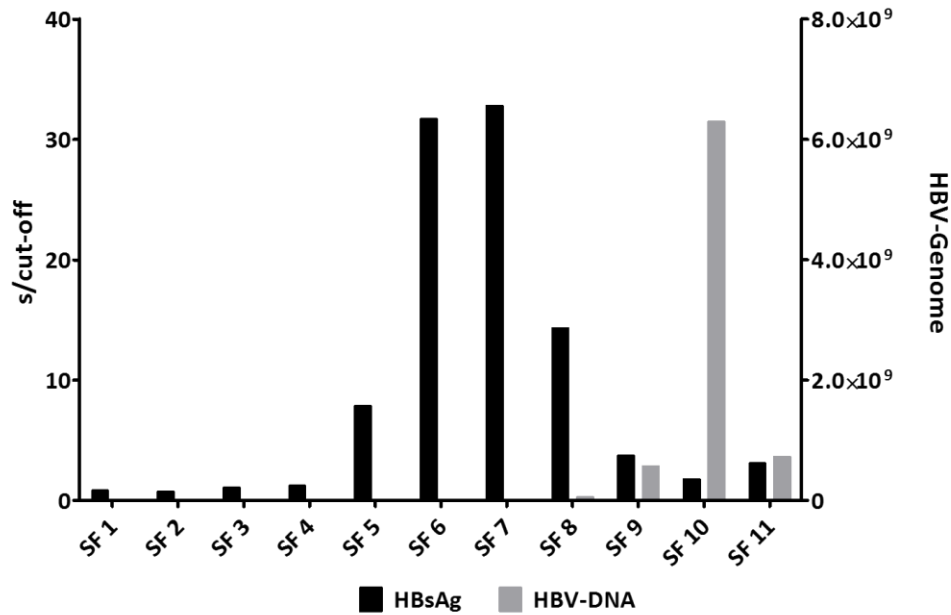


Abb. 35: Der Zellkultur-Überstand von – mit einem Expressionsplasmid kodierend für **HBV-GtB** – transfizierten Huh7.5-Zellen wurde nach PEG-Präzipitation mittels Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation in 11 Fraktionen unterteilt. Die einzelnen Fraktionen wurden hinsichtlich deren Dichte (Refraktometrie), des HBsAg-Gehalts (ELISA) und der Menge an viraler DNA (qRT-PCR) analysiert.

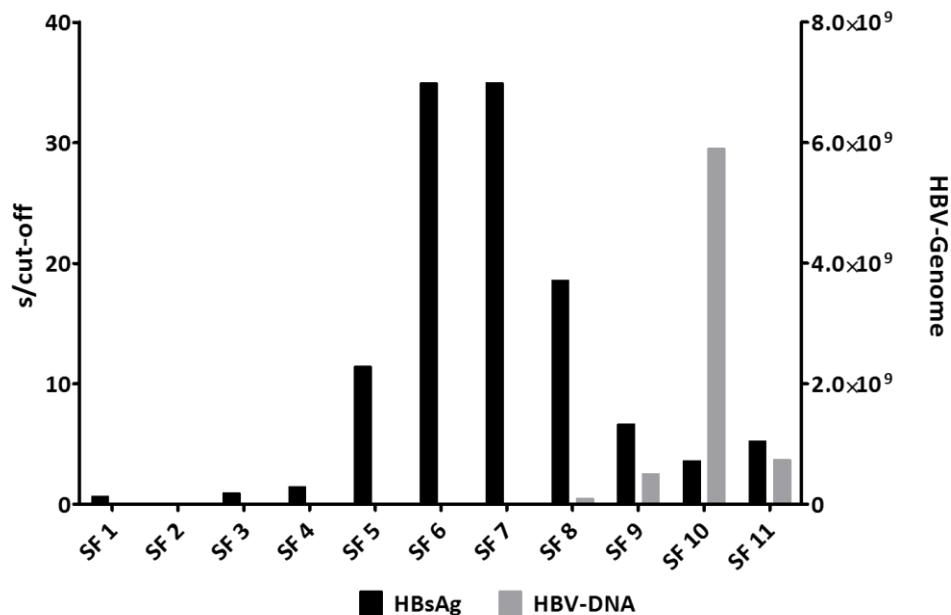


Abb. 36: Der Zellkultur-Überstand von – mit einem Expressionsplasmid kodierend für **HBV-GtC** – transfizierten Huh7.5-Zellen wurde nach PEG-Präzipitation mittels Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation in 11 Fraktionen unterteilt. Die einzelnen Fraktionen wurden hinsichtlich deren Dichte (Refraktometrie), des HBsAg-Gehalts (ELISA) und der Menge an viraler DNA (qRT-PCR) analysiert.

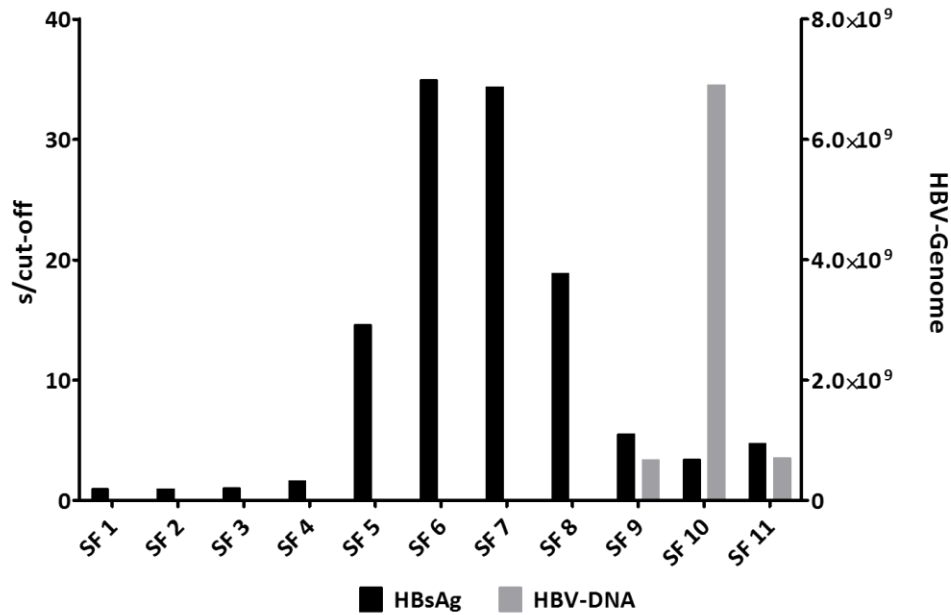


Abb. 37: Der Zellkultur-Überstand von – mit einem Expressionsplasmid kodierend für **HBV-GtD** – transfizierten Huh7.5-Zellen wurde nach PEG-Präzipitation mittels Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation in 11 Fraktionen unterteilt. Die einzelnen Fraktionen wurden hinsichtlich deren Dichte (Refraktometrie), des HBsAg-Gehalts (ELISA) und der Menge an viraler DNA (qRT-PCR) analysiert.

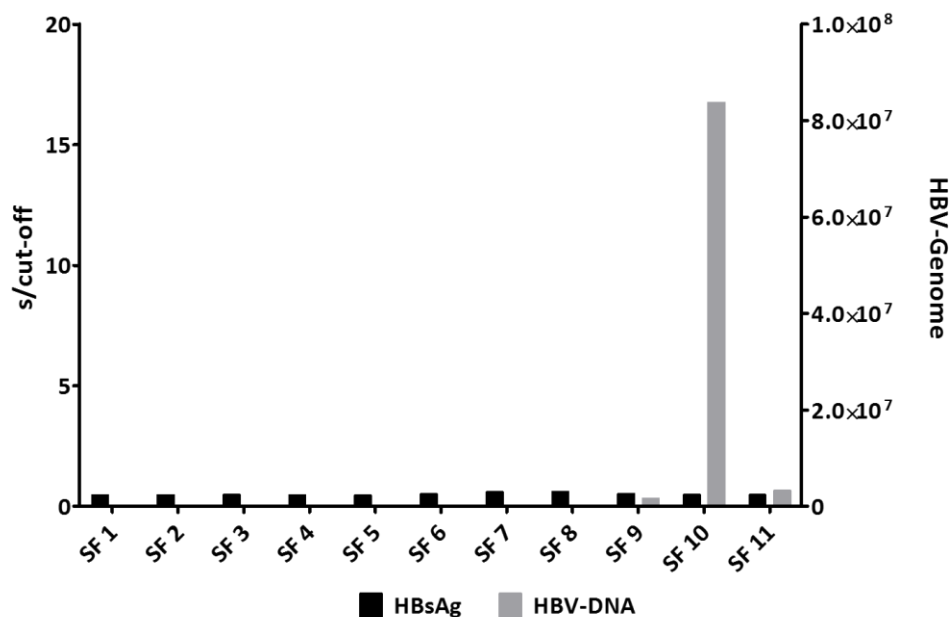


Abb. 38: Der Zellkultur-Überstand von – mit einem Expressionsplasmid kodierend für **HBV-GtG** – transfizierten Huh7.5-Zellen wurde nach PEG-Präzipitation mittels Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation in 11 Fraktionen unterteilt. Die einzelnen Fraktionen wurden hinsichtlich deren Dichte (Refraktometrie), des HBsAg-Gehalts (ELISA) und der Menge an viraler DNA (qRT-PCR) analysiert.

5.3.3 *Gereinigtes rekombinantes HBsAg eignet sich zur Testung und Kalibrierung von ELISA-Systemen*

Nach Reinigung von HBsAg der verschiedenen HBV-Genotypen (siehe Kap. 5.3.2) konnten die Fraktionen mit der jeweils höchsten HBsAg-Menge für detailliertere Messungen mit unterschiedlichen ELISA-Systemen weiterverwendet werden. Im Vorfeld erfolgte eine Bestimmung der absoluten HBsAg-Menge der verschiedenen Proben mit drei unabhängigen, quantitativen ELISA-Systemen. Dies geschah zusätzlich in Verbindung mit einer Normalisierung der gemessenen Signale mit Hilfe von Western Blot-Analysen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers HB01, welcher an ein in allen untersuchten Genotypen konserviertes sequentielles Epitop bindet und somit eine vergleichbare Reaktivität unabhängig vom entsprechenden HBV-Genotyp besitzen sollte. Somit kann davon ausgegangen werden, dass jeweils analoge Mengen an Protein eingesetzt wurden. Mit dem so charakterisierten Material konnten lineare Verdünnungsreihen hergestellt werden, welche Konzentrationen in einem Bereich von 0,0625 bis 1,00 IU/ml abdeckten. Diese Verdünnungsreihen wurden mit Hilfe der drei folgenden unabhängigen, kommerziell erhältlichen und quantitativen HBsAg-ELISA-Systemen vermessen: Roche Elecsys® HBsAg II quant, Abbott Architect® HBsAg quant, Fujirebio Lumipulse® G HBsAg-Quant. Als Kontrolle diente eine etablierte HBsAg-Standardreihe (Paul-Ehrlich-Institut HBsAg-Standard; Subtyp *ad*). Dieser Standard korreliert mit dem 2. Internationalen WHO-HBsAg-Standard (0,43 PEI-U \cong 1,00 IU) und wurde dementsprechend und in Analogie zu den vorbereiteten rekombinanten HBsAg-Verdünnungsreihen eingesetzt. Die zusammengefassten Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 39 dargestellt und zeigen für alle verwendeten HBV-Genotypen einen eindeutig linearen Verlauf, welcher mit dem verwendeten Standard-Material in Einklang stand. Zudem ist deutlich ersichtlich, dass jeweils gleiche Mengen an HBsAg quantifiziert werden und dies stabil insbesondere auch bei sehr kleinen detektierbaren Mengen.

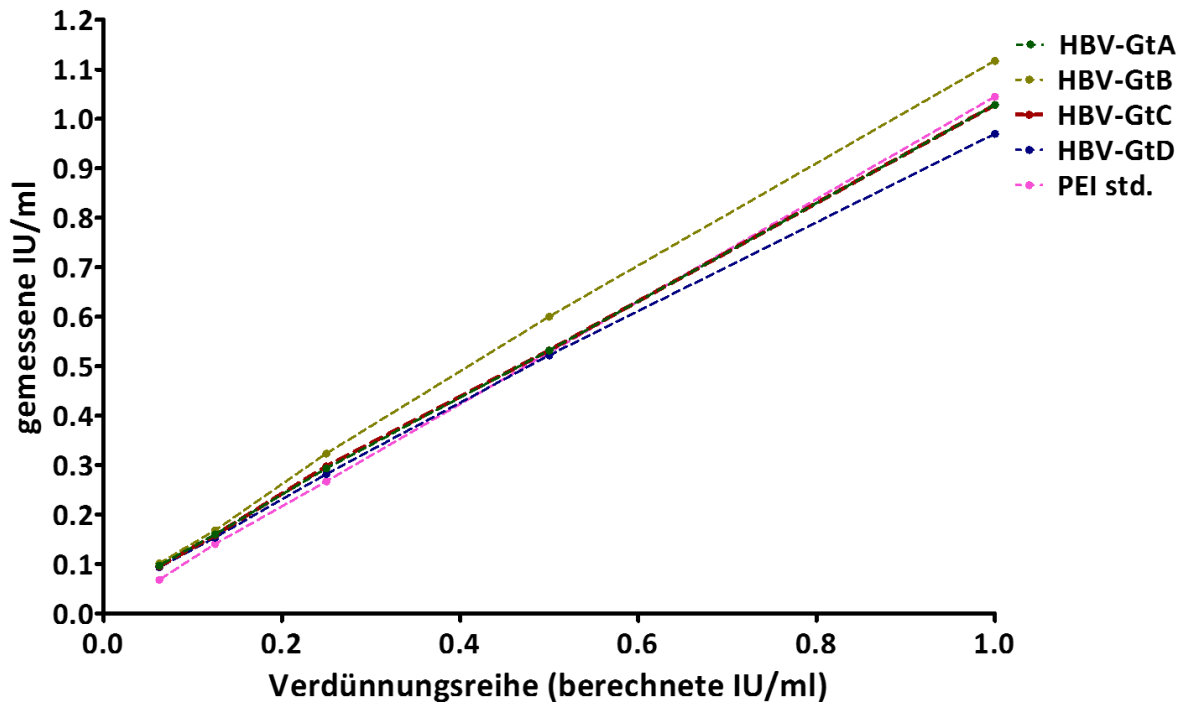


Abb. 39: HBsAg-ELISA-Messungen von aufgereinigtem HBsAg von HBV-GtA-/GtB-/GtC-/GtD-exprimierenden Huh7.5-Zellen. Analoge lineare Verdünnungsreihen, in Verbindung mit einem geeigneten Standard (PEI-Standard, Subtyp ad), wurden hergestellt mittels Messung der absoluten Ausgangskonzentration unter Berücksichtigung der spezifischen Reaktivität. Die Messung erfolgte mit Hilfe folgender ELISA-Systeme: Roche Elecsys® HBsAg II quant, Abbott Architect® HBsAg quant, Fujirebio Lumipulse® G HBsAg-Quant.

Aufgrund dieser Messungen konnte von einer Eignung des aufgereinigten rekombinanten HBsAg-Materials (rHBsAg) für die Testung und Eichung von HBsAg-ELISAs ausgegangen werden, weswegen mit Experimenten mit anderen ELISA-Systemen fortgefahren wurde.

5.3.4 Qualitative HBsAg-ELISAs weisen Genotypen-spezifische Detektionsunterschiede auf

Die im Vorfeld getesteten und kalibrierten Genotypen-spezifischen rHBsAg-Verdünnungsreihen wurden im Anschluss in verschiedenen qualitativen HBsAg-ELISA-Systemen getestet, um mögliche HBV-Genotypen-spezifische Detektionsunterschiede zu überprüfen. Hierbei wurden erneut die bereits beschriebenen Verdünnungsreihen (0,0625–1,00 IU) verwendet. Analysiert wurden folgende qualitativen ELISA-Systeme: GB HBsAg ELISA Kit (SURASE B-96), DPC IMMULITE® HBsAg, Siemens Enzygnost® HBsAg 6.0 (siehe Abb. 40).

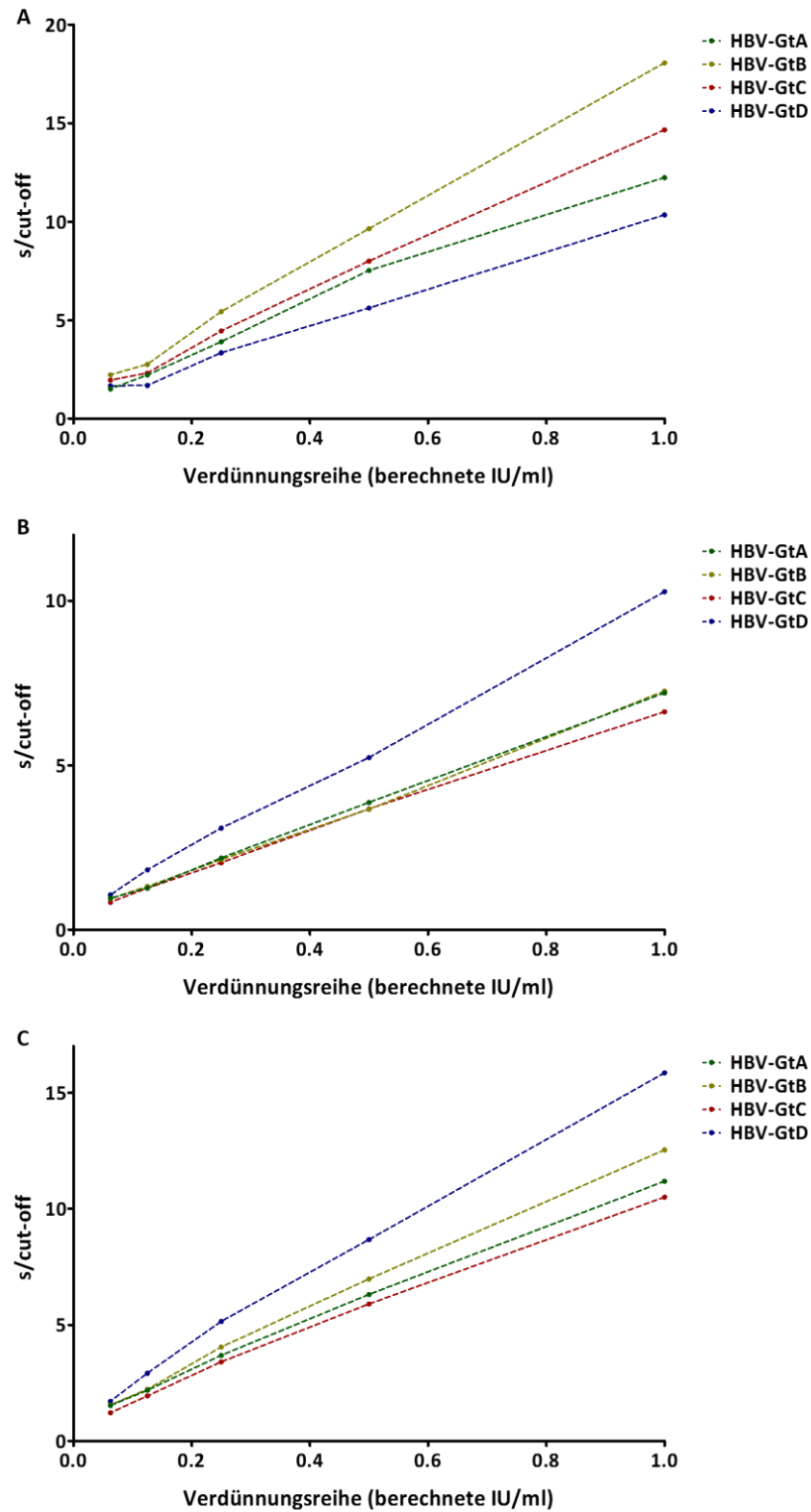


Abb. 40: HBsAg-ELISA Messungen von aufgereinigtem HBsAg von HBV-GtA-/GtB-/GtC-/GtD-exprimierenden Huh7.5-Zellen. Analoge lineare Verdünnungsreihen, in Verbindung mit einem geeigneten Standard (PEI-Standard, Subtyp ad), wurden hergestellt mittels Messung der absoluten Ausgangskonzentration unter Berücksichtigung der spezifischen Reaktivität. Die Messung erfolgte mit Hilfe folgender ELISA-Systeme: (A) GB HBsAg ELISA Kit (SURASE B-96), (B) DPC IMMULITE® HBsAg, (C) Siemens Enzygnost® HBsAg 6.0.

Die Messung mit der SURASE B-96 der Firma GB zeigte ein gestaffeltes Detektionsniveau für die verschiedenen getesteten Genotypen. Hierbei weist HBV-GtD die geringste Reaktivität auf, gefolgt von GtA und GtB. HBV-GtC wurde am besten von diesem Nachweissystem detektiert. Im Fall des IMMULITE Kits der Firma DPC zeigt GtB die geringste Reaktivität, gefolgt von GtA und GtC, welche vergleichbare Eigenschaften aufweisen. Jedoch werden diese drei Genotypen im Vergleich zu HBV-GtD deutlich schlechter erkannt. Ein ähnliches Bild zeigt sich für Enzygnost HBsAg 6.0 der Firma Siemens. Hier weisen die HBV-Genotypen A, B und C sehr ähnliche Reaktivitäten auf, können jedoch erneut im Vergleich zu GtD deutlich schlechter nachgewiesen werden.

Insgesamt muss jedoch angemerkt werden, dass alle getesteten qualitativen ELISA-Systeme lediglich eine Ja-/Nein-Einstufung ermöglichen sollen. Dies konnte für alle getesteten HBV-Genotypen zuverlässig nachgewiesen werden. Unterschiede in den speziellen Reaktivitäten müssen jedoch kritisch beobachtet werden.

Letzten Endes bietet die Kontrolle der kommerziell erhältlichen HBsAg-Nachweissysteme mit Hilfe von rekombinant hergestelltem HBsAg einen deutlichen Vorteil im Hinblick auf die Sicherheit der Testung. So können Abweichungen innerhalb eines Systems mit Genotypen-spezifischem Material zuverlässig und absolut reproduzierbarer nachgewiesen werden.

5.4 Einfluss von α -Taxilin auf die Freisetzung von HBV in nicht-humanen Zelllinien

5.4.1 *Expression von humanem α -Taxilin beeinflusst extrazelluläre HBsAg-Menge*

Der Einfluss von α -Taxilin auf die Sekretion von viralen Partikeln in HBV-positiven Zellen konnte kürzlich berichtet werden (Hoffmann et al. 2013). Bereits seit längerer Zeit werden auch nicht-humane Zellen für die Produktion von HBsAg verwendet, von welchen bekannt ist, dass eine Freisetzung von infektiösen viralen Partikeln nicht messbar ist. Daher sollte untersucht werden, ob dies durch Kotransfektion eines Expressionsplasmids, kodierend für humanes α -Taxilin, in bestimmter Ausprägung beeinflusst werden kann. Für diese Experimente wurden die nicht-humanen Zelllinien CHO (immortalisierte Zelllinie aus Ovarial-Zellen des chine-

sischen Hamsters) und COS-7 (Fibroblasten-ähnliche Zelllinie, von Nieren-Zellen der äthiopischen grünen Meerkatze) mit der humanen Hepatom-Zelllinie Huh7.5 verglichen. Diese wurden gewählt, da sie bereits im Kontext mit HBV verwendet wurden und wie oben erwähnt zur Produktion von HBsAg, bei verhinderter Ausschleusung viraler infektiöser Partikel, genutzt werden.

Hierbei wurden zuerst Überstände von entsprechend transfizierten Zellen mit einem HBsAg-ELISA – sowohl unverdünnt, als auch 1:10 verdünnt aufgrund zu starker Signale – vermessen (siehe Abb. 41). Sowohl in CHO als auch in COS-7 können nach Transfektion mit einem für HBV-kodierenden Expressionsplasmid (HBV-GtA) signifikante Mengen an HBsAg nachgewiesen werden, wobei CHO-Zellen deutlich höhere Mengen sekretieren. Für Huh7.5-Zellen ist bereits bekannt, dass eine Überexpression von α -Taxilin zu einer Reduktion der HBsAg-Sekretion führt (Hoffmann et al. 2013). Dies kann in den nicht-humanen Zelllinien CHO und COS-7 durch Kotransfektionsexperimente ebenfalls beobachtet werden. So sind die HBsAg-spezifischen Signale in Zellkultur-Überständen von Zellen, welche sowohl HBV als auch humanes α -Taxilin exprimieren, signifikant verringert.

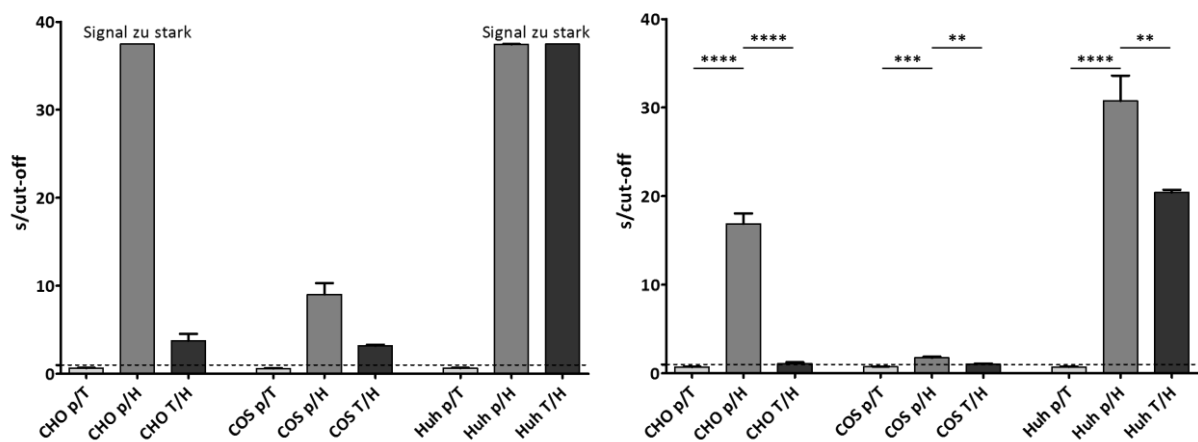


Abb. 41: HBsAg-ELISA von Zellkultur-Überständen verschiedener analog transfizierter Zelllinien (nicht-human: CHO, COS-7; human: Huh7.5). Verwendet wurden Plasmide, welche für α -Taxilin und HBV-GtA kodieren. Zudem wurde der Leervektor pUC18 verwendet. Folgende Kotransfektionen wurden durchgeführt: pUC18/ α -Taxilin (p/T); pUC18/HBV (p/H); α -Taxilin/HBV (T/H). Transfiziert wurden jeweils 0,75 μ g des entsprechenden Plasmids. Die Messung erfolgte (A) mit unverdünnten Zellkultur-Überständen und (B) mit Überständen, welche 1:10 mit PBS verdünnt wurden. Analysiert wurden 5 unabhängige Experimente (n=5).

5.4.2 Expression von humanem α -Taxilin beeinflusst die Menge an freigesetzter viraler DNA

Analog zu den Ergebnissen aus Kap. 5.4.1 sollte weiterhin überprüft werden, ob sich die Mengen an ausgeschleustem Virus durch Kotransfektion von humanem α -Taxilin in HBV-positiven Zellen verändern. Hierbei wurden die gesammelten Zellkultur-Überstände in einem maschinell gestützten Verfahren vorbehandelt und im Anschluss unter Zuhilfenahme geeigneter Primer mittels qRT-PCR vermessen. Die Verwendung entsprechender Standards erlaubte im Anschluss eine eindeutige Quantifizierung der gemessenen Signale und somit eine Bestimmung der Kopien der HBV-DNA. Dies gibt Rückschluss auf die Anzahl der freigesetzten Viren, da nur diese virale DNA beinhalten. In Abb. 42 ist ersichtlich, dass HBV-positive Zellen, welche zudem humanes α -Taxilin exprimierten, stark gesteigerte Mengen an viraler DNA im Zellkultur-Überstand aufweisen. In COS-7-Zellen konnten keine vergleichbaren Ergebnisse beobachtet werden, jedoch war deren Zellviabilität in diesem Versuch stark beeinflusst, was bei den erhaltenen Ergebnissen berücksichtigt werden muss. Darüber hinaus muss die Tatsache, dass nur ein solcher Versuch durchgeführt werden konnte, stets bei der Auswertung beachtet werden.

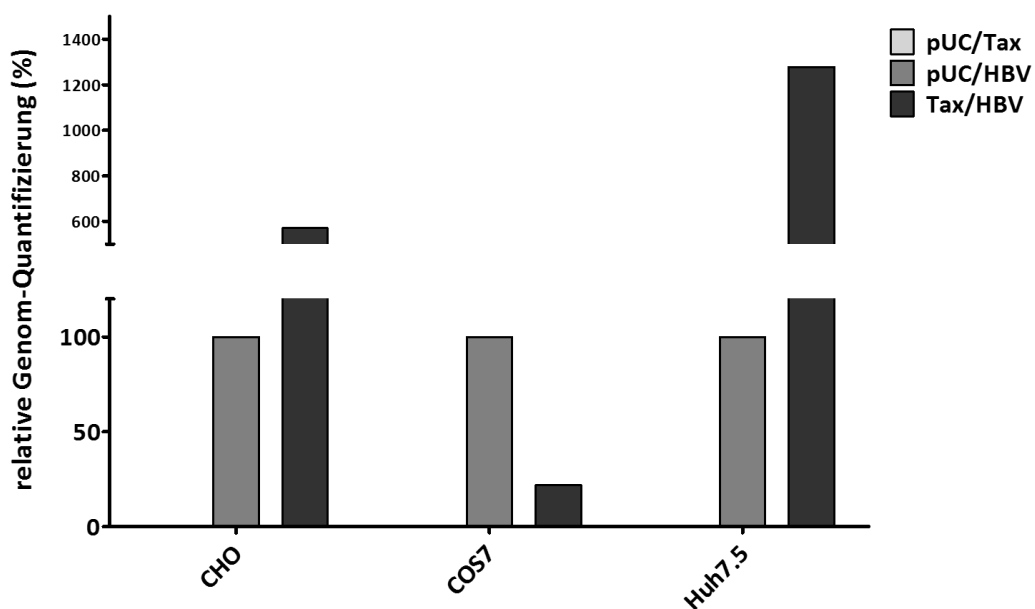


Abb. 42: CHO-, COS-7-, bzw. Huh7.5-Zellen wurden mit jeweils zwei Expressionsplasmiden kotransfiziert. Diese kodieren für: 1. pUC18 und humanes α -Taxilin; 2. oUC18 und HBV-GtA; 3. humanes α -Taxilin und HBV-GtA. Der auf diese Weise geerntete Zellkultur-Überstand wurde mit Hilfe der maschinell durchgeführten qRT-PCR (RealTime HBV, Abbott, Wiesbaden) analysiert, um so die Anzahl der DNA-Kopien zu bestimmen. Die Werte für (2.) pUC/HBV-transfizierte Zellen wurde hierbei als 100 % gewertet. Lediglich ein entsprechender Versuch konnte ausgewertet werden (n=1).

5.4.3 *Humanes α -Taxilin kolokalisiert mit HBV-Oberflächenproteinen in nicht-humanen Zelllinien*

Aufgrund der Ergebnisse der HBsAg-ELISA-Messungen wurden im Anschluss Untersuchungen hinsichtlich der intrazellulären Lokalisation von HBV-Oberflächenproteinen durchgeführt. Hierbei wurde der monoklonale Antikörper Ma18/7 verwendet, welcher die Detektion von LHBs ermöglicht, welches hauptsächlich in der Hülle von viralen Partikeln und Filamenten aufzufinden ist. Durch Kotransfektion von Rab7-YFP (MVB/prälysosomaler Marker) können zudem Kompartimente visualisiert werden, welche bei der Sekretion von viralen und filamentösen subviralen Partikeln eine nachgewiesene Rolle spielen (Jiang et al. 2015). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Abb. 43 (CHO-Zellen), Abb. 44 (COS-7-Zellen) und Abb. 45 (Huh7.5-Zellen) dargestellt.

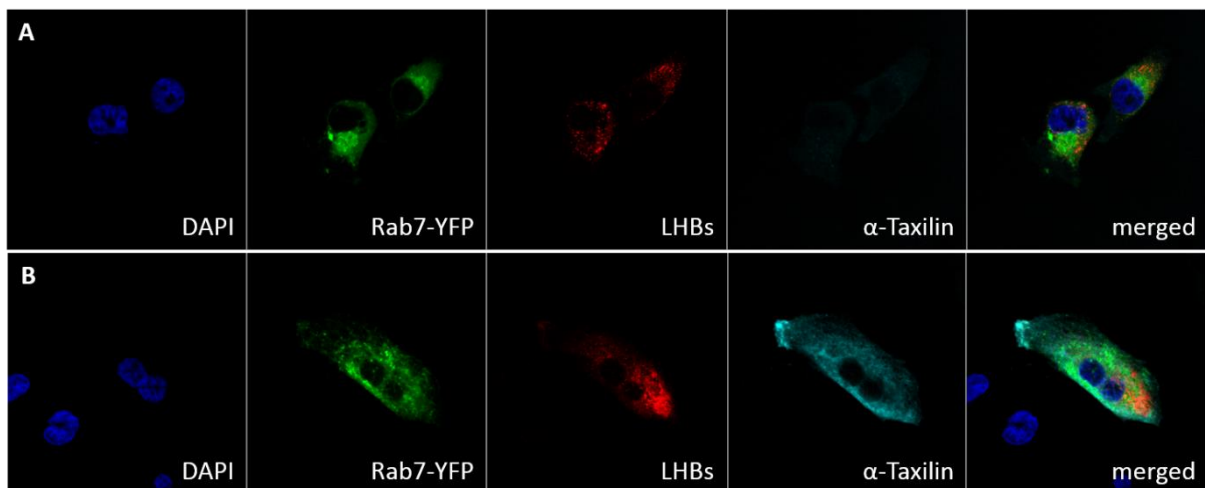


Abb. 43: Konfokale mikroskopische Untersuchung der intrazellulären LHBs-Verteilung von **CHO**-Zellen, welche mit einem HBV-GtA-Expressionsplasmid transfiziert wurden. LHBs wurde mit Hilfe des LHBs-spezifischen Antikörpers Ma18/7 in Verbindung mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert (rot). Die Zellen wurden kotransfiziert mit einem Vektor, welcher für das fluoreszenzmarkierte (grün) Markerprotein Rab7-YFP (MVB/prälysosomaler Marker) kodiert. (**A**) Zeigt Zellen, welche zudem mit dem Leervektor pUC18 kotransfiziert wurden, (**B**) Zellen nach Kotransfektion mit einem für α -Taxilin kodierenden Vektor. α -Taxilin wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers H-66 in Verbindung mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert (türkis). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

Hierbei ist sowohl in COS-7-Zellen als auch in Huh7.5-Zellen eine eindeutige Kolokalisation von α -Taxilin und LHBs in HBV-positiven Zellen zu detektieren, welche ebenfalls humanes α -Taxilin überexprimieren. Zudem scheint das LHBs-spezifische Signal in Zellen, welche α -Taxilin über-

exprimieren, stärker nachweisbar in Verbindung mit einer Veränderung der subzellulären Verteilung, im Vergleich zu den pUC18-transfizierten Kontroll-Zellen. Darüber hinaus kann eine verstärkte partielle Kolo-kalisation von LHBs, α -Taxilin und dem Markerprotein Rab7 (MVB/prälysosomaler Marker) nachgewiesen werden in Zellen, welche neben HBV und Rab7 auch humanes α -Taxilin exprimieren. Hierbei ist vor allem die Überlagerung von LHBs und α -Taxilin mit eindeutiger Signifikanz erkennbar. Somit ist eine räumliche Nähe dieser drei Proteine in den untersuchten Zellen nachweisbar, speziell unter Berücksichtigung der Nutzung eines konfokalen Mikroskops. Diese Effekte können ebenfalls in CHO-Zellen, jedoch in geringerer Ausprägung beobachtet werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen auf einen Einfluss von humanem α -Taxilin auf die subzelluläre Lokalisation von LHBs in den verschiedenen untersuchten Zellen schließen.

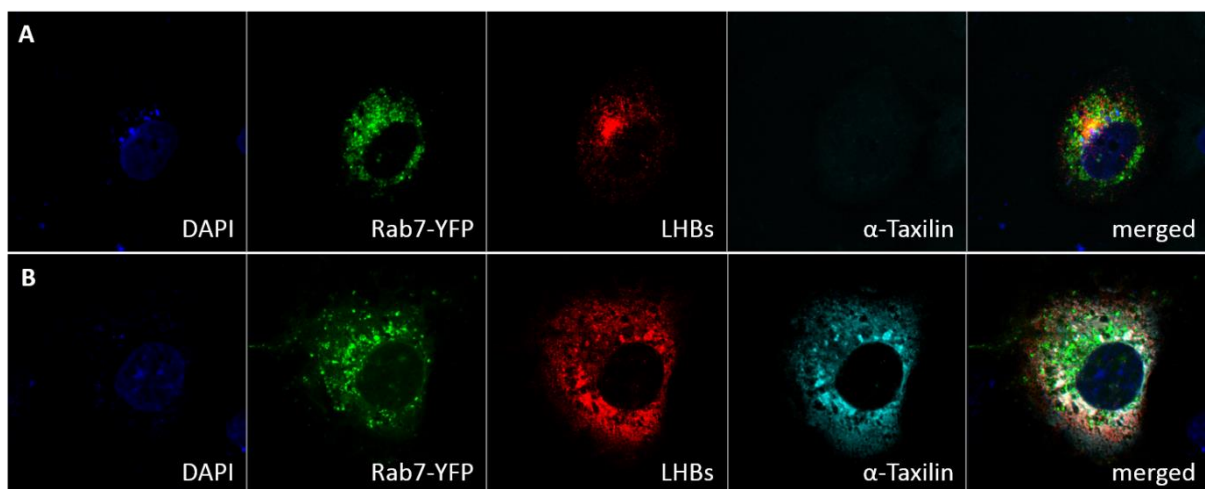


Abb. 44: Konfokale mikroskopische Untersuchung der intrazellulären LHBs-Verteilung von **COS-7**-Zellen, welche mit einem HBV-GtA-Expressionsplasmid transfiziert wurden. LHBs wurde mit Hilfe des LHBs-spezifischen Antikörpers Ma18/7 in Verbindung mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert (rot). Die Zellen wurden kotransfiziert mit einem Vektor, welcher für das fluoreszenzmarkierte (grün) Markerprotein Rab7-YFP (MVB/prälysosomaler Marker) kodiert. (A) Zeigt Zellen, welche zudem mit dem Leervektor pUC18 kotransfiziert wurden, (B) Zellen nach Kotransfektion mit einem für α -Taxilin kodierenden Vektor. α -Taxilin wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers H-66 in Verbindung mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert (türkis). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

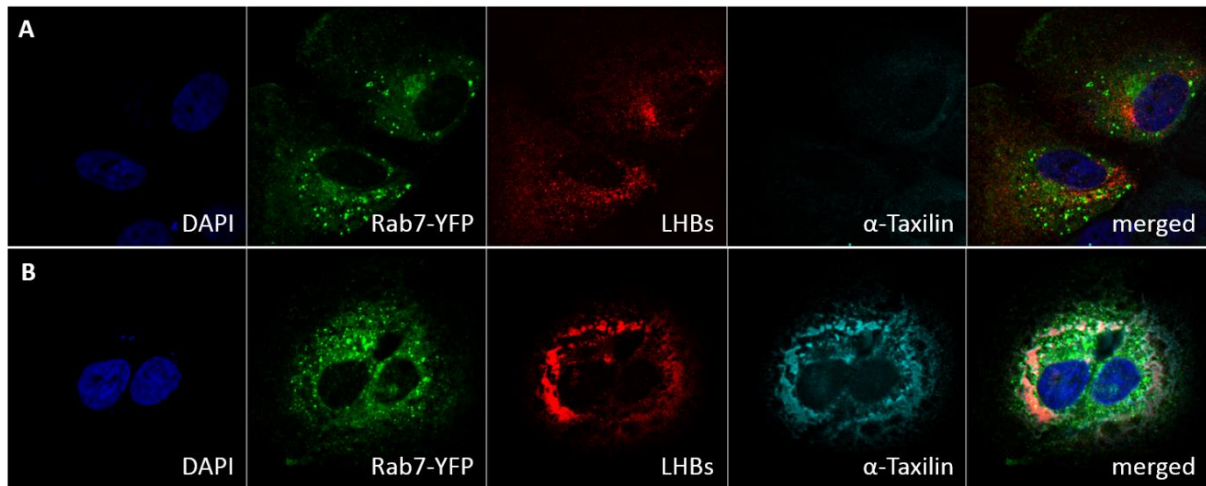


Abb. 45: Konfokale mikroskopische Untersuchung der intrazellulären LHBs-Verteilung von **Huh7.5**-Zellen, welche mit einem HBV-GtA-Expressionsplasmid transfiziert wurden. LHBs wurden mit Hilfe des LHBs-spezifischen Antikörpers Ma18/7 in Verbindung mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert (rot). Die Zellen wurden kotransfiziert mit einem Vektor, welcher für das fluoreszenzmarkierte (grün) Markerprotein Rab7-YFP (MVB/prälysosomaler Marker) kodiert. (A) Zeigt Zellen, welche zudem mit dem Leervektor pUC18 kotransfiziert wurden, (B) Zellen nach Kotransfektion mit einem für α -Taxilin kodierenden Vektor. α -Taxilin wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers H-66 in Verbindung mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert (türkis). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

6 DISKUSSION

Obwohl ein wirksamer Impfstoff seit dem Jahr 1982 verfügbar ist, konnte die von dem Hepatitis-B-Virus ausgehende Gefahr bislang nicht ausreichend eingedämmt werden. Durch HBV verursachte Krankheiten finden sich an neunter Stelle auf der weltweiten Liste der häufigsten Todesursachen und führen bei etwa 600.000–800.000 Patienten pro Jahr letztlich zum Tod, was HBV zur fünftgefährlichsten Infektionskrankheit macht (Szmaragd und Balloux 2007). Aufgrund des großen Reservoirs chronisch infizierter Personen und des ungleichen Zugangs zu Impfstoffen ist die Eradizierung des Virus stark erschwert (Pourkarim und van Ranst 2011). Dies spiegelt sich auch in den regional sehr unterschiedlichen Prävalenzen chronischer HBV-Infektionen wieder. Mit Rücksicht auf die globale Verbreitung des Virus, verbunden mit den dominanten Transmissionswegen, der unterschiedlichen Schwere der individuellen Krankheitsverläufe und dem Auftreten der verschiedenen HBV-Genotypen sind weitere tiefergehende Forschungen und damit verbundene Impfaufklärung regional wie global von entscheidender Notwendigkeit. Da aufgrund klinischer Untersuchungen die Symptomatik einer HBV-Infektion nicht eindeutig von anderen viralen Infektionen unterschieden werden kann, ist eine laborgestützte Diagnose von essentieller Bedeutung. Mit Hilfe einer Vielzahl von auf Blutuntersuchungen basierenden Testsystemen ist es möglich, eine Erkrankung mit HBV zu detektieren und darüber hinaus zwischen akuter und chronischer Infektion zu unterscheiden. Der Hauptfokus dieser Untersuchung liegt auf der Detektion des HBsAg; hierzu empfiehlt die WHO eine HBsAg-spezifische Testung aller Blutspenden, um die Blutsicherheit und die Verhinderung von vermeidbaren Transmissionen zu gewährleisten (WHO 2015). Auf diese Weise stellt die Detektion von HBsAg den wichtigsten klinischen Marker dar, wenn Aussagen bezüglich des Risikos einer chronischen Lebererkrankung bzw. eines HCCs gemacht werden sollen. Im März 2015 verfasste die WHO ein Empfehlungsschreiben, in dem speziell darauf hingewiesen wurde, dass einfache, nicht-invasive diagnostische Verfahren verstärkt genutzt werden sollten, um den Status der Leberschädigung und eine optimierte Behandlung zu bestimmen (WHO 2015). Die Überprüfung dieser Testsysteme hinsichtlich deren Verlässlichkeit und der Nachweis der spezifischen Detektionsgrenzen sind von absolut entscheidender Notwendigkeit und sollte mit Hilfe von optimal geeignetem Referenzmaterial in standardisierten Verfahren regel-

mäßig überprüft werden. Die Untersuchungen dieser Arbeit sollen den Status Quo der angeführten Punkte optimieren und dabei helfen, die vom Hepatitis-B-Virus ausgehende Gefahr zu mindern.

6.1 Vergleichende Analysen der molekularen Virologie verschiedener HBV-Genotypen

In der wissenschaftlichen Literatur gibt es eine Vielzahl an vergleichenden Studien mit besonderem Augenmerk auf die speziellen Eigenschaften der unterschiedlichen HBV-Genotypen. Diese Studien beziehen sich jedoch in aller Regel auf Datenmaterial, welches durch Untersuchungen mit und an HBV-positiven Patienten gesammelt wurde. Hierbei ist zu beachten, dass mehrere Faktoren einer zuverlässigen Vergleichbarkeit bezüglich der untersuchten HBV-Genotypen entgegenstehen. Zum einen muss bei der Untersuchung *in vivo* beachtet werden, dass es durch komplexe Interaktionen im Hinblick auf die individuelle Immunantwort und weiterer viraler Faktoren zu kleineren bis sehr großen Unterschieden von Patient zu Patient kommen kann. Des Weiteren sind solche Studien in aller Regel regional angesiedelt, was zusätzlich durch kulturelle und populationsbedingte Unterschiede eine verlässliche Vergleichbarkeit erschwert. Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz, basierend auf der Transfektion von humanen Hepatoblastom-Zelllinien unter standardisierten Bedingungen, ermöglicht so eine verlässliche Vergleichbarkeit der verschiedenen untersuchten HBV-Genotypen. Dies beinhaltet, beginnend mit der Expression der viralen Genome und in Folge dessen der Genotypen-spezifischen Eigenschaften in Bezug auf die gebildeten viralen Proteine, deren intrazelluläre Kompartimentierung und die damit verbundene Freisetzung von Virionen und subviralen Partikeln. Die Analysen können durch diesen Ansatz ohne Berücksichtigung spezieller wirtsspezifischer Faktoren wie auch unter Vernachlässigung der Einflüsse der individuellen Immunantwort stattfinden, welche die unterschiedlichen Abläufe des viralen Lebenszyklus beeinflussen könnten. Damit gehen jedoch auch einige Einschränkungen einher, sodass nur ein begrenzter Einblick in die viral bedingten zellulären Abläufe gewonnen werden kann. Dennoch wird so eine zuverlässige Vergleichbarkeit und somit eine exakte Detektion der HBV-Genotypen-spezifischen Unterschiede in deren variierendem genomischem Ausgangsmaterial ermöglicht. Dies ermöglicht tiefe Einblicke in die molekulare Virologie der verschiedenen Genotypen. In letzter Konsequenz bietet die Herstellung stabil-transfizierter HBV-positiver Zelllinien hierbei die optimale

Ausgangslage. Speziell unter Verwendung der Zinkfingernuklease-gesteuerten Integration der HBV-DNA in eine spezifische Region innerhalb des Wirtsgenoms wird so die beste Vergleichbarkeit der nachfolgenden Analysen ermöglicht. Die in dieser Arbeit hergestellten stabilen Zelllinien konnten nicht zweifelsfrei charakterisiert werden, weswegen vorläufig auf den transienten Ansatz zurückgegriffen wurde. Hier konnte ebenfalls mittels standardisierter Durchführungsprotokolle eine gute Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen HBV-Genotypen ermöglicht werden.

Die Untersuchung der intrazellulär gebildeten und in Folge dessen sekretierten Mengen an HBsAg zeigte gleich zu Beginn, dass eindeutige Unterschiede zwischen den verschiedenen analysierten Genotypen detektiert werden können. Wie bereits durch Arbeiten in diesem Labor nachgewiesen werden konnte, setzen HBV-GtG-exprimierende Zellen keine subviralen Partikel frei (bzw. nur kleinste Mengen, was jedoch auch auf abgestorbene Zellen zurückzuführen sein kann) (Peiffer et al. 2015). Dies beruht nicht auf einer Störung der intrazellulären Bildung von HBsAg bzw. der Ausbildung von Sphären und Filamenten, wie in Abb. 11 (bzw. Abb. 12) ersichtlich ist. So konnten intrazellulär eindeutige Mengen an HBsAg nachgewiesen werden, jedoch zeigten die entsprechenden Zellkultur-Überstände transfizierter Zellen keine Signale oberhalb der Nachweisgrenzen des verwendeten Tests, was die Arbeiten von Peiffer et al. bestätigt. Mit Hinblick auf die freigesetzten HBsAg-Mengen von Zellen, welche die HBV-Genotypen A, B, C und D exprimierten, konnte beobachtet werden, dass HBV-GtC-positive Zellen in signifikanter Art und Weise die größten Mengen an HBsAg – und folglich an subviralen Partikeln – ausschleusten. Dabei bleibt die intrazelluläre Menge dieser viralen Proteine im Vergleich zu den anderen Genotypen annähernd gleich, was die Analyse von Zelllysaten solcher transfizierter Zellen beweisen konnte (siehe Abb. 11). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Sekretion von HBsAg nicht nur lediglich von der spezifischen intrazellulären Proteinmenge abhängig ist, sondern dass weitere Faktoren bei der Ausschleusung von subviralen Partikeln eine Rolle spielen müssen.

Eine genauere Analyse der intrazellulären HBsAg-spezifischen mRNA-Mengen ergab zudem, dass bei den verschiedenen untersuchten Genotypen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der verschiedenen Transkripte beobachtet werden können (siehe Abb. 32). So sind die abweichenden Proteinmengen, welche intra- bzw. extrazellulär nachgewiesen wurden, mit aller Wahrscheinlichkeit nicht auf eine unterschiedlich starke Transkription zurückzuführen. Ob eine veränderte Translationsrate und andere weitere Faktoren die nachgewiesenen

Abweichungen bezüglich der produzierten und letztlich sekretierten HBsAg-Mengen bedingten, muss weiter beforscht werden. Dies könnte z. B. durch *in silico*-Untersuchungen unter Betrachtung der unterschiedlichen Translationseffizienzen erreicht werden. Des Weiteren konnten die Unterschiede der intrazellulär nachgewiesenen Mengen nicht auf eine veränderte subzelluläre Verteilung der HBsAg zurückgeführt werden. Dies konnte durch Immunfluoreszenz-Analysen in Verbindung mit verschiedenen Zellkompartiment-Markern und unter Nutzung HBsAg- bzw. LHB-spezifischer Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abb. 22 – Abb. 30). Lediglich in HBV-GtG-exprimierenden Zellen konnte die gestörte Freisetzung von subviralen Partikeln auf eine eindeutige und auffällige Veränderung der subzellulären Verteilung der entsprechenden Proteine im Vergleich zu den anderen untersuchten Genotypen zurückgeführt werden (siehe Abb. 24 und Abb. 25). So wurde hier eine eindeutig perinukleäre Akkumulation beobachtet, welche darauf schließen lässt, dass HBsAg dieses Genotyps hinsichtlich der weiteren Prozessierung des konstitutiven Sekretionswegs in kernnahen Kompartimenten zurückgehalten wird. Dies ist aller Wahrscheinlichkeit auf eine gesteigerte Oligomerisierungsrate der PreS-Domäne zurückzuführen, welche als Fehlfaltung erkannt wird (Peiffer et al. 2015) und somit zur intrazellulären Retention führt (Hurtley und Helenius 1989), da nur korrekt gefaltete Proteine von der Zelle freigesetzt werden (Araki und Nagata 2011). Da zudem unterschiedlichen Studien nachgewiesen haben, dass spezifische Mutationen (H51P und I84T; Stuyver et al. 2000; Kim et al. 2013) in der PreS1-Domäne bei HBV-GtA zu einer Störung in der HBsAg-Sekretion führen und diese Aminosäuren ebenfalls bei HBV-GtG gefunden werden können, wurde eine mutierte HBV-GtG-Variante kloniert (mutGtG). Bei Immunfluoreszenz-Analysen konnte bei entsprechend transfizierten Zellen eine eindeutige Veränderung der subzellulären Verteilung der HBV-Oberflächenproteinen beobachtet werden (siehe Abb. 31), welche mit Aufnahmen von HBV-GtA-exprimierenden Zellen in starker Übereinstimmung stehen. Zellen, welche die mutierte Variante des Genotyps G exprimierten, produzierten zudem signifikante Mengen an HBsAg, was in entsprechenden Zellkultur-Überständen Zellen nachgewiesen werden konnte. Somit sind die Abweichungen des Genotyps G im Hinblick auf die gestörte Sekretion von HBsAg wohl größtenteils auf die Mutation dieser beiden Aminosäuren zurückzuführen (Peiffer et al. 2015).

Mit Hilfe von Western Blot-Analysen konnte zudem nachgewiesen werden, dass zwischen den verschiedenen untersuchten HBV-Genotypen eindeutige Unterschiede bezüglich der Zusam-

mensetzung der gebildeten HBsAg herrschen (siehe Abb. 12 – Abb. 17). Aufgrund der Tatsache, dass bei verstärkter LHBs-Produktion in Verbindung mit vergleichsweise niedrigen Mengen an M-/SHBs eine verminderte HBsAg-Sekretion zu erwarten ist (Bruss und Vieluf 1995; Bruss et al. 1996), könnte dies für HBV-GtA die niedrigeren Sekretionsmengen im Vergleich zu HBV-GtB und -GtC erklären. Da auch bei HBV-GtD gesteigerte Mengen an LHBs nachgewiesen werden konnten (jedoch wegen fehlender Nachweismöglichkeit kein Vergleich mit den entsprechenden Mengen an M-/SHBs möglich war), lässt das intrazelluläre Vorkommen von erhöhten Mengen an LHBs die geminderte Sekretion von HBsAg auf Grundlage der erwähnten Publikationen erklären. Ob die unterschiedlichen Glykosylierungsmuster der verschiedenen untersuchten Genotypen einen zusätzlichen Einfluss auf die Sekretion von HBsAg haben könnten, sollte deswegen in weiteren Experimenten analysiert werden. Diese Untersuchungen zeigten jedoch nur marginale Unterschiede zwischen den verschiedenen HBV-Genotypen. Lediglich das Verhältnis von glykosyliertem zu nicht-glykosyliertem LHBs ist bei HBV-GtB extrazellulär nicht so deutlich wie bei den anderen untersuchten Genotypen. Dies lässt jedoch keine Aussage zu den unterschiedlichen Sekretionsmengen zu. Dennoch konnte bei allen drei verschiedenen Oberflächenproteinen nachgewiesen werden, dass die Glykosylierungsstelle Asn146 nur teilweise genutzt wird (Gerlich et al. 1992; Lu et al. 1995). Zusätzlich dazu erfolgt eine weitere N-Glykosylierung im Falle des MHBs an Asn4 der Pres2-Domäne. Diese wird in allen untersuchten HBV-Genotypen zu 100 % genutzt, da keine nicht-glykosylierten Proteine in den verschiedenen Western Blot-Analysen – Deglykosylierungs-Experimente ausgenommen (siehe Abb. 18) – nachweisbar waren. Dies steht ebenfalls im Einklang mit der aktuellen Literatur, da die N-terminale PreS2-Domäne des MHBs kotranslational in das ER-Lumen transloziert und dort am Asn4 glykosyliert wird (Bruss und Ganem, D. 1991). Die bislang postulierten O-Glykosylierungen erfolgen jedoch scheinbar sehr kurz vor der Sekretion der verschiedenen Proteine am Golgi-Apparat (Schmitt et al. 2004; Schmitt et al. 1999), da diese nicht mit Hilfe von Deglykosylierungsexperimenten unter Verwendung von Zelllysaten nachgewiesen werden konnten. Der Vergleich von den Zelllysaten und den entsprechenden Zellkultur-Überständen jedoch konnte eindeutige Größenunterschiede zwischen den verschiedenen detektierten Proteinbanden nachweisen (siehe Abb. 19). Dies deutet darauf hin, dass es bei den untersuchten Genotypen in vergleichbaren Verhältnissen zu einer O-Glykosylierung der entsprechenden Aminosäuren kommt. Dennoch konnte mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese nachgewiesen werden, dass sowohl glykosyliertes als auch nicht-glykosyliertes LHBs

aller untersuchten HBV-Genotypen zusätzlich modifiziert vorliegen (siehe Abb. 21). Diese Modifikationen könnten durch verschiedene bereits beschriebene Ereignisse erklärt werden, wie z. B. N-terminale Acetylierung (Glebe et al. 2005), N-terminale Myristoylierung (Persing et al. 1987) oder auch unterschiedliche Phosphorylierung (Hildt et al. 2002). Da die einzelnen „Protein-Spots“ zu saurem pH verschoben waren, sind unterschiedliche Phosphorylierungsmuster die wahrscheinlichste Erklärung dieser detektierten Proteinmodifikationen. Bezüglich der PreS1-/PreS2-Domäne konnte bislang eine duale Membran-Topologie beschrieben werden, wobei jeweils ein Teil in das Lumen des ERs ragt, wohingegen der jeweils andere Teil eine zytoplasmatische Lokalisation aufweist (Lambert et al. 2007; Ostapchuk et al. 1994; Bruss 2007; Prange und Streeck 1995). Es ist bekannt, dass die PreS2-Domäne PKC-abhängig phosphoryliert werden kann (Hildt et al. 2002) und dass die zytoplasmatisch orientierte PreS2-Domäne eine transkriptionelle Aktivator-Funktion besitzt. Unter Berücksichtigung dieser Umstände kann spekuliert werden, ob die möglichen Modifikationen innerhalb des Phosphorylierungsmusters zu Unterschieden bei der transkriptionellen Aktivator-Funktion des PreS2 und somit des LHBs führt (Hildt et al. 1996).

6.2 Gereinigtes rekombinantes HBsAg als Referenzmaterial für die Testung von HBsAg-gestützten Diagnose-Verfahren

HBsAg ist einer der ersten serologischen Marker im Verlauf einer Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus. Seit dem ersten Nachweis vor mehr als 40 Jahren entwickelte sich die maschinelle Detektion von HBsAg zu einem verlässlichen Eckpunkt der Diagnose von HBV-Infektionen und darüber hinaus zu einem Stützpfiler in der weiteren Behandlung solcher Infektionen (Janssen et al. 1994; Chan et al. 2011; Martinot-Peignoux et al. 2014). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Menge an HBsAg im Serum HBV-positiver Patienten mit der Menge an cccDNA in infizierten Leberzellen und der Menge an HBV-DNA in entsprechenden Blutproben korreliert (Wursthorn et al. 2006; Chan et al. 2007; Jaroszewicz et al. 2010; Nguyen et al. 2010). Aufgrund dieser Umstände ist es von entscheidender Notwendigkeit, kommerziell erhältliche HBsAg-Nachweissysteme verlässlich hinsichtlich deren Sensitivität – auch unter Berücksichtigung der verschiedenen HBV-Genotypen und Subgenotypen – zu prüfen. Um die unterschiedlichen Systeme zu analysieren, wurde durch das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) – als Kollaborations-

partner der WHO – im Jahr 2013 das erste internationale HBV-Genotypen-spezifische Referenz-System für HBsAg-ELISAs erstellt (Chudy et al. 2013). Die auf aus Patienten-Seren isoliertem HBsAg basierenden Messungen lassen Aussagen zur gemessenen HBsAg-Menge jedoch nur in willkürlichen Einheiten (sog. IUs; *international units*) zu. Bereits mit diesen Standards konnten signifikante Unterschiede in den verschiedenen kommerziell erhältlichen Test-Systemen von Mitarbeitern des PEI nachgewiesen werden (Chudy et al. 2013; Scheiblaue et al. 2006; Scheiblaue et al. 2010). Darüber hinaus sind bereits einige Mutationen in der immunologisch wichtigen a-Determinante bekannt, welche zu falsch-negativen Ergebnissen in solchen Testungen führen können (Gerlich et al. 2010; Gerlich 2013). Durch den in dieser Arbeit gewählten Ansatz sollte sichergestellt werden, dass absolut verlässliches Prüfmaterial für die detaillierte Testung der standardisierten HBsAg-Messungen zur Verfügung gestellt werden kann, welches nicht aus dem Serum von HBV-positiven Patienten stammt.

Durch einfache, aber wirkungsvolle Reinigungsschritte konnte mit dem erstellten methodischen Verfahren eine starke Konzentrierung viralen Materials in Verbindung mit einer signifikanten Diskriminierung von subviralen und viralen Partikeln sichergestellt werden (siehe dazu Abb. 33). Das auf diese Weise erhaltene Material kann eindeutig auf das ursprüngliche HBV-Genom zurückgeführt werden und besitzt daher eine zweifelsfreie Aminosäure-Sequenz hinsichtlich der viralen Proteine. Somit kann eine Testung verschiedener Nachweissysteme und die möglicherweise daraus resultierenden abweichenden Ergebnisse eindeutig auf das verwendete DNA-Material zurückgeführt werden. Nach der detaillierten Kontrolle der gewählten Methode mit Zellkultur-Überstand von HBV-GtA-exprimierenden Zellen konnte die Eignung des Konzepts weiter für die Genotypen B, C, D und G bestätigt werden (siehe Abb. 34 – Abb. 38). Die so erhaltenen Ergebnisse zeigten keine Unterschiede zwischen den analysierten Genotypen hinsichtlich der spezifischen Dichte der sekretierten und nachfolgend aufgetrennten viralen und subviralen Partikel. Lediglich HBV-GtG zeigte eine zu erwartende Abweichung, da neben den mittels PCR nachgewiesenen Virionen keine weiteren subviralen Partikel ausgeschleust wurden (Peiffer et al. 2015).

Das aufgereinigte HBsAg-Material wurde im Anschluss mit Hilfe von drei unabhängigen quantitativen HBsAg-ELISAs vermessen, um die Güte der Aufreinigung und die Eignung der verschiedenen Proben in absolut vergleichbarer Weise zu überprüfen. In Verbindung mit Western Blot-Analysen konnte auf diese Weise sichergestellt werden, dass absolut vergleichbare Standardreihen – basierend auf unterschiedlichem Genotypen-spezifischen Material – hergestellt

werden können. Dies geschah unter Verwendung eines HBs-spezifischen Antikörpers, welcher ein in allen verwendeten Genotypen konserviertes sequentielles Epitop detektiert. Zusätzlich zeigten diese Untersuchungen, dass die etablierte Aufreinigungsmethode für alle untersuchten HBV-Genotypen in analoger Weise funktionierte. Geringfügige Unterschiede konnten auf die in Kap. 5.1.1 nachgewiesenen Abweichungen in der Sekretion der individuellen HBsAg-Menge zurückgeführt werden und bestätigten somit die vorhergehenden Analysen. Abschließend zeigten die Ergebnisse in Abb. 39, dass die hergestellten Verdünnungsreihen für die Testung von den verschiedensten HBsAg-ELISA-Systemen geeignet waren. Darüber hinaus lassen sich Aussagen über die Güte des jeweiligen analysierten Testsystems mit besonderem Augenmerk auf die entsprechenden HBV-Genotypen treffen. Dies wurde im Anschluss exemplarisch an drei verschiedenen unabhängigen qualitativen HBsAg-ELISAs getestet, welche bereits für die kommerzielle Nutzung freigegeben waren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen (siehe Abb. 40) wiesen darauf hin, dass es zwischen den unterschiedlichen verwendeten Detektionsystemen deutliche Unterschiede hinsichtlich deren Genotypen-spezifischer Sensitivität gibt. Dennoch konnte ebenso nachgewiesen werden, dass keines der drei Testsysteme, welche lediglich eine qualitative Aussage über eine mögliche Infektion mit HBV zulassen, mit dem hier verwendeten Material falsche Ergebnissen lieferte. Somit konnte die Eignung der drei Assays bestätigt werden, dennoch weisen die beobachteten Abweichungen bereits auf Schwachstellen innerhalb der entsprechenden Diagnose-Varianten hin, welche weiterer Beobachtung bedürfen.

Die Quantifizierung der HBsAg-Mengen in Serum-Proben ist nicht nur zur Diagnose von HBV-Infektionen von entscheidendem Nutzen, sondern auch essentiell für die Überwachung des Krankheitsverlaufs während der individuellen Therapie (Martinot-Peignoux et al. 2015; Lee und Ahn 2011). Daher ist es von größter Bedeutung, dass solche Nachweis-Verfahren, welche für die Testung von Blutproben verwendet werden, auch geringste HBsAg-Mengen sicher und zuverlässig detektieren können. Um dies sicherzustellen, bedarf es der Verfügbarkeit von geeignetem Standard- und Referenzmaterial für die verlässliche Kalibrierung dieser Detektionsysteme. Hierfür wurde durch das internationale Konsortium für Blutsicherheit (ICBS) ein HBsAg-Masterpanel – basierend auf Seren von infizierten Patienten – welches die am meisten vertretenen HBV-Genotypen A–F und die HBsAg-Serotypen *adw2–4*, *ayw1–4* und *adr* umfasst, erstellt (Chudy et al. 2013; Scheiblaue et al. 2010). Jedoch ist die begrenzte Verfügbarkeit dieses Referenzmaterials aufgrund seines Ursprungs aus Patientenserum ein unabänderlicher

Zustand. Sobald dieses Material verbraucht wurde, bedarf es der Identifizierung und Isolierung neuer Serum-Proben, welche wegen unterschiedlicher wirts- und virusspezifischer Faktoren in einem zusätzlichen Kalibrierungs-Verfahren für die erneute Testung von Detektions-Verfahren geeicht werden müssen.

Mit Hilfe von rekombinant produziertem und gereinigtem HBsAg könnten all diese beschriebenen Unwägbarkeiten in einfacher Weise umgangen werden. Darüber hinaus bietet ein Zellkultur-System, basierend auf der transienten Transfektion von geeigneten Zelllinien mit für HBV kodierenden Expressionsplasmiden, die Möglichkeit, in einfacher und sowohl zeitlich als auch finanziell effizienter Art und Weise eindeutig definiertes virales Material herzustellen, welches nicht nur für die Testung und Eichung verschiedener Diagnose-Verfahren genutzt werden kann. Zusätzlich bietet sich so die Möglichkeit, durch gezielte Veränderungen in der viralen DNA-Struktur weitere Varianten für eine Testung verfügbar zu machen, welche bislang noch nicht *in vivo* nachweisbar sind und somit dem System des fortschreitenden Mutationsverlaufs des Hepatitis-B-Virus vorzugreifen. Auf diese Art und Weise könnte die Sicherheit von entsprechenden Diagnose-Verfahren in gesteigertem Maße gewährleistet und mögliche bislang nicht nachweisbare Virus-Varianten in unabhängigen Tests bestätigt werden. Dadurch könnte man auf solche suboptimalen Test-Systeme reagieren, bevor es zu möglichen nicht-nachweisbaren Infektionen käme. Auch die Modifikation von Impfverfahren wäre mit solchem rekombinanten HBsAg denkbar, sodass möglicherweise regional adaptierte Impfstoffe entwickelt werden könnten, welche an die globalen Gegebenheiten in Verbindung mit den prädominanten HBV-Genotypen angepasst werden könnten.

Somit stellt rekombinantes und gereinigtes HBsAg einen Nutzen dar, welcher in einer Vielzahl von möglichen Anwendungsgebieten vorteilhaft wäre und das gänzlich unabhängig von individuellen wirts- oder Genotyp-spezifischen Faktoren.

6.3 Einfluss von α -Taxilin auf die Sekretion von HBV

Durch wissenschaftliche Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass in HBV-positiven humanen Leberzellen gesteigerte Mengen des zellulären Faktors α -Taxilin gebildet werden (Hoffmann et al. 2013; Barthel, SR et al. 2016). Hierbei induzieren die regulatorischen viralen Proteine HBx und LHBs (mittels dessen PreS2-Domäne) die α -Taxilin Expression via c-Raf-vermitteltem Signalweg. Neben der zentralen Rolle des α -Taxilins bei der Freisetzung von

vollständig assemblierten Virionen konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass eine Verminderung der α -Taxilin-Levels sogar zu einer Steigerung der Freisetzung von subviralen Partikeln führt (Hoffmann et al. 2013). Somit bindet α -Taxilin an freie Syntaxine und verhindert auf diesem Wege die Formierung von t-SNARE-Komplexen (Nogami et al. 2003a; Nogami et al. 2003b). Auf diese Weise wird der intrazelluläre Vesikeltransport beeinträchtigt, sodass im Umkehrschluss erklärt werden kann, wie geringere Mengen an α -Taxilin zu mehr SNARE-Komplexen und somit zu einer gesteigerten Ausschleusung von HBsAg in Form von subviralen Partikeln (hauptsächlich Sphären) führt. Darüber hinaus konnte in α -Taxilin-Knockdown-Zellen nachgewiesen werden, dass es zu einer deutlichen Verminderung in der Sekretion von Viren, jedoch keinen Einschränkungen in der Ausschleusung von subviralen Partikeln kommt (Hoffmann et al. 2013). Dies beruht darauf, dass Viren und subvirale Partikel (im Allgemeinen sphärische Partikel) auf unterschiedlichen Routen die Zelle verlassen. So findet die Sekretion von vollständig assemblierten Virionen MVB-abhängig mittels des ESCRT-vermittelten Transportwegs statt (Patient et al. 2009; Lambert et al. 2007). Im Gegensatz dazu erfolgt die Ausschleusung von sphärischen subviralen Partikeln über den konstitutiven sekretorischen Pfad via ER/Golgi und ERGIC (Patient et al. 2009; Patient et al. 2007; Prange 2012). Bei der Freisetzung von Viren übernimmt α -Taxilin eine Adapter-Funktion durch die Bindung einerseits an LHBS (bzw. die PreS2-Domäne) und andererseits mittels Protein-eigene *late* Domänen an Komponenten des ESCRT-Komplexes und ermöglichen so die Ausschleusung von viralen Partikeln (Hoffmann et al. 2013).

Bereits seit längerer Zeit wurden auch nicht-humane Zellen für die Produktion von HBsAg verwendet, von welchen bekannt war, dass eine Sekretion von infektiösen viralen Partikeln nicht messbar war. Daher sollte durch parallele Arbeiten untersucht werden, ob dies durch Expression von humanem α -Taxilin in bestimmter Ausprägung beeinflusst wird. In nicht-humanen Nicht-Leberzelllinien (CHO/COS-7) konnte beobachtet werden, dass eine Expression von α -Taxilin die Sekretionsleistung von HBsAg – in Form von subviralen Partikeln – stark vermindert (siehe Abb. 41). Analoge Experimente in humanen Leberzellen bestätigten diese Untersuchungen und somit die von Hoffmann et al. (Hoffmann et al. 2013) postulierten Thesen. So scheint humanes α -Taxilin in nicht-humanen Zellen ebenfalls den intrazellulären Vesikeltransport durch Verhinderung der Ausbildung von SNARE-Komplexen und so die Sekretion von sphärischen subviralen Partikeln zu beeinträchtigen. Im Überstand solcher HBV-positiver Zellen, welche zudem α -Taxilin überexprimierten, konnten zusätzlich gesteigerte Mengen viraler DNA

nachgewiesen werden (siehe Abb. 42). Dies kann auf eine vermehrte Sekretion von viralen Partikeln hindeuten. Hierbei könnte humanes α -Taxilin in nicht-humanen Zellen diese Sekretion ermöglichen, da humane Leberzellen, welche α -Taxilin konstitutiv exprimieren, die Ausschleusung viraler Partikel erlauben. Dennoch muss dies tiefergehend analysiert werden, da nicht kategorisch ausgeschlossen werden kann, dass die detektierte virale DNA von vollständig assemblierten und im Anschluss sekretierten Virionen stammt. Untersuchungen an stabil transfizierten HBV-positiven Zelllinien wäre hierbei ein interessanter Ansatz. Jedoch konnte darüber hinaus durch Immunfluoreszenz-Analysen beobachtet werden, dass humanes α -Taxilin – analog zu Untersuchungen an humanen Leberzellen – in CHO- und COS-7-Zellen eindeutig mit LHBs kolokalisiert (vgl. Abb. 43, Abb. 44 und Abb. 45). Zusätzlich wiesen diese Experimente auf eine zumindest partielle Kolokalisation von LHBs – und folglich auch α -Taxilin – mit dem MVB-Markerprotein Rab7 hin. Basierend auf diesen Ergebnissen ist eine α -Taxilin-abhängige, LHBs-vermittelte Induktion der Sekretion von vollständig assemblierten Virionen in nicht-humanen Zellen äußerst wahrscheinlich. Um dies jedoch in eindeutig signifikanter Weise zu bestätigen, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Die Visualisierung von Hepatitis-B-Viren in diesem Zellkultur-Überstand mittels elektronenmikroskopischer Analyse würde die in dieser Arbeit beobachteten Effekte weiter bestätigen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Weltweit haben etwa 2 Milliarden Menschen eine HBV-Infektion durchgemacht, wobei sich in ca. 250–350 Millionen Fällen eine chronische Infektion etabliert hat (WHO 2015). Durch die Entwicklung einer Leberzirrhose bzw. eines hepatozellulären Karzinoms als Resultat einer solchen chronischen Infektion sterben jährlich etwa 600.000–800.000 Personen, was HBV zu einer der gefährlichsten Viruserkrankung weltweit macht (Gerlich 2013). Aufgrund einer Vielzahl an Faktoren ist eine optimale und zuverlässige Ausheilung mittels antiviraler Therapie bislang nicht möglich, weswegen eine bestens angepasste Impfstrategie von entscheidender Notwendigkeit ist. Aktuell konnten acht verschiedene Genotypen des humanen Hepatitis-B-Virus mit Unterschieden im viralen Genom von mindestens 8 % definitiv beschrieben werden (Kramvis et al. 2005; Norder et al. 2004; Schaefer 2007). Diese unterscheiden sich im Hinblick auf deren geografische Prävalenz, Pathogenese, Transmission und Krankheitsverlauf in eindeutiger Art und Weise (Kim et al. 2011; Pourkarim et al. 2014). Aufgrund dieser Tatsachen ist eine HBV-Genotypen-spezifische angepasste Vorgehensweise sowohl im Hinblick auf Impfverfahren als auch in Bezug auf die Diagnostik und Therapie von entscheidender Bedeutung. Speziell steht hierbei die Sicherheit von Blutprodukten im Fokus, bei der der zuverlässige Nachweis aller HBV-Genotypen höchste Priorität haben sollte.

Um die Charakterisierung der molekularen Virologie der einzelnen Genotypen näher zu untersuchen, sind Analysen unabhängig von wirtsspezifischen Faktoren ein geeigneter Ansatz, um spezielle Abweichungen zwischen den verschiedenen Genotypen zu analysieren. Darüber hinaus bietet sich so die Möglichkeit, virale Proteine in großem Maßstab und in verlässlich reproduzierbarer Art und Weise aufzureinigen und so für eine weitere Nutzung verfügbar zu machen. Die in dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden Analysen zeigten, dass es zwischen den verschiedenen untersuchten Genotypen eindeutige Unterschiede hinsichtlich der Bildung und Ausschleusung der diagnostisch wichtigen Oberflächenproteine gibt. Hierbei weist der Genotyp G – auch im Hinblick auf die intrazelluläre Verteilung des HBsAg – die größten Abweichungen auf, da dieser durch eine Sekretionsinkompetenz von subviralen Partikeln charakterisiert wurde (Peiffer et al. 2015). Hinsichtlich der Glykosylierungsmuster der verschiedenen viralen Oberflächenproteine konnten keine eindeutigen Unterschiede beobachtet werden, doch zeigten 2D-Elektrophorese-Analysen eindeutige Hinweise auf eine Genotypen-spezifische abweichende posttranslationale Modifikation des LHBS.

Mit Hilfe des gewählten Expressionssystems konnte in einem speziell etablierten Verfahren HBsAg der verschiedenen untersuchten HBV-Genotypen durch Trennung subviraler und viraler Partikel gereinigt werden und stand so für weitere Analysen in stark konzentrierter Form zu Verfügung. Die Testung dieses Materials in mehreren quantitativen Nachweissystemen konnte bestätigen, dass eine Eignung des rekombinant hergestellten und nachfolgend aufgereinigten HBsAg als Referenzmaterial zur Eichung von kommerziell erhältlichen Diagnose-Systemen besteht. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an unterschiedlichen qualitativen Nachweisverfahren konnten nachfolgend Genotypen-spezifische Unterschiede in der Signifikanz der jeweiligen Nachweisbarkeit aufzeigen.

Unter Berücksichtigung der in Kapitel 2 beschriebenen Ziele, konnten diese sukzessive erreicht werden. Die im Verlauf dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestätigen, dass Untersuchungen mit einem zwischen den unterschiedlichen HBV-Genotypen diskriminierenden Fokus in Bezug auf angepasste Impfverfahren bzw. im Hinblick auf eine optimierte Diagnostik und angepasste Therapie von entscheidender Notwendigkeit sind. Zudem kann rekombinantes HBsAg durch das hier beschriebene Verfahren zuverlässig aufgereinigt und in Folge die Genotypen-spezifische Testung von Blutproben optimiert und ausgebaut werden. Der Ansatz der *in vitro*-Produktion von eindeutig bestimmbar HBsAg bietet darüber hinaus den Vorteil, dass spezielle Änderungen im viralen Genom einfach und schnell verfügbar gemacht werden können, um letztlich die Nutzung von Patienten-Seren abzulösen. Des Weiteren sind Anwendungsmöglichkeiten in der Impfstoff- und Antikörperproduktion denkbar, sodass letztendlich der Nutzen von rekombinant hergestelltem, Genotypen-spezifischen HBsAg eindeutig bestätigt werden konnte. Schließlich spielt die Charakterisierung der molekularen Virologie der verschiedenen Genotypen eine herausragende Rolle, um letzten Endes das Ansprechen auf die individuelle Therapie und den unterschiedlichen Pathogenese-Verlauf klären zu können. So trägt das Verstehen der Charakteristika der verschiedenen HBV-Genotypen bestmöglich zu einer besseren Kontrolle dieser Krankheit bei.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Allain, J. P. (2006): Epidemiology of Hepatitis B virus and genotype. In: *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 36 Suppl 1, S12-7.
- Araki, K.; Nagata, K. (2011): Protein folding and quality control in the ER. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (11), a007526. DOI: 10.1101/cshperspect.a007526.
- Arauz-Ruiz, P.; Norder, H.; Robertson, B. H.; Lo Magnius (2002): Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. In: *The Journal of general virology* 83 (Pt 8), S. 2059–2073. DOI: 10.1099/0022-1317-83-8-2059.
- Bartenschlager, R.; Kuhn, C.; Schaller, H. (1992): Expression of the P-protein of the human hepatitis B virus in a vaccinia virus system and detection of the nucleocapsid-associated P-gene product by radiolabelling at newly introduced phosphorylation sites. In: *Nucleic acids research* 20 (2), S. 195–202.
- Bartenschlager, R.; Schaller, H. (1988): The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. In: *The EMBO journal* 7 (13), S. 4185–4192.
- Bartenschlager, R.; Schaller, H. (1992): Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. In: *The EMBO journal* 11 (9), S. 3413–3420.
- Barthel, SR; Medvedev, R.; Heinrich, T.; Buchner, S. M.; Ketterer, N.; Hildt, E. (2016): Hepatitis B virus inhibits insulin receptor signaling and impairs liver regeneration via intracellular retention of the insulin receptor. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. DOI: 10.1007/s00018-016-2259-1.
- Beasley, R. P.; Hwang, L. Y. (1983): Postnatal infectivity of hepatitis B surface antigen-carrier mothers. In: *The Journal of infectious diseases* 147 (2), S. 185–190.
- Beck, Juergen; Nassal, Michael (2007): Hepatitis B virus replication. In: *World journal of gastroenterology* 13 (1), S. 48–64.

Berggren, K.; Steinberg, T. H.; Lauber, W. M.; Carroll, J. A.; Lopez, M. F.; Chernokalskaya, E. et al. (1999): A luminescent ruthenium complex for ultrasensitive detection of proteins immobilized on membrane supports. In: *Analytical biochemistry* 276 (2), S. 129–143. DOI: 10.1006/abio.1999.4364.

Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic acids research* 7 (6), S. 1513–1523.

Blight, K. J.; McKeating, J. A.; Rice, C. M. (2002): Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. In: *Journal of virology* 76 (24), S. 13001–13014.

Block, Timothy M.; Guo, Haitao; Guo, Ju-Tao (2007): Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. In: *Clinics in liver disease* 11 (4), 685-706, vii. DOI: 10.1016/j.cld.2007.08.002.

Blumberg, Baruch S. (2002): Baruch Blumberg--hepatitis B and beyond. Interviewed by Pam Das. In: *The Lancet. Infectious diseases* 2 (12), S. 767–771.

BLUMBERG, B. S.; ALTER, H. J.; VISNICH, S. (1965): A "NEW" ANTIGEN IN LEUKEMIA SERA. In: *JAMA* 191, S. 541–546.

Bouchard, Michael J.; Puro, Robyn J.; Wang, Lihua; Schneider, Robert J. (2003): Activation and inhibition of cellular calcium and tyrosine kinase signaling pathways identify targets of the HBx protein involved in hepatitis B virus replication. In: *Journal of virology* 77 (14), S. 7713–7719.

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical biochemistry* 72, S. 248–254.

Brunetto; Moriconi, F.; Bonino, F.; Lau, G. K.; Farci, P.; Yurdaydin, C. et al. (2009): Hepatitis B virus surface antigen levels: a guide to sustained response to peginterferon alfa-2a in HBeAg-negative chronic hepatitis B. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 49 (4), S. 1141–1150. DOI: 10.1002/hep.22760.

Bruns, M.; Miska, S.; Chassot, S.; Will, H. (1998): Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. In: *Journal of virology* 72 (2), S. 1462–1468.

- 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* 71 (12), S. 9350–9357.
- Bruss, V.; Ganem, D. (1991): The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (3), S. 1059–1063.
- Bruss, V.; Gerhardt, E.; Vieluf, K.; Wunderlich, G. (1996): Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphogenesis. In: *Intervirology* 39 (1-2), S. 23–31.
- Bruss, V.; Gerlich, W. H. (1988): Formation of transmembraneous hepatitis B e-antigen by cotranslational in vitro processing of the viral precore protein. In: *Virology* 163 (2), S. 268–275.
- 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* 13 (10), S. 2273–2279.
- Bruss, V.; Vieluf, K. (1995): Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis. In: *Journal of virology* 69 (11), S. 6652–6657.
- Bruss, Volker (2004): Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. In: *Virus research* 106 (2), S. 199–209. DOI: 10.1016/j.virusres.2004.08.016.
- Bruss, Volker (2007): Hepatitis B virus morphogenesis. In: *World journal of gastroenterology* 13 (1), S. 65–73.
- Burns, Gregory S.; Thompson, Alexander J. (2014): Viral hepatitis B: clinical and epidemiological characteristics. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 4 (12), a024935. DOI: 10.1101/cshperspect.a024935.
- Carman, W. F. (1997): The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. In: *Journal of viral hepatitis* 4 Suppl 1, S. 11–20.
- Carman, W. F.; Jacyna, M. R.; Hadziyannis, S.; Karayiannis, P.; McGarvey, M. J.; Makris, A.; Thomas, H. C. (1989): Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. In: *Lancet (London, England)* 2 (8663), S. 588–591.

- Cassidy, A.; Mossman, S.; Olivieri, A.; Ridder, M. de; Leroux-Roels, G. (2011): Hepatitis B vaccine effectiveness in the face of global HBV genotype diversity. In: *Expert review of vaccines* 10 (12), S. 1709–1715. DOI: 10.1586/erv.11.151.
- Chai, N.; Chang, H. E.; Nicolas, E.; Han, Z.; Jarnik, M.; Taylor, J. (2008): Properties of subviral particles of hepatitis B virus. In: *Journal of virology* 82 (16), S. 7812–7817. DOI: 10.1128/JVI.00561-08.
- Chain, Benjamin M.; Myers, Richard (2005): Variability and conservation in hepatitis B virus core protein. In: *BMC microbiology* 5, S. 33. DOI: 10.1186/1471-2180-5-33.
- Chan, H. L.; Thompson, A.; Martinot-Peignoux, M.; Piratvisuth, T.; Cornberg, M.; Brunetto et al. (2011): Hepatitis B surface antigen quantification: why and how to use it in 2011 - a core group report. In: *Journal of hepatology* 55 (5), S. 1121–1131. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.06.006.
- Chan, H. L.; Wong, V. W.; Am Tse; Tse, C. H.; Am Chim; Chan, H. Y. et al. (2007): Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. In: *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 5 (12), S. 1462–1468. DOI: 10.1016/j.cgh.2007.09.005.
- Chang, J. J.; Lewin, S. R. (2007): Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. In: *Immunology and cell biology* 85 (1), S. 16–23. DOI: 10.1038/sj.icb.7100009.
- Chang, S. F.; Netter, H. J.; Hildt, E.; Schuster, R.; Schaefer, S.; Hsu, Y. C. et al. (2001): Duck hepatitis B virus expresses a regulatory HBx-like protein from a hidden open reading frame. In: *Journal of virology* 75 (1), S. 161–170. DOI: 10.1128/JVI.75.1.161-170.2001.
- Chen, C. H.; Lee, C. M.; Wang, J. H.; Tung, H. D.; Hung, C. H.; Lu, S. N. (2004): Correlation of quantitative assay of hepatitis B surface antigen and HBV DNA levels in asymptomatic hepatitis B virus carriers. In: *European journal of gastroenterology & hepatology* 16 (11), S. 1213–1218.
- Chisari, F. V.; Isogawa, M.; Wieland, S. F. (2010): Pathogenesis of hepatitis B virus infection. In: *Pathologie-biologie* 58 (4), S. 258–266. DOI: 10.1016/j.patbio.2009.11.001.

- Chu, C. M.; Liaw, Y. F. (2005): Genotype C hepatitis B virus infection is associated with a higher risk of reactivation of hepatitis B and progression to cirrhosis than genotype B: a longitudinal study of hepatitis B e antigen-positive patients with normal aminotransferase levels at baseline. In: *Journal of hepatology* 43 (3), S. 411–417. DOI: 10.1016/j.jhep.2005.03.018.
- Chudy, M.; Scheiblaue, H.; Hanschmann, K. M.; Kress, J.; Nick, S.; Wend, U. et al. (2013): Performance of hepatitis B surface antigen tests with the first WHO international hepatitis B virus genotype reference panel. In: *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 58 (1), S. 47–53. DOI: 10.1016/j.jcv.2013.06.011.
- Chudy, M.; Schmidt, M.; Czudai, V.; Scheiblaue, H.; Nick, S.; Mosebach, M. et al. (2006): Hepatitis B virus genotype G mono-infection and its transmission by blood components. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 44 (1), S. 99–107. DOI: 10.1002/hep.21220.
- Cooksley, W. G. (2010): Do we need to determine viral genotype in treating chronic hepatitis B? In: *Journal of viral hepatitis* 17 (9), S. 601–610. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2010.01326.x.
- Crowther, R. A.; Kiselev, N. A.; Bottcher, B.; Berriman, J. A.; Borisova, G. P.; Ose, V.; Pumpens, P. (1994): Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. In: *Cell* 77 (6), S. 943–950.
- Cui, Jie; Holmes, Edward C. (2012): Endogenous hepadnaviruses in the genome of the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) and the evolution of avian hepadnaviruses. In: *Journal of virology* 86 (14), S. 7688–7691. DOI: 10.1128/JVI.00769-12.
- Custer, B.; Sullivan, S. D.; Hazlet, T. K.; Iloeje, U.; Veenstra, D. L.; Kowdley, K. V. (2004): Global epidemiology of hepatitis B virus. In: *Journal of clinical gastroenterology* 38 (10 Suppl 3), S158-68.
- Dane, D. S.; Cameron, C. H.; Briggs, M. (1970): Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. In: *Lancet (London, England)* 1 (7649), S. 695–698.
- Deguchi, M.; Yamashita, N.; Kagita, M.; Asari, S.; Iwatani, Y.; Tsuchida, T. et al. (2004): Quantitation of hepatitis B surface antigen by an automated chemiluminescent microparticle immunoassay. In: *Journal of virological methods* 115 (2), S. 217–222.
- Devesa, M.; Pujol, F. H. (2007): Hepatitis B virus genetic diversity in Latin America. In: *Virus research* 127 (2), S. 177–184. DOI: 10.1016/j.virusres.2007.01.004.

- Drexler, Jan Felix; Geipel, Andreas; König, Alexander; Corman, Victor M.; van Riel, Debby; Leijten, Lonneke M. et al. (2013): Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (40), S. 16151–16156. DOI: 10.1073/pnas.1308049110.
- Eble, B. E.; Lingappa, V. R.; Ganem, D. (1990): The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences. In: *Journal of virology* 64 (3), S. 1414–1419.
- Eble, B. E.; MacRae; Lingappa, V. R.; Ganem, D. (1987): Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. In: *Molecular and cellular biology* 7 (10), S. 3591–3601.
- Ehrhardt, Christina; Schmolke, Mirco; Matzke, Andreas; Knoblauch, Alexander; Will, Carola; Wixler, Viktor; Ludwig, Stephan (2006): Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. In: *Signal Transduction* 6 (3), S. 179–184. DOI: 10.1002/sita.200500073.
- Fattovich, G.; Bortolotti, F.; Donato, F. (2008): Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. In: *Journal of hepatology* 48 (2), S. 335–352. DOI: 10.1016/j.jhep.2007.11.011.
- Francois, G.; Kew, M.; van Damme, P.; Mphahlele, M. J.; Meheus, A. (2001): Mutant hepatitis B viruses: a matter of academic interest only or a problem with far-reaching implications? In: *Vaccine* 19 (28-29), S. 3799–3815.
- Ganem, D. (1991): Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. In: *Current topics in microbiology and immunology* 168, S. 61–83.
- Ganem, D.; Schneider, R.J.: Hepadnaviridae: the viruses and their replication. Unter Mitarbeit von D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.). In: *Fields virology*, 4th ed., vol. 2, S. 2923–2969.
- Ganji, A.; Esmailzadeh, A.; Ghafarzadegan, K.; Helalat, H.; Rafatpanah, H.; Mokhtarifar, A. (2011): Correlation between HBsAg quantitative assay results and HBV DNA levels in chronic HBV. In: *Hepatitis monthly* 11 (5), S. 342–345.
- Gerelsaikhon, T.; Tavis, J. E.; Bruss, V. (1996): Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. In: *Journal of virology* 70 (7), S. 4269–4274.

- Gerlich, W. H.; Heermann, K. H.; Lu, X. (1992): Functions of hepatitis B surface proteins. In: *Archives of virology. Supplementum 4*, S. 129–132.
- Gerlich, Wolfram H. (2013): Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. In: *Virology journal* 10, S. 239. DOI: 10.1186/1743-422X-10-239.
- Gerlich, Wolfram H.; Bremer, Corinna; Saniewski, Mona; Schuttler, Christian G.; Wend, Ulrike C.; Willems, Wulf R.; Glebe, Dieter (2010): Occult hepatitis B virus infection: detection and significance. In: *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 28 (1), S. 116–125. DOI: 10.1159/000282074.
- Gilbert, Clement; Feschotte, Cedric (2010): Genomic fossils calibrate the long-term evolution of hepadnaviruses. In: *PLoS biology* 8 (9). DOI: 10.1371/journal.pbio.1000495.
- Glebe, D.; Gerlich, W. H. (2004): Study of the endocytosis and intracellular localization of subviral particles of hepatitis B virus in primary hepatocytes. In: *Methods in molecular medicine* 96, S. 143–151. DOI: 10.1385/1-59259-670-3:143.
- Glebe, Dieter; Urban, Stephan; Knoop, Eva V.; Cag, Nilgun; Krass, Peter; Grun, Stefanie et al. (2005): Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. In: *Gastroenterology* 129 (1), S. 234–245.
- Gluzman, Y. (1981): SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. In: *Cell* 23 (1), S. 175–182.
- Goerg, A.; Obermaier, C.; Boguth, G.; Harder, A.; Scheibe, B.; Wildgruber, R.; Weiss, W. (2000): The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. In: *Electrophoresis* 21 (6), S. 1037–1053. DOI: 10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6<1037::AID-ELPS1037>3.0.CO;2-V.
- Grandjacques, C.; Pradat, P.; Stuyver, L.; Chevallier, M.; Chevallier, P.; Pichoud, C. et al. (2000): Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B virus genome: correlation with viral persistence and disease severity. In: *Journal of hepatology* 33 (3), S. 430–439.
- Gripon, P.; Cannie, I.; Urban, S. (2005): Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. In: *Journal of virology* 79 (3), S. 1613–1622. DOI: 10.1128/JVI.79.3.1613-1622.2005.

- Grosso, G.; Mistretta, A.; Marventano, S.; Ferranti, R.; Mauro, L.; Cunsolo, R. et al. (2012): Long-term persistence of seroprotection by hepatitis B vaccination in healthcare workers of southern Italy. In: *Hepatitis monthly* 12 (9), e6025. DOI: 10.5812/hepatmon.6025.
- Hafner, A.; Brandenburg, B.; Hildt, E. (2003): Reconstitution of gene expression from a regulatory-protein-deficient hepatitis B virus genome by cell-permeable HBx protein. In: *EMBO reports* 4 (8), S. 767–773. DOI: 10.1038/sj.embor.embor903.
- Halegoua-De, Marzio D.; Hann, H. W. (2014): Prevention of hepatocellular carcinoma and its recurrence with anti-hepatitis B viral therapy. In: *Minerva gastroenterologica e dietologica* 60 (3), S. 191–200.
- He, Jun-Dong; Gao, Jian-Mei; Shen, Tao; Murphy, Robert W.; Yan, Xin-Min (2013): Evolutionary perspective on hepatitis B virus with an expanded sampling strategy. In: *Virus research* 178 (2), S. 525–529. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.09.032.
- Heermann, K. H.; Goldmann, U.; Schwartz, W.; Seyffarth, T.; Baumgarten, H.; Gerlich, W. H. (1984): Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. In: *Journal of virology* 52 (2), S. 396–402.
- Hildt, E.; Munz, B.; Saher, G.; Reifenberg, K.; Hofschneider, P. H. (2002): The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. In: *The EMBO journal* 21 (4), S. 525–535.
- Hildt, E.; Saher, G.; Bruss, V.; Hofschneider, P. H. (1996): The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. In: *Virology* 225 (1), S. 235–239. DOI: 10.1006/viro.1996.0594.
- Hildt, E.; Urban, S.; Hofschneider, P. H. (1995): Characterization of essential domains for the functionality of the MHBst transcriptional activator and identification of a minimal MHBst activator. In: *Oncogene* 11 (10), S. 2055–2066.
- Hoffmann, C. J.; Thio, C. L. (2007): Clinical implications of HIV and hepatitis B co-infection in Asia and Africa. In: *The Lancet. Infectious diseases* 7 (6), S. 402–409. DOI: 10.1016/S1473-3099(07)70135-4.
- Hoffmann, J.; Boehm, C.; Himmelsbach, K.; Donnerhak, C.; Roettger, H.; Weiss, T. S. et al. (2013): Identification of alpha-taxilin as an essential factor for the life cycle of hepatitis B virus. In: *Journal of hepatology* 59 (5), S. 934–941. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.06.020.

- Huovila, A. P.; Am Eder; Fuller, S. D. (1992): Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. In: *The Journal of cell biology* 118 (6), S. 1305–1320.
- Hurtley, S. M.; Helenius, A. (1989): Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. In: *Annual review of cell biology* 5, S. 277–307. DOI: 10.1146/annurev.cb.05.110189.001425.
- Janssen, H. L.; Kerhof-Los, C. J.; Heijtkink, R. A.; Schalm, S. W. (1994): Measurement of HBsAg to monitor hepatitis B viral replication in patients on alpha-interferon therapy. In: *Antiviral research* 23 (3-4), S. 251–257.
- Jaroszewicz, J.; Calle, Serrano B.; Wursthorn, K.; Deterding, K.; Schlue, J.; Raupach, R. et al. (2010): Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective. In: *Journal of hepatology* 52 (4), S. 514–522. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.01.014.
- JENSEN, F. C.; GIRARDI, A. J.; GILDEN, R. V.; KOPROWSKI, H. (1964): INFECTION OF HUMAN AND SIMIAN TISSUE CULTURES WITH ROUS SARCOMA VIRUS. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 52, S. 53–59.
- Jiang, Bingfu; Himmelsbach, Kiyoshi; Ren, Huimei; Boller, Klaus; Hildt, Eberhard (2015): Sub-viral Hepatitis B Virus Filaments, like Infectious Viral Particles, Are Released via Multivesicular Bodies. In: *Journal of virology* 90 (7), S. 3330–3341. DOI: 10.1128/JVI.03109-15.
- Jilg, Wolfgang; Gerlich, Wolfram H. (2013): Klinischer Leitfaden Virushepatitis. Hg. v. Abbott GmbH. Wissenschaftliche Verlagsabteilung Abbott GmbH.
- Julithe, Romain; Abou-Jaoude, Georges; Sureau, Camille (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* 88 (16), S. 9049–9059. DOI: 10.1128/JVI.01161-14.
- Kang, Donghoon; Gho, Yong Song; Suh, Myungkoo; Kang, Chulhun (2002): Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: *Bulletin of the Korean Chemical Society* 23 (11), S. 1511–1512. DOI: 10.5012/bkcs.2002.23.11.1511.
- Kann, M.; Sodeik, B.; Vlachou, A.; Gerlich, W. H.; Helenius, A. (1999): Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. In: *The Journal of cell biology* 145 (1), S. 45–55.

- Kao, J. H.; Chen, D. S. (2002): Global control of hepatitis B virus infection. In: *The Lancet. Infectious diseases* 2 (7), S. 395–403.
- Kato, H.; Orito, E.; Gish, R. G.; Bzowej, N.; Newsom, M.; Sugauchi, F. et al. (2002): Hepatitis B e antigen in sera from individuals infected with hepatitis B virus of genotype G. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 35 (4), S. 922–929. DOI: 10.1053/jhep.2002.32096.
- Kerenyi, L.; Gallyas, F. (1973): Errors in quantitative estimations on agar electrophoresis using silver stain. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 47 (3), S. 425–436.
- Kew, M. C.; Kramvis, A.; Yu, M. C.; Arakawa, K.; Hodgkinson, J. (2005): Increased hepatocarcinogenic potential of hepatitis B virus genotype A in Bantu-speaking sub-saharan Africans. In: *Journal of medical virology* 75 (4), S. 513–521. DOI: 10.1002/jmv.20311.
- Kew, Michael C. (2011): Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. In: *Journal of gastroenterology and hepatology* 26 Suppl 1, S. 144–152. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06546.x.
- Kian, Chua P.; Lin, M. H.; Shih, C. (2006): Potent inhibition of human Hepatitis B virus replication by a host factor Vps4. In: *Virology* 354 (1), S. 1–6. DOI: 10.1016/j.virol.2006.07.018.
- Kim, B. K.; Revill, P. A.; Ahn, S. H. (2011): HBV genotypes: relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B. In: *Antiviral therapy* 16 (8), S. 1169–1186. DOI: 10.3851/IMP1982.
- Kim, H.; Lee, S. A.; Kim, D. W.; Lee, S. H.; Kim, B. J. (2013): Naturally occurring mutations in large surface genes related to occult infection of hepatitis B virus genotype C. In: *PloS one* 8 (1), e54486. DOI: 10.1371/journal.pone.0054486.
- Knowles, B. B.; Howe, C. C.; Aden, D. P. (1980): Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. In: *Science (New York, N.Y.)* 209 (4455), S. 497–499.
- Kobayashi, M.; Suzuki, F.; Akuta, N.; Tsubota, A.; Ikeda, K.; Arase, Y. et al. (2005): Virological differences between patients infected with subtypes Ba and Bj of hepatitis B virus genotype B. In: *Journal of gastroenterology and hepatology* 20 (4), S. 570–576. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2005.03798.x.

- Kohmoto, M.; Enomoto, M.; Tamori, A.; Habu, D.; Takeda, T.; Kawada, N. et al. (2005): Quantitative detection of hepatitis B surface antigen by chemiluminescent microparticle immunoassay during lamivudine treatment of chronic hepatitis B virus carriers. In: *Journal of medical virology* 75 (2), S. 235–239. DOI: 10.1002/jmv.20262.
- Kramvis, A. (2014): Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. In: *Intervirolgy* 57 (3-4), S. 141–150. DOI: 10.1159/000360947.
- Kramvis, A.; Kew, M.; Francois, G. (2005): Hepatitis B virus genotypes. In: *Vaccine* 23 (19), S. 2409–2423. DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.10.045.
- Kramvis, A.; Kew, M. C. (2005): Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. In: *Journal of viral hepatitis* 12 (5), S. 456–464. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2005.00624.x.
- Kuhns, M. C.; Kleinman, S. H.; McNamara, A. L.; Rawal, B.; Glynn, S.; Busch, M. P. (2004): Lack of correlation between HBsAg and HBV DNA levels in blood donors who test positive for HBsAg and anti-HBc: implications for future HBV screening policy. In: *Transfusion* 44 (9), S. 1332–1339. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2004.04055.x.
- Ladner, S. K.; Otto, M. J.; Barker, C. S.; Zaifert, K.; Wang, G. H.; Guo, J. T. et al. (1997): Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41 (8), S. 1715–1720.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Lambert, Carsten; Doring, Tatjana; Prange, Reinhild (2007): Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. In: *Journal of virology* 81 (17), S. 9050–9060. DOI: 10.1128/JVI.00479-07.
- Lau, D. T.; Bleibel, W. (2008): Current status of antiviral therapy for hepatitis B. In: *Therapeutic advances in gastroenterology* 1 (1), S. 61–75. DOI: 10.1177/1756283X08093944.
- Lavanchy, D. (2005): Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. In: *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 34 Suppl 1, S1-3.

- Le Bouvier, G. (1976): HBs antigen subdeterminants as serological entities. In: *Bibliotheca haematologica* 42, S. 20–21.
- Lee, J. M.; Ahn, S. H. (2011): Quantification of HBsAg: basic virology for clinical practice. In: *World journal of gastroenterology* 17 (3), S. 283–289. DOI: 10.3748/wjg.v17.i3.283.
- Leistner, Corinna M.; Gruen-Bernhard, Stefanie; Glebe, Dieter (2008): Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. In: *Cellular microbiology* 10 (1), S. 122–133. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.01023.x.
- Liang, T. Jake (2009): Hepatitis B: the virus and disease. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 49 (5 Suppl), S13-21. DOI: 10.1002/hep.22881.
- Littlejohn, Margaret; Locarnini, Stephen; Yuen, Lilly (2016): Origins and Evolution of Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 6 (1), a021360. DOI: 10.1101/cshperspect.a021360.
- Liu, C. J.; Kao, J. H. (2013): Global perspective on the natural history of chronic hepatitis B: role of hepatitis B virus genotypes A to J. In: *Seminars in liver disease* 33 (2), S. 97–102. DOI: 10.1055/s-0033-1345716.
- Liu, Haiou; Xu, Jiejie; Zhou, Lei; Yun, Xiaojing; Chen, Lin; Wang, Shanshan et al. (2011): Hepatitis B virus large surface antigen promotes liver carcinogenesis by activating the Src/PI3K/Akt pathway. In: *Cancer research* 71 (24), S. 7547–7557. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2260.
- Livingston, S. E.; Simonetti, J. P.; Bulkow, L. R.; Homan, C. E.; Snowball, M. M.; Cagle, H. H. et al. (2007): Clearance of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B and genotypes A, B, C, D, and F. In: *Gastroenterology* 133 (5), S. 1452–1457. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.08.010.
- London, W. T.; Millman, I. (1969): Australia antigen and viral hepatitis. In: *Revue française d'études cliniques et biologiques* 14 (10), S. 961–963.
- Lu, X.; Mehta, A.; Dwek, R.; Butters, T.; Block, T. (1995): Evidence that N-linked glycosylation is necessary for hepatitis B virus secretion. In: *Virology* 213 (2), S. 660–665. DOI: 10.1006/viro.1995.0038.

- Lucifora, J.; Arzberger, S.; Durantel, D.; Belloni, L.; Strubin, M.; Levrero, M. et al. (2011): Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. In: *Journal of hepatology* 55 (5), S. 996–1003. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.02.015.
- Lucifora, J.; Protzer, U. (2016): Attacking hepatitis B virus cccDNA - The holy grail to hepatitis B cure. In: *Journal of hepatology* 64 (1 Suppl), S41-8. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.02.009.
- Lupberger, J.; Hildt, E. (2007): Hepatitis B virus-induced oncogenesis. In: *World journal of gastroenterology* 13 (1), S. 74–81.
- Lupberger, J.; Schaedler, S.; Peiran, A.; Hildt, E. (2013): Identification and characterization of a novel bipartite nuclear localization signal in the hepatitis B virus polymerase. In: *World journal of gastroenterology* 19 (44), S. 8000–8010. DOI: 10.3748/wjg.v19.i44.8000.
- Magnius, L. O.; Espmark, A. (1972): A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. In: *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section B: Microbiology and immunology* 80 (2), S. 335–337.
- Manesis, E. K.; Hadziyannis, E. S.; Angelopoulou, O. P.; Hadziyannis, S. J. (2007): Prediction of treatment-related HBsAg loss in HBeAg-negative chronic hepatitis B: a clue from serum HBsAg levels. In: *Antiviral therapy* 12 (1), S. 73–82.
- Martinot-Peignoux, M.; Asselah, T.; Marcellin, P. (2015): HBsAg quantification to optimize treatment monitoring in chronic hepatitis B patients. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 35 Suppl 1, S. 82–90. DOI: 10.1111/liv.12735.
- Martinot-Peignoux, M.; Lapalus, M.; Asselah, T.; Marcellin, P. (2014): HBsAg quantification: useful for monitoring natural history and treatment outcome. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 34 Suppl 1, S. 97–107. DOI: 10.1111/liv.12403.
- Mauss, Stefan; Berg, Thomas; Rockstroh, Juergen; Sarrazin, Christoph; Wedemeyer, Heiner (Hg.) (2015): Hepatology – A clinical textbook. 7th Edition: Medizin Fokus Verlag.
- McMahon, B. J. (2009a): The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. In: *Hepatology international* 3 (2), S. 334–342. DOI: 10.1007/s12072-008-9112-z.

- McMahon, B. J. (2009b): The natural history of chronic hepatitis B virus infection. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 49 (5 Suppl), S45-55. DOI: 10.1002/hep.22898.
- Melegari, Margherita; Wolf, Sarah K.; Schneider, Robert J. (2005): Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. In: *Journal of virology* 79 (15), S. 9810–9820. DOI: 10.1128/JVI.79.15.9810-9820.2005.
- Merkert, S.; Wunderlich, S.; Bednarski, C.; Beier, J.; Haase, A.; Dreyer, A. K. et al. (2014): Efficient designer nuclease-based homologous recombination enables direct PCR screening for footprintless targeted human pluripotent stem cells. In: *Stem cell reports* 2 (1), S. 107–118. DOI: 10.1016/j.stemcr.2013.12.003.
- Miller, J. C.; Holmes, M. C.; Wang, J.; Guschin, D. Y.; Lee, Y. L.; Rupniewski, I. et al. (2007): An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. In: *Nature biotechnology* 25 (7), S. 778–785. DOI: 10.1038/nbt1319.
- Mizokami, M.; Orito, E.; Ohba, K.; Ikeo, K.; Lau, J. Y.; Gojobori, T. (1997): Constrained evolution with respect to gene overlap of hepatitis B virus. In: *Journal of molecular evolution* 44 Suppl 1, S83-90.
- Moehle, E. A.; Rock, J. M.; Lee, Y. L.; Jouvenot, Y.; DeKever, R. C.; Gregory, P. D. et al. (2007): Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (9), S. 3055–3060. DOI: 10.1073/pnas.0611478104.
- Moucari, R.; Mackiewicz, V.; Lada, O.; Ripault, M. P.; Castelnau, C.; Martinot-Peignoux, M. et al. (2009): Early serum HBsAg drop: a strong predictor of sustained virological response to pegylated interferon alfa-2a in HBeAg-negative patients. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 49 (4), S. 1151–1157. DOI: 10.1002/hep.22744.
- Nassal, M. (2015): HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. In: *Gut* 64 (12), S. 1972–1984. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-309809.
- Nassal, M.; Rieger, A.; Steinau, O. (1992): Topological analysis of the hepatitis B virus core particle by cysteine-cysteine cross-linking. In: *Journal of molecular biology* 225 (4), S. 1013–1025.
- Nassal, Michael (2008): Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. In: *Virus research* 134 (1-2), S. 235–249. DOI: 10.1016/j.virusres.2007.12.024.

- Nguyen, T.; Thompson, A. J.; Bowden, S.; Croagh, C.; Bell, S.; Desmond, P. V. et al. (2010): Hepatitis B surface antigen levels during the natural history of chronic hepatitis B: a perspective on Asia. In: *Journal of hepatology* 52 (4), S. 508–513. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.01.007.
- Nguyen, V. T.; Law, M. G.; Dore, G. J. (2009): Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma: epidemiological characteristics and disease burden. In: *Journal of viral hepatitis* 16 (7), S. 453–463. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2009.01117.x.
- Ni, Y.; Lempp, F. A.; Mehrle, S.; Nkongolo, S.; Kaufman, C.; Falth, M. et al. (2014): Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. In: *Gastroenterology* 146 (4), S. 1070–1083. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.12.024.
- Niedre-Otomere, Baiba; Bogdanova, Ance; Bruvere, Ruta; Ose, Velta; Gerlich, Wolfram H.; Pumpens, Paul et al. (2013): Posttranslational modifications and secretion efficiency of immunogenic hepatitis B virus L protein deletion variants. In: *Virology journal* 10, S. 63. DOI: 10.1186/1743-422X-10-63.
- Nogami, S.; Satoh, S.; Nakano, M.; Shimizu, H.; Fukushima, H.; Maruyama, A. et al. (2003a): Taxilin; a novel syntaxin-binding protein that is involved in Ca²⁺-dependent exocytosis in neuroendocrine cells. In: *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 8 (1), S. 17–28.
- Nogami, S.; Satoh, S.; Nakano, M.; Terano, A.; Shirataki, H. (2003b): Interaction of taxilin with syntaxin which does not form the SNARE complex. In: *Biochemical and biophysical research communications* 311 (4), S. 797–802.
- Norder, H.; Am Courouce; Coursaget, P.; Echevarria, J. M.; Lee, S. D.; Mushahwar, I. K. et al. (2004): Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. In: *Intervirology* 47 (6), S. 289–309. DOI: 10.1159/000080872.
- Oess, S.; Hildt, E. (2000): Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. In: *Gene therapy* 7 (9), S. 750–758. DOI: 10.1038/sj.gt.3301154.
- Oh, I. S.; Park, S. H. (2015): Immune-mediated Liver Injury in Hepatitis B Virus Infection. In: *Immune network* 15 (4), S. 191–198. DOI: 10.4110/in.2015.15.4.191.

- O'Halloran, J. A.; Gascun, C. F. de; Dunford, L.; Carr, M. J.; Connell, J.; Howard, R. et al. (2011): Hepatitis B virus vaccine failure resulting in chronic hepatitis B infection. In: *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 52 (2), S. 151–154. DOI: 10.1016/j.jcv.2011.06.020.
- Okada, K.; Kamiyama, I.; Inomata, M.; Imai, M.; Miyakawa, Y. (1976): e antigen and anti-e in the serum of asymptomatic carrier mothers as indicators of positive and negative transmission of hepatitis B virus to their infants. In: *The New England journal of medicine* 294 (14), S. 746–749. DOI: 10.1056/NEJM197604012941402.
- Orito, E.; Mizokami, M.; Ina, Y.; Moriyama, E. N.; Kameshima, N.; Yamamoto, M.; Gojobori, T. (1989): Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (18), S. 7059–7062.
- Ostapchuk, P.; Hearing, P.; Ganem, D. (1994): A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. In: *The EMBO journal* 13 (5), S. 1048–1057.
- Paraskevis, Dimitrios; Magiorkinis, Gkikas; Magiorkinis, Emmanouil; Ho, Simon Y. W.; Bels-haw, Robert; Allain, Jean-Pierre; Hatzakis, Angelos (2013): Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 57 (3), S. 908–916. DOI: 10.1002/hep.26079.
- Patient, R.; Hourieux, C.; Roingeard, P. (2009): Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. In: *Cellular microbiology* 11 (11), S. 1561–1570. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01363.x.
- Patient, R.; Hourieux, C.; Sizaret, P. Y.; Trassard, S.; Sureau, C.; Roingeard, P. (2007): Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. In: *Journal of virology* 81 (8), S. 3842–3851. DOI: 10.1128/JVI.02741-06.
- Patzer, E. J.; Nakamura, G. R.; Simonsen, C. C.; Levinson, A. D.; Brands, R. (1986): Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum. In: *Journal of virology* 58 (3), S. 884–892.
- Peiffer, K. H.; Akhras, S.; Himmelsbach, K.; Hassemer, M.; Finkernagel, M.; Carra, G. et al. (2015): Intracellular accumulation of subviral HBsAg particles and diminished Nrf2 activation

in HBV genotype G expressing cells lead to an increased ROI level. In: *Journal of hepatology* 62 (4), S. 791–798. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.11.028.

Persing, D. H.; Varmus, H. E.; Ganem, D. (1987): The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid. In: *Journal of virology* 61 (5), S. 1672–1677.

Ploen, D.; Hafirassou, M. L.; Himmelsbach, K.; Sauter, D.; Binossek, M. L.; Weiss, T. S. et al. (2013): TIP47 plays a crucial role in the life cycle of hepatitis C virus. In: *Journal of hepatology* 58 (6), S. 1081–1088. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.01.022.

POLSON, A.; POTGIETER, G. M.; LARGIER, J. F.; MEARS, G. E.; JOUBERT, F. J. (1964): THE FRACTIONATION OF PROTEIN MIXTURES BY LINEAR POLYMERS OF HIGH MOLECULAR WEIGHT. In: *Biochimica et biophysica acta* 82, S. 463–475.

Pourkarim, Mahmoud Reza; Amini-Bavil-Olyaei, Samad; Kurbanov, Fuat; van Ranst, Marc; Tacke, Frank (2014): Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions. In: *World journal of gastroenterology* 20 (23), S. 7152–7168. DOI: 10.3748/wjg.v20.i23.7152.

Pourkarim, Mahmoud Reza; van Ranst, Marc (2011): Guidelines for the detection of a common source of hepatitis B virus infections. In: *Hepatitis monthly* 11 (10), S. 783–785. DOI: 10.5812/kowsar.1735143X.773.

Prange, R.; Clemen, A.; Streeck, R. E. (1991): Myristylation is involved in intracellular retention of hepatitis B virus envelope proteins. In: *Journal of virology* 65 (7), S. 3919–3923.

Prange, R.; Streeck, R. E. (1995): Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. In: *The EMBO journal* 14 (2), S. 247–256.

Prange, Reinhild (2012): Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. In: *Medical microbiology and immunology* 201 (4), S. 449–461. DOI: 10.1007/s00430-012-0267-9.

Rabe, B.; Glebe, D.; Kann, M. (2006): Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events. In: *Journal of virology* 80 (11), S. 5465–5473. DOI: 10.1128/JVI.02303-05.

- Rabilloud, T.; Carpentier, G.; Tarroux, P. (1988): Improvement and simplification of low-back-ground silver staining of proteins by using sodium dithionite. In: *Electrophoresis* 9 (6), S. 288–291. DOI: 10.1002/elps.1150090608.
- Rehermann, B.; Nascimbeni, M. (2005): Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. In: *Nature reviews. Immunology* 5 (3), S. 215–229. DOI: 10.1038/nri1573.
- Riviere, L.; Ducroux, A.; Buendia, M. A. (2014): The oncogenic role of hepatitis B virus. In: *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* 193, S. 59–74. DOI: 10.1007/978-3-642-38965-8_4.
- Roingear, P.; Diouf, A.; Sankale, J. L.; Boye, C.; Mboup, S.; Diadhiou, F.; Essex, M. (1993): Perinatal transmission of hepatitis B virus in Senegal, west Africa. In: *Viral immunology* 6 (1), S. 65–73. DOI: 10.1089/vim.1993.6.65.
- Roseman, Alan M.; Berriman, John A.; Wynne, Samantha A.; Butler, P. Jonathan G.; Crowther, R. Anthony (2005): A structural model for maturation of the hepatitis B virus core. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (44), S. 15821–15826. DOI: 10.1073/pnas.0504874102.
- Sakamoto, T.; Tanaka, Y.; Simonetti, J.; Osioy, C.; Borresen, M. L.; Koch, A. et al. (2007): Classification of hepatitis B virus genotype B into 2 major types based on characterization of a novel subgenotype in Arctic indigenous populations. In: *The Journal of infectious diseases* 196 (10), S. 1487–1492. DOI: 10.1086/523111.
- Schaedler, Stephanie; Hildt, Eberhard (2009): HBV life cycle: entry and morphogenesis. In: *Viruses* 1 (2), S. 185–209. DOI: 10.3390/v1020185.
- Schaefer, S. (2005): Hepatitis B virus: significance of genotypes. In: *Journal of viral hepatitis* 12 (2), S. 111–124. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2005.00584.x.
- Schaefer, S. (2007): Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. In: *World journal of gastroenterology* 13 (1), S. 14–21.
- Scheiblauer, H.; El-Nageh, M.; Diaz, S.; Nick, S.; Zeichhardt, H.; Grunert, H. P.; Prince, A. (2010): Performance evaluation of 70 hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) assays from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes. In: *Vox sanguinis* 98 (3 Pt 2), S. 403–414. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2009.01272.x.

- Scheiblaue, H.; Soboll, H.; Nick, S. (2006): Evaluation of 17 CE-marked HBsAg assays with respect to clinical sensitivity, analytical sensitivity, and hepatitis B virus mutant detection. In: *Journal of medical virology* 78 Suppl 1, S66-70. DOI: 10.1002/jmv.20611.
- Schmitt, S.; Glebe, D.; Alving, K.; Tolle, T. K.; Linder, M.; Geyer, H. et al. (1999): Analysis of the pre-S2 N- and O-linked glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (17), S. 11945–11957.
- Schmitt, Sigrid; Glebe, Dieter; Tolle, Tanja K.; Lochnit, Gunter; Linder, Dietmar; Geyer, Rudolf; Gerlich, Wolfram H. (2004): Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus. In: *The Journal of general virology* 85 (Pt 7), S. 2045–2053. DOI: 10.1099/vir.0.79932-0.
- Schmitz, Andre; Schwarz, Alexandra; Foss, Michael; Zhou, Lixin; Rabe, Birgit; Hoellenriegel, Julia et al. (2010): Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket. In: *PLoS pathogens* 6 (1), e1000741. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000741.
- Schulze, A.; Gripon, P.; Urban, S. (2007): Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 46 (6), S. 1759–1768. DOI: 10.1002/hep.21896.
- Seeger, C.; Mason, W. S. (2000): Hepatitis B virus biology. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 64 (1), S. 51–68.
- Seitz, Stefan; Urban, Stephan; Antoni, Christoph; Bottcher, Bettina (2007): Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions. In: *The EMBO journal* 26 (18), S. 4160–4167. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601841.
- Sharma, S. K.; Saini, N.; Chwla, Y. (2005): Hepatitis B virus: inactive carriers. In: *Virology journal* 2, S. 82. DOI: 10.1186/1743-422X-2-82.
- Shepard, C. W.; Simard, E. P.; Finelli, L.; Fiore, A. E.; Bell, B. P. (2006): Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. In: *Epidemiologic reviews* 28, S. 112–125. DOI: 10.1093/epirev/mxj009.
- Shi, W.; Zhang, Z.; Ling, C.; Zheng, W.; Zhu, C.; Carr, M. J.; Higgins, D. G. (2013): Hepatitis B virus subgenotyping: history, effects of recombination, misclassifications, and corrections. In: *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 16, S. 355–361. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.03.021.

- Short, J. M.; Chen, S.; Am Roseman; Butler, P. J.; Crowther, R. A. (2009): Structure of hepatitis B surface antigen from subviral tubes determined by electron cryomicroscopy. In: *Journal of molecular biology* 390 (1), S. 135–141. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.04.059.
- Standring, D. N.; Ou, J. H.; Masiarz, F. R.; Rutter, W. J. (1988): A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in *Xenopus* oocytes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (22), S. 8405–8409.
- Stoeckl, L.; Funk, A.; Kopitzki, A.; Brandenburg, B.; Oess, S.; Will, H. et al. (2006): Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (17), S. 6730–6734. DOI: 10.1073/pnas.0509765103.
- Stuyver, L.; Gendt, S. de; van Geyt, C.; Zoulim, F.; Fried, M.; Schinazi, R. F.; Rossau, R. (2000): A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. In: *The Journal of general virology* 81 (Pt 1), S. 67–74. DOI: 10.1099/0022-1317-81-1-67.
- Su, F.; Schneider, R. J. (1996): Hepatitis B virus HBx protein activates transcription factor NF-kappaB by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins. In: *Journal of virology* 70 (7), S. 4558–4566.
- Sugauchi, F.; Orito, E.; Ichida, T.; Kato, H.; Sakugawa, H.; Kakumu, S. et al. (2003): Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C. In: *Gastroenterology* 124 (4), S. 925–932. DOI: 10.1053/gast.2003.50140.
- Suh, Alexander; Weber, Claudia C.; Kehlmaier, Christian; Braun, Edward L.; Green, Richard E.; Fritz, Uwe et al. (2014): Early mesozoic coexistence of amniotes and hepadnaviridae. In: *PLoS genetics* 10 (12), e1004559. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004559.
- Szmaragd, C.; Balloux, F. (2007): The population genomics of hepatitis B virus. In: *Molecular ecology* 16 (22), S. 4747–4758. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03564.x.
- Tacke, F.; Amini-Bavil-Olyaei, S.; Heim, A.; Luedde, T.; Manns, M. P.; Trautwein, C. (2007): Acute hepatitis B virus infection by genotype F despite successful vaccination in an immune-competent German patient. In: *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 38 (4), S. 353–357. DOI: 10.1016/j.jcv.2006.12.024.

- Tamada, Y.; Yatsushashi, H.; Masaki, N.; Nakamuta, M.; Mita, E.; Komatsu, T. et al. (2012): Hepatitis B virus strains of subgenotype A2 with an identical sequence spreading rapidly from the capital region to all over Japan in patients with acute hepatitis B. In: *Gut* 61 (5), S. 765–773. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300832.
- Tanaka, Y.; Hasegawa, I.; Kato, T.; Orito, E.; Hirashima, N.; Acharya, S. K. et al. (2004): A case-control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 40 (3), S. 747–755. DOI: 10.1002/hep.20365.
- Te, H. S.; Jensen, D. M. (2010): Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. In: *Clinics in liver disease* 14 (1), 1-21, vii. DOI: 10.1016/j.cld.2009.11.009.
- Tillmann, Hans L.; Zachou, Kalliopi; Dalekos, George N. (2012): Management of severe acute to fulminant hepatitis B: to treat or not to treat or when to treat? In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 32 (4), S. 544–553. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2011.02682.x.
- TJIO, J. H.; PUCK, T. T. (1958): Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. In: *The Journal of experimental medicine* 108 (2), S. 259–268.
- Tong, Myron J.; Trieu, Judy (2013): Hepatitis B inactive carriers: clinical course and outcomes. In: *Journal of digestive diseases* 14 (6), S. 311–317. DOI: 10.1111/1751-2980.12051.
- Tong, S.; Revill, P. (2016): Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. In: *Journal of hepatology* 64 (1 Suppl), S4-S16. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.01.027.
- Tosun, S.; Deveci, S.; Kaplan, Y.; Kasirga, E. (2011): Should a booster dose be administered in children after mass immunization for hepatitis B? In: *Hepatitis monthly* 11 (6), S. 440–444.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (9), S. 4350–4354.
- Tugendheim (2016): Hepatitis B. Online verfügbar unter http://www.tugendheim.de/impfen/impfungen/hep_b/hepatitis_b.html.
- 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* 76 (4), S. 1986–1990.

- van Damme, P.; Zanetti, A. R.; Shouval, D.; van Herck, K. (2010): Strategies for global prevention of hepatitis B virus infection. In: *Advances in experimental medicine and biology* 659, S. 175–188. DOI: 10.1007/978-1-4419-0981-7_14.
- van Hemert, Formijn J.; van de Klundert, Maarten A A; Lukashov, Vladimir V.; Kootstra, Neeltje A.; Berkhout, Ben; Zaaijer, Hans L. (2011): Protein X of hepatitis B virus: origin and structure similarity with the central domain of DNA glycosylase. In: *PloS one* 6 (8), e23392. DOI: 10.1371/journal.pone.0023392.
- Vieth, S.; Manegold, C.; Drosten, C.; Nippraschk, T.; Gunther, S. (2002): Sequence and phylogenetic analysis of hepatitis B virus genotype G isolated in Germany. In: *Virus genes* 24 (2), S. 153–156.
- Waguri, S.; Dewitte, F.; Le Borgne, R.; Rouille, Y.; Uchiyama, Y.; Dubremetz, J. F.; Hoflack, B. (2003): Visualization of TGN to endosome trafficking through fluorescently labeled MPR and AP-1 in living cells. In: *Molecular biology of the cell* 14 (1), S. 142–155. DOI: 10.1091/mbc.E02-06-0338.
- 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: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (24), S. 10205–10210. DOI: 10.1073/pnas.0704000104.
- Weber, C. J. (2004): Update on viral hepatitis. In: *Urologic nursing* 24 (1), S. 56–57.
- Westland, C.; Delaney, W., 4th.; Yang, H.; Chen, S. S.; Marcellin, P.; Hadziyannis, S. et al. (2003): Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adefovir dipivoxil. In: *Gastroenterology* 125 (1), S. 107–116.
- WHO (2015): Hepatitis B. Online verfügbar unter <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo20022/en/index1.html>.
- Wiegand, J.; Wedemeyer, H.; Finger, A.; Heidrich, B.; Rosenau, J.; Michel, G. et al. (2008): A decline in hepatitis B virus surface antigen (hbsag) predicts clearance, but does not correlate with quantitative hbeag or HBV DNA levels. In: *Antiviral therapy* 13 (4), S. 547–554.
- Wieland, S.; Thimme, R.; Purcell, R. H.; Chisari, F. V. (2004): Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (17), S. 6669–6674. DOI: 10.1073/pnas.0401771101.

- Wieland, S. F.; Chisari, F. V. (2005): Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. In: *Journal of virology* 79 (15), S. 9369–9380. DOI: 10.1128/JVI.79.15.9369-9380.2005.
- Wollersheim, M.; Debelka, U.; Hofschneider, P. H. (1988): A transactivating function encoded in the hepatitis B virus X gene is conserved in the integrated state. In: *Oncogene* 3 (5), S. 545–552.
- Wursthorn, K.; Lutgehetmann, M.; Dandri, M.; Volz, T.; Buggisch, P.; Zollner, B. et al. (2006): Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 44 (3), S. 675–684. DOI: 10.1002/hep.21282.
- Yan, Huan; Zhong, Guocai; Xu, Guangwei; He, Wenhui; Jing, Zhiyi; Gao, Zhenchao et al. (2012): Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. In: *eLife* 1, e00049. DOI: 10.7554/eLife.00049.
- Yang, H. C.; Kao, J. H. (2014): Persistence of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in hepatocytes: molecular mechanisms and clinical significance. In: *Emerging microbes & infections* 3 (9), e64. DOI: 10.1038/emi.2014.64.
- Yang, Z.; Lauder, I. J.; Lin, H. J. (1995): Molecular evolution of the hepatitis B virus genome. In: *Journal of molecular evolution* 41 (5), S. 587–596.
- You, Chan Ran; Lee, Sung Won; Jang, Jeong Won; Yoon, Seung Kew (2014): Update on hepatitis B virus infection. In: *World journal of gastroenterology* 20 (37), S. 13293–13305. DOI: 10.3748/wjg.v20.i37.13293.
- Yuen, M. F.; Lai, C. L. (2007): Hepatitis B virus genotypes: natural history and implications for treatment. In: *Expert review of gastroenterology & hepatology* 1 (2), S. 321–328. DOI: 10.1586/17474124.1.2.321.
- Yuen, M. F.; Tanaka, Y.; Fong, D. Y.; Fung, J.; Wong, D. K.; Yuen, J. C. et al. (2009): Independent risk factors and predictive score for the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B. In: *Journal of hepatology* 50 (1), S. 80–88. DOI: 10.1016/j.jhep.2008.07.023.
- Zanetti, A. R.; van Damme, P.; Shouval, D. (2008): The global impact of vaccination against hepatitis B: a historical overview. In: *Vaccine* 26 (49), S. 6266–6273. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.09.056.

Zuckerman, A. J. (2000): Effect of hepatitis B virus mutants on efficacy of vaccination. In: *Lancet (London, England)* 355 (9213), S. 1382–1384. DOI: 10.1016/S0140-6736

9 ANHANG

9.1 Plasmidkarten

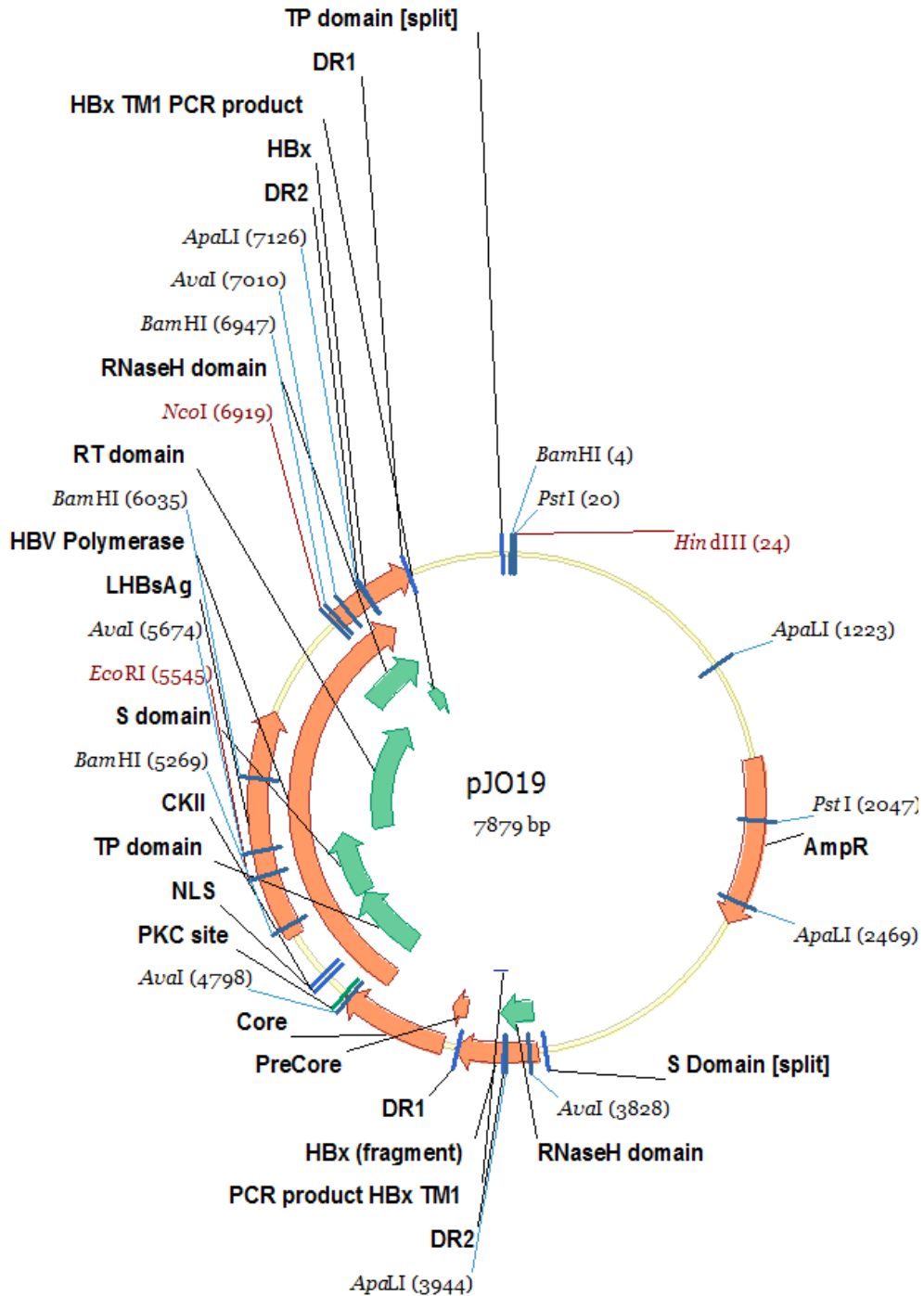


Abb.46: Plasmidkarte von pJo19 (nach Lupberger et al. 2013). Wichtige Domänen und Restriktionsstellen wurden entsprechend markiert.

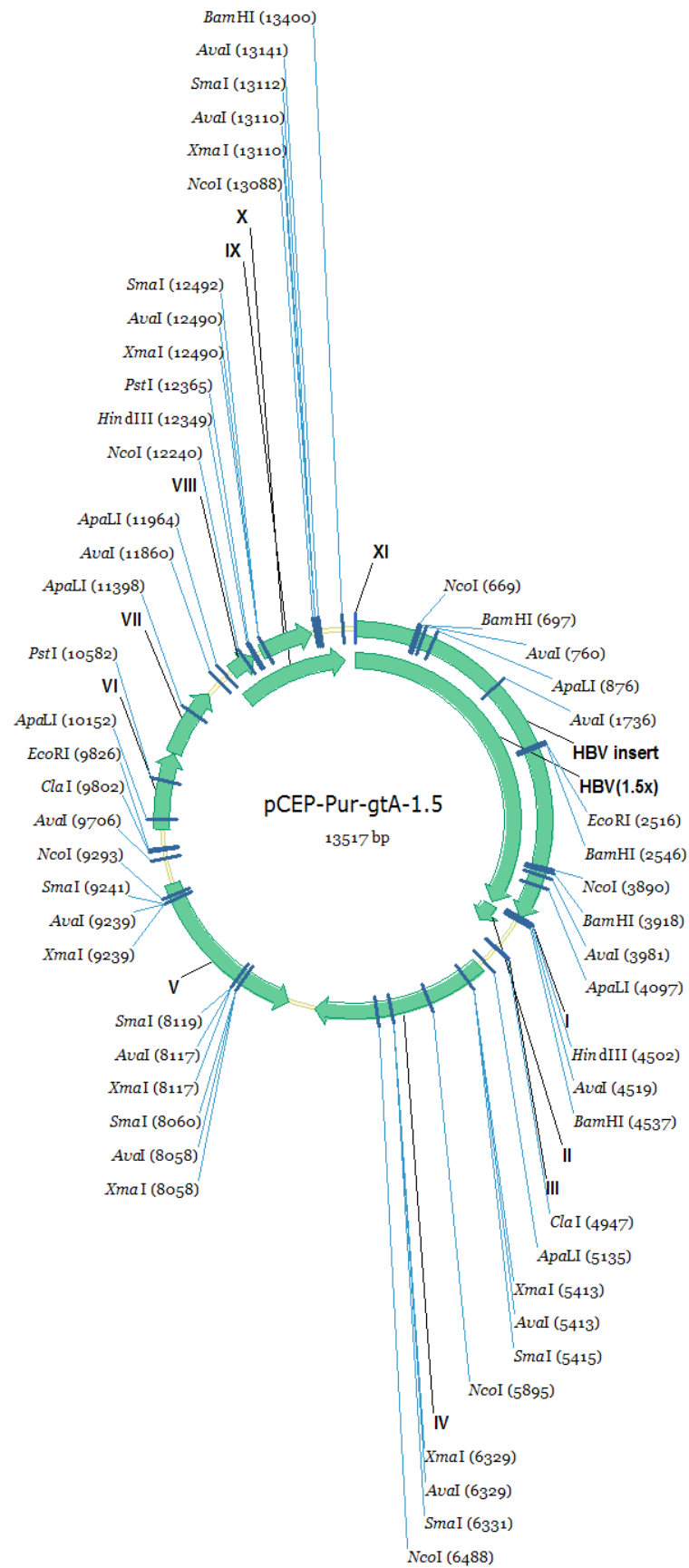


Abb. 47: Plasmidkarte von pCEP-Pur-GtA-1.5 (beispielhaft für pCEP-Pur-gtA-1.5/pCEP-Pur-gtB-1.5/pCEP-Pur-GtC-1.5/pCEP-Pur-GtG-1.5) nach Diss. H. Nienkamp 2014. Wichtige Domänen und Restriktionsstellen wurden entsprechend markiert.

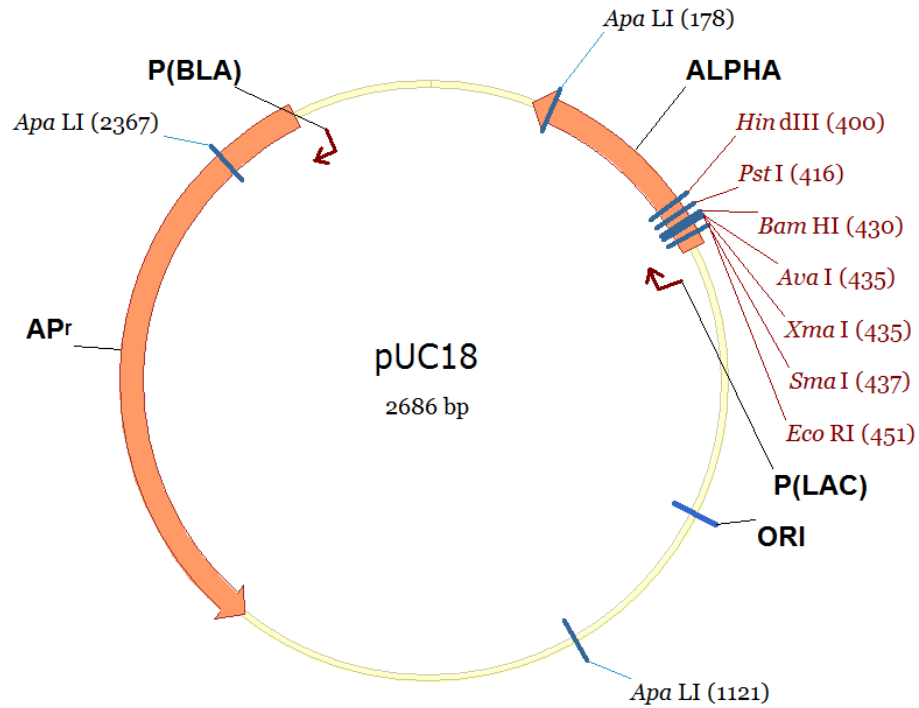


Abb. 48: Plasmidkarte des Kontrollvektors pUC18. Wichtige Domänen und Restriktionsstellen wurden entsprechend markiert.

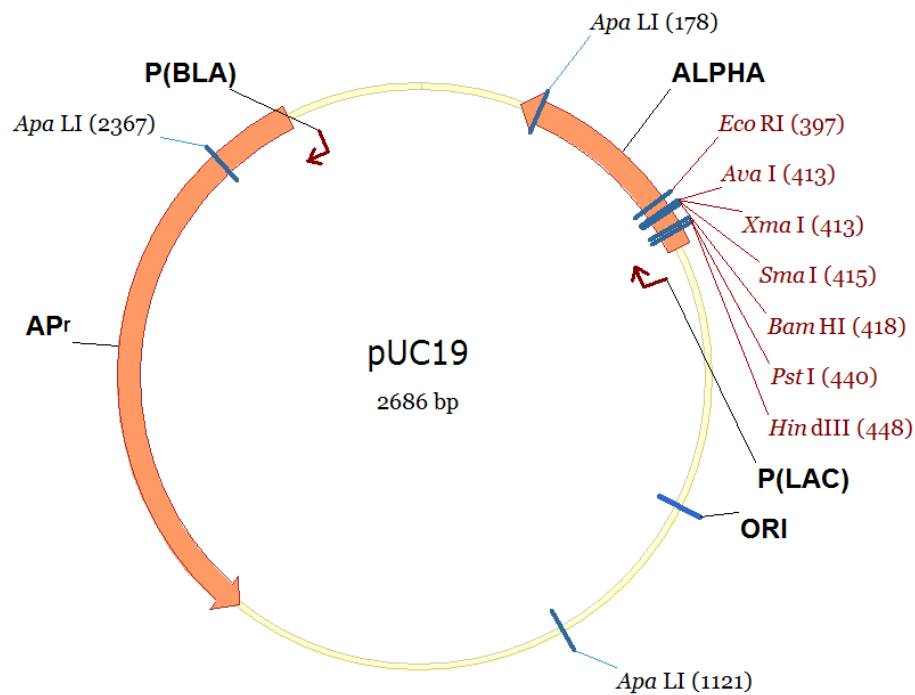


Abb. 49: Plasmidkarte des Kontrollvektors pUC19. Wichtige Domänen und Restriktionsstellen wurden entsprechend markiert.

9.2 Abkürzungsverzeichnis

In diesem Verzeichnis nicht aufgeführt sind:

- SI- (und davon abgeleitete) Einheiten
- aus dem Periodensystem der Elemente bekannte Kürzel chemischer Elemente
- im DUDEN zu findende, alltägliche Abkürzungen

× g	Vielfaches der Erdanziehungskraft
(C)LSM	<i>(confocal) laser scanning microscope</i>
(v/v)	<i>volume/volume</i>
(w/v)	<i>weight/volume</i>
(w/w)	<i>weight/weight</i>
2D	Zweidimensional
AAVS1	<i>adeno-associated virus integration site 1</i>
Abb.	Abbildung
ABR	Australische Aborigines
ad	auf (lat.)
AG	Arbeitsgruppe
AgNO ₃	Silbernitrat
AK	Arbeitskreis
Anti-HBc	<i>hepatitis B core protein antibody</i>
Anti-XXX	XXX-spezifischer Antikörper
APS	Ammoniumperoxosulfat
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
AuAg	<i>Australia Antigen</i>
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BSL	<i>biosafety level</i>
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i>
CCD	<i>charge-coupled device</i>

CEU	Europäische Urlinie
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CI-M6PR	<i>cation-independent mannose-6-phosphate receptor</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cRaf/Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma protein; Isoform C</i>
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	<i>double-distilled water</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
Diss.	Dissertationsschrift
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyrebonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiimintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	<i>ER-Golgi intermediate compartement</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinases</i>
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
EtOH	Ethanol
extra	extrazellulär
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>

FKS	fötales Kälberserum
G418	Geneticin
GalT	1,4-Galactosyltransferase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ggMHBs	<i>double-glycosylated middle hepatitis B surface protein</i>
gLHBs	<i>glycosylated large hepatitis B surface protein</i>
gMHBs	<i>glycosylated middle hepatitis B surface protein</i>
GRASP65	Golgi-assoziiertes Protein GRASP65
gSHBs	<i>glycosylated small hepatitis B surface protein</i>
GtX	HBV-Genotyp X
H51P	Austausch von Histidin an Stelle 51 durch Prolin
HAc	Essigsäure
HAN	Chinesische Han-Linie
HBc	<i>hepatitis B core protein</i>
HBcAg	<i>hepatitis B core antigen</i>
HBcAg	<i>hepatitis B (enigmatic) precore antigen</i>
HBsAg	<i>hepatitis B surface antigen</i>
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBx	<i>hepatitis B x protein</i>
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i>
HCl	Salzsäure
I84T	Austausch von Isoleucin an Stelle 84 durch Threonin
ICBS	<i>international consortium for blood safety</i>
IFN α	Interferon Alpha
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
intra	intrazellulär
IU	<i>international unit</i>
K/R/I	Aminosäuren (Standard-Nomenklatur)
Kap.	Kapitel

kB	tausend Basenpaare
kDa	kilo-Dalton
kyBP	<i>thousand years before present</i>
LB	<i>lysogenic broth</i>
LHBs	<i>large hepatitis B surface protein</i>
M	molar
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBV	<i>multivesicular body</i>
MEK	MAPK/ERK Kinase
MeOH	Methanol
MHBs	<i>middle hepatitis B surface protein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mutGtG	mutierte Variante des HBV-Genotyps G
MW	<i>molecular weight</i>
n	Anzahl der analysierten Experimente
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NfκB	<i>Nuclear factor κ B</i>
NTCP	<i>Na⁺-Taurochlorat co-transporting polypeptide</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
p	<i>possibility</i>
p53	Tumor-Suppressor-Protein (Schutz vor DNA-Schäden)
PAGE	Polyakryl-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PEI	Polyethylenimin
PEI-U	<i>PEI unit</i>

pgRNA	<i>pregenomic RNA</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydrogenium-Ionen-Aktivität
PKC	Protein-Kinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PreS1	Hepatitis-B-Virus PreS1-Domäne
PreS2	Hepatitis-B-Virus PreS2-Domäne
PS	Patienten-Seren
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	<i>quantitative realtime PCR</i>
RAB7	<i>Ras-related protein Rab-7</i>
Ras	<i>rat sarcoma (Proto-Onkogen)</i>
rcDNA	<i>relaxed circular DNA</i>
rHBsAg	<i>recombinant hepatitis B virus surface antigen</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAseH	Ribonuklease H
S	Hepatitis-B-Virus S-Domäne
s/co	<i>signal through cut-off</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
Sec22	<i>Vesicle-trafficking protein SEC22</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SHBs	<i>small hepatitis B surface protein</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor</i>
SVP	<i>subviral particle</i>
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGN46	<i>trans-Golgi network protein 46</i>
TLM	Translokationsmotiv

TM	Transmembran-Domäne
TNE	Tris/NaCl/EDTA-Puffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>t</i> -SNARE	<i>target synaptosome-associated protein receptor</i>
TXLNA	alpha-Taxilin
U	<i>unit</i> /Enzymeinheit
ÜS	Zellkultur-Überstand
UV	ultraviolett
VPS4	<i>vacuolar protein sorting-associated protein 4</i>
<i>w/wo</i>	<i>with/without</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
YRI	Yoruba Urstamm
ZFN	Zinkfinger-Endonuklease
λ	Wellenlänge

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:

Name: Matthias Hassemer
Adresse: Schulstraße 5
55435 Gau-Algesheim
Deutschland
Geburtsdatum: 30.05.1986
Geburtsort: Bingen (Rhein)
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig
Email-Adresse: Hassemer.Matthias@gmail.com

Hochschulstudium:

Seit 10/2013 Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
Promotionsstudiengang Chemie im Fachbereich Biochemie
4/2006–5/2012 Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
Diplom-Studiengang Chemie, Fachrichtung Biochemie
Gesamturteil: sehr gut
Titel der Abschluss-Arbeit: „Clusterin – Charakterisierung verschiedener Funktionen und Regulationsmechanismen“

Beruflicher Werdegang

05/2013–05/2016 PhD-Student im Fachgebiet Virologie am Paul-Ehrlich-Institut in Langen (Bundesinstitut im Geschäftsbereich des BMG) in der Arbeitsgruppe von Prof. Eberhard Hildt
Titel der Arbeit: „Vergleichende Charakterisierung der Oberflächenproteine von verschiedenen Hepatitis-B-Virus-Genotypen“
06/2012–11/2012 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Fachbereich Biochemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in der Arbeitsgruppe von Prof. Claudia Koch-Brandt

Schulbildung

08/1996–03/2005 Stefan-George-Gymnasium, Bingen am Rhein,
Abschluss: Abitur

Zivildienst

04/2005–12/2005 Deutsches Rotes Kreuz, Rettungsdienst Rheinhessen-Nahe gGmbH
inkl. erfolgreicher Ausbildung zum Rettungssanitäter

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt habe.

Gau-Algesheim, 08.08.2016, Matthias Hassemer

Datum, Unterschrift