

Charakterisierung der funktionellen Relevanz des
zellulären Proteins α -Taxilin als
potentieller Co-Rezeptor für das
Hepatitis-B-Virus

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
(Dr. rer. nat.)

im Promotionsfach Pharmazie

Vorgelegt dem Fachbereich für Chemie, Pharmazie,
und Geowissenschaften
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

von
Catrina Spengler
geboren in Frankfurt am Main

Mainz, 2020
(D77)

vom Fachbereich 09 der Johannes-Gutenberg-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

[REDACTED]

1. Berichterstatter:

[REDACTED]

2. Berichterstatter:

[REDACTED]

Datum der mündlichen Prüfung: 12. August 2020

*Overhead the albatross
Hangs motionless upon the air
And deep beneath the rolling waves
In labyrinths of coral caves
The echo of a distant tide
Comes willowing across the sand
And everything is green and submarine*

(Echoes, Pink Floyd, 1971)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Hepatitis-B-Virus-Infektion	1
1.1.2	Virale Hepatitis	1
1.1.3	Epidemiologie und Transmission	1
1.1.4	Pathogenese der akuten HBV-Infektion	3
1.1.5	Pathogenese der chronischen HBV-Infektion	5
1.1.6	Prävention und Therapie	7
1.2	Das Hepatitis-B-Virus	10
1.2.1	Geschichte	10
1.2.2	Klassifizierung	10
1.2.3	Morphologie und Struktur viraler Partikel	11
1.2.4	Genomorganisation	12
1.2.5	Die viralen Oberflächenproteine	15
1.2.6	Der virale Replikationszyklus	19
1.3	<i>In vitro</i> Infektionssysteme	24
1.4	<i>Sodium taurocholate co-transporting polypeptide</i>	25
1.5	Annexin A5	26
1.6	α -Taxilin	27
2.	Ziel der Arbeit	29
3.	Material	30
3.1	Zellen	30
3.1.1	prokaryotische Zellen	30
3.1.2	eukaryotische Zellen	30
3.2	Plasmide	31
3.3	Enzyme	32
3.4	Oligonukleotide	33
3.4.1	Klonierungsoligonukleotide	33

3.4.2	Sequenzierungsprimer	33
3.4.3	RT-qPCR-Primer.....	34
3.5	Antikörper.....	34
3.5.1	Primärantikörper.....	34
3.5.2	Sekundärantikörper	35
3.6	Fluoreszenzfarbstoffe.....	36
3.7	Marker.....	36
3.7.1	DNA-Marker	36
3.7.2	Protein-Marker	37
3.8	Inhibitoren	37
3.9	Lösungen für die Zellkultur	37
3.10	Medien	38
3.11	Chemikalien	39
3.12	Puffer und Lösungen	42
3.12.1	Puffer.....	42
3.12.2	Spezielle Puffer zur Proteinreinigung	44
3.12.3	Lösungen	45
3.13	Kits.....	46
3.14	Geräte.....	46
3.14.1	Elektrophorese.....	46
3.14.2	Chromatographie	46
3.14.3	Imaging	46
3.14.4	<i>Surface Plasmon Resonance</i> Spektroskopie.....	47
3.14.5	Mikroskope.....	47
3.14.6	Durchflusszytometer.....	47
3.14.7	PCR-Cycler	47
3.14.8	Zentrifugen.....	48
3.14.9	Weitere Geräte.....	48
3.15	Verbrauchsmaterialien	49
3.16	Software.....	50

4. Methoden	52
4.1 Zellbiologische Methoden.....	52
4.1.1 Prokaryotische Zellkultur	52
4.1.2 Eukaryotische Zellkultur	52
4.1.3 Differenzierung von HepaRG-Zellen.....	53
4.1.4 Infektion von Sf9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren	54
4.1.5 Transfektion von HepaRG-Zellen	54
4.1.6 Transfektion von HepG2-hNTCP-Zellen.....	54
4.1.7 Selektion und Kultivierung monoklonaler TXLNA- <i>Knockout</i> HepaRG-Zellen ...	55
4.1.8 Präzipitation und Konzentrierung viraler Partikel aus Zellkulturüberstand.....	55
4.1.9 Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus	55
4.1.10 Infektionsinhibition.....	56
4.1.11 Infektionskompetition.....	56
4.1.12 Zellernte und Zellyse	57
4.1.12.1 Proteinlysate für Western Blot Analysen	57
4.1.12.2 Proteinlysate für CoIP-Experimente	57
4.2 Molekularbiologische Methoden	57
4.2.1 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA.....	57
4.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA.....	57
4.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	58
4.2.4 Klonierung der sgRNAs in PX459-Plasmide.....	58
4.2.5 Bestimmung der <i>Genome Targeting</i> -Effizienz	58
4.2.6 Agarosegelelektrophorese.....	58
4.2.7 Isolierung von Gesamt-RNA.....	59
4.2.8 cDNA-Synthese.....	59
4.2.9 <i>Real-Time</i> qPCR.....	60
4.3 Proteinbiochemische Methoden	61
4.3.1 Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	61
4.3.2 Produktion rekombinanter Proteine in Sf9-Zellen	61
4.3.3 Zellaufschluss unter denaturierenden Bedingungen.....	62

4.3.4	Chromatographie	62
4.3.4.1	Nickel-NTA-Affinitätschromatographie	62
4.3.4.2	Strep-Tactin-Affinitätschromatographie	62
4.3.5	Dialyse	63
4.3.6	Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie	63
4.3.7	Oberflächenbiotinylierung.....	64
4.3.8	Bradford-Assay	64
4.3.9	SDS-PAGE	65
4.4	Immunologische Methoden	65
4.4.1	Western Blot	65
4.4.2	Peptid-Microarray.....	66
4.4.3	Immunpräzipitation biotinylierter Oberflächenproteine	67
4.4.4	Co-Immunpräzipitation	67
4.4.5	Durchflusszytometrie.....	68
4.4.6	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	69
4.4.7	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	69
4.5	Mikroskopie.....	70
4.5.1	Konfokale <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskopie	70
4.5.2	<i>Super-Resolution</i> -Mikroskopie	70
4.6	Statistische Methoden	71
5.	Ergebnisse	72
5.1	α -Taxilin bindet direkt an die Rezeptorbindedomäne des Hepatitis-B-Virus.....	72
5.2	PreS bindet mit moderater Affinität an α -Taxilin.....	73
5.3	Leichte Reduktion der α -Taxilin-Proteinmenge im Zuge der Differenzierung von HepaRG-Zellen	74
5.4	α -Taxilin befindet sich an der Plasmamembran HBV-suszeptibler Zellen	76
5.5	α -Taxilin colokalisiert mit Annexin A5 und NTCP an der Plasmamembran HBV-suszeptibler Zellen	79
5.6	HBV-suszeptible Zellen exponieren α -Taxilin an der Zelloberfläche	82
5.7	α -Taxilin interagiert direkt mit Annexin A5, nicht jedoch mit NTCP	83

5.8	Relevanz von α -Taxilin für den <i>Entry</i> -Prozess des Hepatitis-B-Virus.....	85
5.8.1	Etablierung der Infektion mit aus Zellkulturüberstand isoliertem HBV.....	85
5.8.2	Signifikante Hemmung der HBV-Infektion durch α -Taxilin-spezifische Antikörper.....	87
5.8.3	Signifikante Hemmung der HBV-Infektion durch eine Vorinkubation von HBV mit rekombinantem α -Taxilin-Protein.....	90
5.8.4	Die HBV-Infektion kann durch eine Vorinkubation von PHH mit rekombinantem α -Taxilin-Protein signifikant vermindert werden.....	92
5.9	Herstellung und Charakterisierung stabiler monoklonaler HepaRG-TXLNA- <i>Knockout</i> -Zellen.....	94
5.9.1	HepaRG-TXLNA- <i>Knockout</i> -Zellen können nicht mit HBV infiziert werden.....	95
5.10	Signifikant höhere Anzahl infizierter Zellen durch zusätzliche Überexpression von α -Taxilin in HepG2-hNTCP-Zellen.....	99
6.	Diskussion.....	103
7.	Zusammenfassung.....	113
8.	Referenzen.....	115
9.	Abkürzungen.....	131
10.	Anhang.....	136
10.1	Protokoll zur Generierung monoklonaler <i>Knockout</i> -Zelllinien mittels CRISPR/Cas9-System.....	136
10.2	Aminosäuresequenz von mCherry-markiertem α -Taxilin.....	139
11.	Danksagung.....	140
12.	Lebenslauf.....	141
13.	Eidesstattliche Erklärung.....	143

1. Einleitung

1.1 Hepatitis-B-Virus-Infektion

1.1.2 Virale Hepatitis

Eine Entzündung der Leber, eine sogenannte Hepatitis, kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden. Neben Giften, Alkohol oder Medikamenten – in eher seltenen Fällen auch Bakterien oder Parasiten – ist meist eine Virus-Infektion Ursache der Hepatitis. Dabei kann die virale, infektiöse Hepatitis als Virusbegleithepatitis auftreten – als Begleiterscheinung einer Infektion mit nicht primär die Leber infizierenden Viren, wie sie beispielsweise im Zuge des Pfeifferschen Drüsenfiebers, ausgelöst durch das Epstein-Barr-Virus (EBV), auftreten kann – oder, wie es hauptsächlich der Fall ist, als Folge einer Infektion mit einem sogenannten Hepatitis-Virus, welche dann als Virushepatitis bezeichnet wird. Hepatitis-Viren können in fünf Hauptgruppen unterteilt werden (A, B, C, D, E), wobei die durch das Hepatitis-B-Virus (HBV) verursachte Hepatitis B die weltweit am häufigsten auftretende Form der Virushepatitis darstellt [1,2]. Eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus kann asymptomatisch, akut oder chronisch verlaufen. Eine akute HBV-Infektion heilt bei Erwachsenen in den meisten Fällen von alleine aus und weist eine Chronifizierungsrate von unter 5 % auf [3]. Infizieren sich allerdings Neugeborene oder Kinder im ersten Lebensjahr, so verläuft die Hepatitis B in etwa 90 % der Fälle chronisch [3]. Eine chronische Hepatitis-B-Virus-Infektion geht immer mit einem um etwa 30 % gesteigerten Risiko, eine Leberzirrhose und/oder ein hepatozelluläres Karzinom (*hepatocellular carcinoma*, HCC) zu entwickeln, einher [3,4].

1.1.3 Epidemiologie und Transmission

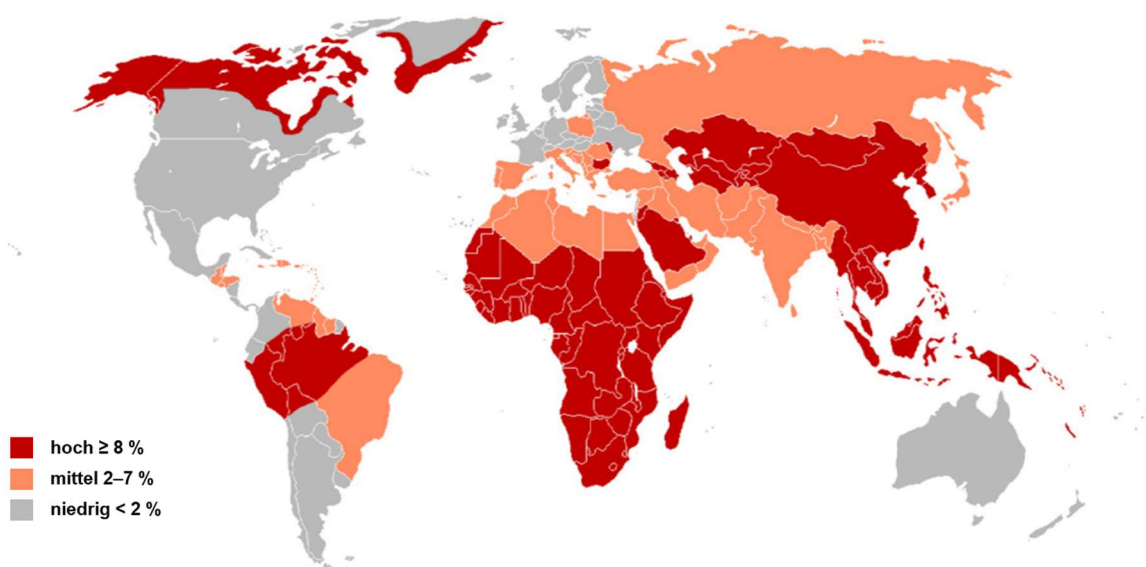
Eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus stellt noch immer ein globales Gesundheitsproblem dar [1,3]. Weltweit waren bisher mehr als zwei Milliarden Menschen – etwa ein Drittel der Weltbevölkerung – mit dem Hepatitis-B-Virus infiziert [4–6]. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (*world health organisation*, WHO) leiden derzeit etwa 257 Millionen Menschen an einer chronischen HBV-Infektion, im Jahr 2015 wurden zudem etwa 887.000 HBV-assoziierte Todesfälle verzeichnet, meist als Folge schwerwiegender Leberschädigungen [3]. Eine chronische Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus stellt die häufigste Ursache für ein HCC dar. Etwa 50 % – in hochendemischen Regionen sogar bis zu 80 % – der primären Leberzelltumore sind auf das Hepatitis-B-Virus zurückzuführen [7].

Regionen und Länder, welche eine Prävalenz von mehr als 8 % aufweisen, werden als hochendemic bezeichnet. Dazu zählen neben Ländern aus Subsahara-Afrika Gebiete in der westlichen Pazifik-Region (Abb. 1). In Ost- und Süd-Europa sowie Russland, Süd-Ost-Asien

und Zentral- und Südamerika wurden Prävalenzen von 2–7 % ermittelt. Die niedrigsten Prävalenzen sind in den USA, in West-Europa und Australien zu verzeichnen, wo weniger als 1 % der dortigen Bevölkerung chronisch mit HBV infiziert ist [4,5,8].

Das Hepatitis-B-Virus kann parenteral, d. h. über direkten Blutkontakt unter Umgehung des Darmtraktes, perinatal sowie mukosal übertragen werden. Am häufigsten erfolgt die Transmission des Hepatitis-B-Virus – vor allem in hochendemischen Gebieten – vertikal von der infizierten Mutter auf das neugeborene Kind während der Geburt (perinatale Transmission). Nahezu 100 % der Kinder infizierter Mütter werden so bei der Geburt angesteckt, wenn keine umgehende Vakzinierung sowie Immunglobulin-Gabe erfolgt [4]. In Regionen mit niedriger Endemizität erfolgt die HBV-Transmission zumeist horizontal im Erwachsenenalter bei Kontakt mit infektiösem Blut, Speichel, Vaginal- oder Samenflüssigkeit. Intravenöser Drogenkonsum mit mehrfach verwendeten Nadeln und Spritzen sowie häufig wechselnde (nicht geimpfte) Sexualpartner sind in diesen Gebieten die Hauptursachen einer Ansteckung [4,5]. Eine horizontale Übertragung des Virus wird weiterhin dadurch begünstigt, dass das Hepatitis-B-Virus bis zu sieben Tage außerhalb des Körpers infektiös bleibt [9].

Das Risiko eine chronische Hepatitis B zu entwickeln hängt invers von dem Alter zur Zeit der Ansteckung ab und korreliert damit auch mit der Art der Übertragung. Die perinatale Ansteckung führt bei 90 % der Kinder zu einer chronischen Infektion, horizontale Ansteckungen bei Ein- bis Fünfjährigen haben in 20–60 % der Fälle einen chronischen Verlauf der Infektion zur Folge, eine horizontale Ansteckung im Erwachsenenalter resultiert dahingegen nur bei weniger als 5 % der Infizierten in einer Chronifizierung [4].



◀ Abbildung 1: Globale Epidemiologie der HBV-Infektion.

Die Karte zeigt die globale Verteilung der Prävalenzen für eine HBV-Infektion. In Subsahara-Afrika, Teilen Südamerikas sowie Ländern der westlichen Pazifik-Region ist die Prävalenz mit mehr als 8 % am höchsten. Der Norden Afrikas sowie Süd- und Ost-Europa, Russland, Süd-Ost-Asien und Teile Zentral- und Südamerikas sind mit Prävalenzen von 2–7 % Gebiete intermediärer Endemizität. Die mit unter 2 % niedrigste Prävalenz für eine HBV-Infektion haben West-Europa, Australien und die größten Teile Nord- und Südamerikas. Modifiziert nach [10].

1.1.4 Pathogenese der akuten HBV-Infektion

Eine akute Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus verläuft bei etwa zwei Drittel der Patienten asymptomatisch, d. h. ohne klinische Symptome und heilt von selbst aus [11]. Etwa ein Drittel der akut Infizierten entwickeln milde Symptome wie Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Fieber sowie Muskel- und Gliederschmerzen bis hin zu schwerwiegenderen Symptomen, welche Schmerzen im Oberbauch, starke Übelkeit und Erbrechen und den für eine Hepatitis charakteristischen Ikterus (Gelbsucht) umfassen [2, 11]. Bei etwa einem Prozent der infizierten Patienten entwickelt sich die akute HBV-Infektion zu einer lebensbedrohlichen fulminanten Hepatitis, welche durch ein massives Absterben des Leberparenchyms und einer dadurch bedingten drastisch verminderten Funktionsfähigkeit der Leber charakterisiert ist und zu akutem Leberversagen führt [11,12]. Klinisch kennzeichnend für ein akutes Leberversagen sind – bedingt durch die Abnahme der Lebersyntheseleistung sowie durch eine unzureichende Entgiftungsfunktion, was in der Akkumulation toxischer Stoffwechselprodukte resultiert – eine Störung der Blutgerinnung (Koagulopathie) und die hepatische Enzephalopathie, welche sich durch Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma manifestiert [13,14].

Auf die initiale Infektion folgt eine Inkubationszeit von durchschnittlich zwei bis drei Monaten [3,11]. Als erste virale Marker können HBV-DNA gefolgt von HBsAg (*hepatitis B surface antigen*) und HBeAg (*hepatitis B e antigen*) im Serum detektiert werden (Abb. 2) [11,15]. Das Auftreten von HBeAg korreliert dabei mit einer hohen replikativen Aktivität sowie mit einer hohen Infektiosität des Virus [16]. Parallel dazu kann ein Anstieg der Leberenzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) im Serum beobachtet werden (Abb. 2). Während dieser Phase können unspezifische Frühsymptome auftreten, die für eine HBV-Infektion nicht charakteristisch sind und oftmals ignoriert werden [2,13]. Nach dieser prodromalen Phase folgt die ikterische Phase, während der die Patienten die für eine Hepatitis charakteristische Gelbsucht entwickeln. Während dieser akuten Krankheitsphase nehmen die HBV-DNA- und HBsAg-Level im Serum deutlich ab und auch die Menge an HBeAg im Serum sinkt [11]. Gleichzeitig werden während dieser akuten Phase der Infektion HBcAg(*hepatitis B core antigen*)-spezifische und HBeAg-spezifische Antikörper (IgM) produziert [11,17]. Die Abnahme der HBeAg-Menge im Serum sowie die Präsenz HBeAg-spezifischer Antikörper gelten als serologische Marker für eine Rekonvaleszenz des Patienten [11]. Die anschließende

Genesungsphase zeichnet sich durch ein gänzlich Verschwinden der Symptome sowie die Serokonversion der HBcAg- und HBeAg-spezifischen Antikörper von IgM hin zu IgG sowie durch das Auftreten HBsAg-spezifischer Antikörper (IgG) aus. Gleichzeitig sinken die Serumlevel an HBV-DNA und HBsAg und sind spätestens sechs Monate nach Infektion nicht mehr nachweisbar (Abb. 2). HBsAg-spezifische Antikörper verbleiben auch nach Ausheilen der Infektion im Serum und gelten als Marker für eine Immunität gegen HBV [11,17]. Allerdings entwickeln etwa 10–15 % der genesenen Patienten keine HBsAg-spezifischen Antikörper, weshalb Antikörper gegen HBcAg als diagnostischer Marker für eine vorangegangene HBV-Infektion verwendet werden [18]. Darüber hinaus dient der Nachweis HBcAg-spezifischer Antikörper auch der Unterscheidung einer überstandenen HBV-Infektion von einer erfolgreichen Immunisierung mit einem Hepatitis-B-Impfstoff, da durch diese präventive Vakzinierung ausschließlich die Bildung HBsAg-spezifischer Antikörper induziert wird [11,13]

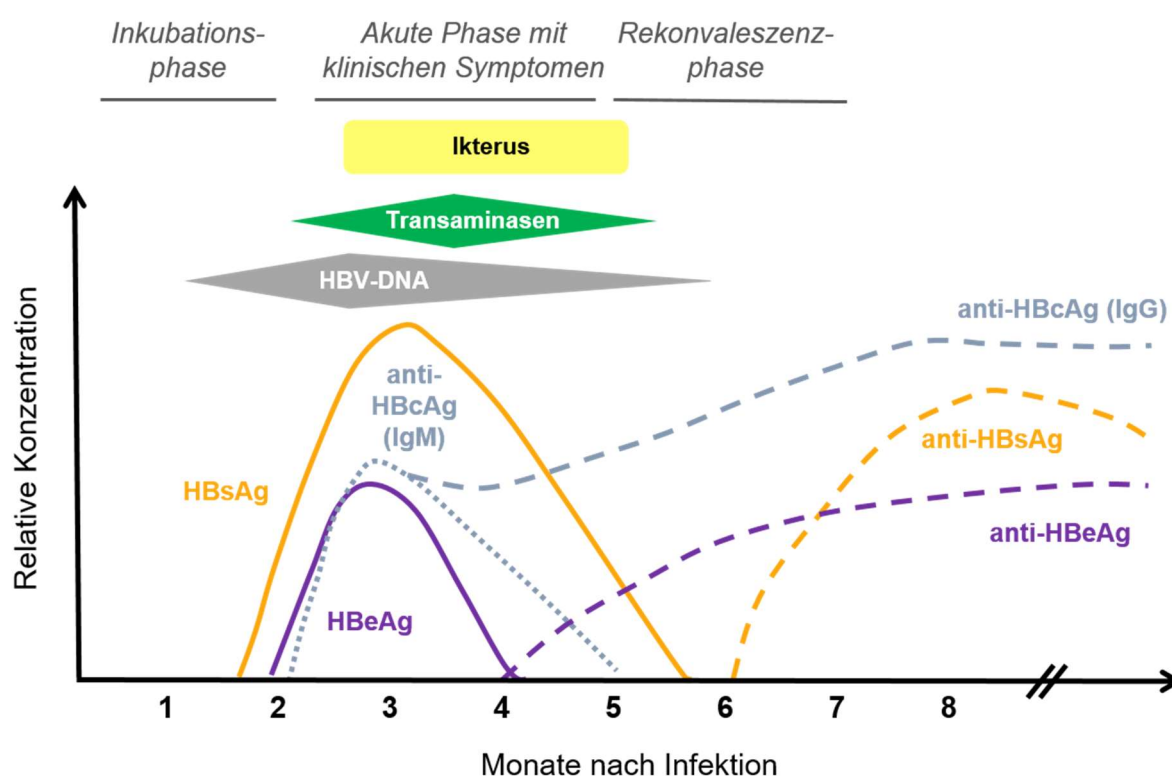


Abbildung 2: Serologischer Verlauf einer akuten HBV-Infektion.

Nach einer Inkubationsphase sind als erste virale Marker HBV-DNA und HBsAg im Serum nachweisbar. Kurz darauf kann HBeAg nachgewiesen werden. Gleichzeitig kommt es zu einem Anstieg der Leberenzyme ALT und AST (Transaminasen) sowie zur Produktion HBcAg-spezifischer Antikörper. Mit Auftreten klinischer Symptome nehmen die HBV-DNA- und HBsAg-Level ab, weiterhin verschwindet HBeAg mit dem Aufkommen HBeAg-spezifischer Antikörper aus dem Serum. HBsAg-spezifische Antikörper werden erst spät nach Rekonvaleszenz gebildet. Nach Ausheilung der Infektion sind weder HBV-DNA noch HBsAg im Serum detektierbar.

Modifiziert nach [11,17,19].

Das Hepatitis-B-Virus selbst ist nicht zytopathisch. Die pathogenen, die Leber schädigenden Prozesse werden vielmehr durch das wirtseigene Immunsystem verursacht [20–22]. HBV wird als sogenanntes *stealth virus* fast nicht vom angeborenen Immunsystem erkannt und induziert somit nach Infektion parenchymaler Hepatozyten auch keine nennenswerte Produktion von Typ I Interferonen (IFN α , IFN β) [23,24]. So kann HBV zunächst einige Zeit ungehindert replizieren, bevor es vom adaptiven Immunsystem erkannt wird. Die Eliminierung des Virus sowie infizierter Hepatozyten – und im Zuge dessen auch die Pathogenese – werden hauptsächlich durch zelluläre Komponenten des adaptiven Immunsystems vermittelt [17]. Schon während des Auftretens erster klinischer Symptome kommt es zur Infiltration der Leber mit CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL) [25]. Die CTL eliminieren zum einen infizierte Hepatozyten durch direkten Kontakt, zum anderen sezernieren sie das Typ II Interferon IFN γ sowie TNF α (*tumor necrosis factor α*), welche zur Inhibition der viralen Replikation und Genexpression führen [26–28]. Die CTL-vermittelte Lyse infizierter Zellen führt dabei zu einem Anstieg der ALT- und AST-Level im Serum [17,29]. Als Reaktion des humoralen Immunsystems werden, induziert durch eine Subgruppe von T-Helferzellen, spezifische Antikörper gegen HBeAg, HBcAg und HBsAg gebildet. Es wird vermutet, dass neutralisierende HBsAg-spezifische Antikörper das Ausbreiten des Virus in der Leber und damit die Infektion weiterer Hepatozyten sowie deren Reinfektion verhindern [22,30]. Insgesamt spielt die humorale Immunantwort aber bei der Beseitigung der HBV-Infektion eine eher untergeordnete Rolle [30]. Nach erfolgreicher Eliminierung des Hepatitis-B-Virus sowie infizierter Zellen verbleiben HBcAg-spezifische (IgG) und neutralisierende HBsAg-spezifische Antikörper im Blut und vermitteln eine lebenslange Immunität gegenüber HBV [17]. Allerdings verbleiben meist auch bei einer ausgeheilten Hepatitis nicht nachweisbare Mengen des Virus im Blut, welche durch das adaptive Immunsystem kontrolliert werden [17], jedoch unter immunsuppressiven Bedingungen, beispielsweise durch eine Chemotherapie, reaktiviert werden können [10,31].

1.1.5 Pathogenese der chronischen HBV-Infektion

Eine chronische Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus zeichnet sich im Allgemeinen durch die Persistenz von HBsAg und HBV-DNA im Serum für mehr als sechs Monate nach der initialen Infektion aus [11,15]. Der Verlauf einer chronischen Hepatitis B (CHB) kann dabei in vier Phasen untergliedert werden [25,32,33]. Die immuntolerante Phase, welche sich bei perinatal infizierten Patienten aufgrund des noch nicht vollständig ausgereiften Immunsystems der Neugeborenen als erste Phase einer CHB etabliert [17], ist durch eine hohe replikative Aktivität des Virus und damit durch die Präsenz von HBeAg und einem hohen Titer von HBV-DNA im Serum bei gleichzeitig normalen Mengen an ALT gekennzeichnet und kann Jahre bis

Jahrzehnte andauern [17,33]. Auf sie folgt eine Phase der immunologischen Aktivität, welche bei CHB-Patienten mit horizontal erworbener HBV-Infektion die erste Phase einer CHB darstellt [32] und mit einer schwerwiegenderen Symptomatik einher geht [17]. Diese *Immune-Clearance*-Phase zeichnet sich durch fluktuierende Mengen an HBeAg und HBV-DNA im Wechsel mit der Serum-ALT aus [17,33]. Die wiederholte Zunahme der Serum-ALT kann dabei auf eine T-Zell-vermittelte Eliminierung infizierter Hepatozyten zurückgeführt werden [32]. Während der immunaktiven Phase kann es zur Produktion HBeAg-spezifischer Antikörper kommen, welche dann eine Phase niedriger replikativer Aktivität einleitet (Abb. 3). Dabei normalisieren sich die ALT-Werte, HBeAg wird aus dem Serum geklärt und die Viruslast sinkt [25]. Dieser Zustand wird auch als *Inactive Carrier State* bezeichnet und kann ein Leben lang anhalten. Bei etwa 20 % der inaktiven Träger kommt es jedoch zu einem spontanen Rückfall mit einer Reaktivierung des Virus [34,35], wobei es sich meist um HBeAg-negative HBV-Varianten mit einer Mutation im PreCore/Core-Promotor handelt (HBeAg-negative chronische Hepatitis B) [17,35].

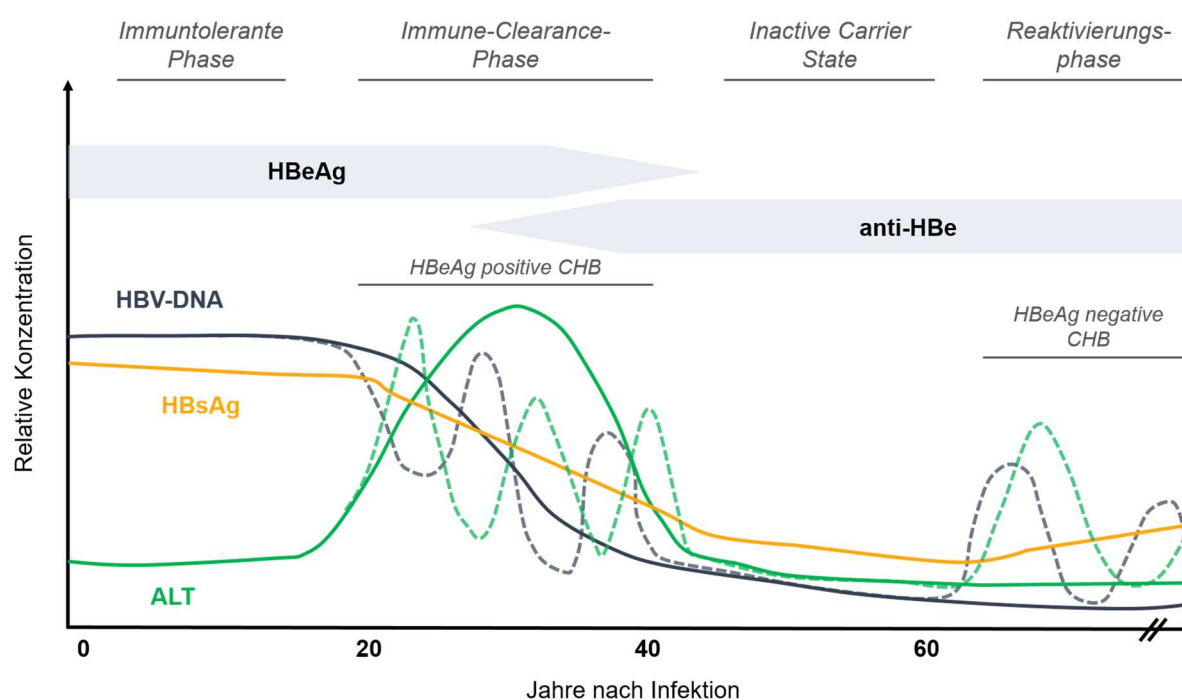


Abbildung 3: Serologischer Verlauf einer chronischen HBV-Infektion nach perinataler Ansteckung.

Während der immuntoleranten Phase, welche durch eine hohe Replikation des Virus charakterisiert ist, können hohe Titer an HBV-DNA sowie HBeAg und HBsAg im Serum nachgewiesen werden, die Serum-ALT-Werte bleiben klinisch unauffällig. Die *Immune-Clearance*-Phase ist durch einen starken Anstieg der Serum-ALT sowie durch eine Reduktion der Viruslast gekennzeichnet, wobei diese Parameter fluktuieren können. Gleichzeitig kommt es zur Serokonversion HBeAg-spezifischer Antikörper und in Folge dessen zum Verlust von HBeAg. Die meisten Patienten verbleiben als inaktive Träger in einer Phase mit niedriger, teils nicht detektierbarer viraler Replikation

◀ (*Inactive Carrier State*). Bei etwa einem Fünftel der CHB-Patienten kommt es zur Reaktivierung des Hepatitis-B-Virus und Viruslast sowie Serum-ALT nehmen wieder zu. Modifiziert nach [33].

Im Vergleich zur akuten HBV-Infektion ist die chronische durch eine nur sehr schwache adaptive Immunantwort charakterisiert [22], welche auf einer signifikant verminderten Aktivität von sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen beruht [25,36,37]. Die ineffiziente CTL-Antwort resultiert zum einen aus einer nur unzureichenden Induktion durch CD4⁺ T-Helferzellen und zum anderen aus der für eine chronische Hepatitis B typischen T-Zellerschöpfung [21,38]. Die Erschöpfung HBV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen entsteht durch die permanente Präsenz viraler Antigene, wie HBeAg und HBsAg, was zur vermehrten Expression inhibitorischer Rezeptoren, wie PD-1 (*programmed death 1*), auf den antiviralen CTL führt [38–40]. Gleichzeitig werden die Liganden dieser inhibitorischen Rezeptoren, z. B. PD-L1 (*PD-1 ligand*), verstärkt im Lebergewebe gebildet, was letztlich eine Hemmung der antiviralen CTL-Antwort bedingt [38]. Darüber hinaus sind auch die Dendritischen Zellen, welche bei der Aktivierung von T-Zellen eine essentielle Rolle spielen, in ihrer Funktion beeinträchtigt, was zu einer reduzierten Produktion von IFN α und IFN γ führt und sich unmittelbar mindernd auf die T-Zellaktivität auswirkt [41–44]. Gleichzeitig kann eine Zunahme regulatorischer T-Zellen, welche immunsuppressive Zytokine wie IL-10 oder TGF- β sezernieren, beobachtet werden [45,46]. Aufgrund der erschöpfungsbedingten, stark verminderten Aktivität HBV-spezifischer CTL wird angenommen, dass die Immunpathogenese hauptsächlich durch NK-Zellen (*natural killer cells*) und Makrophagen verursacht wird [38]. Das anhaltende Wechselspiel zwischen Inflammation und Leberregeneration, bei der Hepatozyten zunehmend durch dysfunktionale Fibroblasten ersetzt werden [21], führt letztlich zu schwerwiegenden Leberschädigungen wie Zirrhose und HCC [11,22].

1.1.6 Prävention und Therapie

Der effizienteste Schutz vor einer Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus besteht in der präventiven Vakzinierung. Der heutzutage standardmäßig verwendete, 1986 entwickelte HBV-Impfstoff zweiter Generation basiert auf rekombinant in Hefen produziertem HBsAg [47], wird nach einem Drei-Dosen-Impfschema verabreicht [2,10] und induziert nach Vakzinierung bei etwa 95 % der Geimpften die Produktion protektiver Antikörper [3,13], welche einen lebenslangen Schutz gewährleisten [2,3].

Eine akute Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus wird in der Regel ausschließlich symptomatisch und nicht antiviral behandelt, da sie in den meisten Fällen spontan von alleine ausheilt [48].

Eine chronische Hepatitis B hingegen wird mit antiviralen Medikamenten therapiert [48], welche die Virusvermehrung unterdrücken, allerdings nicht in der Lage sind, das Virus gänzlich zu eliminieren. Eine chronische HBV-Infektion ist somit nicht heilbar [49]. Der Erfolg der Therapie wird anhand des serologischen Status von HBsAg und HBeAg sowie der HBV-DNA kontrolliert. Das Verschwinden von HBeAg und HBsAg aus dem Serum oder die Produktion HBeAg-/HBsAg-spezifischer Antikörper sind Ziel der antiviralen Therapie. Ein solcher serologischer Status wird als funktionelle Heilung angesehen [49,50].

Derzeit sind für die Therapie einer CHB zwei Behandlungsstrategien – (PEG)IFN α und fünf verschiedene Nukleosid-/Nukleotidanaloga – zugelassen, deren therapeutisches Ziel die langanhaltende Unterdrückung der viralen Replikation und damit die Unterbindung des Fortschreitens von Leberschädigungen zur Prävention einer Zirrhose und eines HCC ist [49].

IFN α oder pegyliertes IFN α (PEG-IFN α), was aufgrund seiner höheren Halbwertszeit weniger oft verabreicht werden muss als nicht pegyliertes IFN α , wird zur Behandlung einer CHB seit Beginn der 1980er Jahre eingesetzt und induziert durch Stimulation des Immunsystems eine antivirale Antwort [10,49]. Allerdings sprechen nur etwa 30 % der Patienten auf diese Therapie an [51–54]. Darüber hinaus verursacht die Gabe von (PEG)IFN α sehr starke Nebenwirkungen, weshalb die Patienten engmaschig überwacht werden sollten [10,49].

Die Nukleosid- und Nukleotidanaloga (NA) Lamivudin, Adefovir, Entecavir, Telbivudin und Tenofovir inhibieren die Synthese neuer Virionen durch eine Inhibition der reversen Transkription von prägenomischer RNA (pgRNA) in virale DNA [49]. Aufgrund ihrer chemischen Ähnlichkeit zu natürlichen Nukleotiden werden sie während der reversen Transkription durch die virale Reverse Transkriptase in die neu synthetisierte virale DNA eingebaut, was zum Abbruch des DNA-Stranges führt. NA blockieren effizient die Neusynthese von Virionen, was bei bis zu 95 % der CHB-Patienten zu einer drastischen Reduktion der HBV-DNA-Level im Serum führt [55]. Weiterhin verursacht die Einnahme von NA im Gegensatz zur Therapie mit (PEG)IFN α kaum Nebenwirkungen, sie müssen allerdings lebenslang verabreicht werden, was in vielen Fällen zur Bildung von resistenten HBV-Quasispezies führt, deren Replikation dann nicht mehr durch die NA inhibiert werden kann [49,56]. Insbesondere die Therapie mit dem NA der ersten Generation Lamivudin birgt ein hohes Risiko an Resistenzbildung, da etwa 65 % der damit behandelten Patienten nach fünf Jahren resistente Viren aufweisen [57]. Neuere NA, wie Entecavir und Tenofovir, verursachen insbesondere bei der Therapie Behandlungs-naiver Patienten kaum Resistenzen [10,49,58]. Werden diese Präparate allerdings für die Behandlung von Patienten eingesetzt, welche bereits Lamivudin-resistente Viren aufweisen, so entwickeln sich auch gegen diese Wirkstoffe im Laufe einer Langzeit-Therapie resistente HBV-Spezies [58]. Eine Kombination der

(PEG)IFN α -Therapie und der Therapie mit NA hat in Studien keine verbesserte Wirkung gezeigt [10,49,59,60].

Aufgrund der schlechten Verträglichkeit von IFN α und der Resistenzbildungen bei Gabe von NA zielen neuere Therapieansätze auf die Modulation des wirtseigenen Immunsystems, welches bei einer CHB nicht in der Lage ist, die Infektion effizient zu kontrollieren und das Virus zu eliminieren [22]. Um eine HBV-spezifische T-Zellantwort zu stimulieren, werden beispielsweise sogenannte *Checkpoint*-Inhibitoren eingesetzt, welche Oberflächenmoleküle auf erschöpften T-Zellen, die die Inaktivität dieser Effektorzellen verursachen, blockieren und die Zellen somit reaktivieren sollen [61,62]. Ein anderer Ansatz, HBV-spezifische T-Zellen zu reaktivieren, besteht in der Vakzinierung mit Dendritischen Zellen, welche zuvor *ex vivo* mit HBV-Antigenen stimuliert wurden [63].

Ein kürzlich entwickelter, innovativer Therapieansatz verwendet von HBV-Capsiden abstammende zellpermeable *virus like particles* (VLP, virus-ähnliche Partikel) zur therapeutischen Vakzinierung, wodurch zumindest im Mausmodell sowohl eine robuste HBV-spezifische B- und T-Zellantwort als auch eine verbesserte Antigenpräsentation durch Dendritische Zellen induziert werden konnten [64,65].

Bei all diesen Therapien kann das Hepatitis-B-Virus jedoch nicht vollständig eliminiert werden, da die episomale cccDNA (*covalently closed circular DNA*, kovalent geschlossene zirkuläre DNA) im Zellkern der infizierten Hepatozyten verbleibt und nach Beendigung der Therapie zur Reaktivierung der Infektion führen könnte. Darüber hinaus kann in infizierten Hepatozyten häufig eine Integration viraler DNA in das Wirtsgenom beobachtet werden, welche in vielen Fällen die Entstehung eines HCC initiiert [66,67]. Auch diese viralen Integrate können durch die zuvor beschriebenen Therapieansätze nicht eliminiert werden. Deshalb werden aktuell Strategien entwickelt, die cccDNA sowie integrierte virale DNA durch gezielte epigenetische Modifikation zu inaktivieren [49,68] oder durch gezieltes Einfügen von Mutationen unter Verwendung von Zinkfinger-nukleasen [69,70] oder mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems zu beseitigen [62,68,71].

1.2 Das Hepatitis-B-Virus

1.2.1 Geschichte

Baruch S. Blumberg entdeckte 1963 im Blut australischer Aborigines ein bis dahin unbekanntes Antigen, was er daraufhin als *Australia Antigen* (AuAg) bezeichnete [72]. Ende der 1960er Jahre wurde AuAg als Marker einer viralen Hepatitis identifiziert [73,74], es blieb allerdings immer noch unklar, was genau das AuAg ist [10]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von gereinigtem AuAg zeigten runde Partikel mit einer variablen Größe zwischen 17 und 25 nm [10,75]. David S. Dane konnte 1970 beobachten, dass AuAg nicht nur auf diesen pleomorphen Partikeln variabler Größe vorhanden ist, sondern auch auf größeren, Virus-ähnlichen Partikeln mit einem Durchmesser von 42 nm, welche einen klar erkennbaren inneren Kern enthalten, detektiert werden kann [76]. Die sogenannten ‚Dane-Partikel‘ konnten dann als die Hepatitis B auslösende Virus – das Hepatitis-B-Virus – und AuAg als das Oberflächenprotein der Virushülle, welches entsprechend als HBsAg (*hepatitis B surface antigen*) bezeichnet wurde, identifiziert werden [10,76,77]. Baruch S. Blumberg wurde 1976, zusammen mit D. Carleton Gajdusek, für „ihre Entdeckungen neuer Mechanismen für den Ursprung und die Verbreitung von Infektionskrankheiten“ mit dem Nobel-Preis in Physiologie oder Medizin ausgezeichnet [10].

1.2.2 Klassifizierung

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) gehört zur Familie der *Hepadnaviridae*, eine Gruppe kleiner umhüllter Viren, die ein partiell doppelsträngiges DNA-Genom besitzen [78]. Die Hepadnaviren teilen sich weiter in zwei Gattungen, die *Avihepadnaviridae* und die *Orthohepadnaviridae*, auf [79]. Zu den Avihepadnaviren, welche ausschließlich Vögel infizieren und mit einer Sequenzhomologie von nur etwa 40 % phylogenetisch am weitesten von HBV entfernt sind [79], gehören unter anderen das Enten-Hepatitis-B-Virus (*Duck hepatitis B virus*, DHBV), das Reiher-Hepatitis-B-Virus (*Heron hepatitis B virus*, HHBV), das Weißstorch-Hepatitis-B-Virus (*Stork hepatitis B virus*, STHBV) und das Schneegans-Hepatitis-B-Virus (*Snow goose hepatitis B virus*, SGHBV) [79–83]. Die Gattung der *Orthohepadnaviridae*, welche einzig Säugetiere infizieren, umfasst neben dem humanen Hepatitis-B-Virus (HBV) das Schimpansen- (HBVcpz), das Orang-Utan- (HBVoru) und das Gibbon-Hepatitis-B-Virus (HBVgbn) [84–86]. Weiterhin gehören das Wollaffen-Hepatitis-B-Virus (*Woolly monkey hepatitis B virus*, WMHBV), das Waldmurmeltier-Hepatitis-Virus (*Woodchuck hepatitis virus*, WHV), das Ziesel- (*Ground squirrel hepatitis virus*, GSHV) und das arktische Ziesel-Hepatitis-Virus (*Arctic squirrel hepatitis virus*, AHV) dieser Gattung an [79,87–90]. Allen Hepadnaviren gemein sind neben dem namensgebenden Hepatotropismus eine sehr strikte Wirtsspezifität und das Potenzial, akute und persistente Infektionen zu verursachen [78].

Die Spezies des humanen Hepatitis-B-Virus umfasst zehn Genotypen (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J), welche sich zu mindestens 8 % in ihrer genomischen Sequenz unterscheiden [79,91,92]. Darüber hinaus können die meisten Genotypen in weitere Subgenotypen unterteilt werden, welche eine Sequenzhomologie von etwa 96 % aufweisen [79,91]. Genotypen und Subgenotypen unterscheiden sich sowohl hinsichtlich ihrer geographischen Distribution als auch hinsichtlich ihrer Pathogenität und der Tendenz zu chronifizieren sowie im Hinblick auf das Ansprechen auf antivirale Therapien [91,92].

1.2.3 Morphologie und Struktur viraler Partikel

Das Hepatitis-B-Virus ist ein etwa 42 nm großes, umhülltes Virus [93,94], welches ein partiell doppelsträngiges DNA-Genom besitzt (Abb. 4) [78,95,96]. Die virale Hülle, welche aus Lipiden der Wirts-Hepatozyten sowie den drei viralen Oberflächenproteinen (HBsAg) LHBs, MHBs und SHBs gebildet wird, umgibt das ikosaedrische Nukleocapsid [95]. Das etwa 34 nm große Capsid wird aus 120 Core-Protein-Dimeren assembliert und weist somit eine T=4 Symmetrie auf [97]. Gelegentlich können im Serum infizierter Patienten auch umhüllte HBV-Partikel detektiert werden, die ein aus 90 Core-Protein-Dimeren assembliertes Capsid mit einer T=3 Symmetrie und einem Durchmesser von etwa 30 nm aufweisen [93]. Ob letztere Partikel tatsächlich infektiös sind, ist allerdings nicht bekannt [93]. Das Nukleocapsid beherbergt das virale Genom, welches im Virion als partiell doppelsträngige *relaxed circular* DNA (rcDNA) vorliegt [95,98,99] und kovalent mit der viralen Polymerase verknüpft ist [100]. Darüber hinaus können im Nukleocapsid verschiedene zelluläre Proteine, wie z. B. die Proteinkinase C (PKC), vorhanden sein [101–103].

Neben den 42 nm großen infektiösen Virionen sezernieren infizierte Hepatozyten auch etwa 20 nm große Sphären und Filamente variabler Länge (Abb. 4), welche lediglich aus Lipiden und den viralen Oberflächenproteinen bestehen, weder Capsid noch virale DNA enthalten und somit nicht infektiös sind [10,78]. Diese subviralen Partikel können in Seren infizierter Patienten in sehr hohen Konzentrationen nachgewiesen werden, welche die Menge infektiöser Partikel oft um das 1.000- bis 10.000-fache überschreiten [10,78]. Während in infektiösen Partikeln die drei Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs im molekularen Verhältnis von 4:1:1 vorliegen, bestehen Sphären hauptsächlich aus SHBs und weisen nur geringe Mengen an MHBs sowie vernachlässigbar wenig LHBs auf [104,105]. Filamente hingegen beinhalten neben SHBs und MHBs auch LHBs in relevanten Mengen [105]. Die genaue Funktion subviraler Partikel ist bislang nicht gänzlich verstanden, es wird aber angenommen, dass sie die Replikation des Virus fördern [106], neutralisierende Antikörper abfangen und durch Induktion von Immuntoleranz eine persistente Infektion begünstigen [10,13].

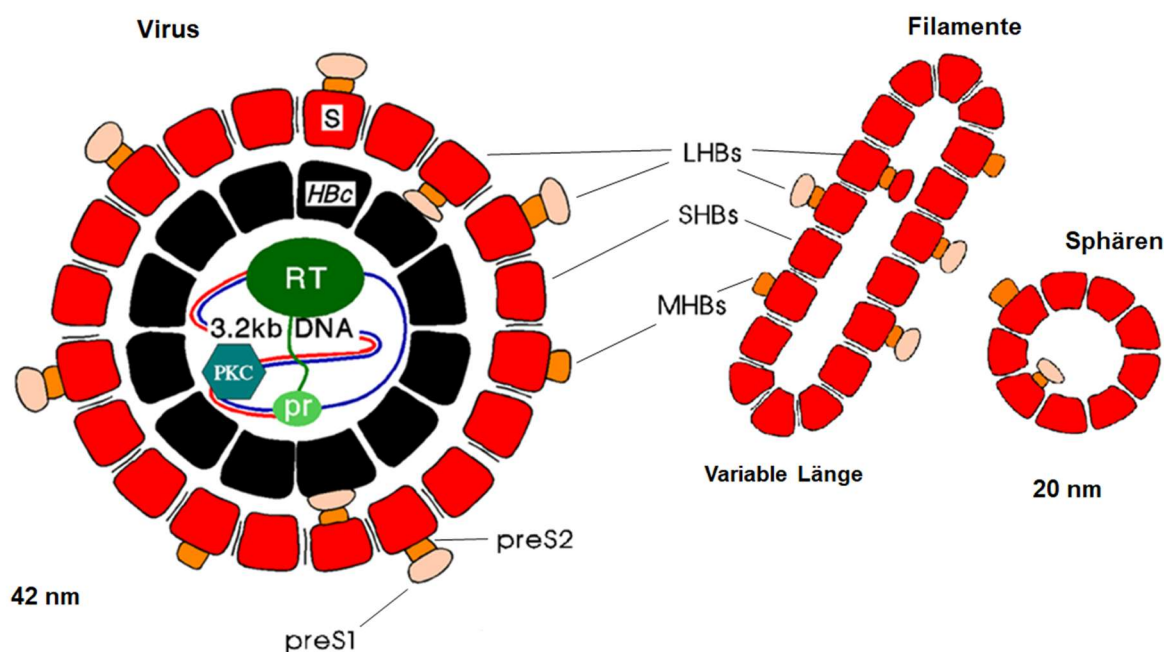


Abbildung 4: Morphologie viraler und subviraler Partikel.

Die 42 nm großen infektiösen viralen Partikel besitzen eine Virushülle, welche aus den drei Oberflächenproteinen LHBs, MHBs und SHBs gebildet wird. Die Hülle umschließt ein ikosaedrisches Nukleocapsid, welches sich aus Core-Proteinen (HBcAg) zusammensetzt und das virale DNA-Genom sowie die virale Polymerase enthält. Subvirale Partikel enthalten keine virale Nukleinsäure und sind nicht infektiös. Sphären weisen einen Durchmesser von etwa 20 nm auf und bestehen im Wesentlichen aus SHBs und geringen Mengen MHBs. Filamente können in unterschiedlichen Längen auftreten und enthalten alle drei Oberflächenproteine. RT = Reverse Transkriptase, pr = Primase-Domäne, PKC = Proteinkinase C. Modifiziert nach [10].

1.2.4 Genomorganisation

Das Hepatitis-B-Virus besitzt ein partiell doppelsträngiges DNA-Genom, welches etwa 3.200 Basenpaare (bp) umfasst und aufgrund seiner geringen Größe sehr kompakt organisiert ist (Abb. 5) [95,96]. Das zirkuläre, aber nicht kovalent geschlossene HBV-Genom (rcDNA, *relaxed circular DNA*) besteht aus einem vollständigen, kodierenden DNA-Strang negativer Orientierung und einem unvollständigen, nicht-kodierenden DNA-Strang positiver Orientierung, wodurch eine einzelsträngige Lücke variabler Länge entsteht [10,99]. Das 5'-Ende des kodierenden Strangs ist im Nukleocapsid kovalent an die Primase-Subdomäne (*Terminal Protein*, TP) der viralen Polymerase gebunden, deren Reverse-Transkriptase (RT)-Subdomäne am 3'-Ende des nicht-kodierenden Strangs angelagert ist [10,100]. Am 5'-Ende des nicht-kodierenden DNA-Strangs hängt ein etwa 18 Nukleotide umfassendes RNA-Oligomer mit 5'-Cap, welches ein Reststück nicht degradiertes prägenomischer RNA (pgRNA) darstellt und als *Primer* bei der Synthese des DNA-Strangs positiver Orientierung fungiert [78,99,107]. Das HBV-Genom enthält vier offene Leserahmen (*open reading frames*, ORF),

welche einander partiell überlappen und für die sieben viralen Proteine kodieren, sowie zwei *direct repeats* (DR1, DR2), welche für die DNA-Replikation und die Zirkularisation des Genoms relevant sind (Abb. 5) [96,99]. Der größte ORF, welcher etwa zwei Drittel des viralen Genoms umfasst, kodiert für die virale Polymerase (P), die neben einer TP-Domäne eine *Spacer*-Domäne, eine Reverse-Transkriptase-Domäne und eine RNase-H-Domäne enthält [78,98]. Der PreCore/Core-ORF überlappt mit dem 5'-Ende des P-ORF und kodiert – je nach genutztem Startcodon – für HBeAg und HBcAg [78,95]. Das preS/S-Gen überlappt gänzlich mit dem P-ORF und kodiert für die drei viralen Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs [78,95]. Ein letzter ORF, welcher sowohl mit dem 3'-Ende des P-ORF als auch mit dem 5'-Ende des PreCore/Core-ORF überlappt, kodiert für das regulatorische X-Protein (HBx), welches mit vielen zellulären Proteinen interagiert und in die epigenetische Kontrolle der Transkription der cccDNA involviert ist [78,108].

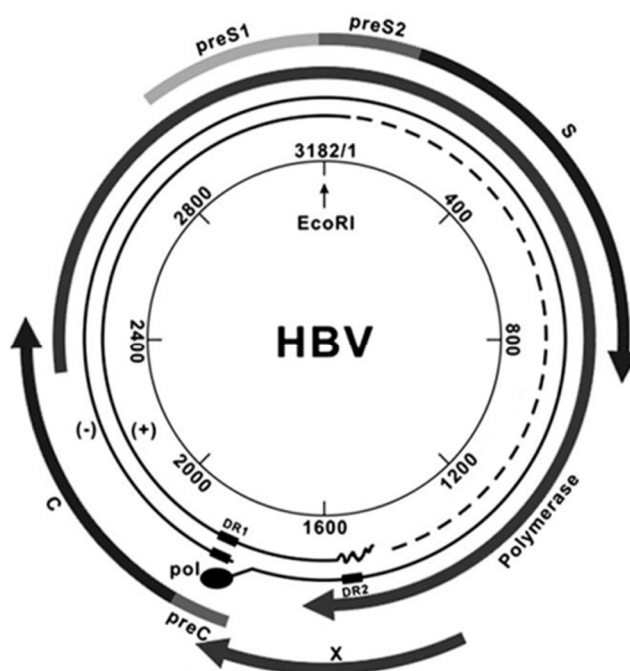


Abbildung 5: Genomorganisation des Hepatitis-B-Virus.

Das HBV-Genom beinhaltet vier ORF, welche für die virale Polymerase, für HBeAg und HBcAg (preC/C), für die drei Oberflächenproteine (preS1/preS2/S) und für HBx (X) kodieren und einander partiell überlappen. Der kodierende (-)-DNA-Strang ist am 5'-Ende kovalent an die virale Polymerase (pol) gebunden, der unvollständige (+)-DNA-Strang, dessen Länge in 3'-Richtung variiert (gestrichelte Linie), weist am 5'-Ende ein RNA-Oligomer, bestehend aus nicht degradiertem pgRNA, auf. Die Sequenz wurde gemäß Genotyp D nummeriert [109].

DR = *direct repeats*. Modifiziert nach [110].

Im Zuge der Infektion wird die rcDNA im Zellkern der Hepatozyten zu kovalent geschlossener zirkulärer DNA (*covalently closed circular DNA*, cccDNA) vervollständigt und anschließend in die prägenomische RNA und die vier subgenomischen mRNAs (3,5 kb-, 2,4 kb-, 2,1 kb- und 0,7 kb-mRNA) transkribiert, welche alle am 3'-Ende polyadenyliert sind (Abb. 6) [96,107]. Die 3,5 kb große prägenomische RNA (pgRNA) dient zum einen als Vorlage für die Neusynthese des viralen Genoms, zum anderen wird sie in die 94 kDa große virale Polymerase und das 21 kDa große Core-Protein (HBcAg) translatiert. Die ebenfalls 3,5 kb umfassende PreCore-mRNA wird in ein PreCore-Vorläuferprotein translatiert, welches anschließend proteolytisch gespalten und als HBeAg sezerniert wird. Die 2,4 kb-mRNA dient als Matrize für das große Oberflächenprotein (*large*, LHBs). Das mittlere (*middle*, MHBs) und das kleine (*small*, SHBs) Oberflächenprotein werden von der 2,1 kb-mRNA translatiert. Die mit 0,7 kb kleinste mRNA dient der Translation des regulatorischen HBx-Proteins [110].

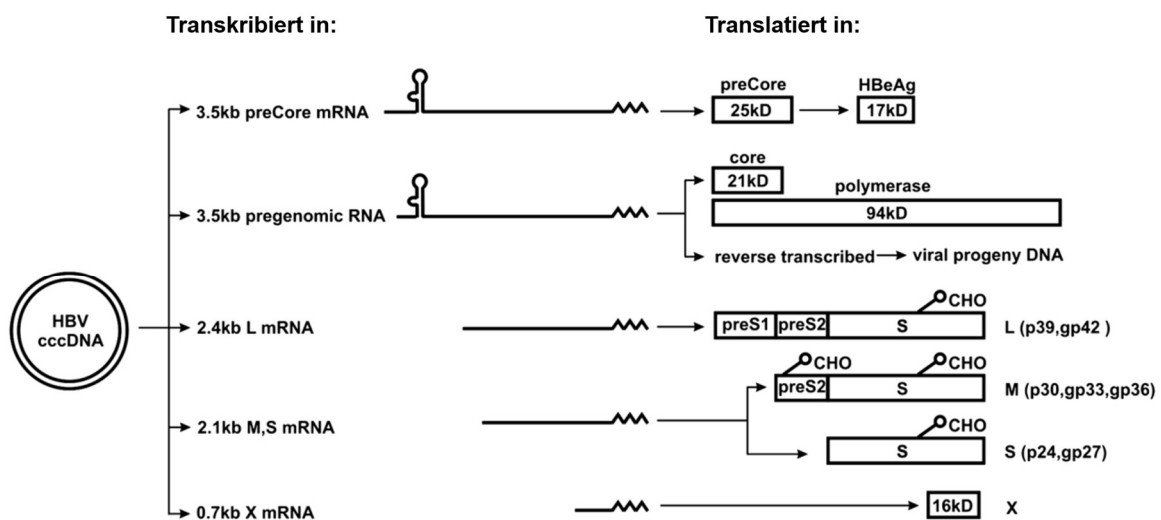


Abbildung 6: Virale RNA-Transkripte und korrespondierende Proteine.

Die cccDNA wird in fünf verschiedene 3'-polyadenylierte RNAs transkribiert, welche in die sieben viralen Proteine translatiert werden. Die pgRNA wird zusätzlich revers transkribiert und dient so als Matrize für *de novo* synthetisierte virale DNA. CHO gibt die N-Glykosylierung der Oberflächenproteine an den entsprechenden Positionen an. Modifiziert nach [110].

1.2.5 Die viralen Oberflächenproteine

Alle drei Oberflächenproteine des Hepatitis-B-Virus werden von einem einzigen ORF, dem preS/S-ORF, welcher drei *in frame* Startcodons aufweist, kodiert [95]. Bei der Transkription des preS/S-ORF werden zwei verschiedene mRNAs synthetisiert, die 2,4 kb-mRNA und die 2,1 kb-mRNA [110]. Die 2,4 kb-mRNA wird in das große Oberflächenprotein LHBs translatiert, aus der 2,1 kb-mRNA entstehen das mittlere (MHBs) und das kleine (SHBs) Oberflächenprotein [96]. LHBs besteht aus den Domänen PreS1, PreS2 und S, MHBs ist aus den Domänen PreS2 und S aufgebaut und SHBs wird ausschließlich aus der S-Domäne gebildet (Abb. 7 A). Alle viralen Oberflächenproteine sind integrale Membranproteine, welche über die S-Domäne in der Membran verankert sind [95].

Das kleine Oberflächenprotein SHBs besteht aus der 226 Aminosäuren (AS) umfassenden S-Domäne, welche vier Transmembrandomänen (TM) aufweist, zwischen welchen sich drei hydrophile *Loops* befinden (Abb. 8) [111–113]. Die TM werden cotranslational in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) integriert [78]. Die AS 1–7 sowie der hydrophile *Loop*, welcher die AS 99–169 umfasst, ragen in das ER-Lumen, der die AS 23–79 umfassende hydrophile *Loop* zwischen TM3 und TM4 ragt im reifen Protein ins Zytoplasma [95]. SHBs weist an Asparagin(Asn)-146 eine potentielle Glykosylierungsstelle auf, welche aber nur partiell genutzt wird [78,95,114]. Darüber hinaus enthält der ins ER-Lumen orientierte hydrophile *Loop* das konformationelle Hauptepitop des HBV-Oberflächenantigens (HBsAg) und wird deshalb als *Antigenic Loop* bezeichnet [78,95]. Nach dem *Budding* der Virionen in das ER-Lumen und deren darauffolgender Freisetzung befinden sich die zuvor ins ER-Lumen ragenden Proteindomänen auf der Virusoberfläche [93,94].

Das mittlere Oberflächenprotein MHBs besteht aus der S-Domäne und einer aminoterminalen PreS2-Domäne, welche 55 AS umfasst (Abb. 7 A). Die Struktur der S-Domäne bleibt gegenüber SHBs gleich, die PreS2-Domäne ragt ins ER-Lumen und wird durch dort lokalisierte Glykosyltransferasen stets an Asn-4 N-glykosyliert [95]. Darüber hinaus weist PreS2 an Threonin(Thr)-37 eine O-Glykosylierung auf, welche bei allen HBV-Genotypen bis auf Genotyp A, welcher an dieser Position kein Threonin besitzt, vorhanden ist [115,116]. Weiterhin befindet sich in der PreS2-Domäne (AS 41–52) das sogenannte *Translocation Motif* (TLM), eine amphipathische α -Helix, welche Membranpermeabilität vermittelt und nach dem Zelleintritt des Virus bei der Freisetzung des Nukleocapsids aus dem Endosom ins Zytoplasma möglicherweise eine relevante Funktion besitzt [117].

Das große virale Oberflächenprotein LHBs besteht ebenfalls aus den Domänen S und PreS2 und ist am Aminoterminus durch die PreS1-Domäne, die je nach Genotyp 108 (gtD), 118 (gtE/gtG) oder 119 AS umfasst, verlängert [114]. Die PreS1-Domäne beinhaltet die für die Infektiosität des Hepatitis-B-Virus essentielle Rezeptorbindedomäne (RBD), welche den

Bereich der AS 2–48 abdeckt und in eine essentielle Region (AS 9–18) sowie zwei akzessorische Regionen (AS 28–39 und AS 39–48) untergliedert werden kann (Abb. 7 B) [118]. Darüber hinaus ist erwiesen, dass die AS 2–77 unerlässlich für eine Infektion sind [119]. Des Weiteren ist PreS1 an Glycin-2 myristoyliert, was eine für die Infektiosität der Viruspartikel essentielle posttranslationale Modifikation darstellt [120,121]. Diverse Studien haben ergeben, dass von der PreS1-Domäne abgeleitete Lipopeptide nicht nur an Hepatozyten binden, sondern auch eine HBV-Infektion inhibieren können [119,122–124]. Dabei zeigte sich, dass das inhibitorische Potential eines solchen Peptids am größten ist, wenn es aus den AS 2–48 der PreS1-Domäne besteht und aminoterminal myristoyliert ist [124,125]. Abgeleitet von diesen Erkenntnissen wurde ein den N-terminalen Bereich der PreS1-Domäne (AS 2–48) umfassendes, myristoyliertes Peptid entwickelt, welches sehr effektiv ($IC_{50} \sim 0,1 \text{ nM}$) den HBV-Entry sowie den Zelleintritt des HBV-Satellitenvirus HDV (Hepatitis Delta Virus) inhibieren kann und sich derzeit unter dem Namen Myrcludex B für die Therapie einer HDV-Infektion in einer klinischen Studie Phase III befindet [125–127].

Im Gegensatz zu MHBs wird die PreS2-Domäne bei LHBs nicht cotranslational ins ER-Lumen verlagert und weist daher zusammen mit der PreS1-Domäne ins Zytoplasma, wobei die TM1 nicht in die ER-Membran integriert ist (Abb. 8) [128]. Aufgrund dieser Orientierung bleibt die posttranslationale N-Glykosylierung an Asn-4 bei LHBs aus [129]. Bei etwa der Hälfte der synthetisierten großen Oberflächenproteine wird die PreS1PreS2-Domäne nach der Translation in das Lumen des ER transloziert, wodurch LHBs in zwei verschiedenen Membrantopologien vorzufinden ist (Abb. 8) [128–130]. Der genaue Mechanismus dieser posttranslationalen Translokation ist bislang allerdings nicht vollständig verstanden, anscheinend spielt dabei aber die TM2 eine entscheidende Rolle [131,132]. Die verschieden orientierten LHBs weisen unterschiedliche Funktionen auf. LHBs, dessen PreS1PreS2-Domäne ins Zytoplasma weist, ist aufgrund der Interaktion der PreS1-Domäne (AS 92–113) mit dem Nukleocapsid essentiell für die Virusmorphogenese [133]. Des Weiteren kann die PreS2-Domäne in zytoplasmatischer Orientierung regulatorische Funktionen übernehmen, da sie mit der PKC interagiert und somit den c-Raf/MEK/ERK-Signalweg aktiviert, welcher die Expression einer Vielzahl zellulärer und viraler Gene kontrolliert [134]. Die andere Topologie des LHBs, bei welcher PreS1PreS2 zunächst ins ER-Lumen ragen und am reifen Viruspartikel auf dessen Oberfläche exponiert werden, ermöglicht die Exposition der in der PreS1-Domäne lokalisierten Rezeptorbindedomäne, welche für die Infektion von Hepatozyten obligat ist [78,114].

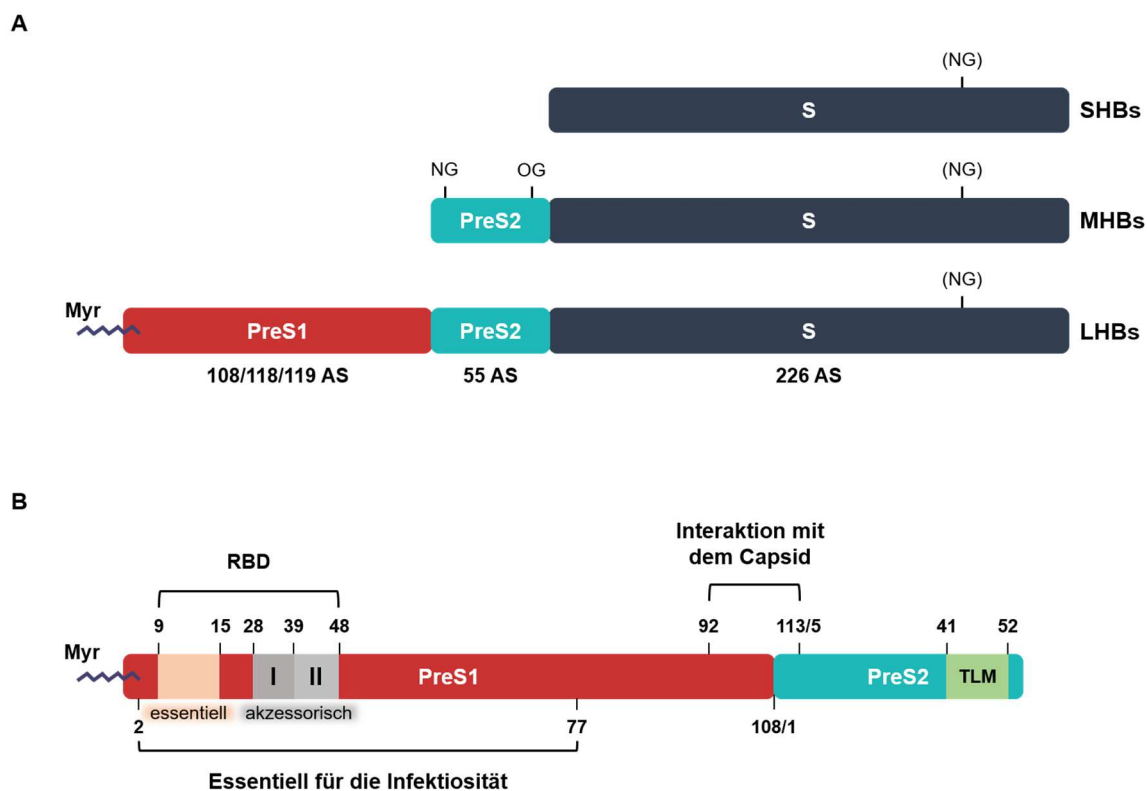


Abbildung 7: Aufbau der Oberflächenproteine des Hepatitis-B-Virus.

(A) Schematische Darstellung der drei viralen Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs. Die S-Domäne umfasst 226 AS, die PreS2-Domäne besteht aus 55 AS, die PreS1-Domäne umfasst, abhängig vom Genotyp, 108, 118 oder 119 AS. N- (NG) und O-Glykosylierungen (OG) sind an den entsprechenden Positionen markiert, partiell genutzte Glykosylierungsseiten stehen in Klammern. LHBs ist N-terminal an Glycin-2 myristoyliert (Myr).

(B) Schematische Darstellung der für den *Entry* und die Virusmorphogenese wichtigen PreS-Domänen von LHBs. Die Rezeptorbindedomäne (RBD) umfasst die AS 9–48 und beinhaltet eine essentielle (AS 9–15) und zwei akzessorische Regionen (AS 28–39 und AS 39–48). Eine Region am C-Terminus von PreS1 bis zum N-Terminus von PreS2 (AS 92–113/5) interagiert mit dem Nukleocapsid und ist für dessen Umhüllung essentiell. Am carboxyterminalen Ende der PreS2-Domäne (AS 41–52) befindet sich das *Translocation Motif* (TLM), welches Membranpermeabilität vermittelt. PreS1 wurde gemäß Genotyp D nummeriert.

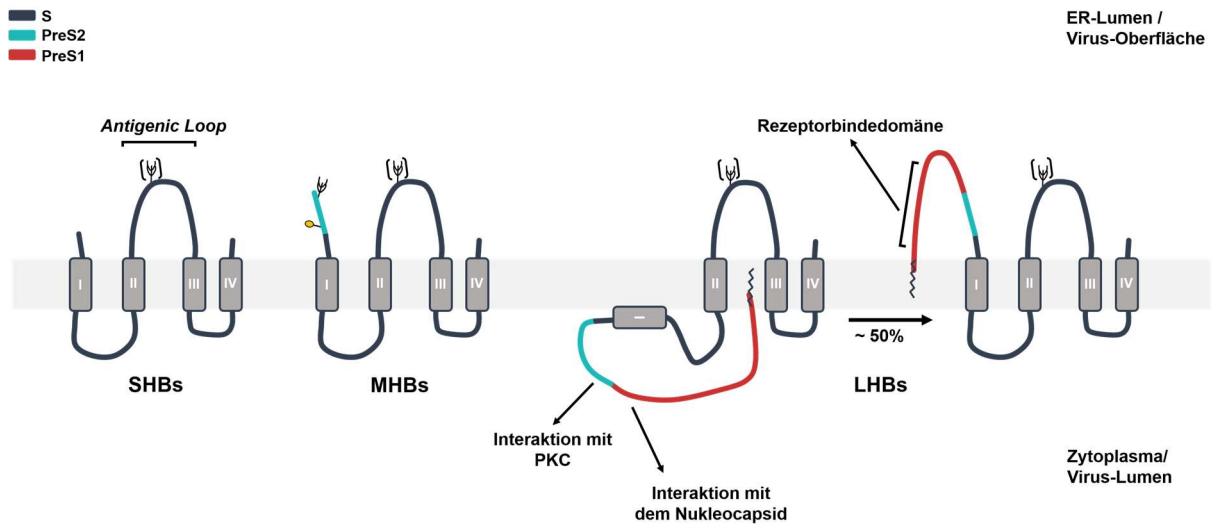


Abbildung 8: Membrantopologie der viralen Oberflächenproteine.

Die S-Domäne, welche allen Oberflächenproteinen gemein ist, enthält vier Transmembrandomänen (I–IV), welche cotranslational in die ER-Membran integriert werden. Der *Antigenic Loop* beinhaltet das konformationelle Hauptepitop der HBV-Oberflächenproteine und wird partiell an Asn-146 N-glykosyliert. MHBs ist N-terminal durch die PreS2-Domäne verlängert, welche ins ER-Lumen weist und an Asn-4 N-glykosyliert und an Thr-37 O-glykosyliert (außer gtA) ist. LHBs besteht aus den Domänen PreS1, PreS2 und S und weist eine duale Membrantopologie auf. Nach der Translation ragt die PreS1PreS2-Domäne ins Zytoplasma und ist essentiell in die Virusmorphogenese involviert. Weiterhin interagiert zytoplasmatisch orientiertes PreS2 mit der PKC, was eine Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden zur Folge hat. Etwa die Hälfte der PreS1PreS2-Domänen werden posttranslational ins ER-Lumen transloziert und werden schließlich im reifen Viruspartikel an der Oberfläche exponiert, wodurch die Interaktion der in der PreS1-Domäne lokalisierten Rezeptorbindedomäne mit dem Rezeptor ermöglicht wird. ER = Endoplasmatisches Retikulum, PKC = Proteinkinase C, (ψ) = partiell genutzte N-Glykosylierungsseite, Ψ = N-Glykosylierung, † = O-Glykosylierung, ~ = Myristoylierung.

1.2.6 Der virale Replikationszyklus

Das Hepatitis-B-Virus gelangt bei der initialen Infektion über das Blut in die Leber, wo es über Lebersinusoiden, die erweiterten Kapillargefäße der Leber, den Disse-Raum erreicht. An den Disse-Raum, welcher durch ein diskontinuierliches Endothel von den Kapillargefäßen getrennt ist, grenzen die parenchymalen Hepatozyten, welche die primären Zielzellen des Hepatitis-B-Virus darstellen. Nach Erreichen des Disse-Raums bindet HBV an auf der basolateralen Membran der Hepatozyten exponierte Rezeptoren, um in die Leberzelle aufgenommen zu werden.

Der virale Replikationszyklus (Abb. 9) beginnt mit dem Zelleintritt (*Entry*) des Hepatitis-B-Virus, welcher als mehrschrittiger Prozess verstanden werden kann. Die initiale Anlagerung (*Attachment*) des Virus an die Hepatozyten erfolgt über die reversible Bindung der S-Domäne der viralen Oberflächenproteine an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) [135–137]. Dieses *Attachment* wird durch die Interaktion positiv geladener Aminosäuren des *Antigenic Loops* (Arginin-122 und Lysin-14) mit den negativ geladenen HSPG vermittelt [137]. Auf diese erste, nieder-affine Anlagerung folgt die hoch-affine Bindung mindestens eines spezifischen Rezeptors, was den *Entry* durch Clathrin-vermittelte Endozytose initiiert [95, 138]. Die Bindung des spezifischen hoch-affinen Rezeptors erfolgt über die virale Rezeptorbindedomäne (RBD), welche im N-terminalen Bereich der PreS1-Domäne (AS 2–48) von LHBs lokalisiert ist [114, 118]. Erst im Jahr 2012, mehr als 40 Jahre nach der Entdeckung des Hepatitis-B-Virus, konnte der hauptsächlich in der Leber exprimierte Gallensäuretransporter NTCP (*sodium taurocholate co-transporting polypeptide*) als funktioneller HBV-Rezeptor identifiziert werden [139]. Mit Hilfe eines biochemischen experimentellen Ansatzes konnte eine spezifische Bindung der viralen RBD an NTCP nachgewiesen werden. Eine ektopische Expression von NTCP in humanen Hepatomzellen, welche basal nicht suszeptibel für eine HBV-Infektion sind, machte diese – zumindest partiell – permissiv, ein siRNA-vermittelter *Knockdown* von NTCP in suszeptiblen, primären Hepatozyten resultierte in einer verminderten Infizierbarkeit [139]. Diese Beobachtungen konnten in diversen anderen Studien bestätigt werden [140–148]. NTCP ist als *bona fide* Rezeptor des Hepatitis-B-Virus inzwischen etabliert, wie genau aber NTCP den Zelleintritt von HBV vermittelt, ist noch immer nicht bekannt [149]. Darüber hinaus gibt es einige ungewöhnliche Eigenschaften von NTCP als HBV-Rezeptor [150, 151]. So hängt die Suszeptibilität für eine HBV-Infektion NTCP-überexprimierender Zellen nicht allein von der NTCP-Expression, sondern auch stark von der Zelllinie, in der NTCP ektopisch exprimiert wird, ab [139, 140, 152]. Weiterhin ist die HBV-Infektion *in vitro* abhängig von der Zugabe von Polyethylenglykol (PEG), ein Polymer, welches die Anlagerung des Virus an die Plasmamembran fördert [135, 150, 151, 153, 154]. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte stellt sich die Frage, ob NTCP der alleinige HBV-Rezeptor ist oder ob es noch weiterer (Co-)Rezeptoren bedarf. Auch die Tatsache, dass ein NTCP-*Knockdown* in primären

Leberzellen nicht zum gänzlichen Verlust der Suszeptibilität führt, spricht dafür, dass neben NTCP weitere Faktoren in den *Entry*-Prozess involviert sind [139]. Nicht zuletzt die Beobachtung einer epidemiologischen Studie, dass Menschen mit einem homozygoten genetischen Polymorphismus im NTCP-Gen, welcher zu einer Mutation in der Aminosäuresequenz von NTCP (S267F) führt und den Verlust der HBV-Rezeptorfunktion *in vitro* zur Folge hat [155], mit HBV infiziert sind, deutet stark auf die Beteiligung weiterer (Co-)Rezeptoren neben NTCP am HBV-*Entry*-Prozess hin [151,156,157]. Insgesamt ist der HBV-*Entry*-Prozess bis heute nur ansatzweise verstanden und bedarf weiterer, detaillierter Erforschung.

Durch die Bindung des Hepatitis-B-Virus an NTCP (und/oder andere Co-Rezeptoren) wird die Clathrin-vermittelte Endozytose initiiert und HBV wird in die Zelle aufgenommen [138]. Im Endosom wird durch den dort vorherrschenden niedrigen pH-Wert sowie durch proteolytische Prozessierung der viralen Oberflächenproteine das *Translocation Motif* (TLM), eine amphipathische, Membranpermeabilität-vermittelnde α -Helix [117], demaskiert und exponiert [158]. Es wird angenommen, dass das TLM die Energie- und Rezeptor-unabhängige Translokation von HBV aus dem endosomalen Kompartiment ins Zytoplasma vermittelt, wo dann die proteolytisch prozessierte Virushülle dissoziiert und das Nukleocapsid freigesetzt wird [158]. Die TLM-vermittelte Freisetzung des Nukleocapsids wird allerdings kontrovers diskutiert, einige Studien dementieren die Relevanz des TLM für die Infektiosität des Hepatitis-B-Virus und halten sowohl das TLM als auch die PreS2-Domäne folglich als entbehrlich für die HBV-Infektion [159–162]. Ein alternatives Modell geht davon aus, dass nach Endozytose des Virus über die virale S-Domäne die Fusion der Virushülle mit der endosomalen Membran initiiert wird, wodurch das Nukleocapsid ins Zytoplasma freigesetzt wird [111,163,164].

Nach der Freisetzung des Nukleocapsids aus dem endosomalen Kompartiment ins Zytoplasma (*Uncoating*) wird es aktiv über Mikrotubuli zum Zellkern transportiert [165]. Am Kernporenkomplex zerfällt dann das Nukleocapsid und die rcDNA (*relaxed circular DNA*) wird zusammen mit der kovalent gebundenen viralen Polymerase in den Zellkern importiert, was über ein in der TP-Domäne der viralen Polymerase lokalisiertes bipartites Kernlokalisierungssignal (NLS, *nuclear localisation signal*) vermittelt wird [166–168]. Die partiell doppelsträngige rcDNA muss zur Etablierung einer effizienten Infektion in die episomale cccDNA (*covalently closed circular DNA*, kovalent geschlossene zirkuläre DNA) konvertiert werden [95]. Dafür muss der unvollständige DNA-Strang positiver Orientierung vervollständigt werden, die kovalent gebundene virale Polymerase sowie das RNA-Oligonukleotid müssen entfernt und beide DNA-Stränge kovalent ligiert werden [99]. Wie genau die rcDNA in cccDNA umgewandelt wird, ist immer noch nicht verstanden [99,169]. Die cccDNA assoziiert, wie wirtseigene Chromosomen auch, mit Histonen und anderen Proteinen, weshalb sowohl die Stabilität der cccDNA als auch die virale Genexpression abhängig von

epigenetischen Modifikationen sind [170]. Als episomales Intermediat der Virus-Replikation dient die cccDNA als Vorlage für die Transkription der vier subgenomischen RNAs und der prägenomischen RNA (pgRNA) (Abb. 6), welche das RNA-Intermediat für die virale Replikation darstellt [78,95,171]. Vier verschiedene Promotoren (Core, SPI, SPII, X) initiieren die Transkription der viralen subgenomischen RNAs – der 3,5 kb-mRNA, der 2,4 kb- und 2,1 kb-mRNA und der 0,7 kb-mRNA – sowie der 3,5 kb großen bicistronischen pgRNA durch die zelluläre RNA-Polymerase II [96,99,110]. Alle viralen RNAs sind am 3'-Ende polyadenyliert und weisen 5'-Cap-Strukturen auf [78,96,99]. Nach dem Transport der viralen RNAs ins Zytoplasma werden die subgenomischen RNAs in die viralen Proteine translatiert. Die 0,7 kb-mRNA wird in das regulatorische X-Protein (HBx) übersetzt, die 2,4 kb-mRNA wird in das große Oberflächenprotein LHBs translatiert, das mittlere (MHBs) und das kleine Oberflächenprotein (SHBs) werden anhand des 2,1 kb-Transkripts generiert [96,171]. Die 3,5 kb-mRNA (PreCore-mRNA) dient der Translation des PreCore-Proteins, welches posttranslational proteolytisch prozessiert und anschließend als HBeAg sezerniert wird [171]. Die ebenfalls 3,5 kb umfassende pgRNA kodiert ein überlanges Transkript des viralen Genoms und hat eine duale Funktion. Sie dient zum einen der Translation des Core-Proteins sowie der viralen Polymerase, zum anderen dient sie der Genomreplikation und stellt die Matrize für die *de novo* Synthese der viralen DNA dar [78]. Die virale Replikation wird mit der Bindung der viralen Polymerase an eine Haarnadelstruktur am 5'-Ende der pgRNA, dem sogenannten Enkapsidierungssignal (ϵ -Signal), initiiert [99]. Diese Interaktion, welche durch zelluläre Chaperone, wie z. B. Hsp90 unterstützt wird, induziert die Verpackung des Komplexes aus pgRNA und viraler Polymerase in aus Core-Proteinen assemblierende Capside [78,99]. Durch die Enkapsidierung des pgRNA-Polymerase-Komplexes wird die reverse Transkription initiiert [99]. Zunächst synthetisiert die virale Polymerase, welche neben der TP-Domäne (*Terminal Protein*-Domäne) eine Reverse-Transkriptase(RT)-Domäne und eine RNase-H-Domäne besitzt, den DNA-Strang negativer Orientierung, anschließend wird die pgRNA bis auf ein als *Primer* für die Synthese des (+)-Stranges dienendes Oligonukleotid durch die RNase H degradiert. Zuletzt wird der DNA-Strang positiver Orientierung synthetisiert, an dessen 3'-Ende die Polymerase angelagert bleibt [99]. Grundsätzlich findet die reverse Transkription der pgRNA in rcDNA ausschließlich in intakten Capsiden statt [95,172,173]. Nach erfolgreicher reverser Transkription können reife Capside entweder zurück zum Zellkern transportiert werden, um die neu synthetisierte rcDNA in den Nukleus zu entlassen und einen cccDNA-Pool für die Virus-Replikation zu generieren [78,99], oder sie interagieren mit einer bestimmten Region des an der ER-Membran translatierten großen Oberflächenproteins zytoplasmatischer Orientierung (AS 92–113) [133,174]. Diese Interaktion leitet die Knospung (*Budding*) der Viren an intrazellulären Membranen ein, wodurch sie mit den Oberflächenproteinen umhüllt und anschließend ESCRT(*endosomal sorting complexes*

required for transport)-abhängig über *Multivesicular Bodies* (MVB) sekretiert werden [175–179]. An welchen intrazellulären Membranen das *Budding* stattfindet, ist bisher nicht eindeutig geklärt, es ist aber erwiesen, dass sowohl das reife Nukleocapsid als auch LHBs mit Proteinen interagieren, welche mit der ESCRT-Maschinerie assoziiert sind, wie z. B. γ 2-Adaptin und Nedd4, und, dass die Freisetzung infektiöser Virionen durch Inhibition der MVB-Komponenten ESCRT-III und Vps4 unterbunden werden kann [175–179]. Weiterhin konnte das zelluläre Protein α -Taxilin, welches die Bindung zwischen LHBs und der ESCRT-Komponente Tsg101 vermittelt, als relevanter Faktor für die MVB-abhängige Freisetzung viraler Partikel identifiziert werden [180]. Diese Beobachtungen weisen auf ein *Budding* der Hepatitis-B-Viren in späte Endosomen oder direkt in MVB hin, da diese zellulären Kompartimente mit der ESCRT-Maschinerie assoziiert sind [176].

Die Morphogenese und Freisetzung subviraler Partikel unterscheidet sich merklich von der infektiöser Virionen. Subvirale Partikel, welche hauptsächlich aus dem viralen Strukturprotein SHBs bestehen, assemblieren von selbst zu Spheren und Knospen ins ER-Lumen [181,182]. Anschließend verlassen sie ERGIC(*ER-Golgi intermediate compartment*)-abhängig über den konventionellen sekretorischen Weg die Hepatozyte [175,176]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte aber die ESCRT/MVB-abhängige Freisetzung subviraler Filamente nachweisen, was auf eine maßgebliche Rolle von LHBs bei diesem Freisetzungsweg hindeutet [183]. Weiterhin liefert diese Studie experimentelle Evidenz, dass subvirale Spheren und Filamente die Hepatozyte auf unterschiedlichen Wegen verlassen.

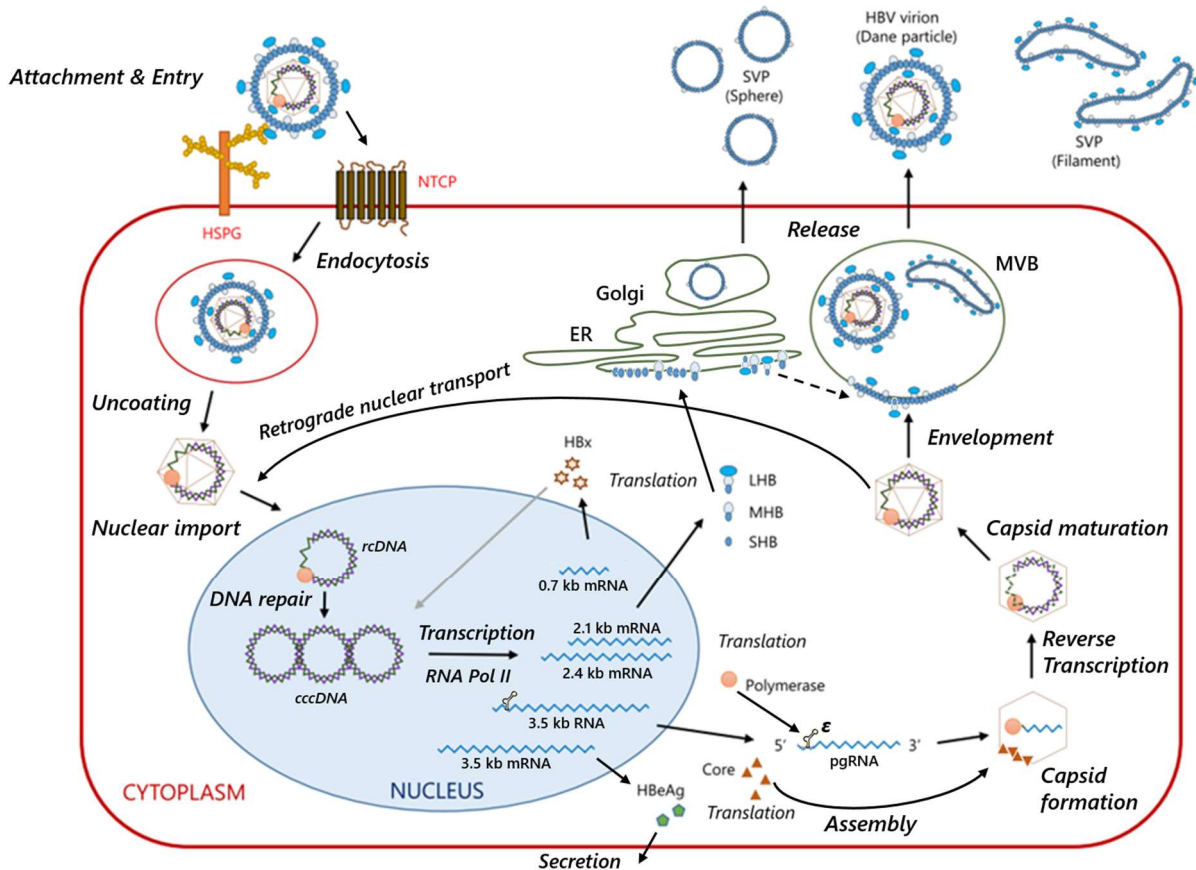


Abbildung 9: Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus.

Nach initialer Anlagerung (*Attachment*) an HSPG bindet HBV an NTCP und gelangt endozytotisch in die Hepatozyte. Das Nukleocapsid wird ins Zytoplasma freigesetzt (*Uncoating*) und zum Zellkern transportiert. Die rcDNA wird im Nucleus in cccDNA konvertiert, welche von der zellulären RNA Polymerase II in die viralen subgenomischen mRNAs und die pgRNA transkribiert wird. Anschließend werden die viralen RNAs ins Zytoplasma transportiert. Die pgRNA wird zum einen in Core und Polymerase translatiert, zum anderen dient sie als Vorlage für die Genomreplikation, welche durch Bindung der viralen Polymerase an ϵ gestartet wird. Die Polymerase-pgRNA-Interaktion initiiert sowohl die Verpackung des pgRNA-Polymerase-Komplexes in aus Core-Proteinen assemblierende Capside als auch die reverse Transkription der pgRNA in (-)-DNA. Während der Reifung der Capside (*Capsid maturation*) wird die rcDNA-Synthese abgeschlossen. Reife Capside können entweder zurück zum Nucleus migrieren oder werden von den parallel an der ER-Membran translatierten Oberflächenproteinen (LHBs, MHBs, SHBs) umhüllt und verlassen die Zelle über *Multivesicular Bodies* (MVB). Subvirale Sphären werden über den konventionellen sekretorischen Weg freigesetzt. Die Freisetzung subviraler Filamente erfolgt über MVB. HSPG = Heparansulfat-Proteoglykane, NTCP = sodium taurocholate co-transporting polypeptide, rcDNA = relaxed circular DNA, cccDNA = covalently closed circular DNA, pgRNA = prägenomische RNA, ER = Endoplasmatisches Retikulum, MVB = *Multivesicular Body*, SVP = Subvirale Partikel, ϵ = Enkapsidierungssignal. Modifiziert nach [184].

1.3 *In vitro* Infektionssysteme

Neben primären humanen Hepatozyten (PHH) und primären Hepatozyten des nördlichen Spitzhörnchens *Tupaia belangeri* (PTH) stellen differenzierte HepaRG-Zellen die einzigen Zellsysteme dar, um die Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus *in vitro* zu untersuchen [125,154,185–187]. Obwohl von Hepatozyten abstammend, kann keine der etablierten Hepatomzelllinien, wie z. B. HepG2 oder Huh7, mit HBV infiziert werden [125,154]. Aufgrund ihrer Suszeptibilität für eine HBV-Infektion sind PHH, PTH und HepaRG die einzigen Zelltypen, anhand derer der gesamte HBV-Lebenszyklus untersucht werden kann [125]. Im Gegensatz zur HBV-Infektion *in vivo*, für deren Etablierung schon zehn Virionen ausreichen [10], ist die *in vitro* Infektion primärer Hepatozyten erheblich weniger effizient [95,125,151]. Darüber hinaus sind primäre Hepatozyten, insbesondere PHH, nur begrenzt verfügbar und variieren hinsichtlich Qualität und Suszeptibilität zwischen den Donoren, was Schwierigkeiten für die Reproduzierbarkeit der Infektionen mit sich bringt [95,125]. Weiterhin sind PHH und PTH direkt nach der Isolierung nur für wenige Tage suszeptibel, die Zellen beginnen in Kultur rasch zu dedifferenzieren, was mit dem Verlust der Suszeptibilität für eine HBV-Infektion korreliert [126]. Durch die Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO), Hydrocortison und Polyethylenglykol (PEG) während des Infektionsprozesses *in vitro* können sowohl die Infektionseffizienz als auch die Reproduzierbarkeit deutlich erhöht werden [125]. Die hepatische bipotente Progenitorzelllinie HepaRG, welche aus einem HCC einer HCV-infizierten Patientin etabliert wurde, kann *in vitro* mittels DMSO in Hepatozyten-artige Zellen differenziert werden [154]. Nach DMSO-abhängiger, zweiwöchiger Differenzierung ist eine Subpopulation dieser Zellen suszeptibel für eine HBV-Infektion. Wie bei der *in vitro* Infektion von PHH und PTH müssen auch zur Etablierung einer effizienten Infektion in HepaRG DMSO und PEG zugesetzt werden [125]. Wie genau DMSO die Infektion fördert, ist bislang nicht bekannt, es konnte aber beobachtet werden, dass durch DMSO im Zuge der HepaRG-Differenzierung die Expression des HBV-Rezeptors NTCP sowie die Polarisierung der HepaRG-Zellen induziert werden [125,188–190]. Des Weiteren fördert DMSO auch die HBV-Replikation [125,191]. Eine ektopische Expression von NTCP in humanen Hepatomzelllinien (HepG2 und Huh7) vermittelt Suszeptibilität für eine HBV-Infektion [139,140], wodurch das Repertoire an *in vitro* Infektionssystemen erweitert werden konnte. Die Verwendung stabil NTCP exprimierender HepG2- oder Huh7-Zellen ist deutlich weniger zeitaufwendig als der Gebrauch von HepaRG-Zellen, welche bis zur Infektion zunächst zwei Wochen kultiviert und zwei Wochen differenziert werden müssen. Allerdings bedarf es für deren Infektion neben der Zugabe von DMSO und PEG einer sehr hohen Anzahl an Viren pro Zelle (*multiplicity of infection*, MOI). Darüber hinaus stellen auch stabil NTCP-exprimierende Hepatomzellen ein heterogenes System dar, da lediglich etwa 10 % der Zellen Suszeptibilität für eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus aufweisen [139]. Die trotz stabiler

NTCP-Überexpression geringe Suszeptibilität dieser Zellen deutet weiterhin sehr auf die Existenz eines HBV-Co-Rezeptors hin.

1.4 ***Sodium taurocholate co-transporting polypeptide***

Sodium taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) ist ein etwa 38 kDa großer Gallensäuretransporter und gehört der Familie der *solute carrier 10* (SLC10) an, welche auch als Natrium-Gallensäure-Cotransporter-Familie (*sodium bile acid cotransporter family*) bezeichnet wird [192,193]. Neben NTCP (SLC10A1) gehören fünf weitere Proteine zur SLC10-Familie, der *apical sodium-dependent bile acid transporter* (ASBT, SLC10A2), der *sodium-dependent organic anion transporter* (SOAT, SLC10A6) sowie als P3 (SLC10A3), P4 (SLC10A4) und P5 (SLC10A5) bezeichnete Mitglieder mit bis jetzt unbekannter Funktion [193,194]. Das fünf Exons umfassende SLC10A1-Gen codiert für das 349 Aminosäuren lange Glykoprotein NTCP [195]. NTCP ist ein Transmembranprotein mit einem extrazellulären N-Terminus und einem zytoplasmatischen C-Terminus [193,196]. Bioinformatische Analysen ergaben, dass NTCP wahrscheinlich neun Transmembrandomänen besitzt [193,194]. NTCP ist ein fast ausschließlich in der sinusoidalen/basolateralen Membran von Hepatozyten lokalisierter Gallensäure-Natrium-Symporter, dessen Substrat hauptsächlich konjugierte Gallensalze, wie Taurocholat und Glykocholat, sind [193,195,197]. Während des NTCP-abhängigen Transports gelangen Gallensalze zusammen mit Natrium-Ionen (Na^+) in einer Stöchiometrie von zwei Natrium-Ionen pro Gallensalz-Molekül in die Leberzelle [192,195,198]. Dabei ist NTCP essentiell in die Homöostase und enterohepatische Zirkulation von Gallensäuren involviert [193]. Neben der physiologischen Funktion als Gallensäure-Transporter konnte NTCP als funktioneller Rezeptor für das Hepatitis-B-Virus identifiziert werden [139]. Als erster potentieller Rezeptorkandidat vermittelt NTCP nach ektopischer Expression in für eine HBV-Infektion nicht suszeptiblen Zellen Suszeptibilität und ist daher als *bona fide* Rezeptor etabliert [125,126,139]. Die Aminosäuren 157–162 konnten als essentiell für die Interaktion mit der viralen Rezeptorbindedomäne ermittelt werden [139]. Wie genau NTCP den Zelleintritt des Hepatitis-B-Virus vermittelt, ist bislang unklar, evident ist aber, dass die PreS1-Bindung an NTCP mit dessen Transportfunktion interferiert [149]. So kann die Bindung myristoylierter PreS1-Peptide durch Taurocholsäure inhibiert werden und umgekehrt hemmt die Bindung des viralen Lipopeptids den Gallensäure-Transport [140,142,155].

1.5 Annexin A5

Annexin A5 (AnxV) gehört zur Annexin-Superfamilie, einer Familie Calcium und Phospholipide bindender Proteine, welche nur in Eukaryoten vorkommt [199]. Die Annexine der Vertebraten werden als Annexin A-Familie klassifiziert [199]. Die humane Annexin-Familie wiederum besteht aus zwölf Proteinen, Annexin A1–A13, wobei Annexin A12 in der Nomenklatur nicht vergeben ist [199,200]. Mit einem Molekulargewicht von etwa 36 kDa ist das 320 Aminosäuren umfassende AnxV das kleinste der humanen Annexine [200].

AnxV wird ubiquitär exprimiert und liegt sowohl zytosolisch vor als auch – obwohl es kein sekretorisches *signal peptide* aufweist – an der extrazellulären Seite der Plasmamembran [199–202]. AnxV besteht aus einer am Carboxyterminus lokalisierten Kerndomäne, die zwischen den Annexinen hoch konserviert ist, und einer variablen aminoterminalen Domäne, welche als Bindedomäne für molekulare Interaktionspartner dient [200,203,204]. Die Kerndomäne wird aus vier gleichartigen, etwa 70 Aminosäuren umfassenden Subdomänen gebildet, die zyklisch angeordnet sind und die Membranbindedomäne darstellen (Abb. 10) [203,204]. Die Bindung von AnxV an Membranen ist abhängig von Calcium-Ionen (Ca^{2+}). Dabei binden vier bis fünf Calcium-Ionen an der Kerndomäne und vermitteln über ihre positive Ladung die Bindung an in der Membran lokalisierte, negativ geladene Phospholipide, vor allem an Phosphatidylserin (PS) [200]. Auf diese Weise an der Membran gebundenes AnxV kann weiterhin zu zweidimensionalen netzartigen Strukturen assemblieren, welche für Membranreparaturprozesse von Bedeutung sind [200]. Darüber hinaus ist AnxV in weitere Membran-assoziierte Prozesse involviert. So kann AnxV verschiedene Membranstrukturen stabilisieren sowie Einstülpungen der Plasmamembran und damit Endozytose induzieren [201,202]. Des Weiteren fungiert AnxV als eine Art Membran-Plattform, welche andere Proteine zur Plasmamembran rekrutieren kann [201].

Die hoch-affine Bindung von AnxV an PS wird auch für diagnostische Zwecke genutzt. Dabei wird markiertes AnxV zur Detektion apoptotischer Zellen, welche große Mengen an PS an der Zelloberfläche exponieren, verwendet [205].

In den 1990ern Jahren wurde AnxV als für den Zelleintritt des Hepatitis-B-Virus relevanter Faktor beschrieben und als potentieller HBV-Rezeptor diskutiert [206–211]. Dabei konnte zum einen eine Bindung der S-Domäne der viralen Oberflächenproteine an AnxV nachgewiesen werden, zum anderen wurde eine Interaktion von AnxV mit Lipidkomponenten der Virushülle beobachtet [206,208,209]. Weiterhin wurde beschrieben, dass humanes AnxV eine für den HBV-Entry essentielle Rolle spielt [210,211], die evidente Funktionalität als HBV-Rezeptor konnte allerdings nicht bestätigt werden [114].

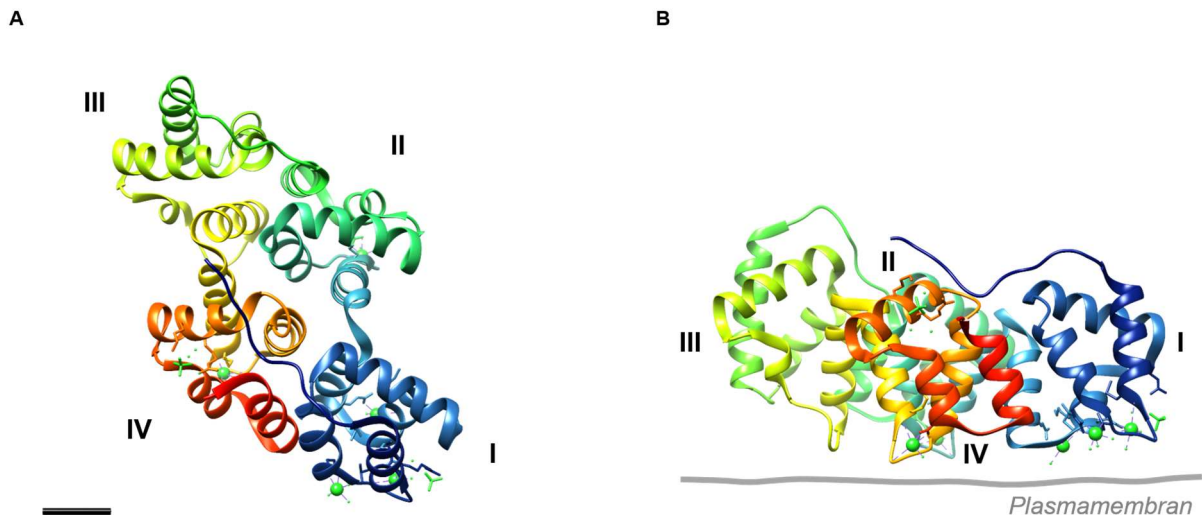


Abbildung 10: Struktur von Annexin A5.

Dargestellt ist die Tertiärstruktur von humanem Annexin A5, von oben **(A)** und von der Seite **(B)** betrachtet. Die vier die Kerndomäne aufbauenden Subdomänen (I–IV) sind entsprechend nummeriert, der N-Terminus ist in blau dargestellt, der C-Terminus in rot. Calcium-Ionen sind als grüne Kugeln dargestellt. Die Struktur wurde anhand der PDB-Datei 1AVR unter Verwendung von UCSF Chimera visualisiert [203,212]. Maßstabbalken = 10 Å.

1.6 α -Taxilin

Das zelluläre Protein α -Taxilin (Txlna) umfasst 546 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von etwa 62 kDa auf (Abb. 11). Txlna gehört zur Taxilin-Proteinfamilie, welche mindestens die drei Taxilin-Isoformen α -, β - und γ -Taxilin umfasst [213,214]. Während β -Taxilin fast ausschließlich in Skelett- und Herzmuskelzellen vorliegt, werden α -Taxilin und γ -Taxilin ubiquitär exprimiert [214]. Im Gegensatz zu γ -Taxilin konnte allerdings eine erhöhte Expression von Txlna im Herz und in der Niere sowie in Pankreas und Leber nachgewiesen werden [213]. Darüber hinaus wurde eine verstärkte Txlna-Expression in Tumoren, wie dem hepatozellulären Karzinom (HCC) und dem Nierenzellkarzinom (*renal cell carcinoma*, RCC), detektiert, welche sowohl mit einer erhöhten proliferativen Aktivität des Tumors als auch mit einer verstärkten Metastasierung korreliert [215,216]. Auch in kolorektalen Tumoren konnten erhöhte Txlna-Mengen nachgewiesen werden, die ebenfalls mit einer erhöhten Tumor-Proliferation einhergingen [217].

Mit einer außerordentlich langen *coiled-coil*-Domäne, welche in der carboxyterminalen Hälfte des Proteins lokalisiert ist, weist Txlna ein strukturelles Merkmal auf, das als wichtig für Protein-Protein-Interaktionen und für die Protein-Dimerisierung bekannt ist [213]. Weiterhin ergaben strukturelle Analysen, dass Txlna keine Transmembrandomänen besitzt, es ist aber bekannt,

dass die verwandten Hefe-Proteine Uso1 und Sys3, welche eine homologe *coiled-coil*-Domäne besitzen, peripher mit Membranen assoziiert sind [213,218–220].

Funktionell ist Txlna in den intrazellulären Vesikeltransport involviert [213,221]. Dabei interagiert es mit Syntaxin-1a, -3 und -4, so lange diese nicht im SNARE(*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*)-Komplex assembliert sind [221]. Dadurch wird die Partizipation der Syntaxine an der Bildung des SNARE-Komplexes verhindert, was letztlich die Interaktion zwischen *vesicle*-SNARE und *target*-SNARE unterbindet und unter anderem zur Inhibition der Ca^{2+} -abhängigen Exocytose führt [213,221]. Weiterhin ist Txlna anscheinend in den Transport intrazellulärer Komponenten zur Plasmamembran involviert, wobei es mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett interagiert [222]. Darüber hinaus wurde eine Beteiligung von Txlna im post-endozytotischen *Recycling*-Prozess des Transferrin-Rezeptors beschrieben [223].

Neben erhöhten Mengen an Txlna in Tumorgewebe wurde eine divergente Txlna-Expression in Lebergewebe chronisch mit dem Hepatitis-B-Virus oder dem Hepatitis-C-Virus infizierter Patienten beschrieben [180,224]. Eingehende Untersuchungen ergaben, dass Txlna wesentlich in den Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus eingebunden ist. So interagiert Txlna direkt mit der PreS1-Domäne des großen HBV-Oberflächenproteins LHBs und vermittelt über eine parallele Bindung der ESCRT-Komponente Tsg101 die MVB-abhängige Freisetzung infektiöser Virionen und subviraler Filamente [180,183].

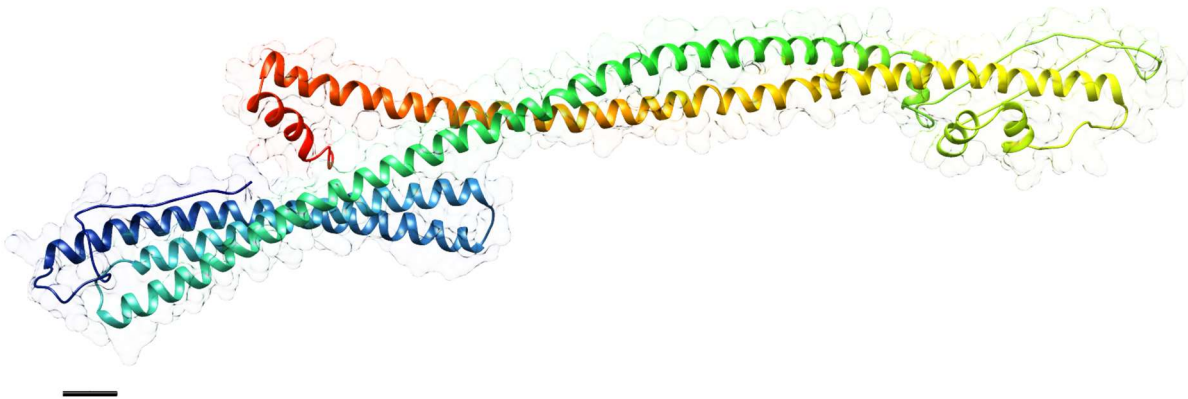


Abbildung 11: Struktur von α -Taxilin.

Dargestellt ist die *in silico* berechnete Struktur von Txlna, welche eine außergewöhnlich lange C-terminale *coiled-coil*-Domäne aufweist. Das Modell umfasst die Aminosäuren 32–493, was 84 % der Aminosäuresequenz entspricht. Der N-Terminus ist in blau dargestellt, der C-Terminus in rot. Das Strukturmodell wurde gemäß [225] berechnet und unter Verwendung von UCSF Chimera visualisiert [212]. Maßstabbalken = 10 Å.

2. Ziel der Arbeit

Der *Entry*-Prozess des Hepatitis-B-Virus gehört zu den bis heute am wenigsten verstandenen Abschnitten des HBV-Lebenszyklus, was auf die lange Zeit nur limitierte Verfügbarkeit effizienter *in vitro* Infektionssysteme zurückzuführen ist. Mit der Identifizierung von NTCP als funktioneller HBV-Rezeptor im Jahr 2012 konnte ein bedeutender Fortschritt zum Verständnis des *Entry*-Prozesses erzielt werden. NTCP ist der erste und bisher einzige HBV-Rezeptorkandidat, welcher ektopisch exprimiert basal nicht infizierbaren Zellen Suszeptibilität für eine HBV-Infektion verleiht. Dennoch gibt es einige ungewöhnliche Gegebenheiten hinsichtlich NTCP als HBV-Rezeptor, weshalb sich die Frage stellt, ob NTCP der alleinige HBV-Rezeptor oder vielmehr Teil eines Rezeptorkomplexes ist, dem weitere (Co-)Rezeptoren angehören.

Ein für den HBV-Infektionsprozess potentiell relevantes Protein ist α -Taxilin (Txlna). Das zelluläre Protein Txlna wird ubiquitär exprimiert und wurde als essentieller Faktor für den HBV-Lebenszyklus identifiziert [180]. Dabei konnte eine Interaktion von Txlna mit der PreS1PreS2-Domäne des großen viralen Oberflächenproteins LHBs beobachtet werden. Weitere Untersuchungen der Interaktion zwischen Txlna und LHBs ergaben, dass Txlna spezies-spezifisch an den N-terminalen Bereich der PreS1-Domäne bindet [226]. So interagiert Txlna mit einem Peptid, das die AS 2–47 der PreS1-Domäne umfasst, nicht jedoch mit einer Deletionsmutante, der die Rezeptorbindedomäne größtenteils fehlt (PreS1PreS2_ Δ aa10–47) [226]. Des Weiteren konnte das ehemals als potentieller HBV-Rezeptor diskutierte Protein Annexin A5 affinitätschromatographisch und massenspektrometrisch als direkter Interaktionspartner von Txlna identifiziert werden [227]. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde eine Beteiligung von Txlna am *Entry*-Prozess des Hepatitis-B-Virus in Betracht gezogen.

Ziel dieser Arbeit war die eingehende Charakterisierung des zellulären Proteins α -Taxilin hinsichtlich dessen Bedeutung für den *Entry*-Prozess des Hepatitis-B-Virus. Dafür sollte die Interaktion zwischen Txlna und PreS näher charakterisiert werden. Weiterhin sollte die subzelluläre Lokalisation von Txlna, AnxV und NTCP in HBV-suszeptiblen Zellen eingehend analysiert und mit der Situation in nicht-suszeptiblen Zellen verglichen werden. Zuletzt sollte die funktionelle Relevanz von Txlna für den *Entry*-Prozess des Hepatitis-B-Virus umfassend untersucht werden, wofür zunächst ein *in vitro* Infektionssystem etabliert werden musste.

3. Material

3.1 Zellen

3.1.1 prokaryotische Zellen

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK ⁻ , mK ⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> M15[pREP4]	F ⁻ , Φ80ΔlacM15, thi, lac ⁻ , mtl ⁻ , recA ⁺ , [pREP4, lacI, KmR]	Qiagen, Hilden

3.1.2 eukaryotische Zellen

Stamm	Beschreibung	Herkunft
HepAD38	Humane Hepatomzelllinie abstammend von HepG2-Zellen, in deren Genom ein 1,2-faches HBV- Genom (Genotyp D, Serotyp ayw) stabil integriert ist.	Ladner <i>et al.</i> [228]
HepaRG	Humane hepatische Progenitorzelllinie abstammend von einem HCV-positiven HCC, welche <i>in vitro</i> in Hepatozyten-artige Zellen differenziert werden kann.	Gripon <i>et al.</i> [154]
HepaRG-T1K6	Stabile TXLNA-Knockout Zelllinie erzeugt mittels CRISPR/Cas9- System unter Verwendung der sgRNA-txlna1 abstammend von HepaRG-Zellen	diese Arbeit, hergestellt von [REDACTED]

Stamm	Beschreibung	Herkunft
HepaRG-T3K6	Stabile TXLNA- <i>Knockout</i> Zelllinie erzeugt mittels CRISPR/Cas9-System unter Verwendung der sgRNA-txlna3 abstammend von HepaRG-Zellen	diese Arbeit, hergestellt von [REDACTED]
HepaRG-T6K1	Stabile TXLNA- <i>Knockout</i> Zelllinie erzeugt mittels CRISPR/Cas9-System unter Verwendung der sgRNA-txlna6 abstammend von HepaRG-Zellen	diese Arbeit, hergestellt von [REDACTED]
HepaRG- <i>off target</i>	Korrespondierende CRISPR Kontrollzellen, welche mit unspezifischer sgRNA transfiziert wurden, abstammend von HepaRG-Zellen	diese Arbeit, hergestellt von [REDACTED]
HepG2-hNTCP	Stabil lentiviral transduzierte, humanes NTCP exprimierende Hepatomzelllinie abstammend von HepG2-Zellen	Ni <i>et al.</i> [140]
Primäre humane Hepatozyten (PHH) Sf9	Isoliert aus Lebergewebe einer partiellen Hepatektomie Insektenzelllinie abstammend von Ovar-Zellen der Larve des Eulenfalters <i>Spodoptera frugiperda</i>	MH-Hannover, TTU Hepatitis, DZIF DSMZ No. ACC 125

3.2 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pcDNA3.1(-)_mCherryTxlna	Expressionskonstrukt für N-terminal mCherry-markiertes α -Taxilin	[REDACTED]
pBacPaK9-Taxilin	Baculovirus-Expressionskonstrukt für N-terminal HA-Strep- und C-terminal His-markiertes humanes α -Taxilin	[REDACTED] [229]

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0	CRISPR/Cas9-Klonierungsplasmid	Ran <i>et al.</i> [230] (Adgene #62988)
pQE8_preS1/preS2	Expressionskonstrukt für die PreS1PreS2-Domäne des großen Oberflächenproteins von HBV (gtD)	
pUC18	Leerer Vektor, dient als Kontrolle	Invitrogen, Karlsruhe
PX459_off target	CRISPR/Cas9 Plasmid, welches für unspezifische sgRNA codiert	diese Arbeit, hergestellt von
PX459_taxilin1	CRISPR/Cas9 Plasmid, welches für die sgRNA-taxilin1 codiert	diese Arbeit, hergestellt von
PX459_taxilin2	CRISPR/Cas9 Plasmid, welches für die sgRNA-taxilin2 codiert	diese Arbeit, hergestellt von
PX459_taxilin3	CRISPR/Cas9 Plasmid, welches für die sgRNA-taxilin3 codiert	diese Arbeit, hergestellt von
PX459_taxilin6	CRISPR/Cas9 Plasmid, welches für die sgRNA-taxilin6 codiert	diese Arbeit, hergestellt von
PX459_taxilin8	CRISPR/Cas9 Plasmid, welches für die sgRNA-taxilin8 codiert	diese Arbeit, hergestellt von

3.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
Accutase	Merck Millipore, Darmstadt
<i>FastDigest</i> BbsI	Fermentas, St. Leon-Rot
Q5 <i>HotStart</i> DNA Polymerase	NEB, Frankfurt am Main
<i>RevertAid H Minus Reverse Transcriptase</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
RQ1 <i>RNase-free DNase</i>	Promega, Fitchburg, USA
T4 PNK	NEB, Frankfurt am Main
T7 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
T7 Endonuklease I (M0302)	NEB, Frankfurt am Main

3.4 Oligonukleotide

3.4.1 Klonierungsoligonukleotide

Bezeichnung	Nummer	Sequenz (5' → 3')
crRNA_off-target_fwd	1074	CAC CGC ACT ACC AGA GCT AAC TCA
crRNA_off-target_rev	1075	AAA CTG AGT TAG CTC TGG TAG TGC
crRNA_txlna_1_fwd	1248	CAC CGA ACC AAG ACA AAA AGA ACG
crRNA_txlna_1_rev	1249	aaa cCG TTC TTT TTG TCT TGG TTC
crRNA_txlna_2_fwd	1250	CAC CGC AAC CGG AAG CAG GAC CCG A
crRNA_txlna_2_rev	1251	aaa cTC GGG TCC TGC TTC CGG TTG C
crRNA_txlna_3_fwd	1252	CAC CGG AGA GAA GGA ACC CTC CAA
crRNA_txlna_3_rev	1253	AAA CTT GGA GGG TTC CTT CTC TCC
crRNA_txlna_4_fwd	1254	CAC CGC TCC TCA GAG ACA TCA CGA
crRNA_txlna_4_rev	1255	AAA CTC GTG ATG TCT CTG AGG AGC
crRNA_txlna_5_fwd	1256	CAC CGA ATA CTC TGA GTA CCC CAG
crRNA_txlna_5_rev	1257	AAA CCT GGG GTA CTC AGA GTA TTC
crRNA_txlna_6_fwd	1258	CAC CGA GTA CCC CAG AGG AGA AGC
crRNA_txlna_6_rev	1259	AAA CGC TTC TCC TCT GGG GTA CTC
crRNA_txlna_7_fwd	1260	CAC CGG TCC TTC TCT TGC ACC AGC
crRNA_txlna_7_rev	1261	AAA CGC TGG TGC AAG AGA AGG ACC
crRNA_txlna_8_fwd	1262	CAC CGC CTA TGC CGT GAG CTG CAG
crRNA_txlna_8_rev	1263	AAA CCT GCA GCT CAC GGC ATA GGC

3.4.2 Sequenzierungsprimer

Bezeichnung	Nummer	Sequenz (5' → 3')
Human U6 Seq F_Insert	1073	ACT ATC ATA TGC TTA CCG TAA C
txlna_seq1_fwd	1278	GGC TGT CTG GGG ATA TGC GCA T
txlna_seq1_rev	1279	TCG TTT GGC TGC CAC CTG AC
txlna_seq2_fwd	1280	GTA AAC AGA CTT AAA GAA GTT AGG C
txlna_seq2_rev	1281	AGA ACG TCA AGT CCA AAC TC

Bezeichnung	Nummer	Sequenz (5' → 3')
txlna_seq3_fwd	1282	TTT CAC TAG GGT ACA GTC GT
txlna_seq3_rev	1283	AGT TTC TCC TCT TGC TGC AC
txlna_seq4_fwd	1284	CAG AGT CAG AGC TGG AAT AG
txlna_seq4_rev	1285	GTT TTT TAG TGG CCA GAA GA

3.4.3 RT-qPCR-Primer

Bezeichnung	Nummer	Sequenz (5' → 3')
Txlna-fwd	280	ATG AAG AAC CAA GAC AAA AAG A
Txlna-rev	281	CTG GCT GCT GCC GGG AC
NTCP-fwd	720	TTC TGT GCC CTT GGC ATG AT
NTCP-rev	721	GAG GAC GAT CCC TAT GGT GC
hRPL27cDNA-fwd	835	AAA GCT GTC ATC GTG AAG AAC
hRPL27cDNA-rev	836	GCT GCT ACT TTG CGG GGG TAG
HBV/SHBs Rev	1443	CGA ACC ACT GAA CAA ATG GC
HBV/SHBs Fwd gtB/G/D/A	1444	GCA CCT GTA TTC CCA TCC CA

3.5 Antikörper

3.5.1 Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung WB/IF/FACS/Blocking	Hersteller
anti-β-actin	Maus	monoklonal	1:10.000/-/-/-	Sigma-Aldrich, USA
anti-AnxV (ab14196)	Kaninchen	polyklonal	1:1000/1:100/-/-	Abcam, Cambridge, UK
anti-HBcAg (B0586)	Kaninchen	polyklonal	-/1:200/1:200/-	Dako, Denmark
anti-His-tag (H-15)	Kaninchen	polyklonal	-/-/-/1:500	St. Cruz Biotech, USA
anti-LHBs (MA18/7)	Maus	monoklonal	1:1000/1:100/-/1:2500	Heermann <i>et al.</i> [105]

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung WB/IF/FACS/Blocking	Hersteller
anti-mCherry (ab167453)	Kaninchen	polyklonal	-/-/1:100/-	Abcam, Cambridge, UK
anti-NTCP (HPA042727)	Kaninchen	polyklonal	1:1000/1:100/-/-	Sigma-Aldrich, USA
anti-NTCP- FITC (bs1958R)	Kaninchen	polyklonal	-/-/1:50/1:2500	Bioss Antibodies, USA
anti-Txlna (E-2)	Maus	monoklonal	1:1000/1:80/-/1:500	St. Cruz Biotech, USA
anti-Txlna (HPA045383)	Kaninchen	polyklonal	1:500/-/-/1:500	Atlas Antibodies, Sweden
anti- Transferrin- Rezeptor (H68.4)	Maus	monoklonal	1:3000/-/-/-	Invitrogen, Karlsruhe

3.5.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung WB/IF/FACS	Hersteller
anti- Kaninchen- Alexa488	Esel	polyklonal	-/1:1000/1:1000	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
anti-Maus-Cy3	Esel	polyklonal	-/1:400/-	Jackson ImmunoResear ch Europe Ltd., Suffolk, UK
anti-Maus-HRP	Schaf	polyklonal	1:2000/-/-	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung WB/IF/FACS	Hersteller
anti-Kaninchen-HRP	Esel	polyklonal	1:2000/-/-	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
anti-Maus-IRDye800CW	Esel	polyklonal	1:10.000/-/-	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
anti-Kaninchen-IRDye800CW	Esel	polyklonal	1:10.000/-/-	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
anti-Maus-IRDye680CW	Esel	polyklonal	1:10.000/-/-	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
anti-Kaninchen-IRDye680CW	Esel	polyklonal	1:10.000/-/-	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg

3.6 Fluoreszenzfarbstoffe

Bezeichnung	Verdünnung für IF	Hersteller
DAPI (0,1 mg/ml Stock in PBS)	1:400	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Phalloidin-Atto 633	1:400	Sigma Aldrich, USA

3.7 Marker


3.7.1 DNA-Marker

Bezeichnung	Hersteller
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

3.7.2 Protein-Marker

Bezeichnung	Hersteller
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

3.8 Inhibitoren

Inhibitor	Ziel	Hersteller
Aprotinin	Serinproteasen	Sigma-Aldrich, Seelze
Leupeptin	Serin-, Cysteinproteasen	Sigma-Aldrich, Seelze
Myrcludex B	HBV-Zelleintritt	 Heidelberg
Natriumorthovanadat	Phosphatasen	Sigma-Aldrich, Seelze
Pepstatin	Saure Proteasen	Sigma-Aldrich, Seelze
Phosphatase-Inhibitoren	Phosphatasen	Sigma-Aldrich, Seelze
PMSF	Serinproteasen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

3.9 Lösungen für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> ; 4,5 g/l Glukose, w/o L-Glutamin)	Lonza, Basel, Schweiz
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	Biochrom GmbH, Berlin
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	Sigma-Aldrich, Seelze
L-Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin
Hydrocortison (Hydrocortison-21-Hemisuccinat-Natriumsalz)	St. Cruz Biotech, USA
Insulin (aus Rinderpankreas)	Sigma-Aldrich, Seelze
Penicillin/Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin
PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PEI Medienküche, Langen

Bezeichnung	Hersteller
<i>Primary Hepatocyte Maintenance Supplements</i> (10 mM Dexamethason, Penicillin/Streptomycin, Insulin, Transferrin, Selen, BSA, Linolsäure, HEPES)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Puromycin	Sigma-Aldrich, Seelze
TC 100 Medium (0,35 g/l NaCO ₃)	PEI Medienküche, Langen
Trypsin/EDTA	PEI Medienküche, Langen
William's E Medium (2,2 g/l NaHCO ₃ , w/o L- Glutamin)	Biochrom GmbH, Berlin
William's E Medium (2,2 g/l NaHCO ₃ , w/o L- Glutamin, w/o Phenolrot)	Biochrom GmbH, Berlin

3.10 Medien

Medium	Zusammensetzung
HepAD38-Medium	DMEM (4,5 g/l Glukose) 10 % FCS (Biochrom) 0,1 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 50 µM Hydrocortison 5 µg/ml Insulin
HepaRG-Wachstumsmedium	William's E Medium 10 % FCS (Biochrom) 0,1 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 50 µM Hydrocortison 5 µg/ml Insulin
HepaRG-Differenzierungsmedium	William's E Medium 10 % FCS (Biochrom) 0,1 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 50 µM Hydrocortison 5 µg/ml Insulin 2 % DMSO

Medium	Zusammensetzung
HepG2-hNTCP-Medium (DMEM <i>complete</i>)	DMEM (4,5 g/l Glukose) 10 % FCS (Biochrom) 0,1 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin
HepG2-hNTCP- <i>Replication</i> Medium	DMEM (4,5 g/l Glukose) 10 % FCS (Biochrom) 0,1 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 2,5 % DMSO
Lysogeny broth (LB)-Medium	1 % Trypton (w/v) 0,5 % Hefe Extrakt (w/v) 1 % NaCl (w/v)
PHH-Medium	William's E Medium w/o phenol red <i>Primary Hepatocyte Maintenance</i> <i>Supplements</i>
Sf9-Medium	TC 100 Medium 10 % FCS (Sigma) 0,1 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

3.11 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
5x Reaktionspuffer für RT	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
5x Q5 <i>Reaction Buffer</i>	NEB, Frankfurt am Main
10x NEBuffer 2	NEB, Frankfurt am Main
10x T4 <i>Ligation Buffer</i>	NEB, Frankfurt am Main
10x <i>Tango Buffer</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
6-Aminohexansäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Acetate 4.0 (10 mM Natriumacetat, pH 4,0)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Acetate 4.5 (10 mM Natriumacetat, pH 4,5)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Acetate 5.0 (10 mM Natriumacetat, pH 5,0)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

Bezeichnung	Hersteller
Acetate 5.5 (10 mM Natriumacetat, pH 5,5)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Agarose	Genaxxon, Biberach
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
ATP	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Seelze
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V	PAA, Linz, Österreich
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich, Seelze
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Coomassie-Brillantblau R-250	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DABCO	Merck, Darmstadt
DEPC-H ₂ O	PEI Medienküche, Langen
Desthiobiotin	Sigma-Aldrich, Seelze
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Biomol GmbH, Hamburg
DMSO	Genaxxon BioScience, Ulm
dNTP-Mix (10 mM)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
EDC	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
EDTA	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol (reinst)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanolamin Hydrochlorid NaOH (1 M, pH 8,5)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
EZ-Link™ sulfo-NHS-SS Biotin	Thermo Fisher Scientific, USA
Formaldehyd (37,5 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Glycerol	Gerbu Biotechnik, Heidelberg

Bezeichnung	Hersteller
Guanidinhydrochlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Imidazol	Merck, Darmstadt
Immobilon Western HRP Substrat	Merck Millipore, Darmstadt
IPTG	Fermentas, St. Leon-Rot
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kanamycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Luminata Forte 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
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
NHS	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka, Deisenhofen
Odyssey® Blocking Buffer in TBS	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
peqGOLD TriFast	Peqlab, Erlangen
Pierce™ NeutrAvidin™ Agarose	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Polyethylenglycol (PEG) 8000	AppliChem, Darmstadt
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences, Eppelheim
Protein A/G PLUS-Agarose	St. Cruz Biotech, USA
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Roti 40 Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Roti®-Block	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
RQ1 DNase 10x Reaction Buffer	Promega, Fitchburg, USA
RQ1 DNase Stop Solution	Promega, Fitchburg, USA
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Bezeichnung	Hersteller
Saponin	Sigma-Aldrich, Seelze
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Fluka, Deisenhofen
Tween20	Genaxxon, Ulm
Xylen Cyanol	Sigma-Aldrich, Seelze

3.12 Puffer und Lösungen

3.12.1 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Anodenpuffer I	20 % Ethanol (v/v) 300 mM Tris
Anodenpuffer II	20 % Ethanol (v/v) 25 mM Tris
Biacore-Laufpuffer	0,05 % Tween-20 3 mM EDTA gelöst in PBS, pH 7,1
DNA loading dye (6x)	10 mM Tris-HCl pH 7,6 0,03 % Bromphenolblau 0,03 % Xylen Cyanol 60 % Glycerol 60 mM EDTA
IP-Lysepuffer	1 mM PMSF 1 mM Natriumorthovanadat Phosphatase Inhibitoren 1:1000 30 µM Pepstatin 50 µM Leupeptin 5 mM EDTA 1,5 µM Aprotinin 1% NP-40 gelöst in PBS

Puffer	Zusammensetzung
Kathodenpuffer	20 % Ethanol (v/v) 40 mM 6-Aminohexansäure
MACS-Puffer	136 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 2 mM EDTA 0,5% W/V BSA pH 7,2
Mowiol (<i>Mounting Medium</i>)	10 % Mowiol (w/v) 25 % Glycerol (w/v) 2,5 % DABCO 100 mM Tris/HCl pH 8,5
<i>Phosphate buffered saline (PBS) (10x)</i>	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ ad 1 L ddH ₂ O
Puffer für die Oberflächenbiotinylierung	1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 0,5 mg/ml EZ-Link™ sulfo-NHS-SS Biotin gelöst in PBS
Puffer zur Absättigung von freiem Biotin	1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 50 mM NH ₄ Cl gelöst in PBS
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,2 150 mM NaCl 0,1% SDS (w/v) 1 % Natrium desoxycholat (w/v) 1 % Triton X-100
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris 0,4 % SDS (w/v) pH 6,7

Puffer	Zusammensetzung
SDS-Laufpuffer (10x)	0,25 M Tris 2 M Glycin 1 % SDS (w/v) pH 8,3
SDS-Probenpuffer (4x)	4 % SDS (w/v) 125 mM Tris-HCl pH 6,8 10 % Glycerol (v/v) 10 % β -Mercaptoethanol (v/v) 0,02 % Bromphenolblau (w/v)
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris 1 M Natriumacetat 50 mM EDTA pH 8
TBS-T (10x)	200 mM Tris-HCl pH 7,8 1,5 M NaCl 0,5 % Tween20
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl 0,4% SDS (w/v) pH 8,8

3.12.2 Spezielle Puffer zur Proteinreinigung

Art der Reinigung	Puffer	Zusammensetzung
Nickel-NTA Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen	Lysepuffer	6 M Guanidinhydrochlorid 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 10 mM Tris pH 8,0
	Equilibrierungspuffer	6 M Harnstoff 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 10 mM Tris pH 8,0
	Waschpuffer	6 M Harnstoff 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 10 mM Tris pH 6,3

Art der Reinigung	Puffer	Zusammensetzung
Strep-Tactin Affinitätschromatographie	Elutionspuffer	6 M Harnstoff 100 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 10 mM Tris 250 mM Imidazol pH 6,3
	Laufpuffer	PBS pH 7,4
	Elutionspuffer	PBS 2,5 mM Desthiobiotin pH 7,1

3.12.3 Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
APS-Gebrauchslösung	10 % (w/v) APS gelöst in ddH ₂ O
Blockierlösung für IF-Färbungen	1 % (w/v) BSA gelöst in PBS
Coomassie-Färbelösung	0,5 % Coomassie-Brillantblau R-250 25 % Ethanol (v/v) 10 % Essigsäure gelöst in ddH ₂ O
Entfärbelösung	25 % Ethanol 10 % Essigsäure gelöst in ddH ₂ O
Fixierlösung	3,7 % Formaldehyd gelöst in PBS
Milchpulverlösung	10 % Magermilchpulver (w/v) gelöst in TBS-T
Permeabilisierungslösung für IF-Färbungen	0,5 % Triton X-100 (v/v) gelöst in PBS
Permeabilisierungslösung für FACS-Färbungen	0,1 % Saponin (w/v) gelöst in MACS-Puffer
PEG-Stammlösung autoklaviert	40 % PEG8000 (w/v) gelöst in ddH ₂ O

3.13 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Enzygnost® HBsAg 6.0 ELISA	Siemens Healthcare GmbH, Erlangen
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Maxima™ SYBR Green qPCR Kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Quick Western Kit – IRDye 680 RD	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg

3.14 Geräte

3.14.1 Elektrophorese

Bezeichnung	Hersteller
Horizontales Elektrophorese-System HE33	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Hoefer Elektrophorese Power Supply-EPS301	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Mighty small Multiple Gel Caster SE200 Series	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Mighty small II-Laufkammer	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen
TE77 ECL-Semi-Dry Transfer Unit	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

3.14.2 Chromatographie

Bezeichnung	Hersteller
ÄKTA Purifier 10	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

3.14.3 Imaging

Bezeichnung	Hersteller
AGFA Curix60 Film Developer	AGFA, Köln
Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader	BioTek Germany, Bad Friedrichshall

Bezeichnung	Hersteller
Hypercassette™	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
INTAS Imaging System	INTAS, Göttingen
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg

3.14.4 Surface Plasmon Resonance Spektroskopie

Bezeichnung	Hersteller
Biacore T200	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

3.14.5 Mikroskope

Bezeichnung	Hersteller
Axiovert 40C	Carl Zeiss AG, Jena
Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG, Jena
Confocal Laser Scanning Microscope 510 meta	Carl Zeiss AG, Jena
Confocal Laser Scanning Microscope TCS SP8	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Eclipse Ti	Nikon, Tokio, Japan

3.14.6 Durchflusszytometer

Bezeichnung	Hersteller
CytoFLEX Flow Cytometer	Beckman Coulter, USA

3.14.7 PCR-Cycler

Bezeichnung	Hersteller
LightCycler® 1.5 Instrument	Roche, Mannheim
LightCycler® 480 Instrument II	Roche, Mannheim
Thermocycler	VWR International GmbH, Darmstadt

3.14.8 Zentrifugen

Bezeichnung	Hersteller
Avanti® J-26 SPI	Beckman Coulter, USA
Biofuge A	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Eppendorf Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Heraeus Multifuge 1S-R	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Heraeus Multifuge X3 FR	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Heraeus Sepatech Cryofuge 8500	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Microcentrifuge	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Sorvall RC 5C Plus	Sorvall GmbH, Bad Homburg

3.14.9 Weitere Geräte

Bezeichnung	Hersteller
HD 2200 Sonifizierer	Bandelin Sonopuls
Heizbad 1228-2F	VWR International GmbH, Darmstadt
Heraeus Bacterial incubator Typ B6760	Kendro, Langenselbold
Incubator BBD 6220 (Zellkultur)	Heraeus, Osterode
Infinite® M1000	Tecan, Männedorf, Schweiz
Inkubator Innova 44	New Brunswick Scientific, Enfield, USA
NanoDrop™ One ^C	Thermo Fisher Scientific, USA
Nanophotometer P300	IMPLEN, Westlake Village, USA
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph, Schwabach
RCT Classic Magnetrührer	IKA, Staufen
Rocking Plattform	Biometra, Göttingen
Satorius Analytical balance	Satorius, Göttingen

Bezeichnung	Hersteller
Satorius balance LP 6000 200S	Satorius, Göttingen
SterilGardRIII Advance	The Baker Company, ME, USA
Stuart roller mixer SRT9	Bibby Scientific, UK
Thermomixer 5436	Eppendorf, Enfield, USA
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Überkopfschüttler	VWR International GmbH, Darmstadt
Vakuumpumpe	HLC, Bovenden
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA

3.15 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Biacore Sensor Chip CM5	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Deckgläser, rund 15/18 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dialysemembran (MWCO 10 kDa)	Spectrum Laboratories, USA
Einwegspritzen (10 ml, 20 ml)	B.Braun, Melsungen
FACS-Röhrchen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
HBV PreS (gtD) Peptid-Microarray	PD Dr. Thomas Holzhauser, PEI, Langen
HisTrap™ HP 1 ml	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Hyperfilm (ECL)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Immobilon-P-Transfer-Membran	Merck Millipore, Schwalbach
Lightcycler Kapillaren	Genaxxon, Biberach
Objektträger SuperFrost	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Parafilm	Bemis, Bonn
Phase Lock Gel Heavy, 2 ml	5 PRIME GmbH, Hilden
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Pipettenspitzen, gestopft	4titude, Berlin
Roti®-Fluoro PVDF-Membran	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
RotiLabo® Spritzenfilter (0,22/0,45 µm)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Bezeichnung	Hersteller
Steritop GP Filter, 1000 ml, 0,22 µm	Millipore, Schwalbach
StrepTrap™ HP 5 ml	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Whatman Filterpapier 3 mm	VWR International GmbH, Darmstadt
Zellkulturflaschen (T75/T175)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24- und 96-Wellplatten)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Zentrifugenröhrchen (15 ml/50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

3.16 Software

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Photoshop CS6	Adobe, San Jose, USA
Biacore T200 Control Software	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Biacore T200 Evaluation Software	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Citavi 6	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
CytExpert	Beckman Coulter, USA
GraphPad Prism 8	GraphPad, USA
i-control 1.8	Tecan, Männedorf, Schweiz
Image Studio	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Image Studio Lite	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
INTAS GDS	Intas, Göttingen
LAS X	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
LightCycler Software 3.5	Roche, Mannheim
LightCycler 480 SW 1.5	Roche, Mannheim
MS Office	Microsoft, Redmond, USA
NIS-Elements AR 50.000	Nikon, Tokio, Japan

Bezeichnung	Hersteller
UCSF Chimera 1.13.1	UCSF Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, Universität von Kalifornien, USA [212]
Unicorn 5.31	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Vector NTI Advance 11.5.2	Invitrogen, Karlsruhe
ZEN 2012	Carl Zeiss AG, Jena
ZEN Lite 2012	Carl Zeiss AG, Jena

4. Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Prokaryotische Zellkultur

Zur Generierung von Übernachtskulturen von transformierten *E. coli* TOP10, *E. coli* DH5 α oder *E. coli* M15 wurden 100 ml LB-Medium mit den entsprechenden Bakterien eines Glycerolstocks oder einer einzelnen transformierten Bakterienkolonie inokuliert und für 16 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde dem LB-Medium, abhängig von dem Bakterienstamm und dem transformierten Plasmid, Ampicillin (100 μ g/ml) bzw. Kanamycin (30 μ g/ml) oder eine Kombination aus beiden Antibiotika zugesetzt. Um einen Glycerolstock herzustellen, wurden 5 ml einer Übernachtskultur pelletiert, anschließend in 600 μ l LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, resuspendiert und in 40 % Glycerol (v/v) aufgenommen. Glycerolstocks wurden stets bei -80 °C gelagert.

4.1.2 Eukaryotische Zellkultur

Alle in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und \geq 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. HepaRG-Zellen sowie die von dieser Zelllinie abstammenden CRISPR-HepaRG-Zellen wurden in HepaRG-Wachstumsmedium kultiviert, die Passage der Zellen erfolgte alle zwei Wochen bei einer Konfluenz von 100 %. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Um die adhärennten Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen, wurden diese mit 1 ml Trypsin für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 9 ml Wachstumsmedium gestoppt. Die Zellen wurden resuspendiert und in einer 1:5 Verdünnung in eine neue T75 Zellkulturflasche ausgesät.

HepG2-hNTCP-Zellen, welche stabil humanes NTCP überexprimieren, wurden in DMEM mit 10 % FCS, 0,1 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin (DMEM *complete*) kultiviert und bei einer Konfluenz von 80–90 % wie oben beschrieben passagiert. Die in frischem Medium resuspendierten Zellen wurden in 1:3–1:5 Verdünnungen in T75 Zellkulturflaschen ausgesät. Nach etwa zehn Passagen wurde dem Medium Puromycin (5 μ g/ml) zugesetzt, um stabil transfizierte HepG2-hNTCP-Zellen zu selektionieren. Für Experimente verwendete HepG2-hNTCP-Zellen wurden mindestens eine Passage vor Beginn des Versuchs und während desselben in DMEM *complete* ohne Puromycin kultiviert. Für Infektionsexperimente wurden HepG2-hNTCP-Zellen nach der initialen Infektion (siehe Abschnitt 4.1.9) in HepG2-hNTCP-*Replication*-Medium kultiviert.

Die für die Virusproduktion verwendeten, stabil mit einem überlangen HBV-Genom transfizierten HepAD38-Zellen wurden in DMEM *complete*, welchem zusätzlich Insulin (5 µg/ml) und Hydrocortison (50 µM) zugesetzt wurden, kultiviert und bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 90 % passagiert. Der Zellkulturüberstand wurde bei jeder Passage für die Präzipitation viraler Partikel aufgehoben und bei 4 °C gelagert. Um adhärenente Zellen zu lösen, wurden diese in 2 ml Trypsin für fünf bis zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Die in Medium resuspendierten Zellen wurden in 1:2–1:3 Verdünnungen in T175 Zellkulturflaschen ausgesät.

Primäre humane Hepatozyten (PHH) wurden in der Medizinischen Hochschule Hannover nach Leberresektion aus gesundem Gewebe isoliert und in kollagenbeschichtete Zellkulturplatten ausgesät. Die Zellen wurden nach Erhalt einmal mit PBS gewaschen und anschließend für maximal zwölf Tage in PHH-Medium kultiviert.

Die Insektenzelllinie Sf9 wurde in TC 100 Medium mit 10 % FCS, 0,1 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 27 °C ohne CO₂ kultiviert. Die Passage der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von mindestens 80 % zweimal pro Woche. Dafür wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Adhärenente Zellen wurden durch Abklopfen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, in PBS resuspendiert, in ein 50 ml Falcon überführt und für fünf Minuten bei 200 g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in frischem TC 100 Medium aufgenommen und in 1:1,5–1:2 Verdünnungen in neue T175 Zellkulturflaschen ausgesät.

4.1.3 Differenzierung von HepaRG-Zellen

Die humane hepatische Progenitorzelllinie HepaRG kann *in vitro* in Hepatozyten-ähnliche Zellen differenziert werden, welche suszeptibel für eine Infektion mit HBV sind. Es wurden stets 2×10^4 Zellen pro cm² ausgesät. Zunächst wurden die Zellen für zwei Wochen in HepaRG-Wachstumsmedium kultiviert, wobei alle zwei bis drei Tage das Medium gewechselt wurde, um eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten. Um den Differenzierungsprozess einzuleiten, wurden die Zellen nach zweiwöchiger Kultivierung in Wachstumsmedium für weitere zwei Wochen in HepaRG-Differenzierungsmedium, welches mit 2 % DMSO versetzt ist, kultiviert. Dabei wurde ebenfalls alle zwei bis drei Tage das Medium gewechselt. Nach zweiwöchigem Differenzierungsprozess wurden die Zellen mit HBV infiziert (siehe Abschnitt 4.1.9) oder geerntet bzw. fixiert und für weitere Experimente verwendet.

4.1.4 Infektion von Sf9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren

Sf9-Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 80–90 % mit Zellkulturüberstand bereits mit rekombinanten Baculoviren, welche in einer vorherigen Studie generiert wurden [229], infizierter Sf9-Zellen infiziert. Dafür wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden mit 10 ml infektiösem Zellkulturüberstand überschichtet und für drei bis vier Stunden bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurden 20 ml frisches Sf9-Medium zu den Zellen gegeben und diese bei 27 °C ohne CO₂ inkubiert. Nach 72 Stunden wurde der Überstand mitsamt der darin schwimmenden Zellen abgenommen, in ein 50 ml Falcon überführt und für zehn Minuten bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Falcon überführt und entweder für erneute Infektionen verwendet oder bis zur Proteinreinigung bei 4 °C gelagert. Sf9-Zellpellets wurden mit 10 ml PBS gewaschen und bei -20 °C gelagert.

4.1.5 Transfektion von HepaRG-Zellen

Für die Transfektion von HepaRG-Zellen mit den CRISPR/Cas9-Plasmiden wurde lineares Polyethylenimin (PEI, 1 mg/ml) verwendet. Es wurden 3 x 10⁵ Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät und bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 80 % mit 1 µg Plasmid-DNA und 6 µl PEI pro µg DNA transfiziert. Es wurden stets zwei Wells mit derselben sgRNA bzw. *off-target* Kontrolle transfiziert, wovon eines für die Bestimmung der *Genome Targeting*-Effizienz (siehe Abschnitt 4.2.5) und das andere für die Selektion von Klonen (siehe Abschnitt 4.1.7) verwendet wurde. Die Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion geerntet und einer Extraktion genomischer DNA unterzogen (siehe Abschnitt 4.2.5) oder hinsichtlich erfolgreich transfizierter Zellen selektioniert (siehe Abschnitt 4.1.7).

4.1.6 Transfektion von HepG2-hNTCP-Zellen

Für die transiente Transfektion von HepG2-hNTCP-Zellen mit Plasmid-DNA wurde lineares Polyethylenimin (PEI, 1 mg/ml) verwendet. Dafür wurden stets 0,7 µg Plasmid-DNA mit 10 µl PEI pro µg Plasmid-DNA in einem finalen Volumen von 100 µl PBS gemischt, für 15 Sekunden geschüttelt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde anschließend tropfenweise zu den in einer 12-Well-Platte in 1 ml DMEM *complete* ausgelegten, adhärennten HepG2-hNTCP-Zellen gegeben und bei 37 °C, 5 % CO₂ und ≥ 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 16 Stunden wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion infiziert (siehe Abschnitt 4.1.9) und für weitere Experimente verwendet.

4.1.7 Selektion und Kultivierung monoklonaler TXLNA-Knockout HepaRG-Zellen

48 Stunden nach Transfektion mit den CRISPR/Cas9-Plasmiden wurde die Selektion erfolgreich transfizierter Zellen begonnen. Dafür wurde dem Kultivierungsmedium 0,5 µg/ml Puromycin zugesetzt. Um tote Zellen zu entfernen, wurde das Medium täglich gewechselt. Nach etwa zwei Wochen konnten einzelne Zellklone, welche die Puromycin basierte Selektion überlebt hatten, identifiziert und in ein Loch einer 96-Well-Platte umgesiedelt werden. Dafür wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml PBS bedeckt. Unter Zuhilfenahme eines Mikroskops wurde die entsprechende Zellkolonie mit einer 1000 µl-Pipettenspitze vorsichtig vom Boden der Zellkulturschale abgekratzt und in ein Loch einer 96-Well-Platte, in das 20 µl Trypsin vorgelegt wurden, überführt und resuspendiert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion des Trypsins durch Zugabe von Kultivierungsmedium, welchem nun kein Puromycin mehr zugesetzt werden musste, abgestoppt und die Zellen wurden bei 37 °C kultiviert. Das Medium wurde stets zweimal pro Woche gewechselt, bei Erreichen einer Konfluenz von 100 % wurden die Zellen in ein Loch einer 24-Well-Platte, anschließend einer 12-Well-Platte und schließlich einer 6-Well-Platte überführt. Sobald die Zellen in einer 6-Well-Platte kultiviert wurden, konnten sie hinsichtlich des Gen-Knockouts mittels Western Blot (siehe Abschnitt 4.4.1) und indirekter Immunfluoreszenzfärbung (siehe Abschnitt 4.4.7) charakterisiert werden.

4.1.8 Präzipitation und Konzentrierung viraler Partikel aus Zellkulturüberstand

Die für die Infektionen verwendeten HBV-Partikel wurden stets aus Zellkulturüberstand von HepAD38-Zellen präzipitiert. Um tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen, wurde der gesammelte Zellkulturüberstand zunächst für 15 Minuten bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert und anschließend steril-filtriert (0,45 µm). Der filtrierte Überstand wurde mit 6 % PEG8000 (finale Konzentration) versetzt, dreißigmal invertiert und für mindestens zwei Stunden bei 4 °C gerührt. Der mit PEG8000 versetzte Zellkulturüberstand wurde anschließend für 30 Minuten bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert, wodurch virale Partikel präzipitiert wurden. Das Pellet wurde in einem Hundertstel des Ausgangsvolumens 25 % FCS/PBS resuspendiert (100-fache Konzentrierung), aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Quantifizierung der Virus-Genome wurde mittels RT-qPCR (siehe Abschnitt 4.2.9) durchgeführt.

4.1.9 Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus

Für alle Infektionen wurde aus Zellkulturüberstand von HepAD38-Zellen präzipitiertes HBV (gtD) verwendet. Die Zellen wurden stets in 12-Well-Platten mit einem Infektionsansatz von 1 ml inokuliert. Für die Infektion wurde das der gewünschten MOI (*multiplicity of infection*) entsprechende Volumen an Virus-Stammlösung, welche zuvor, um das unlösliche Pellet zu

entfernen, für 15 Minuten bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert wurde, mit dem für die zu infizierenden Zellen entsprechenden Medium gemischt und für fünf Sekunden geschüttelt. Anschließend wurden dem Gemisch 4 % PEG8000 (finale Konzentration) zugesetzt und der Ansatz wurde für zehn Sekunden geschüttelt. Das Medium, in dem die Zellen kultiviert wurden, wurde entfernt und die Zellen wurden mit 1 ml Inokulum überschichtet und bei 37 °C inkubiert. Nach 16 Stunden (HepaRG-Zellen und PHH) bzw. 20 Stunden (HepG2-hNTCP-Zellen) wurde die Infektion gestoppt. Dafür wurde das Inokulum entfernt und die Zellen viermal mit auf 37 °C vorgewärmtem PBS gewaschen. Die Zellen wurden in frischem Medium für 24 Stunden kultiviert, anschließend wurde das Medium abgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Zwei und vier Tage nach Infektion wurde erneut der Überstand abgenommen und die Zellen zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Die Zellen wurden für weitere zehn Tage kultiviert, wobei alle zwei Tage der infektiöse Überstand gesammelt und durch frisches Medium ersetzt wurde. 14 Tage nach der Infektion wurden die Zellen geerntet oder fixiert und für weitere Experimente verwendet. Der gesammelte infektiöse Überstand wurde mittels ELISA (siehe Abschnitt 4.4.6) hinsichtlich der Menge an freigesetztem HBsAg analysiert.

4.1.10 Infektionsinhibition

Um die HBV-Infektion zu inhibieren, wurden HepaRG-Zellen und PHH mit 0,4 µg Txlna- bzw. NTCP-spezifischer Antikörper für zwei Stunden bei 37 °C vor der Infektion und während derselben (16 h) inkubiert. Die Inkubation mit einem His-tag-spezifischen Antikörper diente als Kontrolle. Die Antikörper wurden für die Präinkubation in HepaRG-Differenzierungsmedium bzw. PHH-Medium verdünnt, für die Inkubation während der Infektion wurden die Antikörper in den entsprechenden Verdünnungen dem Inokulum zugesetzt. Die Infektion und die anschließende zweiwöchige Kultivierung der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 4.1.9 beschrieben.

4.1.11 Infektionskompetition

Zur Infektionskompetition wurde entweder präzipitiertes Virus mit unterschiedlichen Konzentrationen an gereinigtem Txlna (0,5 µM; 1 µM; 2 µM; 5 µM) (siehe Abschnitt 4.3.4.2) für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und direkt im Anschluss für die Infektion von HepaRG-Zellen bzw. PHH verwendet oder die zu infizierenden Zellen wurden mit 500 nM gereinigtem Txlna ebenfalls für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend infiziert. Die Infektion und die anschließende Kultivierung der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 4.1.9 beschrieben.

4.1.12 Zellernte und Zellyse

4.1.12.1 Proteinlysate für Western Blot Analysen

Zur Herstellung von Gesamtproteinlysaten, die für die Western Blot Analyse verwendet wurden, wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit RIPA-Puffer lysiert. Dafür wurden 200 µl mit Protease-Inhibitoren versetzter RIPA-Puffer zu den Zellen einer Vertiefung einer 6-Well-Platte gegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die Zellen vollständig zu lysieren, wurden sie zunächst für zehn Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 20 % Leistung für zehn Sekunden sonifiziert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 17.000 g und 4 °C entfernt. Die Proteinkonzentration wurde anschließend mittels Bradford-Assay (siehe Abschnitt 4.3.8) bestimmt.

4.1.12.2 Proteinlysate für CoIP-Experimente

Um Gesamtproteinlysate für Co-Immunpräzipitations(CoIP)-Experimente herzustellen, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit IP-Lysepuffer lysiert. Dazu wurden 300 µl IP-Lysepuffer zu den Zellen einer Vertiefung einer 6-Well-Platte gegeben, die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers aus der Kulturschale gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 20 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie sechsmal für zehn Sekunden einer Ultraschallbehandlung bei 45 % Leistung unterzogen wurden. Zellreste wurden durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 14.000 g und 4 °C pelletiert, der Überstand wurde anschließend in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für die CoIP (siehe Abschnitt 4.4.4) verwendet.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Für eine Transformation wurden 100 µl kompetente Bakterien zu 200 ng in 20 µl Reinstwasser gelöster plasmidischer DNA gegeben und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Dem Hitzeschock für eine Minute bei 42 °C folgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Die Bakterien wurden anschließend für 60 Minuten in 500 µl LB-Medium bei 37 °C schüttelnd (700 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden danach für fünf Minuten bei 2400 g pelletiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf eine LB-Agar-Platte mit Selektionsmedium ausplattiert, welche über Nacht bei 37 °C inkubiert wurde.

4.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien wurde mit Hilfe des Qiaprep Spin Miniprep Kits bzw. des Qiagen Plasmid Maxi Kits nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterien mit SDS [231]. Im Falle der Maxipräparation plasmidischer DNA wurde diese mit Isopropanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und anschließend in ddH₂O gelöst. Für Maxipräparationen wurden 300 ml, für Minipräparationen 2 ml Übernachtskultur eingesetzt.

4.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde nanophotometrisch bestimmt. Hierbei wird die Absorption (A) bei einer Wellenlänge (λ) von 260 nm gemessen, was – bedingt durch die aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidinbasen – dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren entspricht. Zusätzlich misst das Nanophotometer auch die Absorption sowohl bei $\lambda = 230$ nm als auch bei $\lambda = 280$ nm, um mögliche Verunreinigungen durch Lösungsmittel oder Proteine zu detektieren. Für eine reine Probe sollte das Verhältnis $A_{260/280}$ bei 1,8–2,0 liegen, das Verhältnis $A_{260/230}$ bei 2,0–2,2.

4.2.4 Klonierung der sgRNAs in PX459-Plasmide

Die für die TXLNA-spezifischen sgRNAs kodierenden DNA-Oligomerpaare (siehe Abschnitt 3.4.1) wurden zunächst phosphoryliert und *annealt* und anschließend in einem simultanen Digestions-Ligations-Schritt unter Verwendung des Restriktionsenzym BbsI in das CRISPR/Cas9-Plasmid PX459 kloniert. Eine detaillierte Beschreibung der Klonierungsstrategie befindet sich im Anhang.

4.2.5 Bestimmung der *Genome Targeting*-Effizienz

Zur Bestimmung der *Genome Targeting*-Effizienz wurde 48 Stunden nach Transfektion zunächst die genomische DNA der Zellen mit Hilfe des DNeasy Blood and Tissue Kits gemäß Herstellerangaben extrahiert. Anschließend wurden 100 ng genomische DNA zur Vervielfältigung des potentiell durch die Cas9 editierten genomischen Bereichs mittels PCR eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde nach einem *Annealing*-Schritt mit T7 Endonuklease I verdaut und mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 4.2.6) hinsichtlich der entstanden Nuklease-spezifischen Fragmente analysiert, woraus sich die Funktionalität und die *Genome Targeting*-Effizienz der spezifischen sgRNAs ermitteln lässt. Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise befindet sich im Anhang.

4.2.6 Agarosegelelektrophorese

Mittels Agarosegelelektrophorese wurden Nukleinsäuren anhand ihrer Größe aufgetrennt. Dabei wurde je nach Größe des zu untersuchenden Fragments 0,5–1 % Agarose (w/v) in 1x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst, nach Abkühlen in eine horizontale

Elektrophoresekammer überführt und mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) versetzt. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Agarosegel in eine mit 1x TAE-Puffer befüllte Laufkammer überführt und die mit 6x DNA-Ladepuffer versetzten Proben sowie ein spezifischer DNA-Marker wurden auf das Gel geladen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80–100 V. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids konnten die Nukleinsäuren anschließend mit Hilfe des INTAS-Imaging Systems unter UV-Licht (254 nm/365 nm) detektiert werden.

4.2.7 Isolierung von Gesamt-RNA

Um die Gesamt-RNA von Zellen zu isolieren, wurde diesen 400 µl *peqGOLD TriFast* (Peqlab) zugesetzt und die RNA wurde nach Protokoll des Herstellers isoliert. Die Präzipitation der RNA erfolgte mittels Isopropanol, das Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend in 15–20 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Die Integrität der RNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 4.2.6) überprüft und die Konzentration, wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben, ermittelt. RNA wurde stets bei -80 °C gelagert.

4.2.8 cDNA-Synthese

Vor der cDNA-Synthese wurde die isolierte RNA zunächst einem DNase-Verdau unterzogen, um potentielle Kontaminationen mit DNA zu beseitigen. Dafür wurden 5 µg RNA mit 1 U RQ1 DNase und dem entsprechenden Reaktionspuffer versetzt und in einem Reaktionsvolumen von 10 µl für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Der DNase-Verdau wurde durch Zugabe von 1 µl *RQ1 DNase Stop Solution* und einer zehn minütigen Inkubation bei 65 °C beendet. Die Erststrangsynthese wurde durch Zugabe von 1 µl *Random Hexamer Primer* und einer fünfminütigen Inkubation bei 65 °C gestartet. Anschließend wurden dem Reaktionsansatz 8 µl des in Tabelle 1 dargestellten Mastermixes zugegeben, wodurch die cDNA-Synthese gestartet wurde. Der Ansatz wurde zunächst für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend folgte eine Inkubation für 60 Minuten bei 42 °C, ehe die cDNA-Synthese durch eine fünfminütige Inkubation bei 72 °C beendet wurde. Die so synthetisierte cDNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese.

Komponente	Volumen/Reaktionsansatz
5x RT-Puffer	4 μ l
dNTPs (je 10 mM)	2 μ l
<i>RevertAid H Minus Reverse Transcriptase</i>	1 μ l
DEPC-H ₂ O	1 μ l

4.2.9 Real-Time qPCR

Die Detektion und Quantifizierung spezifischer RNA-Transkripte erfolgte mittels *Real Time* quantitativer PCR (RT-qPCR). Dafür wurde die cDNA zunächst 1:10 in Nuklease-freiem Wasser verdünnt und anschließend mit spezifischen *Primern* sowie *2x Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix* versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde stets auf Eis und nach Herstellerangaben angesetzt. Die Amplifikation und Detektion erfolgte entweder am LightCycler® 1.5 oder am LightCycler® 480, die Quantifizierung der Transkripte erfolgte unter Verwendung der $\Delta\Delta C_p$ -Methode und Normierung auf das Haushaltsgen Rpl27. Das verwendete RT-qPCR-Programm ist in Tabelle 2 dargestellt.

Die Quantifizierung der Virus-Genome in präzipitiertem Zellkulturüberstand erfolgte mittels RT-qPCR unter Verwendung des LightCycler® 1.5 oder des LightCycler® 480 sowie des in Tabelle 2 dargestellten RT-qPCR-Programms. Hierfür wurde zunächst eine serielle Verdünnung des zu quantifizierenden Überstands hergestellt, von welcher jeweils 3 μ l mit den spezifischen *Primern* und *2x Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix* versetzt wurden. Des Weiteren wurde eine serielle Verdünnung eines Kontrollkonstruktes mit bekannter Kopienzahl parallel gemessen. Die Quantifizierung der Virus-Genome erfolgte anhand einer Standardgeraden, welche aus den Messwerten des Kontrollkonstruktes mit bekannter Kopienzahl berechnet wurde.

Tabelle 2: RT-qPCR-Programm.

Programm	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Steigung [°C/s]	Zyklen
<i>Denaturing</i>	95	600	20	1
<i>Cycling</i>	95	15	20	45
	56	30	20	
	72	30	5	
<i>Melting</i>	95	60	20	1
	56	30	20	
	97	0	0,1	
<i>Cooling</i>	37	30	20	

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Produktion von rekombinanter PreS1PreS2-Domäne (PreS) wurden mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformierte *E. coli* M15 in 100 ml LB-Medium, versetzt mit den entsprechenden Antibiotika, für 16 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 50 ml dieser Übernachtskultur wurden anschließend in zwei Liter Antibiotika-freies LB-Medium überführt und für zwei bis drei Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5–0,7 wurde der Bakterienkultur 1 mM IPTG (finale Konzentration) zugefügt, um die Expression des rekombinanten Proteins zu induzieren. Nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Bakterien für 15 Minuten bei 6700 g und 4 °C pelletiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 40 ml kaltem PBS resuspendiert, in ein 50 ml Falcon überführt und für 20 Minuten bei 4700 g und 4 °C zentrifugiert. Bakterienpellets wurden stets auf -20 °C gelagert.

4.3.2 Produktion rekombinanter Proteine in Sf9-Zellen

Für die Produktion von rekombinantem Txlna wurden eurakyotische Sf9-Zellen verwendet, welche eine posttranslationale Modifikation des rekombinant exprimierten Proteins ermöglichen. Dafür wurden Sf9-Zellen mit rekombinanten für Txlna kodierenden Baculoviren infiziert (siehe Abschnitt 4.1.4), welche mittels homologer Rekombination eines Txlna-Expressionskonstrukts und linearisierter Baculovirus-DNA hergestellt wurden [229].

4.3.3 Zellaufschluss unter denaturierenden Bedingungen

Die für die Isolierung von PreS verwendeten *E. coli* M15 wurden stets unter denaturierenden Bedingungen lysiert. Dafür wurde das Bakterienpellet in dem zehnfachen seines Volumens Lysepuffer (siehe Abschnitt 3.12.2) aufgenommen und fünfmal bei 25 % Leistung auf Eis sonifiziert. Die aufgeschlossenen Bakterien wurden anschließend für 30 Minuten bei 50.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der die löslichen Proteine enthaltende Überstand wurde steril-filtriert (0,22 µm) und anschließend für die denaturierende Nickel-NTA-Affinitätschromatographie (siehe Abschnitt 4.3.4.1) verwendet.

4.3.4 Chromatographie

4.3.4.1 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie

Mit 6x-Histidin-markiertes PreS wurde denaturierend unter Verwendung einer 1 ml HisTrap™ HP Säule (maximaler Druck: 0,3 MPa) gereinigt. Die Säule enthält eine Sepharose-Matrix, an welche kovalent der Komplexbildner Nitrilotriessigsäure (NTA) gebunden ist, der Ni²⁺-Ionen chelatiert. Der Imidazolring des Histidins bindet mit hoher Affinität an die Nickel-Ionen, wodurch 6x-Histidin-markierte Proteine spezifisch an die Säule gebunden und angereichert werden können. Zunächst wurde die Säule mit dem fünffachen des Säulenvolumens Equilibrierungspuffer (pH 8,0) equilibriert, anschließend wurde die Säule mit 10 ml des steril-filtrierten Überstands (siehe Abschnitt 4.3.3) beladen. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule mit 5–10 ml Waschpuffer (pH 6,3) gewaschen. Unter Zugabe des mit 250 mM Imidazol versetzten Elutionspuffers (pH 6,3) wurde das 6x-Histidin-markierte Protein von der Säule eluiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und bis zur Analyse bei 4 °C gelagert. Die gesammelten Elutionsfraktionen wurden hinsichtlich des Proteingehalts sowie der Reinheit des eluierten Proteins mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 4.3.9) und Coomassie-Färbung bzw. Western Blot (siehe Abschnitt 4.4.1) analysiert. Fraktionen, die PreS in ausreichender Menge und Reinheit enthielten, wurden vereinigt und anschließend dialysiert (siehe Abschnitt 4.3.5).

4.3.4.2 Strep-Tactin-Affinitätschromatographie

Mit einem Strep-tag markiertes Txlna wurde unter nativen Bedingungen unter Verwendung einer 5 ml StrepTrap™ HP Säule (maximaler Druck: 0,5 MPa) aus Sf9-Zellkulturüberstand isoliert und gereinigt. Die Säule enthält eine Sepharose-Matrix, an die Strep-Tactin gebunden ist, an welches das Strep-Peptid mit hoher Affinität bindet. Nach Equilibrierung der Säule mit dem fünffachen des Säulenvolumens PBS (pH 7,4) wurden 50 ml steril-filtrierter Sf9-Zellkulturüberstand auf die Säule geladen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch einen Waschschrift mit 25 ml PBS (pH 7,4) entfernt. Strep-markiertes Txlna wurde unter

Verwendung des 2,5 mM Desthiobiotin enthaltenden Elutionspuffers (pH 7,1) von der Säule eluiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und bis zur Analyse bei 4 °C gelagert. Die gesammelten Elutionsfraktionen wurden hinsichtlich des Proteingehalts sowie der Reinheit des eluierten Proteins mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 4.3.9) und Coomassie-Färbung bzw. Western Blot (siehe Abschnitt 4.4.1) analysiert. Fraktionen, die Txlna in ausreichender Menge und Reinheit enthielten, wurden vereinigt und dialysiert (siehe Abschnitt 4.3.5).

4.3.5 Dialyse

Unter denaturierenden Bedingungen gereinigtes PreS-Protein wurde mittels Dialyse gegen PBS rückgefaltet. Dafür wurde eine Dialysemembran mit einem Molekulargewichts-Cut off (*molecular weight cut off*, MWCO) von 10 kDa verwendet. Die Dialyse wurde schrittweise durchgeführt, wobei die ursprüngliche Konzentration von 6 M Harnstoff graduell verringert wurde (4 M, 2 M, 1 M, 0 M). Jeder dieser Dialyse-Schritte wurde für 16 Stunden unter Rühren bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurde die dialysierte Protein-Lösung für 15 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um natives von denaturiertem PreS zu trennen. Rückgefaltetes PreS-Protein wurde mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 4.3.9) und Coomassie-Färbung analysiert, die Proteinkonzentration wurde nanophotometrisch bestimmt. PreS-Protein wurde anschließend bis zur Verwendung in weiteren Experimenten gelöst in PBS auf -20 °C gelagert.

Um Desthiobiotin aus den Txlna-Protein-Eluaten zu entfernen, wurde dieses in einem Schritt gegen PBS dialysiert. Dafür wurde eine Dialysemembran mit einem MWCO von 10 kDa verwendet. Der Pufferaustausch wurde für 16 Stunden unter Rühren bei 4 °C durchgeführt. Dialysiertes Txlna-Protein wurde mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 4.3.9) und Coomassie-Färbung analysiert, die Proteinkonzentration wurde nanophotometrisch bestimmt. Gereinigtes Txlna wurde bis zur Verwendung in weiteren Experimenten in PBS gelöst auf -20 °C gelagert.

4.3.6 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie

Die Interaktion von Txlna und PreS wurde mittels Oberflächenplasmonenresonanz(*surface plasmon resonance*, SPR)-Spektroskopie unter Verwendung des Biacore T200 Systems analysiert. Dafür wurde gereinigtes Txlna auf einem Biacore Sensor Chip CM5 durch Amin-Kopplung immobilisiert. Die Oberfläche des Chips wurde zunächst durch die Kopplungsreagenzien NHS und EDC (1:1) aktiviert, anschließend wurde der Chip mit gereinigtem Txlna (100 µg/ml, pH 4,5) für sieben Minuten inkubiert. Um restliche aktivierte Ester zu deaktivieren, wurden die Flusszellen nach Immobilisierung von Txlna mit Ethanolamin

inkubiert. Eine Flusszelle, die – ohne Immobilisierung von TxIna – ausschließlich mit NHS/EDC aktiviert und mit Ethanolamin deaktiviert wurde, diente als Referenzzelle. Experimente zur Bestimmung der Bindungsaffinität von PreS gegenüber TxIna wurden als *single cycle*-Kinetik durchgeführt, wobei fünf verschiedene Konzentrationen von PreS (200 nM–20 µM) in Biacore-Laufpuffer nacheinander, in aufsteigender Konzentration (ohne Regenerationsschritte dazwischen) mit einer Flussrate von 10 µl/min auf den Chip injiziert wurden. Die Dissoziationskonstante (K_d) wurde mit Hilfe der Biacore T200 Evaluation Software unter Verwendung eines *steady state affinity model*-Algorithmus als 1:1-Bindungsmodell berechnet.

4.3.7 Oberflächenbiotinylierung

Oberflächenproteine differenzierter HepaRG-Zellen wurden mit EZ-Link™ sulfo-NHS-SS Biotin biotinyliert. Zellen eines Lochs einer 6-Well-Platte wurden mit PBS gewaschen, anschließend mit 1 ml Biotinylierungspuffer (siehe Abschnitt 3.12.1) bedeckt und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der Biotinylierungspuffer von den Zellen abgenommen und durch 1 ml Puffer zur Absättigung von freiem Biotin (siehe Abschnitt 3.12.1) ersetzt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 4 °C wurde der Puffer entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend folgte die Zelllyse mit RIPA-Puffer (siehe Abschnitt 4.1.12.1), wofür 300 µl mit Proteaseinhibitoren versetzter RIPA-Puffer pro Vertiefung einer 6-Well-Platte verwendet wurden. Die Proteinlysate wurden nicht sonifiziert; 200 µl des Lysats wurden für die Immunpräzipitation biotinylierter Oberflächenproteine eingesetzt (siehe Abschnitt 4.4.3), die restlichen 100 µl des Proteinlysats wurden bis zur SDS-PAGE (siehe Abschnitt 4.3.9) auf Eis aufbewahrt.

4.3.8 Bradford-Assay

Die Proteinkonzentration von wässrigen Lösungen wurde mittels Bradford-Assay bestimmt [232]. Die Methode basiert auf der unspezifischen Komplexbildung des Farbstoffs Coomassie-Brillantblau G-250 mit Proteinen, wodurch sich dessen Absorptionsmaximum auf $\lambda = 595$ nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei $\lambda = 595$ nm kann photometrisch detektiert werden. Es wurden 200 µl Bradford-Reagenz pro Vertiefung einer 96-Well-Platte vorgelegt, mit 2 µl Proteinlysat gemischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte am Tecan-Reader, die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe einer Standardgeraden berechnet. Die Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde stets in Duplikaten bestimmt.

4.3.9 SDS-PAGE

Proteine aus einem Proteingemisch wurden anhand ihres Molekulargewichts mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt [233]. Dabei wurde ein Trenngel mit – je nach Größe der aufzutrennenden Proteine – unterschiedlicher Polyacrylamidkonzentration polymerisiert und mit einem 4 %igen Sammelgel überschichtet. Verschiedene Volumina an Proteinlysate, die 100 µg Protein enthielten, wurden mit der entsprechenden Menge an 4x SDS-Probenpuffer versetzt, für zehn Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend kurz abzentrifugiert. Die Proben sowie 5 µl des Proteinmarkers wurden in die Taschen des Gels geladen, welches in eine mit SDS-Laufpuffer befüllte Gelkammer eingespannt war. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80–120 V.

Um Elutionsfraktionen nach affinitätschromatographischer Reinigung zu analysieren, wurde stets ein Volumen von 25 µl (Probe versetzt mit 4x SDS-Probenpuffer) sowie 5 µl des Protein-Markers in die Taschen des SDS-Gels geladen und wie zuvor beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt.

4.4 Immunologische Methoden

4.4.1 Western Blot

Die Detektion mittels SDS-PAGE aufgetrennter Proteine erfolgte durch Western Blot Analysen [234]. Die aufgetrennten Proteine wurden mittels *Semi-Dry-Blot*-Verfahren aus dem Gel durch Anlegen einer elektrischen Spannung auf eine PVDF-Membran transferiert [235]. Der *Semi-Dry-Blot* wurde, wie in Abbildung 12 dargestellt, aus den in Transferpuffer getränkten Whatman-Filterpapieren, der in Methanol aktivierten PVDF-Membran und dem SDS-Gel luftblasenfrei zusammengebaut. Die Übertragung der Proteine erfolgte stets mit 80 mA pro Membran für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran für 60 Minuten bei Raumtemperatur in Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Antikörperbindestellen zu blockieren. Als Blockierlösung wurden je nach verwendetem Primärantikörper 10 % Milchpulver (w/v) in TBS-T, 1x Roti®-Block in ddH₂O oder Odyssey® *Blocking Buffer* (1:1 in TBS) verwendet. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper, welcher in der entsprechenden Blockierlösung verdünnt wurde, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die entsprechenden Antikörperverdünnungen können Abschnitt 3.5.1 entnommen werden. Nach dreimaligem Waschen in TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (siehe Abschnitt 3.5.2) für 60 Minuten bei Raumtemperatur in Blockierlösung, wonach die Membran erneut dreimal mit TBS-T gewaschen wurde. Für die Detektion spezifischer Proteine kamen, in Abhängigkeit von dem verwendeten Sekundärantikörper, zwei Systeme zum Einsatz. Wurde ein Fluorophor-konjugierter

Sekundärantikörper verwendet, erfolgte die Detektion am *Odyssey Infrared Imaging-System*. Bei Verwendung eines mit der Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP)-konjugierten Sekundärantikörpers erfolgte die Detektion mittels *Enhanced Chemiluminescence* (ECL). Dafür wurde die Membran mit etwa 300 µl ECL-Substrat benetzt und mit einem Fotofilm in einer Entwicklerkassette bedeckt. Durch die enzymatische Reaktion der HRP mit dem ECL-Substrat werden Photonen emittiert und die hervorgerufene Chemilumineszenz kann mit Hilfe eines Fotofilms detektiert werden. Nach Entwickeln des Fotofilms können die Bereiche, in denen es zur Emission von Lichtquanten gekommen ist, sichtbar gemacht werden.

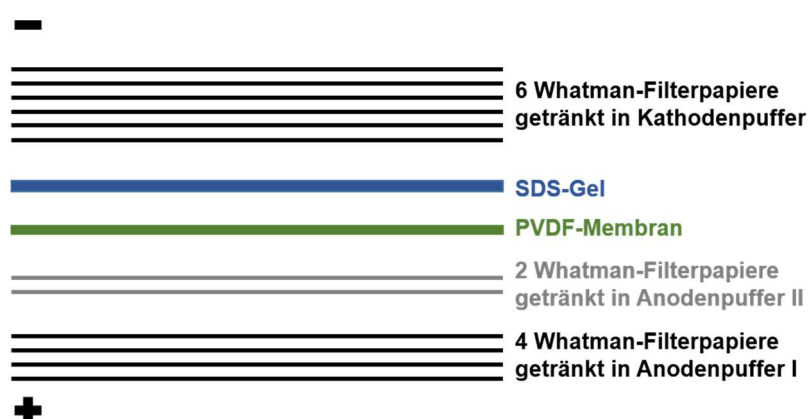


Abbildung 12: Aufbau des *Semi-Dry-Western Blots*.

Whatman-Filterpapiere und PVDF-Membran wurden auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten. Die Whatman-Filterpapiere wurden mit den entsprechenden Puffern getränkt und luftblasenfrei übereinandergestapelt.

4.4.2 Peptid-Microarray

Das in dieser Arbeit verwendete Peptid-Microarray besteht aus 38 Peptidfragmenten, welche die gesamte Aminosäuresequenz der Proteindomänen PreS1PreS2 des viralen Oberflächenproteins LHBs (HBV gtD) abdecken. Die Peptidfragmente umfassen jeweils 15 Aminosäuren (AS) mit einem Überlapp von vier AS und wurden auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert, welche auf einem Objektträger aufgebracht wurde. Die Peptid-Microarrays wurden zunächst für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit Milchpulverlösung inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Anschließend folgte die Inkubation mit 100 µl gereinigtem TxIna verdünnt in Milchpulverlösung für 16 Stunden bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Überschüssiges TxIna wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt, die Arrays wurden anschließend getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die

Peptid-Microarrays mit einem Txlna-spezifischen Primärantikörper (E2) verdünnt in Milchpulverlösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit einem Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP)-konjugierten Sekundärantikörper verdünnt in Milchpulverlösung für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Die entsprechenden Antikörperverdünnungen können Abschnitt 3.5.1 bzw. 3.5.2 entnommen werden. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Peptid-Microarrays erneut dreimal mit TBS-T gewaschen, anschließend erfolgte die Detektion des spezifisch an PreS-Peptide gebundenen α -Taxilins mittels *Enhanced Chemiluminescence* (ECL). Dafür wurde das Peptid-Microarray mit etwa 50 μ l ECL-Substrat benetzt, mit einem Fotofilm bedeckt und in einer Entwicklerkassette inkubiert. Die Detektion der aufgetretenen Chemilumineszenz erfolgte am Entwickler.

4.4.3 Immunpräzipitation biotinylierter Oberflächenproteine

Für die Immunpräzipitation (IP) biotinylierter Oberflächenproteine wurden 200 μ l Proteinlysate (siehe Abschnitt 4.3.7) eingesetzt. Diese wurden mit 200 μ l NeutrAvidin-Beads, welche spezifisch an Biotin binden, gemischt und für zwei Stunden bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die NeutrAvidin-Beads wurden anschließend für zwei Minuten bei 2500 g und 4 °C pelletiert und danach viermal mit *Binding Buffer* (1 % NP-40 gelöst in PBS) gewaschen. Dazu wurden die *Beads* in *Binding Buffer* resuspendiert und für zwei Minuten bei 2500 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen. Nach viermaligem Waschen wurden die *Beads* mit 60 μ l 1x SDS-Probenpuffer, welchem 20 % β -Mercaptoethanol zugesetzt war, versetzt, für 15 Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend für zwei Minuten bei 2500 g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und zur weiteren Analyse mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 4.3.9) auf ein SDS-Gel geladen.

4.4.4 Co-Immunpräzipitation

Für die Co-Immunpräzipitation (Co-IP) wurden zunächst 300 μ l Gesamtproteinlysate (siehe Abschnitt 4.1.12.2) mit 30 μ l Protein A/G Sepharose-Beads, welche zuvor dreimal mit PBS gewaschen wurden, versetzt und für 30 Minuten bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert, um unspezifisch an die Sepharose-Kügelchen bindende Proteine aus dem Proteingemisch zu entfernen. Anschließend wurden die Sepharose-Beads für eine Minute bei 1000 g und 4 °C pelletiert, der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die *Beads* wurden verworfen. Dem Überstand wurde 1 μ g des für die Co-IP verwendeten Antikörpers zugefügt und der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Als *Input*-Kontrolle wurden 10 μ l des Überstands vor Zugabe des Antikörpers entnommen und bis zur Analyse mittels SDS-PAGE auf Eis gelagert. Nach der Inkubation mit dem entsprechenden

Antikörper wurden dem Gemisch 30 µl Protein A/G Sepharose-*Beads* zugesetzt, woraufhin es für 60 Minuten bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert wurde. Anschließend wurden die Sepharose-Kügelchen für eine Minute bei 1000 g und 4 °C pelletiert, der Überstand wurde verworfen und die *Beads*, welche nun die dem Proteingemisch zugesetzten Antikörper gebunden hatten, wurden zweimal in 500 µl IP-Lysepuffer gewaschen. Dafür wurden die Sepharose-Kügelchen zunächst in IP-Lysepuffer resuspendiert und anschließend für eine Minute bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert, wonach der Überstand verworfen wurde. Nach dem Waschen wurden die Sepharose-*Beads* in 60 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert und für zehn Minuten bei 95 °C aufgekocht. Anschließend wurden die *Beads* für eine Minute bei 14.000 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand zur Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 4.3.9) auf ein Polyacrylamidgel geladen. Die co-präzipitierten Proteine wurden mittels Western Blot (siehe Abschnitt 4.4.1) analysiert. Der Blot wurde stets unter Verwendung des Quick Western Kits nach Protokoll des Herstellers entwickelt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe des *Odyssey Infrared Imaging-Systems*.

4.4.5 Durchflusszytometrie

HepG2-hNTCP-Zellen, welche mit einem für mCherry-markiertes Txl α kodierenden Expressionskonstrukt transfiziert wurden (siehe Abschnitt 4.1.6), wurden hinsichtlich der Expression von mCherry-Txl α sowie einer HBV-Infektion durchflusszytometrisch analysiert. Dafür wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Um die Zellen aus der Zellkulturschale zu lösen, wurden sie mit 200 µl Accutase pro Vertiefung einer 12-Well-Platte für mindestens 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde mit 500 µl Medium abgestoppt, die Zellen wurden resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 400 g und 4 °C wurde das Zellpellet in 200 µl MACS-Puffer resuspendiert und erneut für fünf Minuten bei 400 g und 4 °C pelletiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl 3,7 % Formaldehyd in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit MACS-Puffer wurde das Zellpellet in 300 µl MACS-Puffer aufgenommen und bis zur Färbung mit spezifischen Antikörpern bei 4 °C gelagert.

Um die Zellen für die Färbung intrazellulärer Antigene zu permeabilisieren, wurden sie mit 100 µl 0,1 % Saponin in MACS-Puffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, welcher in einem finalen Volumen von 100 µl Permeabilisierungslösung verdünnt wurde, für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen der Zellen in 0,1 % Saponin in MACS-Puffer folgte die Inkubation mit einem Fluorophor-konjugierten Sekundärantikörper, ebenfalls verdünnt in Permeabilisierungslösung, für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Wurde ein Fluorophor-konjugierter Primärantikörper verwendet, so erfolgte dieser Inkubationsschritt

im Dunkeln. Eine Inkubation mit einem Sekundärantikörper war in diesem Fall nicht nötig. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Zellen dreimal mit 0,1 % Saponin in MACS-Puffer gewaschen, anschließend in 100–200 μ l MACS-Puffer (je nach Größe des Zellpellets) resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Analyse der Zellen erfolgte am CytoFLEX Durchflusszytometer.

4.4.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Zum Nachweis von durch HBV-infizierte Zellen freigesetztem HBsAg wurde das Enzygnost[®] HBsAg 6.0 ELISA-Kit verwendet. Die Absorption der Proben bei $\lambda = 450$ nm wurde am Tecan-Reader gemessen. Die manuelle Durchführung sowie die Auswertung des ELISAs erfolgten stets nach Protokoll des Herstellers.

4.4.7 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Um die subzelluläre Lokalisation und Verteilung eines oder mehrerer spezifischer Proteine zu analysieren, wurden diese unter Zuhilfenahme Fluorophor-konjugierter Antikörper markiert und die Zellen mittels indirekter Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Dafür wurden Zellen auf Deckgläschen ausgelegt und nach Ende des Experiments einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 3,7 % Formaldehyd in PBS für zehn Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Um die Plasmamembran der Zellen für die Färbung intrazellulärer Antigene durchlässig zu machen, wurden die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,5 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Unspezifische Antikörperbindestellen wurden durch eine Inkubation mit 1 % BSA in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper verdünnt in PBS für 60 Minuten bei Raumtemperatur in dunkler, feuchter Umgebung. Dafür wurden die Deckgläschen mit den Zellen voraus in 50 μ l Antikörperlösung auf Parafilm überführt. Nach dieser Inkubation wurden die Deckgläschen wieder zurück in die 12-Well-Platte transferiert und die Zellen für 30 Minuten mit PBS gewaschen, wobei der Waschpuffer fünf- bis sechsmal ausgetauscht wurde. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte analog der Inkubation mit dem Primärantikörper. Um die Zellkerne sowie filamentöses Aktin (F-Aktin) anzufärben, wurden der Sekundärantikörperlösung DAPI und Phalloidin-Atto 633 zugefügt. Nach der Inkubation mit DAPI, Phalloidin und dem Sekundärantikörper wurden die Deckgläschen wieder in die 12-Well-Platte überführt und, wie zuvor beschrieben, für 30 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Mowiol auf Objektträger eingedeckelt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Präparate wurden bis zur Analyse mittels konfokaler *Laser-*

Scanning-Mikroskopie (siehe Abschnitt 4.5.1) oder *Super-Resolution*-Mikroskopie (siehe Abschnitt 4.5.2) bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

4.5 Mikroskopie

4.5.1 Konfokale *Laser-Scanning*-Mikroskopie

Die Lokalisation und Distribution Fluorophor-markierter Proteine (siehe Abschnitt 4.4.7) auf subzellulärer Ebene wurde mit Hilfe des konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskops (CLSM) LSM510Meta (Zeiss) und der zugehörigen Software ZEN 2012 analysiert. Im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie werden bei der konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskopie die Fluorophore mit monochromatischem Licht (Laser) angeregt. Des Weiteren wird ausschließlich emittiertes Licht einer definierten Focus-Ebene detektiert, Lichtquanten, welche aus Ebenen ober- oder unterhalb der definierten Ebene emittiert werden, werden durch eine konfokal angeordnete Lochblende (*pinhole*) herausgefiltert, wodurch ein hochaufgelöstes Bild generiert werden kann. Durch die sequenzielle Aufnahme mehrerer Ebenen eines Präparats entlang der z-Achse können Bildstapel, sogenannte *z-stacks*, erzeugt werden, aus denen anschließend ein dreidimensionales Bild des Präparats rekonstruiert werden kann. Um die räumliche Nähe der fluoreszenzmarkierten Proteine zu untersuchen, wurden mit Hilfe der Software ZEN 2012 Fluoreszenzintensitätsprofile erstellt, die die Intensität der detektierten Fluoreszenz entlang einer definierten Kurve abbilden. Weiterhin wurde zur Quantifizierung der Colokalisation zweier Proteine der sogenannte *weighted colocalisation coefficient* (WCC) nach Manders berechnet [236]. Der WCC beschreibt die Colokalisation zweier Proteine, welche mit zwei verschiedenen Fluorophoren markiert wurden, unter Berücksichtigung der Gesamtmenge an markiertem Protein beider Fluoreszenzkanäle. Für beide untersuchten Proteine wird ein Koeffizient berechnet, welcher Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann, wobei ein WCC von 1 aussagt, dass 100 % des entsprechenden Proteins mit dem zu vergleichenden Protein, welches in dem anderen Fluoreszenzkanal detektiert wird, colokalisiert.

4.5.2 *Super-Resolution*-Mikroskopie

Die *Super-Resolution*-Mikroskopie basiert auf dem Prinzip der konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskopie und ermöglicht unter anderem durch sensitivere Detektoren sowie durch spezielle Software-basierte adaptive Verfahren eine höhere Auflösung des Bildes. Die subzelluläre Lokalisation und Verteilung Fluorophor-markierter Proteine (siehe Abschnitt 4.4.7) wurde mit Hilfe des CLSM TCS SP8 (Leica) und der zugehörigen Software LAS X analysiert.

4.6 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte unter Verwendung der Software GraphPad Prism 8. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels zweiseitigem, ungepaartem student'schem t-Test ermittelt. Die Ergebnisse sind – falls nicht anders angegeben – als Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde wie folgt dargestellt: ns: $p > 0,05$ (nicht signifikant); *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

5. Ergebnisse

5.1 α -Taxilin bindet direkt an die Rezeptorbindedomäne des Hepatitis-B-Virus

Das ubiquitär exprimierte Protein α -Taxilin (Txlna) konnte als Adaptorprotein identifiziert werden, welches unter direkter Bindung an LHBs die Freisetzung von HBV-Partikeln vermittelt [180]. Weitere, vorläufige Untersuchungen zur Interaktion zwischen Txlna und LHBs haben ergeben, dass Txlna mit einem die PreS1PreS2-Domäne von LHBs umfassenden Peptid interagiert, nicht jedoch mit einer PreS1PreS2-Mutante, welcher größtenteils die Rezeptorbindedomäne fehlt [226].

Um nun die Aminosäuren der PreS1PreS2-Domäne des großen viralen Oberflächenproteins LHBs zu identifizieren, an welche Txlna spezifisch bindet, wurde ein Peptid-Microarray, welches die gesamte PreS-Aminosäuresequenz abdeckt, mit gereinigtem Txlna inkubiert und hinsichtlich der spezifischen Bindung von Txlna an lineare PreS-Peptide analysiert.

Es konnten spezifische Bindungen von Txlna an mehrere Peptidfragmente der PreS-Aminosäuresequenz detektiert werden, wobei zu erkennen ist, dass die Peptidfragmente, mit denen Txlna interagiert, in fünf spezifische Cluster unterteilt werden können (Abb. 13). Drei dieser Regionen befinden sich in der PreS1-Domäne, zwei weitere Bindungsregionen sind im Bereich der PreS2-Domäne lokalisiert (Abb. 13 B). Die Aminosäuren (AS) der PreS1-Domäne, an die Txlna spezifisch bindet, sind sowohl am N-Terminus und im mittleren Bereich des Proteins als auch an dessen C-Terminus lokalisiert. Dabei ist zu erkennen, dass Txlna genau in der Region mit der PreS1-Domäne interagiert, an der sich die Rezeptorbindedomäne (RBD) des Hepatitis-B-Virus befindet (AS 2–48). Txlna bindet dabei sowohl an die essentielle Region (AS 9–15) der HBV-Rezeptorbindedomäne als auch im C-terminalen Bereich der akzessorischen Region (AS 28–48) der RBD. Weiterhin konnte eine spezifische Interaktion von Txlna mit den Aminosäuren 16–27, welche genau zwischen der essentiellen und der akzessorischen Region der RBD lokalisiert sind, detektiert werden (Abb. 13 B). Diese Ergebnisse bestätigen die Daten präliminärer Co-IP-Experimente, welche ergaben, dass Txlna spezifisch mit PreS interagiert, jedoch nicht mit einer PreS-Mutante, bei der die Rezeptorbindedomäne deletiert ist (PreS1PreS2_Δaa10–47) und identifizieren darüber hinaus eindeutig die mit Txlna interagierenden Bereiche von PreS.



Abbildung 13: α -Taxilin bindet an die Rezeptorbindedomäne des Hepatitis-B-Virus.

(A) Peptid-Microarray bestehend aus 38 überlappenden Peptidfragmenten der Aminosäuresequenz der PreS1PreS2-Domäne von LHBs. Das Peptid-Microarray wurde mit gereinigtem Txlna inkubiert und spezifisch gebundenes Txlna mit Hilfe eines Txlna-spezifischen Antikörpers detektiert. Txlna interagiert mit PreS1PreS-Peptiden in fünf distinkten Regionen (farblich markiert). (B) Aminosäuresequenz von PreS1PreS2. Aminosäurebereiche, an die Txlna spezifisch bindet, wurden farblich markiert. Die Farben korrespondieren mit den in (A) markierten Peptidfragmenten. Die grauen Rechtecke markieren die essentielle (AS 9–15) und die akzessorische (AS 28–48) Region der HBV-Rezeptorbindedomäne (AS 2–48).

5.2 PreS bindet mit moderater Affinität an α -Taxilin

Um die Interaktion zwischen HBV-PreS und Txlna eingehender zu charakterisieren, wurde die Bindung der beiden Proteine mittels SPR-Spektroskopie analysiert. Dafür wurde immobilisiertes Txlna mit steigenden PreS-Konzentrationen (200 nM bis 20 μ M) als *single cycle*-Kinetik inkubiert. Die mittels Biacore-System gemessenen relativen Antwort-Einheiten (*response units*, RU), welche proportional zur Menge an gebundenem PreS sind, steigen in Abhängigkeit der PreS-Konzentration, mit der Txlna inkubiert wurde, an (Abb. 14). Je höher die Konzentration der injizierten PreS-Lösung, desto mehr PreS bindet an Txlna. So resultiert eine Inkubation mit 2 μ M PreS in einer relativen Antwort von etwa 3000 RU, bei einer Inkubation mit 20 μ M PreS wurden etwa 12.000 RU gemessen (Abb. 14 A). Trägt man die relative Antwort gegen die PreS-Konzentration auf, so ergibt sich eine klassische Dosis-Wirkungs-Kurve in Form einer Sättigungskurve (Abb. 14 B). Anhand der gemessenen RU wurde unter Verwendung eines *steady state affinity model*-Algorithmus eine für die Bindung von PreS an Txlna spezifische Dissoziationskonstante (K_d) von $8,5 \times 10^{-7}$ M berechnet. Eine K_d im mikromolaren Bereich deutet auf eine Bindung mit moderater Affinität hin, wie sie bei den meisten Protein-Protein-Interaktionen vorliegt.

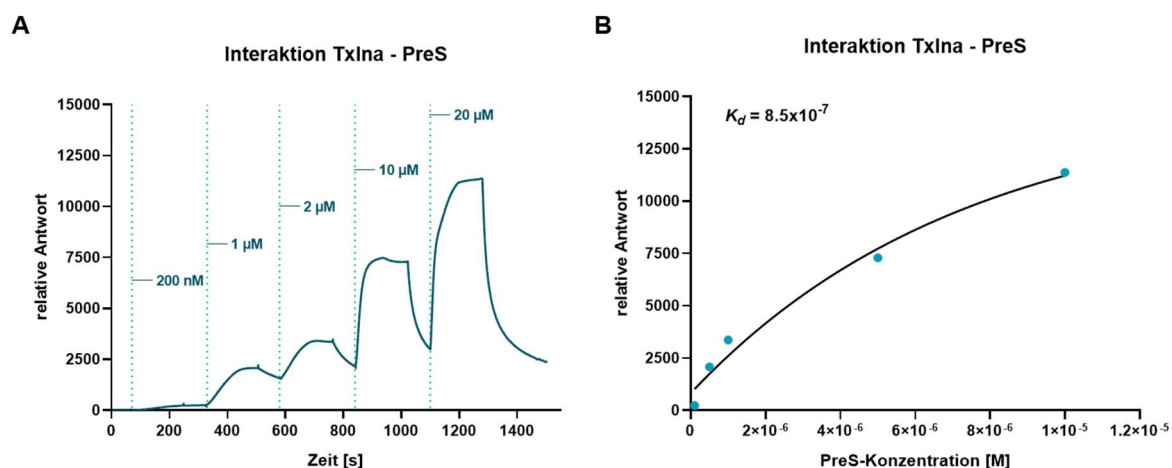


Abbildung 14: HBV-PreS bindet mit moderater Affinität an α -Taxilin.

(A, B) Gereinigtes TxIna wurde kovalent auf einem Biacore Sensor Chip immobilisiert, mit fünf verschiedenen PreS-Konzentrationen (200 nM bis 20 μ M) als *single cycle*-Kinetik inkubiert und oberflächenresonanzspektroskopisch analysiert. Eine Injektion von PreS in steigenden Konzentrationen resultiert in höheren Mengen an an TxIna gebundenem PreS-Protein. **(B)** Die Equilibriums-Dissoziationskonstante (K_d) wurde mit Hilfe eines *steady state affinity model*-Algorithmus berechnet. Gestrichelte Linien geben den Zeitpunkt der Injektion der PreS-Proteinlösung mit entsprechender Konzentration an.

5.3 Leichte Reduktion der α -Taxilin-Proteinmenge im Zuge der Differenzierung von HepaRG-Zellen

Die spezifische Bindung von TxIna an die virale Rezeptorbindedomäne ist ein initialer Hinweis auf eine Beteiligung α -Taxilins am HBV-Entry-Prozess. Um zu untersuchen, ob es Unterschiede hinsichtlich der Expression von TxIna in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades von HepaRG-Zellen und damit deren Suszeptibilität für eine HBV-Infektion gibt, wurde zum einen die Gesamt-RNA undifferenzierter HepaRG-Zellen sowie solcher mit einwöchiger bzw. zweiwöchiger Differenzierungsdauer isoliert und diese hinsichtlich der Expression TxIna-spezifischer Transkripte analysiert. Zum anderen wurden Zellen entsprechender Differenzierung lysiert und mittels Western Blot analysiert. Als Marker für eine erfolgreiche Differenzierung wurde NTCP detektiert.

Die relative Menge TxIna-spezifischer mRNA nimmt im Verlauf der Differenzierung von HepaRG-Zellen leicht zu (Abb. 15). So liegen in differenzierten HepaRG-Zellen etwa dreimal mehr TxIna-spezifische mRNA-Transkripte vor als in undifferenzierten Zellen (Abb. 15 B). Diese Zunahme fällt allerdings deutlich geringer aus als jene NTCP-spezifischer mRNA. In HepaRG-Zellen, welche einer zweiwöchigen Differenzierung unterzogen wurden, konnte gar ein etwa fünfzigfacher Anstieg NTCP-spezifischer mRNA-Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 15 C).

Im Verlauf des Differenzierungsprozesses von HepaRG-Zellen nimmt auch – wie erwartet – die Menge an NTCP-Protein zu, was auf eine erfolgreiche Differenzierung der Zellen hinweist (Abb. 16). Undifferenzierte, für eine HBV-Infektion nicht susceptible HepaRG-Zellen weisen relativ geringe Mengen an NTCP auf. In differenzierten Zellen hingegen kann etwa die sieben- bzw. dreizehnfache Menge an NTCP-Protein detektiert werden (Abb. 16 B).

Die relative Txlna-Proteinmenge ändert sich hingegen im Verlauf der Differenzierung nicht signifikant, es kann jedoch eine leichte Reduktion der Txlna-Menge in HepaRG-Zellen, welche für zwei Wochen differenziert wurden, beobachtet werden (Abb. 16 C). Im Vergleich zu undifferenzierten HepaRG-Zellen weisen Zellen, die für eine Woche differenziert wurden, etwa 10 % mehr Txlna-Protein auf. Nach zweiwöchiger Differenzierung reduziert sich die relative Txlna-Proteinmenge jedoch um etwa 12 % (Abb. 16 C).

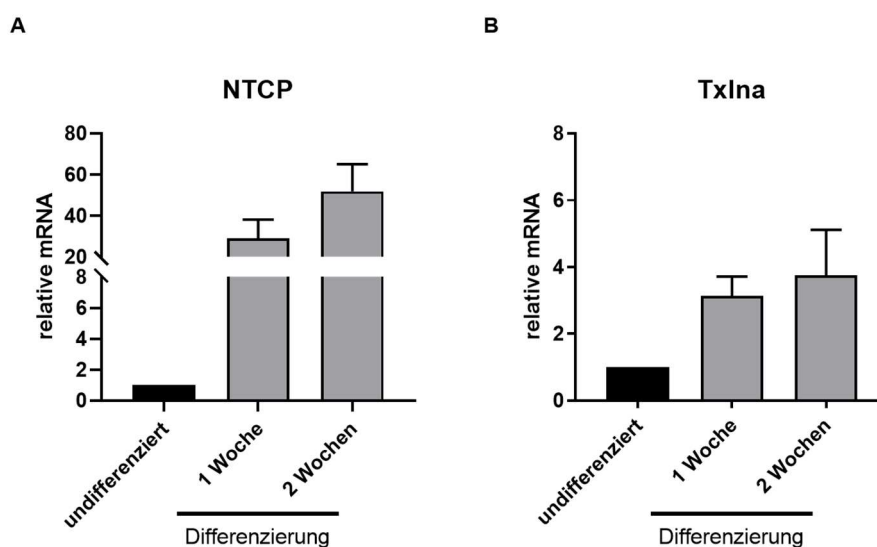


Abbildung 15: Erhöhte Mengen Txlna-spezifischer mRNA-Transkripte in differenzierten HepaRG-Zellen.

HepaRG-Zellen wurden undifferenziert geerntet oder für eine bzw. zwei Wochen differenziert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels RT-qPCR hinsichtlich der Menge von **(A)** NTCP mRNA und **(B)** Txlna mRNA analysiert. Dargestellt ist die Quantifizierung eines technischen Replikats. Die Graphen zeigen relative, auf undifferenzierte HepaRG-Zellen und Rpl27 normierte Werte. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

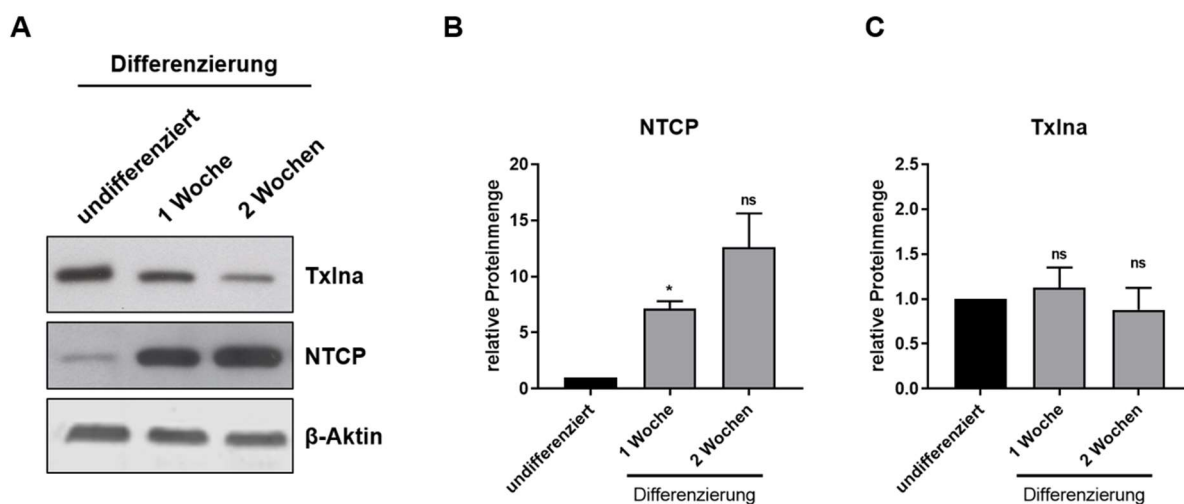


Abbildung 16: Leichte Reduktion der Txlna-Proteinmenge in differenzierten HepaRG-Zellen.

(A) Western Blot eines repräsentativen Experiments. HepaRG-Zellen wurden in undifferenziertem Zustand oder nach ein- bzw. zweiwöchiger Differenzierung lysiert und anschließend hinsichtlich der Expression von NTCP und Txlna untersucht. (B, C) Quantifizierung drei unabhängiger Western Blot Analysen. Die Graphen zeigen relative, auf undifferenzierte HepaRG-Zellen sowie β -Aktin normierte Werte. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. ns $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$

5.4 α -Taxilin befindet sich an der Plasmamembran HBV-suszeptibler Zellen

Um die physiologische subzelluläre Verteilung von Txlna in Zellen, welche für eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus suszeptibel sind, zu untersuchen und mit der subzellulären Distribution in nicht-suszeptiblen Zellen zu vergleichen, wurden zwei Zellsysteme verwendet. Zum einen wurden undifferenzierte, lediglich für zwei Wochen in Wachstumsmedium kultivierte HepaRG-Zellen mit für zwei Wochen differenzierten HepaRG-Zellen (im Weiteren als differenzierte HepaRG-Zellen bezeichnet), welche im Zuge der Differenzierung Suszeptibilität gegenüber einer HBV-Infektion erlangen, verglichen. Zum anderen wurden primäre humane Hepatozyten (PHH) verwendet, welche in differenziertem Zustand – direkt nach Isolierung aus Patientengewebe – mit HBV infiziert werden können, jedoch im Laufe einer Kultivierung für einige Tage zu dedifferenzieren beginnen. Dieser Prozess geht mit dem Verlust der Suszeptibilität für eine Infektion mit HBV einher. Undifferenzierte und differenzierte HepaRG-Zellen bzw. differenzierte und dedifferenzierte PHH wurden fixiert und mittels konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie (CLSM) analysiert. Als Marker-Protein für differenzierte und damit HBV-suszeptible Zellen wurde NTCP spezifisch visualisiert.

In undifferenzierten HepaRG-Zellen liegt Txlna recht gleichmäßig verteilt im Zytoplasma der Zellen vor (Abb. 17 A). In differenzierten HepaRG-Zellen hingegen ändert sich die subzelluläre

Distribution von Txlna drastisch. Im Vergleich zu undifferenzierten HepaRG-Zellen ist in differenzierten lediglich ein sehr geringer Anteil an Txlna im Zytoplasma der Zellen detektierbar, vielmehr befindet sich Txlna nun an der Plasmamembran (Abb. 17 A). Auch in differenzierten, HBV-suszeptiblen PHH lokalisiert Txlna hauptsächlich an der Plasmamembran, nur ein kleiner Anteil Txlna kann retikulär verteilt im Zytoplasma detektiert werden (Abb. 17 B). Die subzelluläre Verteilung von Txlna ähnelt damit stark der subzellulären Verteilung von NTCP, welches sich in differenzierten PHH ebenfalls vorwiegend an der Plasmamembran befindet (Abb. 17 B). In dedifferenzierten PHH ist dahingegen eine diffuse, zytoplasmatische Distribution von Txlna mit vereinzelt Akkumulationen zu erkennen, auch die Plasmamembran-Lokalisation von NTCP ist in dedifferenzierten PHH im Vergleich zu differenzierten deutlich reduziert. Darüber hinaus erhöht sich die Menge an Txlna in dedifferenzierten PHH leicht, was anhand der höheren Fluoreszenzintensität zu erkennen ist (Abb. 17 B).

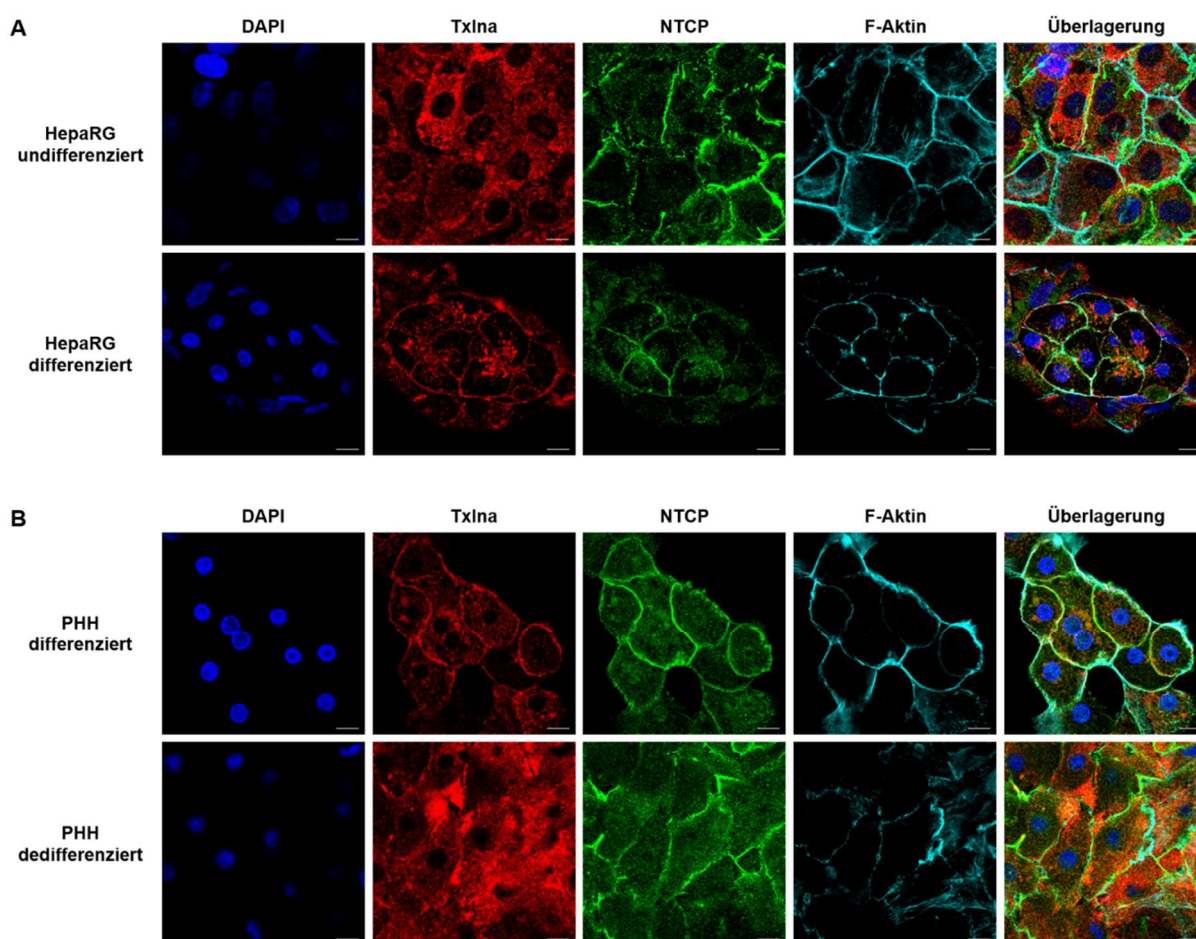


Abbildung 17: Txlna befindet sich an der Plasmamembran HBV-susceptibler Zellen.

CLSM-Aufnahmen undifferenzierter und differenzierter HepaRG-Zellen (A) und differenzierter und dedifferenzierter PHH (B). HepaRG-Zellen wurden für zwei Wochen differenziert und anschließend fixiert. Differenzierte PHH wurden zwei Tage nach Isolierung fixiert oder für zwei weitere Tage in Serum-freiem Medium kultiviert und anschließend

◀ als dedifferenzierte PHH fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Txlna (*rot*) und NTCP (*grün*) durchgeführt. F-Aktin (*türkis*) wurde mittels Phalloidin visualisiert, Zellkerne (*blau*) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstabbalken = 10 µm.

Des Weiteren wurde auch die subzelluläre Distribution von AnxV in HBV-infizierbaren und nicht-infizierbaren Zellen untersucht. Dabei ist zu erkennen, dass AnxV in Zellen, welche nicht mit HBV infiziert werden können (undifferenzierte HepaRG-Zellen sowie dedifferenzierte PHH) diffus zytoplasmatisch verteilt in den Zellen vorliegt und im Zellkern leicht akkumuliert (Abb. 18). In HBV-suszeptiblen Zellen, insbesondere in differenzierten PHH, akkumuliert AnxV zusätzlich an der Plasmamembran, wobei sowohl die diffuse zytoplasmatische Verteilung als auch die Akkumulation im Zellkern erhalten bleiben (Abb. 18 B).

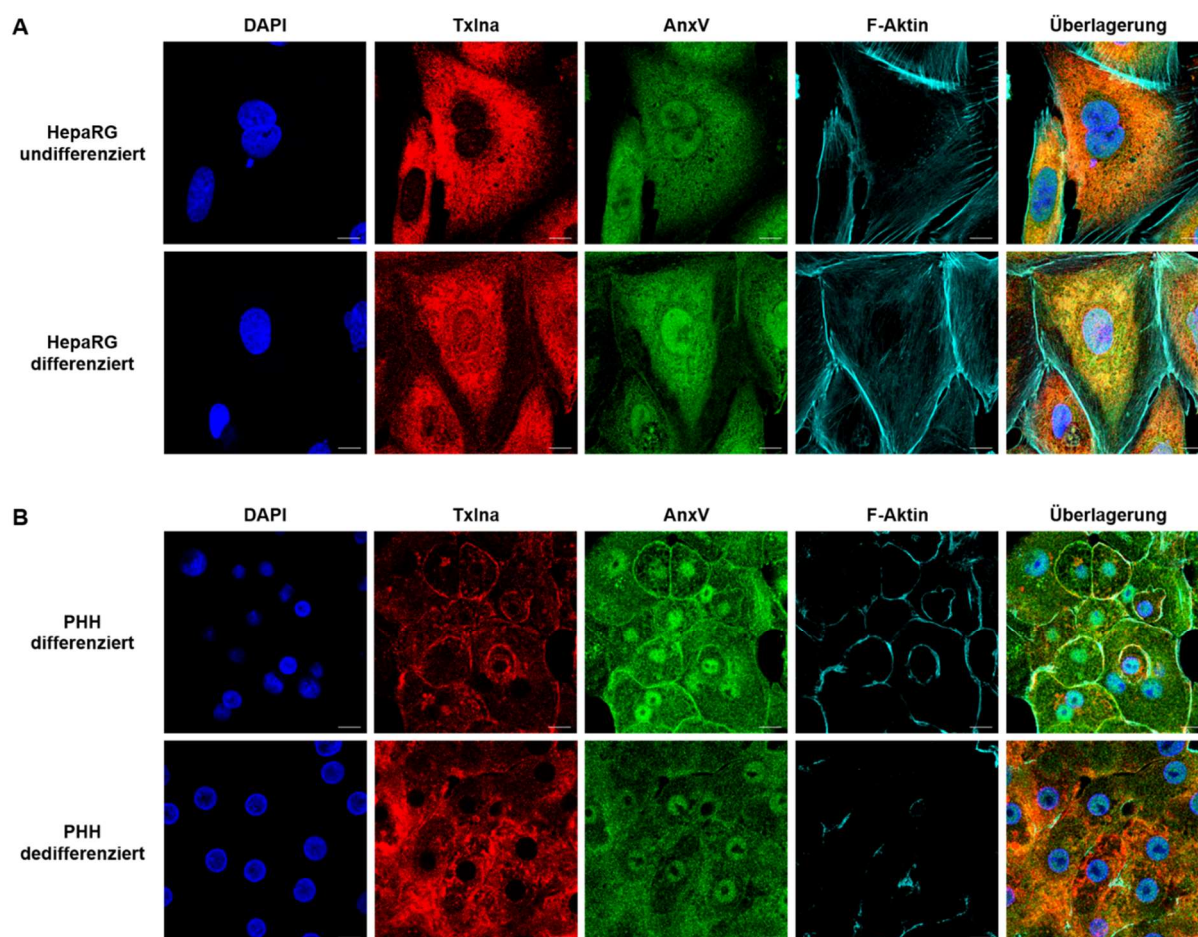


Abbildung 18: AnxV befindet sich an der Plasmamembran HBV-suszeptibler Zellen.

CLSM-Aufnahmen undifferenzierter und differenzierter HepaRG-Zellen (A) und differenzierter und dedifferenzierter PHH (B). HepaRG-Zellen wurden für zwei Wochen differenziert und anschließend fixiert. Differenzierte PHH wurden zwei Tage nach Isolierung fixiert oder für zwei weitere Tage in Serum-freiem Medium kultiviert und anschließend

◀ als dedifferenzierte PHH fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Txlna (*rot*) und AnxV (*grün*) durchgeführt. F-Aktin (*türkis*) wurde mittels Phalloidin visualisiert, Zellkerne (*blau*) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab Balken = 10 μ m.

5.5 α -Taxilin colokalisiert mit Annexin A5 und NTCP an der Plasmamembran HBV-suszeptibler Zellen

Um die Lokalisation von Txlna an der Plasmamembran – insbesondere dessen dortige Verteilung in Relation zu AnxV und NTCP – eingehender zu analysieren, wurden CLSM-Aufnahmen angefertigt und Fluoreszenzintensitätsprofile definierter Bereiche der Plasmamembran HBV-suszeptibler Zellen erstellt.

Dabei zeigt sich, dass Txlna sowohl an der Plasmamembran differenzierter HepaRG-Zellen als auch an der differenzierter PHH mit AnxV colokalisiert (Abb. 19), wobei allerdings diese beiden Proteine an der Plasmamembran differenzierter PHH in höherem Maße und über eine größere Distanz colokalisieren. Darüber hinaus können an der Plasmamembran von PHH deutlich höhere Fluoreszenzintensitäten sowohl von Txlna als auch von AnxV detektiert werden, was auf höhere Mengen dieser beiden Proteine in diesem Kompartiment hindeutet (Abb. 19 B).

Die Analyse der Plasmamembranen differenzierter HepaRG-Zellen und differenzierter PHH hinsichtlich der Lokalisation von Txlna im Verhältnis zu NTCP zeigt, dass auch diese beiden Proteine in diesem Zellkompartiment colokalisieren (Abb. 20). Txlna kann in beiden Zellsystemen in großer räumlicher Nähe zu NTCP an der Plasmamembran nachgewiesen werden. Darüber hinaus können an der Plasmamembran primärer humaner Hepatozyten höhere Fluoreszenzintensitäten für Txlna und NTCP gemessen werden, was auf eine größere Menge dieser beiden Proteine hindeutet (Abb. 20 B).

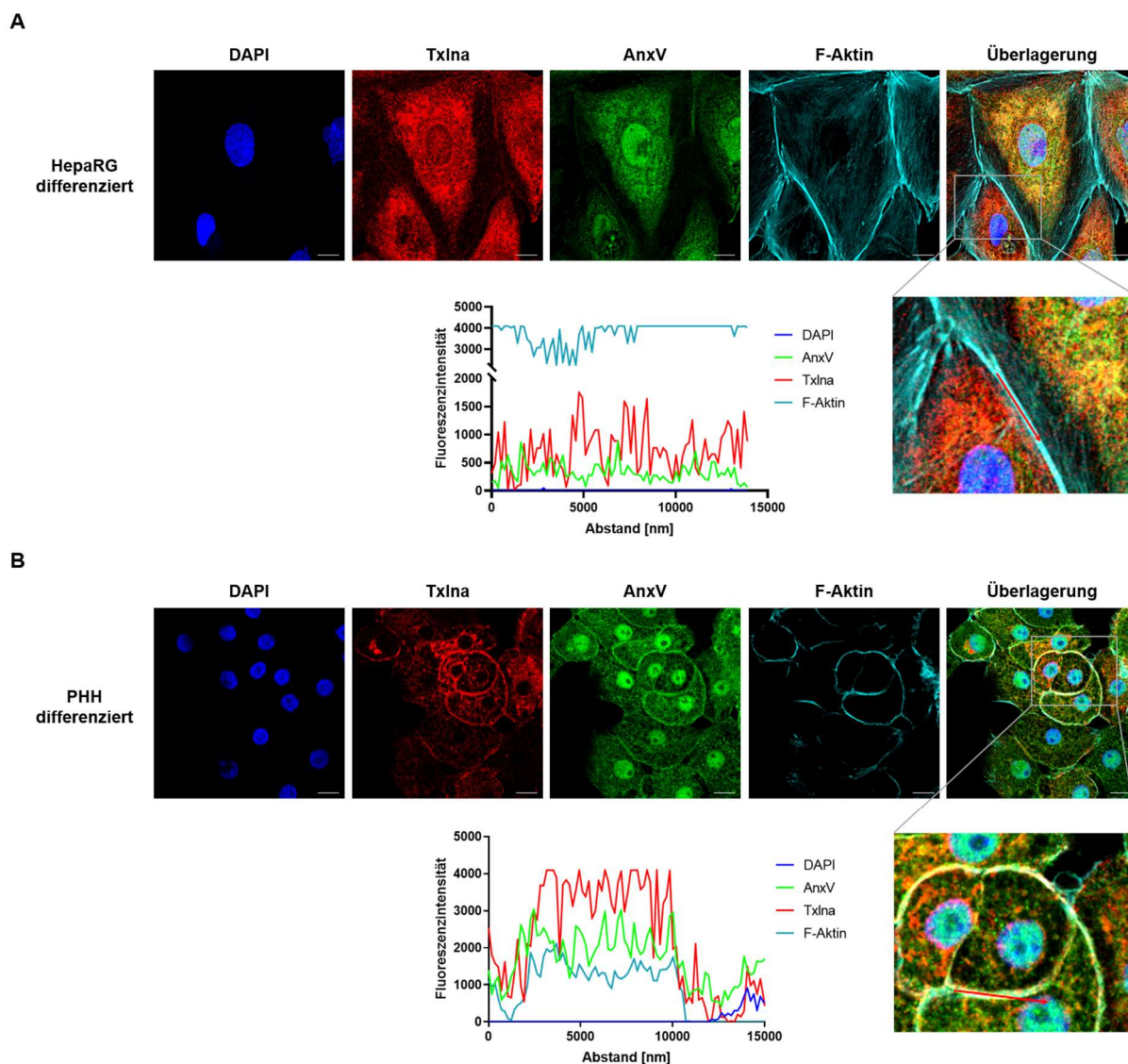


Abbildung 19: α -Taxilin colokalisiert mit Annexin A5 an der Plasmamembran HBV-susceptibler Zellen.

CLSM-Aufnahmen differenzierter HepaRG-Zellen (**A**) und differenzierter PHH (**B**). HepaRG-Zellen wurden für zwei Wochen differenziert und anschließend fixiert, PHH wurden zwei Tage nach Isolierung fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Txlna (*rot*) und AnxV (*grün*) durchgeführt. F-Aktin (*türkis*) wurde mittels Phalloidin visualisiert, Zellkerne (*blau*) wurden mit DAPI gefärbt. Die Fluoreszenzintensitätsprofile geben die Fluoreszenzintensitäten entlang des roten Pfeils in den entsprechenden vergrößerten Bildern an. Maßstabballen = 10 μ m.

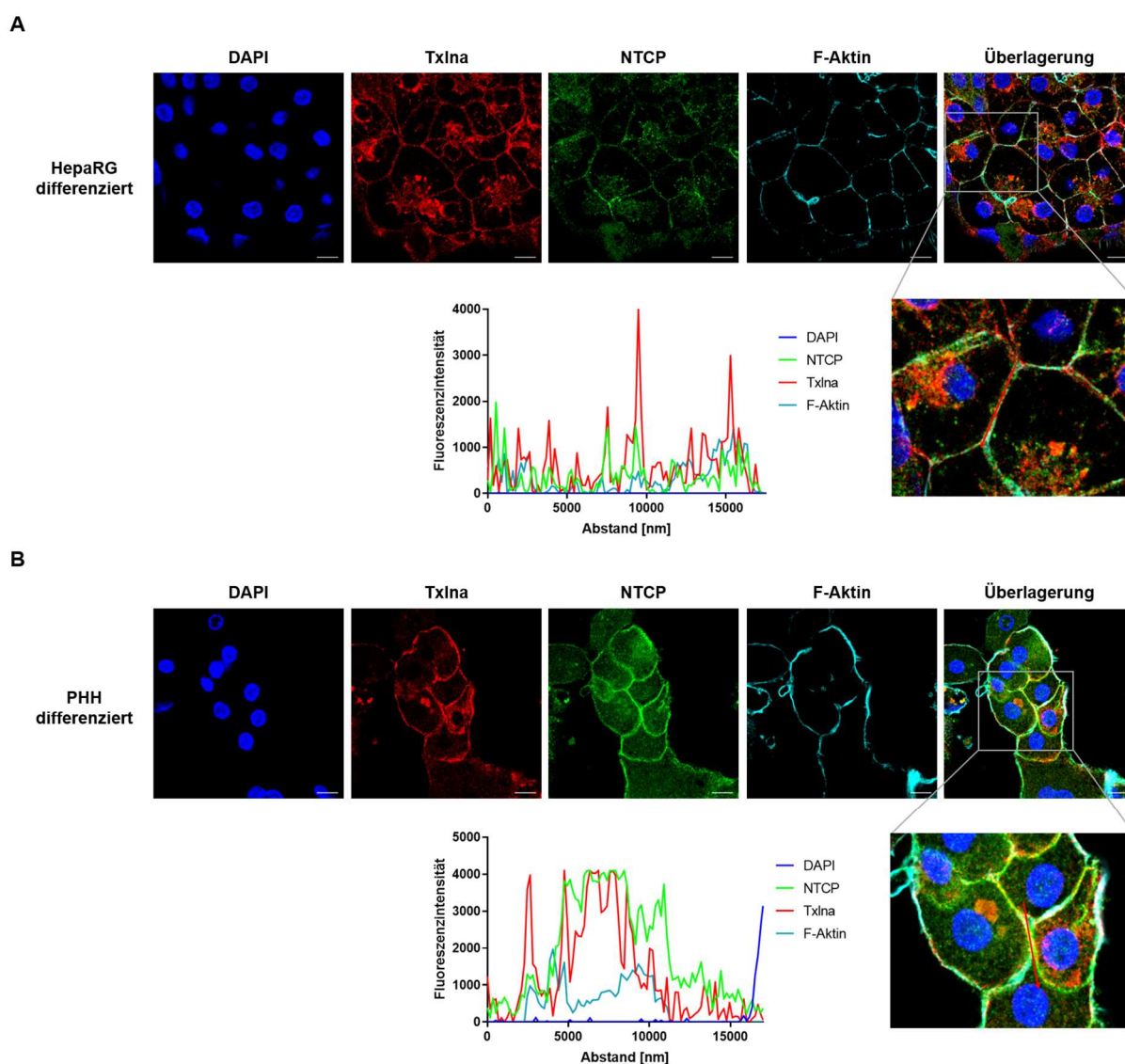


Abbildung 20: α -Taxilin colokalisiert mit NTCP an der Plasmamembran HBV-susceptibler Zellen.

CLSM-Aufnahmen differenzierter HepaRG-Zellen (**A**) und differenzierter PHH (**B**). HepaRG-Zellen wurden für zwei Wochen differenziert und anschließend fixiert, PHH wurden zwei Tage nach Isolierung fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Txlna (*rot*) und NTCP (*grün*) durchgeführt. F-Aktin (*türkis*) wurde mittels Phalloidin visualisiert, Zellkerne (*blau*) wurden mit DAPI gefärbt. Die Fluoreszenzintensitätsprofile geben die Fluoreszenzintensitäten entlang des roten Pfeils in den entsprechenden vergrößerten Bildern an. Maßstabballen = 10 μ m.

Um die räumliche Distribution von Txlna und NTCP an der Plasmamembran sowie deren Colokalisation detaillierter zu untersuchen, wurden mittels konfokaler *Laser-Scanning-Mikroskopie z-stacks* differenzierter PHH aufgenommen, aus denen anschließend ein dreidimensionales Bild rekonstruiert wurde. Neben Bereichen, an denen Txlna und NTCP vereinzelt vorliegen, zeigt die dreidimensionale Rekonstruktion, dass Txlna in hohem Maße

mit NTCP an der Plasmamembran der PHH, insbesondere im Bereich von Zell-Zell-Kontakten, colokalisiert (Abb. 21 A). In diesem Bereich können besonders viele gelbe Cluster detektiert werden, welche für eine Lokalisation von Txl α und NTCP in distinkten Strukturen in sehr enger räumlicher Nähe sprechen und auf ein Wechselspiel zwischen diesen beiden Proteinen hindeuten. Diese Beobachtung wird durch die für Txl α und NTCP ermittelten *weighted colocalisation coefficient* (WCC)-Werte von 0,98 (Txl α) und 0,9 (NTCP) quantifizierend unterstützt, welche ein starkes Maß an Colokalisation indizieren (Abb. 21 B).

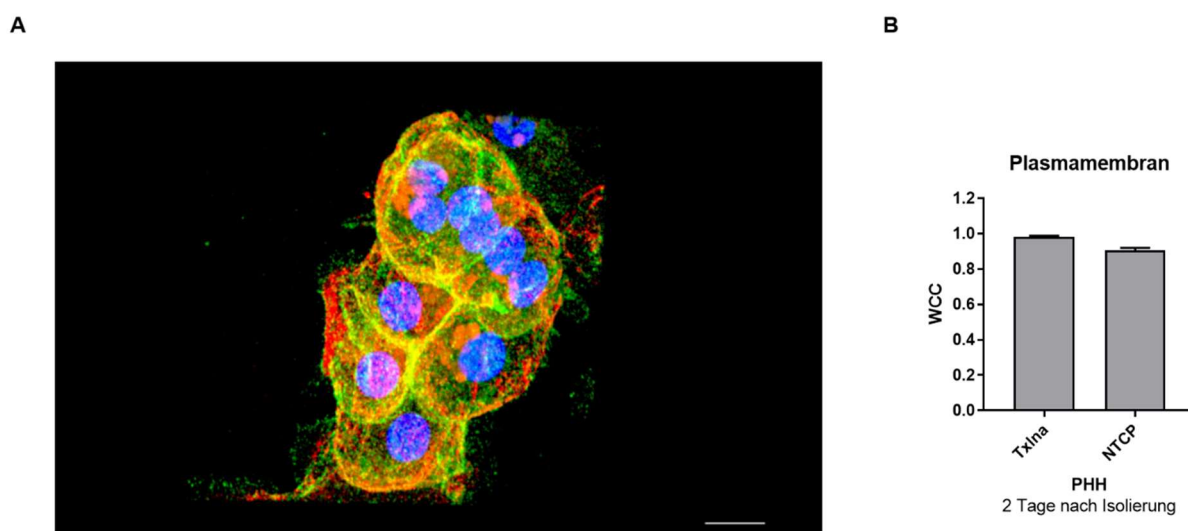


Abbildung 21: α -Taxilin colokalisiert in hohem Maße mit NTCP an der Plasmamembran differenzierter PHH.

(A) Dreidimensionale Rekonstruktion differenzierter PHH. PHH wurden zwei Tage nach Isolierung fixiert und unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Txl α (rot) und NTCP (grün) angefärbt. Zellkerne (blau) wurden mit DAPI visualisiert. Maßstab balken = 10 μ m. (B) Quantifizierung der Colokalisation mittels *weighted colocalisation coefficient* (WCC) von zehn verschiedenen Präparaten. Der Graph zeigt die Mittelwerte \pm SEM.

5.6 HBV-suszeptible Zellen exponieren α -Taxilin an der Zelloberfläche

Um die Distribution von Txl α an der Plasmamembran HBV-suszeptibler Zellen in höherer Auflösung zu untersuchen, wurden PHH zwei Tage nach Isolierung aus Patientengewebe fixiert und mittels *Super-Resolution*-Mikroskopie analysiert. Die *Super-Resolution*-Aufnahme zeigt, dass Txl α an bestimmten Bereichen der Plasmamembran an der Zelloberfläche der PHH exponiert vorliegt (Abb. 22 A). Im Vergleich zu NTCP, welches fast auf der gesamten Zelloberfläche nachweisbar ist, wird Txl α allerdings in deutlich geringerem Maße an der Oberfläche exponiert.

Um eine Exposition von Txlna an der Zelloberfläche – wie sie mittels *Super-Resolution*-Mikroskopie beobachtet werden konnte – zu bestätigen, wurden mit Hilfe eines Membran-impermeablen sulfo-NHS-Esters ausschließlich die Oberflächenproteine differenzierter HepaRG-Zellen biotinyliert, anschließend präzipitiert und mittels Western Blot analysiert. Dabei konnte Txlna, neben bekannten Oberflächenproteinen wie dem Transferrin-Rezeptor (TfnR) und NTCP, in der Fraktion der präzipitierten Oberflächenproteine detektiert werden (Abb. 22 B), was die mittels *Super-Resolution*-Mikroskopie beobachtete Lokalisation verifiziert. Im Vergleich zu NTCP und TfnR wurde Txlna in deutlich geringerer Menge in der Fraktion der an der Zelloberfläche lokalisierten Proteine detektiert, was ebenfalls mit den per *Super-Resolution*-Mikroskopie generierten Daten korreliert.

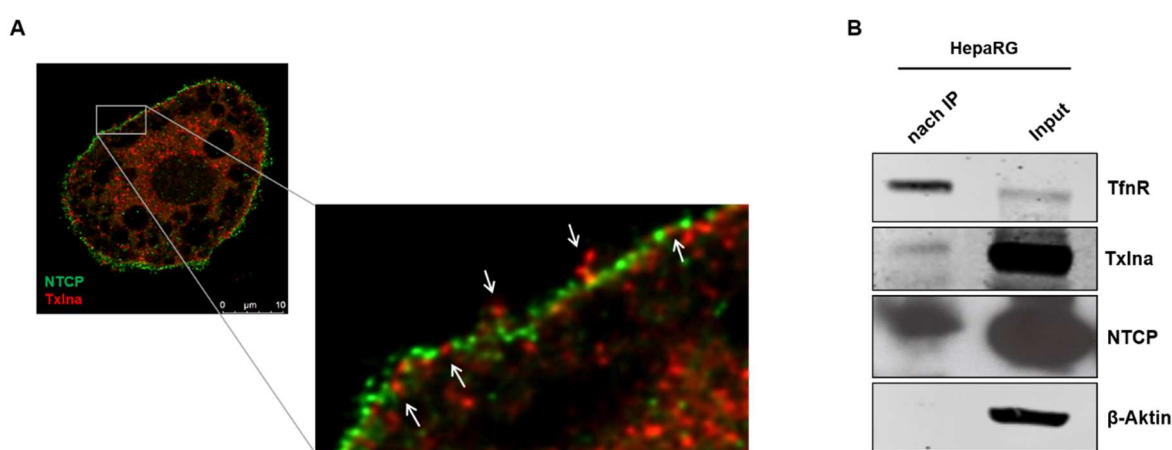


Abbildung 22: HBV-suszeptible Zellen exponieren α -Taxilin auf der Zelloberfläche.

(A) *Super-Resolution*-Mikroskopie-Aufnahme differenzierter PHH. PHH wurden zwei Tage nach Isolierung fixiert und unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Txlna (rot) und NTCP (grün) angefärbt. Txlna wird an distinkten Bereichen der Plasmamembran an der Zelloberfläche exponiert (weiße Pfeile). Maßstabbalken = 10 μ m.

(B) Western Blot eines repräsentativen Oberflächenbiotinylierungsexperiments. Unter Verwendung eines Membran-impermeablen sulfo-NHS-Esters wurden ausschließlich die Oberflächenproteine differenzierter HepaRG-Zellen biotinyliert, mit Hilfe von NeutrAvidin-Agarose präzipitiert und anschließend mittels Western Blot analysiert. Als Marker-Protein für an der Zelloberfläche lokalisierte Proteine wurden TfnR und NTCP, als intrazelluläres Protein, welches nicht an der Zelloberfläche nachzuweisen sein sollte, wurde β -Aktin detektiert.

5.7 α -Taxilin interagiert direkt mit Annexin A5, nicht jedoch mit NTCP

Die mittels CLSM detektierte Colokalisation von Txlna mit AnxV und NTCP deutet auf eine potentielle Interaktion von Txlna mit den beiden Proteinen hin. Für Txlna und AnxV konnte bereits in präliminären Experimenten eine direkte Interaktion nachgewiesen werden [227]. Um zu überprüfen, ob Txlna ebenfalls direkt mit NTCP interagiert, wurde Gesamtproteinlysate differenzierter HepaRG-Zellen mit Txlna-, AnxV- und NTCP-spezifischen Antikörpern inkubiert

und die mit den Antikörpern co-präzipitierten Proteine mittels Western Blot analysiert. Mit einem Txlna-spezifischen Antikörper konnte AnxV co-präzipitiert werden (Abb. 23), was die präliminären massenspektrometrischen Daten bestätigt. Umgekehrt konnte jedoch kein Txlna-Protein mittels AnxV-spezifischem Antikörper co-präzipitiert werden. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass weder NTCP mit Hilfe eines Txlna-spezifischen Antikörpers noch umgekehrt Txlna nach Inkubation mit einem NTCP-spezifischen Antikörper co-präzipitiert werden kann (Abb. 23), sodass dieser Ansatz keinen Hinweis auf eine direkte Interaktion von Txlna mit NTCP gibt. Des Weiteren konnte auch keine direkte Interaktion zwischen AnxV und NTCP nachgewiesen werden.

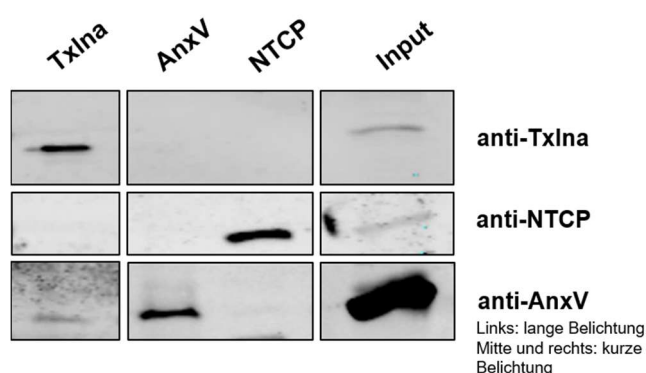


Abbildung 23: α -Taxilin interagiert direkt mit Annexin A5, nicht jedoch mit NTCP.

Repräsentativer Western Blot einer Co-IP von Txlna und AnxV. Differenzierte HepaRG-Zellen wurden lysiert und mit einem Txlna-spezifischen, einem AnxV-spezifischen oder einem NTCP-spezifischen Antikörper inkubiert. Die Präzipitation der Antikörper erfolgte mittels Protein A/G Agarose.

5.8 Relevanz von α -Taxilin für den *Entry*-Prozess des Hepatitis-B-Virus

5.8.1 Etablierung der Infektion mit aus Zellkulturüberstand isoliertem HBV

Um die Bedeutung von Txlna für den *Entry*-Prozess des Hepatitis-B-Virus untersuchen zu können, wurde zunächst die Infektion mit HBV, welches aus Zellkulturüberstand isoliert wurde, etabliert. Dafür wurden HepaRG-Zellen für zwei Wochen differenziert und anschließend mit unterschiedlichen Mengen an Viren pro Zelle (*multiplicity of infection*, MOI) infiziert. Zwei Wochen nach der initialen Infektion wurde der Verlauf der Infektion mittels HBsAg-spezifischem ELISA analysiert, die Zellen wurden fixiert und einer CLSM-Analyse unterzogen.

Die Untersuchung der infektiösen Zellkulturüberstände mittels HBsAg-spezifischem ELISA zeigt, dass die Infektion von HepaRG-Zellen mit HBV, welches aus Zellkulturüberstand von HepAD38-Zellen isoliert wurde, erfolgreich war (Abb. 24 A). Trägt man die ermittelten s/co-Werte, welche dem Quotienten aus der gemessenen Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm und dem Experiment-spezifischen *Cut off*-Wert entsprechen, gegen die Zeit auf, so ergibt sich eine für eine HBV-Infektion typische Kurve (Abb. 24 A), was auf eine erfolgreiche Infektion hindeutet. Eine typische HBV-Infektionskurve weist zunächst hohe s/co-Werte auf, welche größtenteils auf Viren des Inokulums zurückzuführen sind, und ist durch eine starke Abnahme der s/co-Werte an Tag vier nach Infektion sowie einen deutlichen Anstieg selbiger sechs Tage nach Infektion gekennzeichnet. Die Infektionskurven aller infizierten Zellen weisen einen solchen Verlauf auf, unterscheiden sich jedoch in Abhängigkeit der für die Infektion eingesetzten MOI hinsichtlich der Steigung vier Tage nach Infektion und damit der Menge sezernierten HBsAg (Abb. 24 A). Dabei zeigt sich, dass Zellen, welche mit einer höheren MOI infiziert wurden, größere Mengen HBsAg freisetzen (Abb. 24 A). Die Menge an sezerniertem HBsAg steigt proportional zur MOI.

Die erfolgreiche Infektion der HepaRG-Zellen konnte ebenfalls mittels Immunfluoreszenzfärbung und CLSM-Analyse verifiziert werden. Im Vergleich zu uninfizierten Kontrollzellen können in allen infizierten Proben Zellen detektiert werden, welche eine spezifische Färbung des HBV-Core-Proteins aufweisen (Abb. 24 B). Dabei steigt die Anzahl Core-positiver Zellen in Abhängigkeit von der MOI, mit denen die Zellen infiziert wurden. Des Weiteren liegt HBcAg in infizierten Zellen retikulär verteilt vor (Abb. 24 C), was auf eine spezifische Färbung und letztlich auf eine effiziente Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus hinweist.

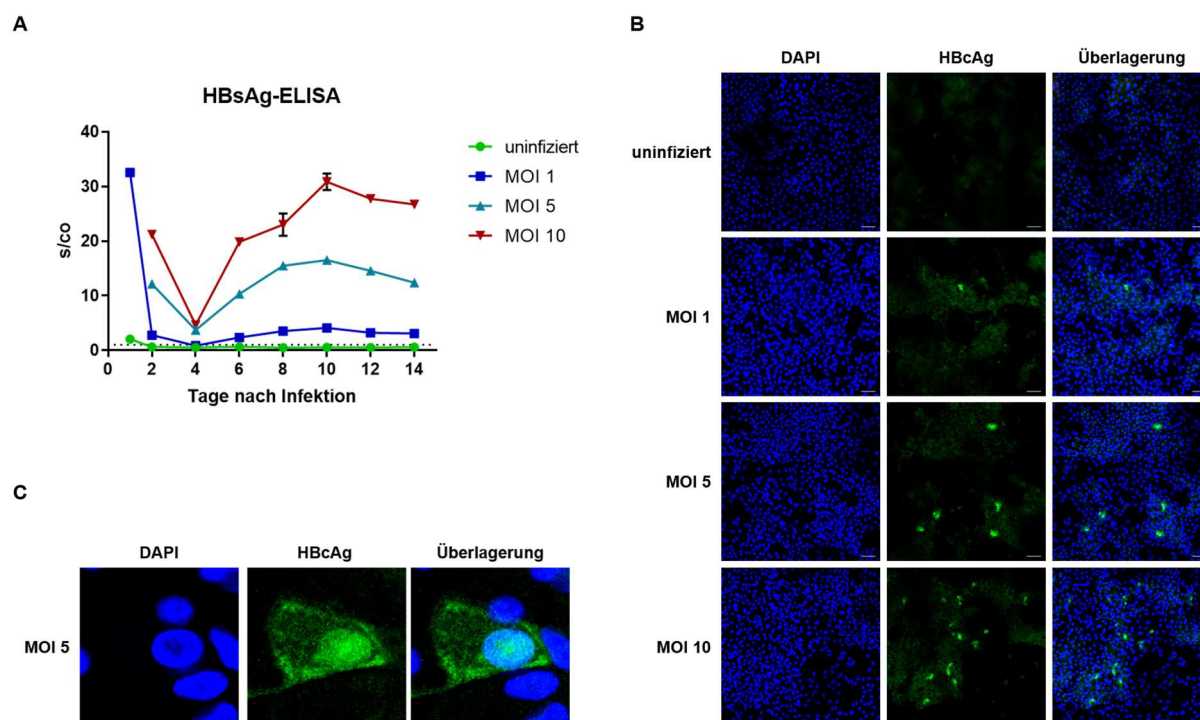


Abbildung 24: Erfolgreiche Infektion mit aus HepAD38-Zellkulturüberstand isoliertem HBV.

(A,B,C) HepaRG-Zellen wurden für zwei Wochen differenziert und anschließend mit verschiedenen Mengen an Virus für 16 Stunden inokuliert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt und die Zellkulturüberstände der infizierten Zellen wurden mittels HBsAg-spezifischem ELISA hinsichtlich der Menge an freigesetztem HBsAg analysiert (A). Der Graph zeigt die Quotienten (s/co) aus Absorption der Probe bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ und dem Experiment-spezifischen *Cut off*-Wert als Mittelwerte \pm SEM. Die gepunktete Linie markiert den s/co -Wert von 1. $s/co < 1$ wird nach Angaben des Herstellers für diagnostische Zwecke als HBsAg-negativ definiert, $s/co \geq 1$ als HBsAg-positiv. (B,C) CLSM-Aufnahmen von HepaRG-Zellen, die zwei Wochen nach Infektion fixiert wurden. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen HBcAg (*grün*) durchgeführt, Zellkerne (*blau*) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstabbalken = 10 μm .

Darüber hinaus konnte die Infektion mit HBV sowohl durch den monoklonalen, LHBs-spezifischen Antikörper MA18/7 als auch durch Myrcludex B inhibiert werden, was sowohl mittels ELISA als auch durch eine CLSM-Analyse bestätigt werden konnte (Abb. 25).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Infektion mit aus HepAD38-Zellkulturüberstand isoliertem Hepatitis-B-Virus kontrollierbar, effizient, spezifisch und reproduzierbar durchgeführt werden kann.

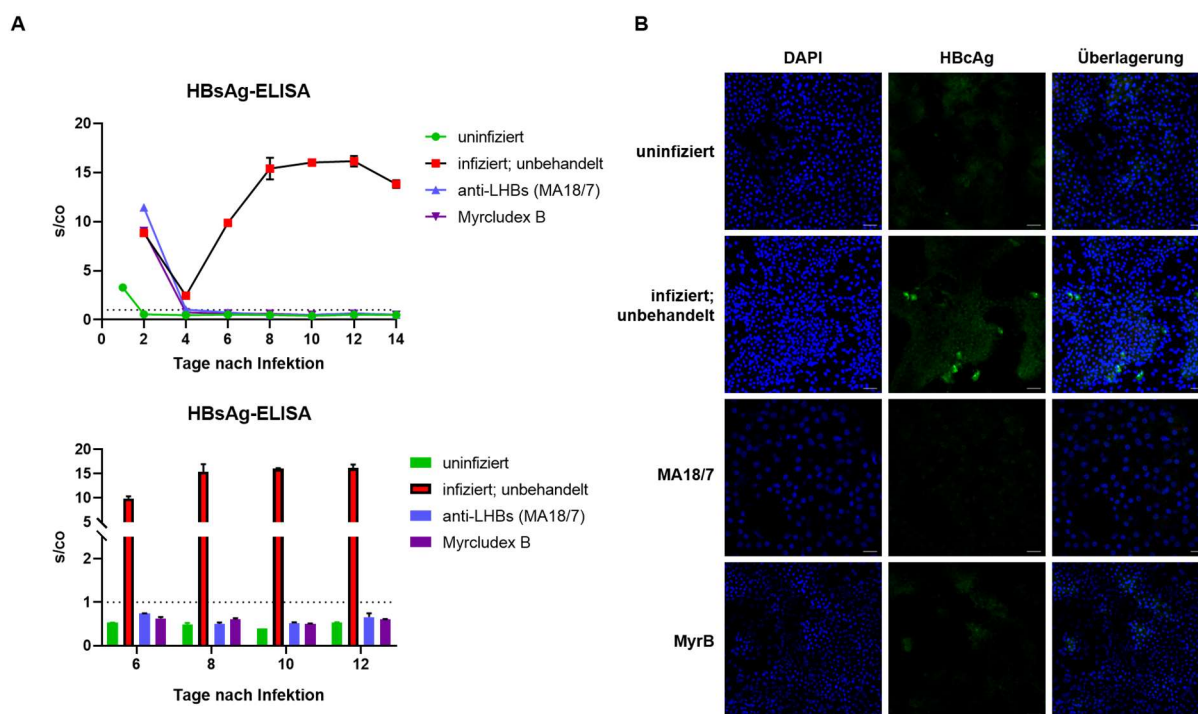


Abbildung 25: Inhibition der HBV-Infektion durch den monoklonalen Antikörper MA18/7 und Myrcludex B.

(A,B) HepaRG-Zellen wurden für zwei Wochen differenziert und anschließend mit HBV (MOI 5) für 16 Stunden inokuliert. Um die HBV-Infektion zu blockieren, wurde entweder Virus mit dem monoklonalen LHBs-spezifischen Antikörper MA18/7 (0,4 µg) für zwei Stunden vor der Infektion vorinkubiert oder dem entsprechenden Inokulum wurde Myrcludex B (500 nM) zugefügt. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt und die Zellkulturüberstände der infizierten Zellen wurden mittels HBsAg-spezifischem ELISA hinsichtlich der Menge an freigesetztem HBsAg analysiert **(A)**. Die Graphen zeigen die Quotienten (s/co) aus Absorption der Probe bei $\lambda = 450$ nm und dem Experiment-spezifischen *Cut off*-Wert als Mittelwerte \pm SEM. Die gepunktete Linie markiert den s/co-Wert von 1. $s/co < 1$ wird nach Angaben des Herstellers zu diagnostischen Zwecken als HBsAg-negativ definiert, $s/co \geq 1$ als HBsAg-positiv. **(B)** CLSM-Aufnahmen von HepaRG-Zellen, die zwei Wochen nach Infektion fixiert wurden. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen HBcAg (*grün*) durchgeführt, Zellkerne (*blau*) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab Balken = 10 µm.

5.8.2 Signifikante Hemmung der HBV-Infektion durch α -Taxilin-spezifische Antikörper

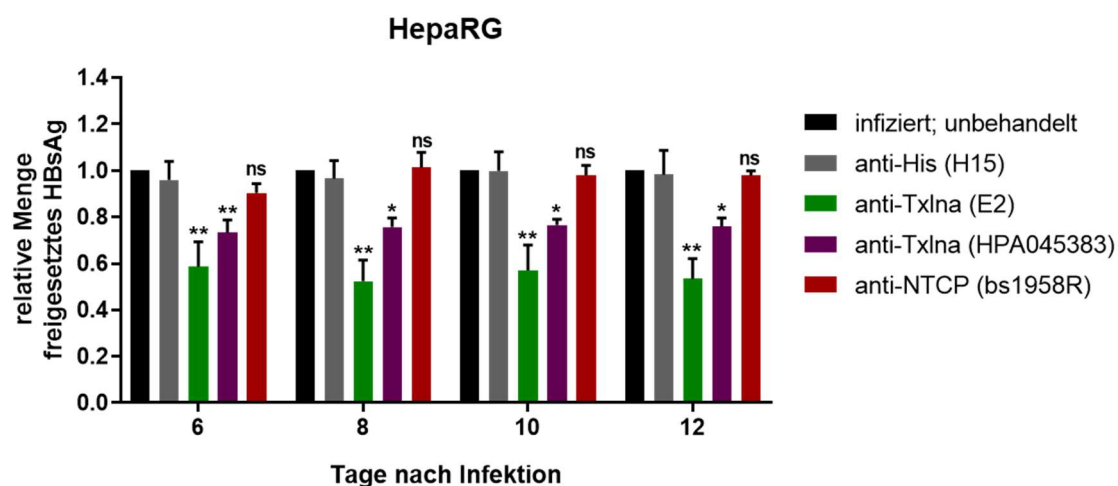
Um die Relevanz von Txlna für den *Entry*-Prozess des Hepatitis-B-Virus zu analysieren, wurden differenzierte HepaRG-Zellen sowie differenzierte PHH mit Txlna-spezifischen Antikörpern vor und während der Infektion inkubiert und hinsichtlich der freigesetzten HBsAg-Menge analysiert. Ein His-tag-spezifischer Antikörper, dessen Epitop nicht auf der Zelloberfläche von HepaRG-Zellen vorzufinden ist, sowie ein NTCP-spezifischer Antikörper dienten als Kontrolle.

Eine Inkubation von HepaRG-Zellen mit den angegebenen Txlna-spezifischen Antikörpern resultiert in signifikant reduzierten Mengen an sezerniertem HBsAg (Abb. 26). So verringert

sich die Menge an HBsAg in Überständen von HepaRG-Zellen, welche mit einem monoklonalen TxIna-spezifischen Antikörper (E2) inkubiert wurden, im Vergleich zu infektiösen Zellkulturüberständen unbehandelter Kontrollzellen um etwa die Hälfte (Abb. 26 A). Die Inkubation der Zellen mit einem polyklonalen TxIna-spezifischen Antikörper (HPA045383) resultiert ebenfalls in einer signifikanten Reduktion von freigesetztem HBsAg, allerdings nur um etwa 25 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 26 A). Des Weiteren fällt auf, dass eine HBV-Infektion von HepaRG-Zellen – anders als eine Infektion von PHH (Abb. 26 B) – durch einen NTCP-spezifischen Antikörper nicht signifikant vermindert werden kann (Abb. 26 A). In Zellkulturüberständen von HepaRG-Zellen, welche mit einem NTCP-spezifischen Antikörper inkubiert wurden, können vielmehr vergleichbare Mengen an HBsAg detektiert werden, wie in Überständen unbehandelter oder mit einem His-tag-spezifischen Antikörper behandelte Kontrollzellen (Abb. 26 A).

Auch in primären humanen Hepatozyten kann die HBV-Infektion signifikant durch TxIna-spezifische Antikörper vermindert werden, wobei sich die verwendeten TxIna-spezifischen Antikörper hinsichtlich der Effektivität im Vergleich zu HepaRG-Zellen unterscheiden (Abb. 26 B). So kann die Effizienz einer HBV-Infektion in PHH durch den monoklonalen TxIna-spezifischen Antikörper (E2) weniger effektiv reduziert werden als mit dem polyklonalen Antikörper. In infektiösen Zellkulturüberständen von PHH, welche mit dem monoklonalen TxIna-spezifischen Antikörper inkubiert wurden, kann im Vergleich zu den Überständen unbehandelter Kontrollzellen etwa 10 % weniger HBsAg detektiert werden, lediglich acht Tage nach Infektion ist eine signifikante Verminderung des freigesetzten HBsAg nachweisbar (Abb. 26 B). Dahingegen führt eine Inkubation von PHH mit dem polyklonalen TxIna-spezifischen Antikörper vor und während der Infektion im Durchschnitt zu um etwa 40 % verminderten Mengen an freigesetztem HBsAg. Damit inhibiert der polyklonale TxIna-spezifische Antikörper eine HBV-Infektion von PHH in vergleichbarem Maße wie ein NTCP-spezifischer Antikörper (Abb. 26 B).

A



B

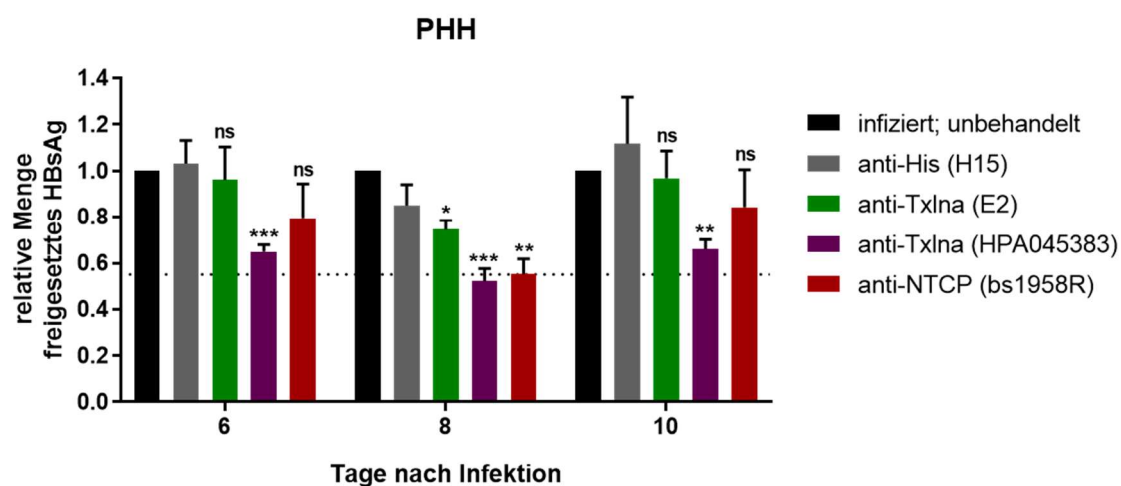


Abbildung 26: Signifikante Hemmung der HBV-Infektion durch α -Taxilin-spezifische Antikörper.

Differenzierte HepaRG-Zellen (**A**) und differenzierte PHH (**B**) wurden zwei Stunden vor Infektion mit Txlna-spezifischen Antikörpern, einem NTCP-spezifischen oder einem als Kontrolle dienenden His-*tag*-spezifischen Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden anschließend unter Anwesenheit dieser Antikörper mit HBV (**A,B**) ~ MOI 1 oder (**A**) ~ MOI 5 für 16 Stunden inokuliert, das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt und die Zellkulturüberstände schließlich mittels HBsAg-spezifischem ELISA analysiert. (**A**) Quantifizierung vier unabhängiger Experimente. Der Graph zeigt relative, auf den Experiment-spezifischen *Cut off*-Wert sowie die unbehandelte Kontrolle normierte Werte. (**B**) Quantifizierung drei technischer Replikate. Die gepunktete Linie markiert die mittels NTCP-spezifischem Antikörper maximal erreichte Verminderung der HBV-Infektionseffizienz. Der Graph zeigt relative, auf den Experiment-spezifischen *Cut off*-Wert sowie die unbehandelte Kontrolle normierte Werte. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM. ns $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

5.8.3 Signifikante Hemmung der HBV-Infektion durch eine Vorinkubation von HBV mit rekombinantem α -Taxilin-Protein

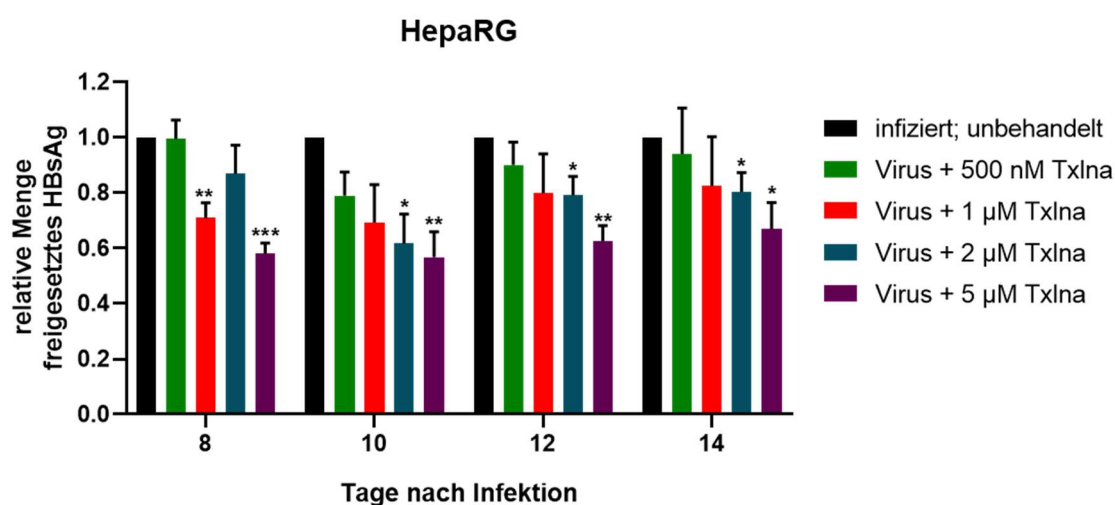
Wie zuvor beschrieben kann eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus durch die Anwesenheit Txlna-spezifischer Antikörper signifikant vermindert werden. Um zu untersuchen, ob eine HBV-Infektion ebenfalls durch rekombinantes Txlna-Protein beeinflusst werden kann, wurde HBV mit unterschiedlichen Konzentrationen an gereinigtem Txlna vorinkubiert und anschließend für die Infektion von HepaRG-Zellen oder PHH verwendet. Die alle zwei Tage nach Infektion gesammelten infektiösen Überstände wurden schließlich mittels ELISA hinsichtlich der Menge an freigesetztem HBsAg analysiert.

Eine Infektion von HepaRG-Zellen mit HBV, welches mit gereinigtem Txlna-Protein präinkubiert wurde, resultiert in einer dosisabhängig reduzierten Menge an HBsAg, welches im Zellkulturüberstand der infizierten Zellen nachgewiesen werden kann (Abb. 27 A). Eine Präinkubation von HBV mit 500 nM Txlna-Protein führt – im Vergleich zu Zellen, die mit unbehandeltem Virus infiziert wurden – zehn, zwölf und vierzehn Tage nach Infektion zu leicht verminderten Mengen an HBsAg, eine Reduktion, die jedoch statistisch nicht signifikant ist (Abb. 27 A). Im Vergleich dazu resultiert die Infektion mit Virus, welches mit 1 μ M Txlna vorinkubiert wurde, in einer etwas stärkeren Verminderung der Infektionseffizienz. So kann acht Tage nach Infektion in infektiösen Überständen dieser Gruppe im Vergleich zu mit unbehandeltem Virus infizierten Zellen signifikant weniger HBsAg detektiert werden (Abb. 27 A). Eine noch deutlichere Hemmung der Infektion kann bei HepaRG-Zellen beobachtet werden, die mit HBV, welches mit 2 μ M bzw. 5 μ M Txlna-Protein behandelt wurde, infiziert wurden (Abb. 27 A). Die Vorinkubation des Virus mit diesen Txlna-Proteinkonzentrationen resultiert in einer signifikanten Inhibition der Infektion um durchschnittlich etwa 25 % (2 μ M Txlna) bzw. 40 % (5 μ M Txlna).

Diese Ergebnisse konnten mit PHH reproduziert werden. Auch eine Infektion primärer humaner Hepatozyten mit HBV, welches zuvor mit rekombinantem Txlna inkubiert wurde, verläuft deutlich weniger effizient als eine Infektion mit unbehandeltem Virus (Abb. 27 B).

Insgesamt ist festzustellen, dass nach Präinkubation von HBV mit gereinigtem Txlna eine konzentrationsabhängige Hemmung der Infektion von HepaRG-Zellen und PHH beobachtet werden kann (Abb. 27).

A



B

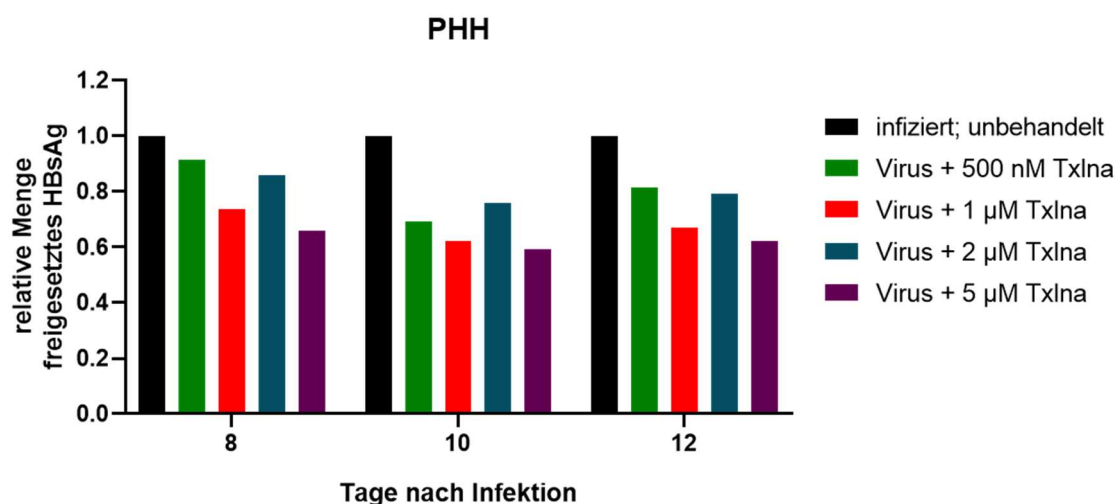


Abbildung 27: Signifikante Hemmung der HBV-Infektion durch Inkubation des Virus mit rekombinantem TxlNa-Protein.

Aus Zellkulturüberstand von HepAD38-Zellen isoliertes HBV wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen gereinigten TxlNa-Proteins für zwei Stunden inkubiert und anschließend für die Infektion (für 16 Stunden) von **(A)** HepaRG-Zellen oder **(B)** PHH (~ MOI 1) verwendet. Das Medium der Zellen wurde alle zwei Tage gewechselt und die Zellkulturüberstände wurden schließlich mittels HBsAg-spezifischem ELISA analysiert. **(A)** Quantifizierung drei unabhängiger Experimente. Der Graph zeigt relative, auf den Experiment-spezifischen *Cut off*-Wert sowie die mit unbehandeltem Virus infizierte Kontrolle normierte Werte. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. **(B)** Quantifizierung eines Experiments. Der Graph zeigt relative, auf den Experiment-spezifischen *Cut off*-Wert sowie die mit unbehandeltem Virus infizierte Kontrolle normierte Werte. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

5.8.4 Die HBV-Infektion kann durch eine Vorinkubation von PHH mit rekombinantem α -Taxilin-Protein signifikant vermindert werden

Eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus kann, wie zuvor beschrieben, durch eine vorherige Inkubation desselben mit gereinigtem Txlna-Protein signifikant vermindert werden. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse sollte untersucht werden, ob eine Inkubation HBV-suszeptibler Zellen mit rekombinantem Txlna vor der Infektion ebenfalls einen Einfluss auf diese hat. Dafür wurden HepaRG-Zellen oder PHH für zwei Stunden mit 500 nM Txlna inkubiert und anschließend mit unbehandeltem HBV infiziert. Des Weiteren wurden mit Txlna vorinkubierte Zellen auch mit HBV infiziert, welches ebenfalls für zwei Stunden mit 500 nM Txlna inkubiert wurde.

Es zeigt sich, dass die Infektion von HepaRG-Zellen mit HBV durch eine Präinkubation der Zellen mit Txlna in der angegebenen Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen lediglich zu einer leicht verminderten Infektion führt, die allerdings statistisch nicht signifikant ist (Abb. 28 A). Auch die Vorinkubation von sowohl HepaRG-Zellen als auch HBV hat keinen signifikanten Effekt auf die Infektion (Abb. 28 A). Im Gegensatz zu HepaRG-Zellen resultiert eine Behandlung primärer humaner Hepatozyten mit gereinigtem Txlna vor der Infektion in einer um etwa 40 % reduzierten Infektionseffizienz und auch eine Vorinkubation von Virus und Zellen hemmt die Infektion deutlich (Abb. 28 B).

Die HBV-Infektion wird demnach durch eine Vorinkubation von HepaRG-Zellen mit rekombinantem Txlna nicht signifikant beeinflusst, eine Inkubation primärer humaner Hepatozyten vor der Inkubation resultiert indessen in einer signifikanten Verminderung der Infektionseffizienz (Abb. 28).

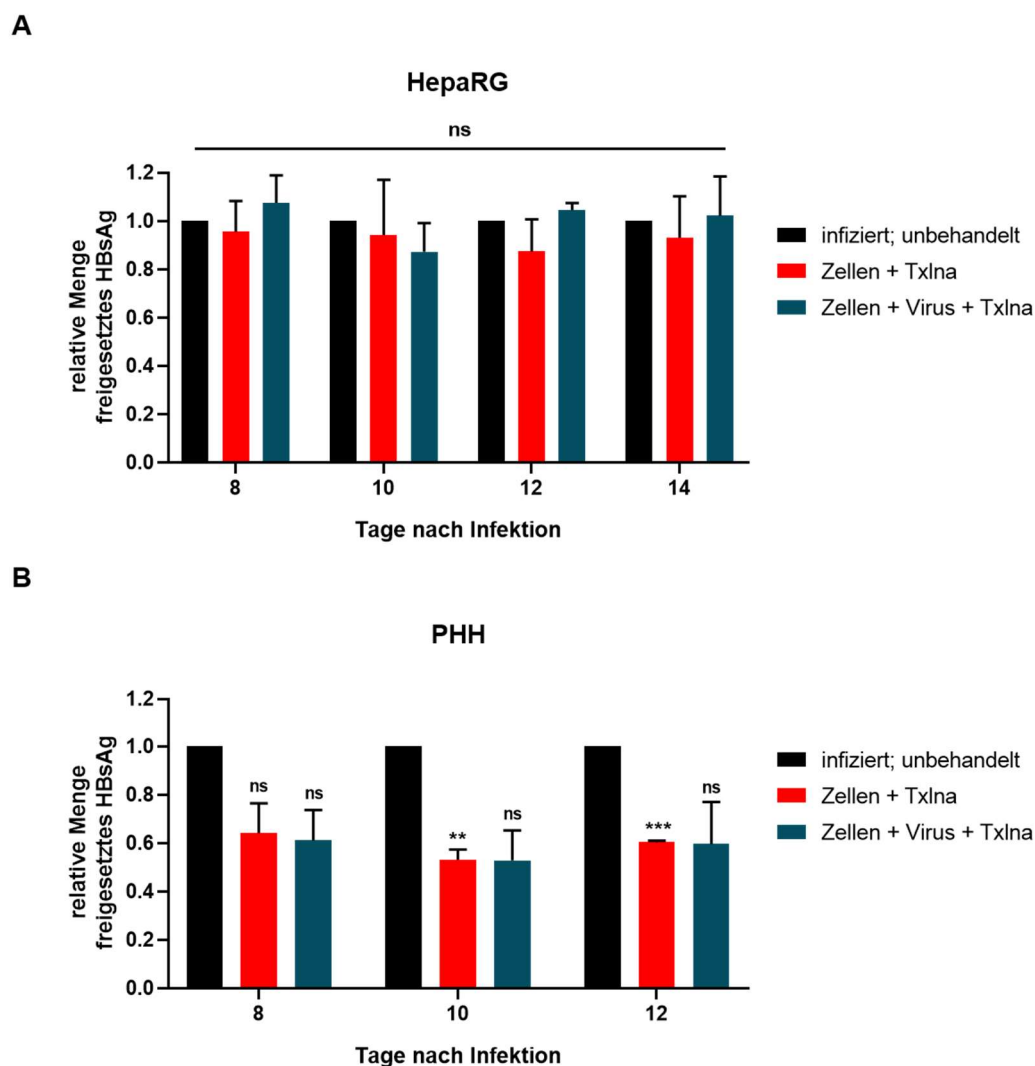


Abbildung 28: Die HBV-Infektion von PHH, nicht aber die von HepaRG-Zellen, kann durch eine Vorinkubation der Zellen mit gereinigtem α -Taxilin vermindert werden.

HepaRG-Zellen (**A**) oder PHH (**B**) wurden zwei Stunden vor Infektion mit 500 nM TxIna-Protein inkubiert und anschließend mit unbehandeltem oder ebenfalls analog zu den Zellen präinkubiertem HBV (~ MOI 1) für 16 Stunden inokuliert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt und die infektiösen Überstände wurden schließlich mittels HBsAg-spezifischem ELISA analysiert. (**A**) Quantifizierung drei unabhängiger Experimente. Der Graph zeigt relative, auf den Experiment-spezifischen *Cut off*-Wert sowie die unbehandelte Kontrolle normierte Werte. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. (**B**) Quantifizierung zwei technischer Replikate. Der Graph zeigt relative, auf den Experiment-spezifischen *Cut off*-Wert sowie die unbehandelte Kontrolle normierte Werte. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. ns $p > 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

5.9 Herstellung und Charakterisierung stabiler monoklonaler HepaRG-TXLNA-*Knockout*-Zellen

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus sowohl durch Txlna-spezifische Antikörper als auch durch freies Txlna-Protein signifikant inhibiert werden kann. Dies deutet darauf hin, dass α -Taxilin wesentlich in den *Entry*-Prozess des Hepatitis-B-Virus involviert ist. Weiterhin sollte nun untersucht werden, wie sich eine Modulation der Txlna-Proteinmenge auf die Suszeptibilität von HepaRG-Zellen für eine HBV-Infektion auswirkt. Zunächst sollte überprüft werden, ob HepaRG-Zellen, die kein Txlna-Protein bilden, nach wie vor mit HBV infiziert werden können. Dafür wurden unter Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems HepaRG-Zellen generiert, welche einen stabilen *Knockout* des TXLNA-Gens aufweisen. Um einen solchen TXLNA-*Knockout* in HepaRG-Zellen zu erzeugen, wurden diese mit Plasmiden transfiziert, welche für die DNA-Endonuklease Cas9 sowie für eine spezifische sgRNA, welche komplementär zu einem bestimmten Bereich im TXLNA-Gen ist, kodieren. Mit Hilfe der TXLNA-spezifischen sgRNA kann die Endonuklease Cas9 spezifisch das TXLNA-Gen aus der genomischen DNA der Zellen entfernen. Als Kontrolle wurden HepaRG-Zellen mit Plasmiden transfiziert, welche für eine sgRNA kodieren, die zu keinem Bereich der humanen genomischen DNA komplementär ist und somit keinen Gen-*Knockout* induziert.

Nach erfolgreicher Selektion der mit CRISPR-Plasmiden transfizierten HepaRG-Zellen und Bestimmung der *Genome Targeting*-Effizienz der verwendeten TXLNA-spezifischen sgRNAs wurden die Zellklone mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Western Blot hinsichtlich der Txlna-Proteinmenge untersucht. Dabei zeigt sich, dass alle HepaRG-*off target*-Zellen Txlna exprimieren und damit als Kontrollzellen fungieren können (Abb. 29). Durch die Analyse einer Vielzahl potentieller TXLNA-*Knockout*-Zellen mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnten fünf Zellklone ermittelt werden, welche im Vergleich zu den anderen Klonen kein (T1K6) bzw. deutlich weniger (T2K2, T3K6, T6K1, T8K4) Txlna-Protein bilden (Abb. 29 A). Mittels Western Blot Analyse konnten anschließend zwei HepaRG-Zellklone mit TXLNA-*Knockout* (T1K6 und T3K6) und ein HepaRG-Zellklon mit stark verminderter Txlna-Proteinmenge (TXLNA-*Knockdown*) (T6K1) identifiziert werden (Abb. 29 B).

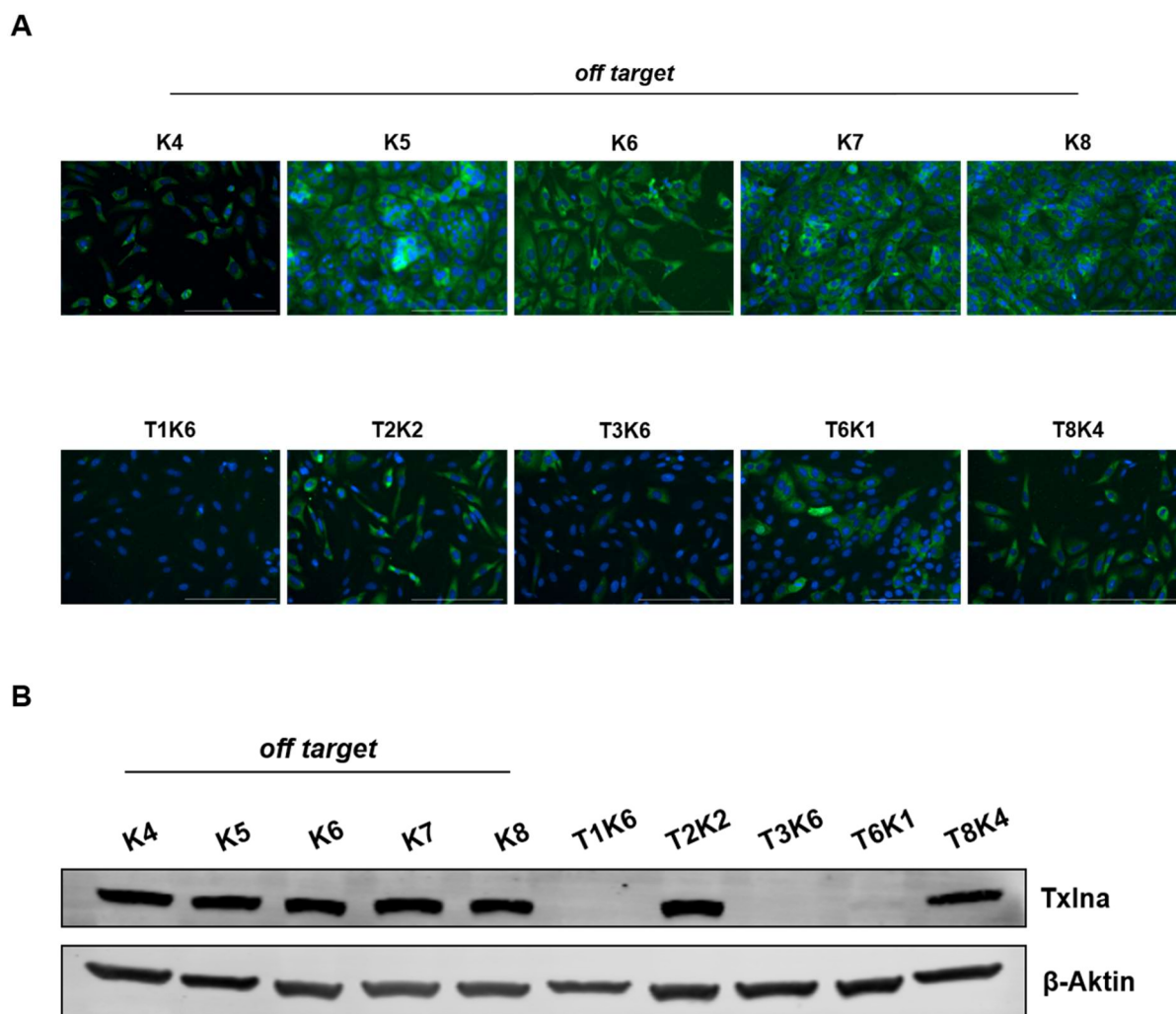


Abbildung 29: CRISPR/Cas9-vermittelter α -Taxilin-Gen-Knockout in HepaRG-Zellen.

Mit CRISPR-Plasmiden transfizierte HepaRG-Zellen wurden nach Selektion und Bestimmung der *Genome Targeting*-Effizienz hinsichtlich der Txlna-Proteinexpression untersucht. **(A)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CRISPR-HepaRG-Zellen. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde unter Verwendung eines Txlna-spezifischen Antikörpers (*grün*) durchgeführt, Zellkerne (*blau*) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstabalken = 200 μ m. **(B)** Repräsentativer Western Blot. CRISPR-HepaRG-Zellen wurden lysiert und hinsichtlich der Expression von Txlna untersucht.

5.9.1 HepaRG-TXLNA-Knockout-Zellen können nicht mit HBV infiziert werden

Die mittels CRISPR/Cas9-System hergestellten HepaRG-TXLNA-Knockout-Zellen sollten nun hinsichtlich ihrer Suszeptibilität für eine HBV-Infektion untersucht werden. Für diese Experimente wurden die mittels Western Blot identifizierte TXLNA-Knockout-Klone T1K6 und T3K6 sowie der TXLNA-Knockdown-Klon T6K1 verwendet, als Kontrolle dienten HepaRG-*off target*-Zellen und wildtypische HepaRG-Zellen. Die Zellen wurden für zwei Wochen kultiviert und für zwei Wochen differenziert und anschließend mit HBV infiziert.

Nach Infektion der CRISPR-HepaRG-Zellen zeigt sich, dass die beiden TXLNA-*Knockout*-Klone T1K6 und T3K6 keine HBV-Infektion etablieren, mittels ELISA konnte kein freigesetztes HBsAg in den Zellkulturüberständen detektiert werden (Abb. 30). Dahingegen konnte der HepaRG-Zellklon mit TXLNA-*Knockdown* (T6K1) mit HBV infiziert werden, die etablierte Infektion verläuft aber im Vergleich zu wildtypischen HepaRG-Zellen deutlich weniger effizient (Abb. 30 A). Unerwarteterweise konnte allerdings auch in den Zellkulturüberständen infizierter *off target*-Zellen kein sezerniertes HBsAg nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass auch die korrespondierenden CRISPR-Kontrollzellen, im Gegensatz zu wildtypischen HepaRG-Zellen, nicht mehr für eine HBV-Infektion suszeptibel sind (Abb. 30).

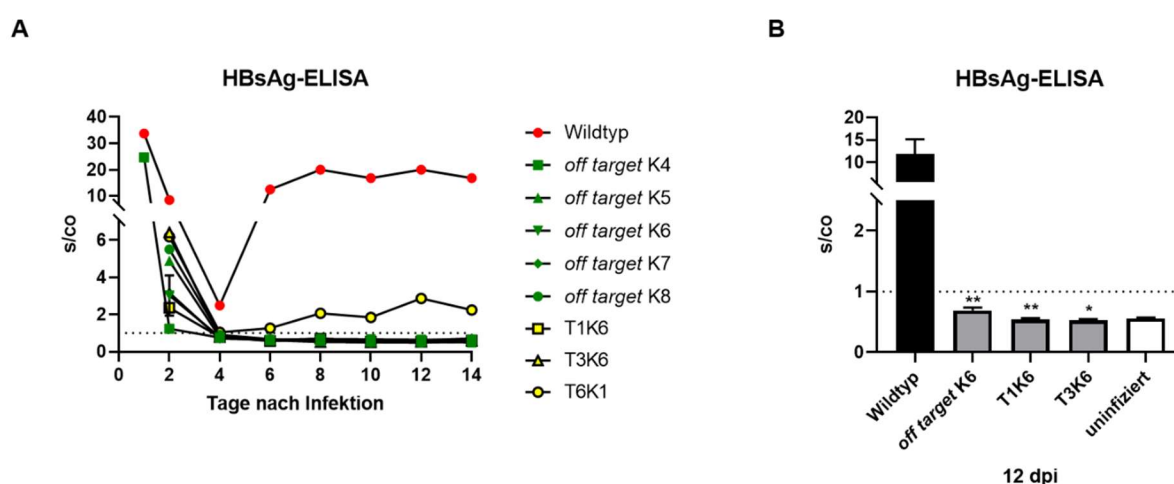


Abbildung 30: Sowohl TXLNA-*Knockout*-Zellen als auch *off target*-Kontrollzellen können nicht mehr mit HBV infiziert werden.

Wildtypische HepaRG-Zellen und CRISPR-HepaRG-Zellen wurden für zwei Wochen differenziert und anschließend mit HBV (~ MOI 10) für 16 Stunden inokuliert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt, die Zellkulturüberstände wurden mittels HBsAg-spezifischem ELISA analysiert. **(A)** Repräsentativer Infektionsverlauf. Die gepunktete Linie markiert den s/co-Wert von 1. **(B)** Quantifizierung vier unabhängiger Experimente. Der Graph zeigt auf den Experiment-spezifischen *Cut off*-Wert normierte Werte. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die gepunktete Linie markiert den s/co-Wert von 1. s/co < 1 HBsAg-negativ; s/co \geq 1 HBsAg-positiv.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Um zu überprüfen, ob der Verlust der Suszeptibilität der TXLNA-*Knockout*-Zellen sowie der korrespondierenden *off target*-Zellen für eine HBV-Infektion etwa durch fehlende Differenzierung der Zellen hervorgerufen wird, wurden diese für zwei Wochen differenziert, anschließend fixiert und mittels CLSM hinsichtlich der Expression von NTCP analysiert.

Die CRISPR-Kontrollzellen *off target*-K5, *off target*-K6 und *off target*-K7 exprimieren alle Txlna, wobei sowohl *off target*-K5-Zellen als auch *off target*-K7-Zellen eine gegenüber

off target-K6-Zellen verminderte Menge Txlna aufweisen (Abb. 31). Darüber hinaus liegt Txlna in HepaRG-*off target*-Zellen überwiegend zytoplasmatisch verteilt vor, eine Lokalisation an der Plasmamembran, wie sie in differenzierten Wildtyp-HepaRG-Zellen zu beobachten ist (Abb. 17 A), kann hier höchstens ansatzweise beobachtet werden. Weiterhin fällt auf, dass in den *off target*-Kontrollzellen NTCP nicht nur in deutlich verminderter Menge exprimiert wird, sondern auch nur sehr vereinzelt im Bereich der Plasmamembran lokalisiert ist (Abb. 31).

In den beiden TXLNA-*Knockout*-Klonen T1K6 und T3K6 kann auch mittels CLSM kein Txlna detektiert werden und auch NTCP ist nur in erheblich verminderten Mengen nachweisbar (Abb. 31). Überdies weisen T1K6- bzw. T3K6-Zellen eine im Vergleich zu wildtypischen HepaRG-Zellen veränderte subzelluläre Distribution von NTCP auf, da NTCP hauptsächlich im Zytoplasma der TXLNA-*Knockout*-Zellen vorliegt und nur äußerst selten an der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 31). Ein anderes Bild ergibt sich bei der CLSM-Analyse von T6K1-Zellen, welche laut Western Blot Analyse (Abb. 29 B) einen TXLNA-*Knockdown* aufweisen. In diesen Zellen kann Txlna in vergleichbaren Mengen wie in *off target*-K6-Zellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus exprimieren diese Zellen im Vergleich zu allen anderen CRISPR-HepaRG-Zellen merklich höhere Mengen an NTCP, welches außerdem deutlich stärker an der Plasmamembran lokalisiert ist (Abb. 31).

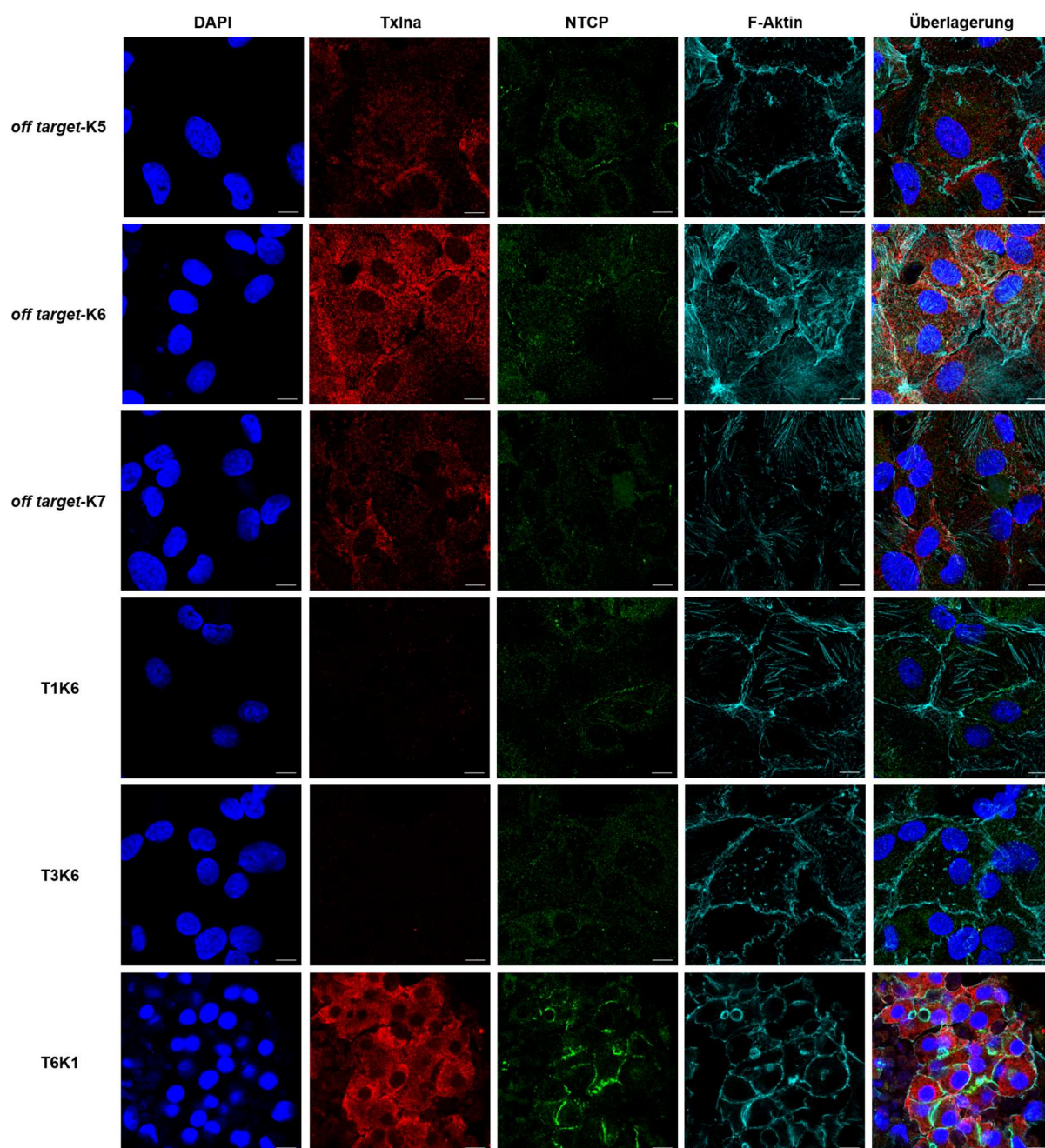


Abbildung 31: Deutlich verminderte NTCP-Expression und veränderte NTCP-Lokalisation in HepaRG-*off target*-Zellen und HepaRG-TXLNA-Knockout-Zellen.

CLSM-Aufnahmen von CRISPR-HepaRG-Zellen. Die Zellen wurden für zwei Wochen differenziert und anschließend fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Txlna (*rot*) und NTCP (*grün*) durchgeführt. F-Aktin (*türkis*) wurde mittels Phalloidin visualisiert, Zellkerne (*blau*) wurden mit DAPI angefärbt. Maßstab Balken = 10 μ m.

5.10 Signifikant höhere Anzahl infizierter Zellen durch zusätzliche Überexpression von α -Taxilin in HepG2-hNTCP-Zellen

Eine konstitutive Expression des HBV-*bona fide*-Rezeptors NTCP in Hepatomzellen, die basal keine Suszeptibilität für eine HBV-Infektion zeigen, führt lediglich zu einer partiellen Permissivität dieser Zellen für das Hepatitis-B-Virus. Nur etwa 5 bis 10 % NTCP-überexprimierender HepG2-Zellen sind tatsächlich suszeptibel für eine HBV-Infektion [139], konstitutiv NTCP exprimierende Huh7-Zellen weisen sogar eine noch geringere Suszeptibilität auf [140]. Dies indiziert, dass es neben NTCP weiterer Faktoren und/oder Co-Rezeptoren für eine HBV-Infektion bedarf.

Um zu untersuchen, ob Txlna die Suszeptibilität konstitutiv NTCP exprimierender HepG2-Zellen für eine HBV-Infektion erhöhen kann, wurden stabil humanes NTCP exprimierende HepG2-Zellen (HepG2-hNTCP-Zellen) mit einem Expressionskonstrukt transfiziert, welches für humanes, mCherry-markiertes Txlna kodiert, und 48 Stunden nach Transfektion infiziert. Vier und sechs Tage nach Infektion wurden die Zellen hinsichtlich der Expression von HBcAg durchflusszytometrisch analysiert, um effizient mit HBV infizierte Zellen zu quantifizieren. HepG2-hNTCP-Zellen, welche mit dem Leervektor pUC18 transfiziert wurden, dienten als Kontrolle. Eine parallel durchgeführte durchflusszytometrische Analyse der HepG2-hNTCP-Zellen ergab zudem, dass zum Zeitpunkt der Infektion stets nahezu die Gesamtheit der Zellen NTCP exprimiert (Abb. 32).

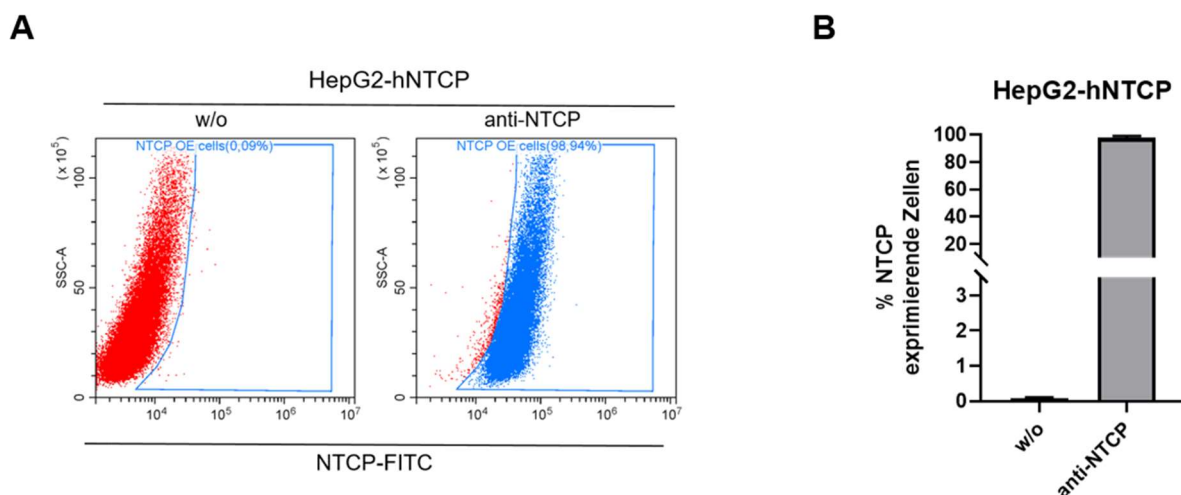


Abbildung 32: Annähernd alle HepG2-hNTCP-Zellen exprimieren NTCP.

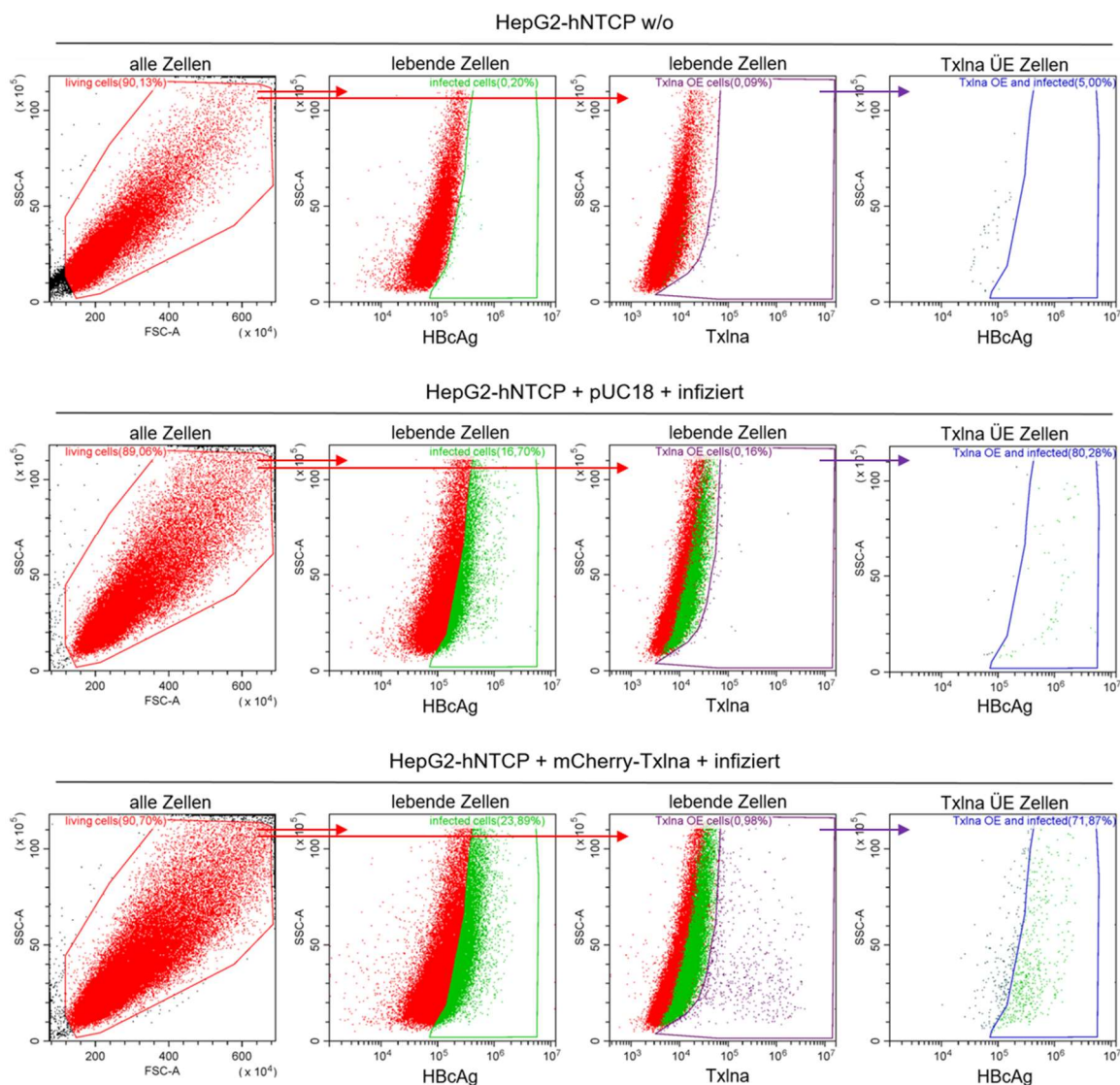
HepG2-hNTCP-Zellen wurden fixiert, mit einem FITC-konjugierten NTCP-spezifischen Antikörper inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (w/o). **(A)** Repräsentativer FACS-Graph. **(B)** Quantifizierung drei unabhängiger Experimente. Der Graph zeigt relative, auf die Gesamtheit lebender Zellen normierte Werte. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. SSC = *side scatter*.

Die durchflusszytometrische Untersuchung von HepG2-hNTCP-Zellen, welche ausschließlich NTCP überexprimieren, zeigt, dass vier Tage nach Infektion durchschnittlich etwa 27 % dieser Zellen HBcAg-positiv sind und somit erfolgreich infiziert wurden (Abb. 33). Dahingegen können in der Population von HepG2-hNTCP-Zellen, welche neben NTCP zusätzlich mCherry-markiertes Txlna exprimieren, etwa 77 % infizierte Zellen detektiert werden, was einem signifikanten Anstieg der Anzahl infizierter Zellen um etwa das Dreifache entspricht (Abb. 33). Auch sechs Tage nach Infektion weist die Population mCherry-Txlna exprimierender HepG2-hNTCP-Zellen signifikant höhere Mengen mit HBV infizierter Zellen im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrollzellen auf. So sind zu diesem Zeitpunkt nach Infektion knapp 82 % der Zellen, die NTCP und Txlna überexprimieren, infiziert. Zellen, die lediglich NTCP überexprimieren, weisen hingegen mit ungefähr 13 % HBcAg-positiver Zellen eine deutlich geringere Anzahl infizierter Zellen auf (Abb. 33).

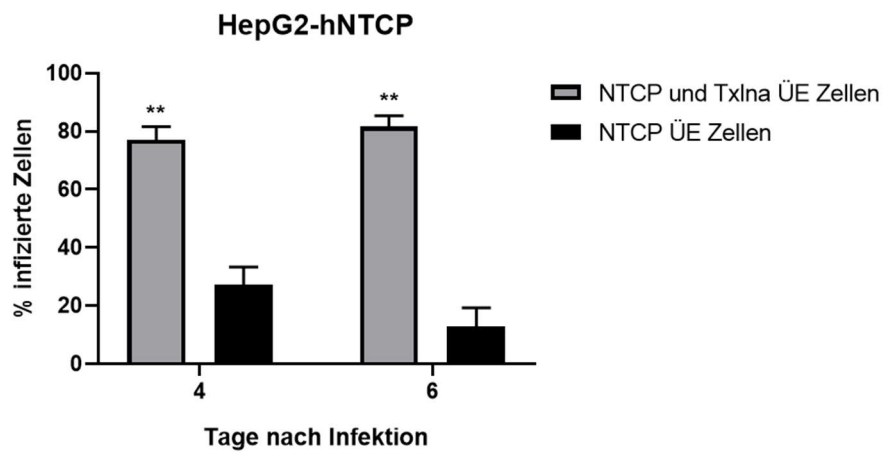
Um zu überprüfen, ob die durch Überexpression von Txlna vermittelte verbesserte Suszeptibilität der Zellen tatsächlich durch eine Involvierung α -Taxilins in den HBV-Entry-Prozess hervorgerufen wird, oder, ob eine Txlna-Überexpression ein vermehrtes *Trafficking* von NTCP an die Zelloberfläche bedingt, was letztlich ebenfalls zu einer gesteigerten Suszeptibilität führen könnte, wurde die Menge an auf der Zelloberfläche exponiertem NTCP in Zellen, welche Txlna überexprimieren, analysiert und mit Kontrollzellen verglichen. Dafür wurden HepG2-hNTCP-Zellen mit dem mCherry-Txlna-Expressionskonstrukt transfiziert, 48 Stunden nach Transfektion fixiert und in unpermeabilisiertem Zustand mit einem NTCP-spezifischen Antikörper inkubiert. Mit HepG2-hNTCP-Zellen, die zur Kontrolle mit dem Leervektor pUC18 transfiziert wurden, wurde analog verfahren. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Die erhobenen Daten zeigen, dass bei etwa 86 % der unbehandelten HepG2-hNTCP-Zellen sowie ebenfalls bei etwa 86 % der pUC18-transfizierten Kontrollzellen NTCP auf der Zelloberfläche detektiert werden kann, welches demnach als Rezeptor bei einer HBV-Infektion zur Verfügung steht (Abb. 34). In etwa 83 % der HepG2-hNTCP-Zellen, welche mCherry-markiertes Txlna exprimieren, lokalisiert NTCP an der Zelloberfläche, was eine leichte Reduktion verglichen mit den Kontrollzellen darstellt, die jedoch statistisch nicht signifikant ist (Abb. 34). Folglich deuten die Daten daraufhin, dass die erhöhte Suszeptibilität von HepG2-hNTCP-Zellen in Folge einer Txlna-Überexpression durch eine Beteiligung α -Taxilins am HBV-Entry-Prozess und nicht durch eine verstärkte Lokalisation von NTCP an der Zelloberfläche zustande kommt.

A



B



◀ **Abbildung 33: Eine zusätzliche Überexpression von α -Taxilin resultiert in signifikant erhöhten Mengen infizierter HepG2-hNTCP-Zellen.**

HepG2-hNTCP-Zellen wurden mit einem für mCherry-markiertes Txlna kodierenden Expressionskonstrukt oder dem Kontrollvektor pUC18 transfiziert und 48 Stunden nach Transfektion mit HBV (MOI 100) für 20 Stunden inokuliert. Vier und sechs Tage nach Infektion wurden die Zellen fixiert, die FACS-Färbung wurde unter Verwendung eines HBcAg-spezifischen Antikörpers durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch hinsichtlich der Expression von mCherry-Txlna und HBcAg untersucht. **(A)** Repräsentative FACS-Graphen untransfizierter, uninfizierter Zellen (oben), pUC18-transfizierter Kontrollzellen (mitte) und mCherry-Txlna-transfizierter Zellen (unten) vier Tage nach Infektion. In allen Proben wurden stets ausschließlich die lebenden Zellen (*rot*) analysiert. Infizierte Zellen sind grün dargestellt, mCherry-Txlna exprimierende lila. Der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellen in Bezug auf die Gesamtheit lebender Zellen ist in den entsprechenden Graphen ebenfalls in grün bzw. lila angegeben. Der prozentuale Anteil infizierter Zellen in Bezug auf die Gesamtheit mCherry-Txlna exprimierender Zellen ist in dem entsprechend gekennzeichneten Graph in blau dargestellt. **(B)** Quantifizierung drei unabhängiger Experimente. Der Graph zeigt relative, auf mCherry-Txlna und NTCP überexprimierende bzw. NTCP überexprimierende Zellen normierte Werte. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. ** $p \leq 0,01$; SSC = *side scatter*, FSC = *forward scatter*, ÜE = überexprimierend.

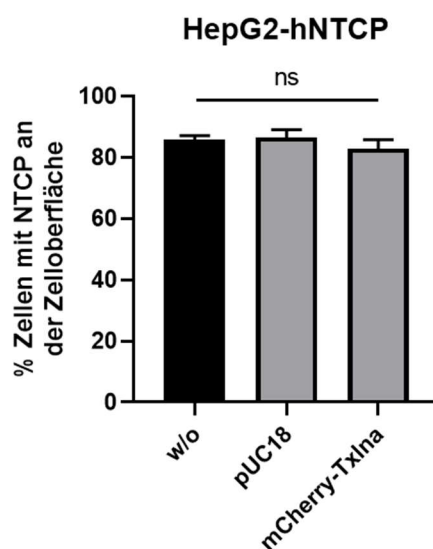


Abbildung 34: Keine Unterschiede bezüglich der Lokalisation von NTCP an der Zelloberfläche in α -Taxilin überexprimierenden HepG2-hNTCP-Zellen.

Quantifizierung drei unabhängiger Experimente. HepG2-hNTCP-Zellen wurden mit einem für mCherry-Txlna kodierenden Expressionskonstrukt oder pUC18 transfiziert und 48 Stunden nach Transfektion fixiert. Die FACS-Färbung wurde mit unpermeabilisierten Zellen unter Verwendung eines NTCP-spezifischen Antikörpers durchgeführt, die Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Der Graph zeigt relative, auf die Gesamtheit lebender Zellen (w/o, pUC18) oder die Gesamtheit mCherry-Txlna exprimierender Zellen normierte Werte. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. ns $p > 0,05$

6. Diskussion

Die Identifizierung von NTCP als funktionellen HBV-Rezeptor ist von elementarer Bedeutung für das Verständnis des HBV-Entry-Prozesses. Neben neuartigen Therapieansätzen, welche die Inhibition der Interaktion zwischen HBV und NTCP anstreben, konnten auch neue *in vitro* Infektionssysteme entwickelt werden, welche die Erforschung des viralen Zelleintritts mit besonderem Fokus auf die Identifizierung und Testung neuer antiviraler Substanzen – insbesondere *Entry*-Inhibitoren – erleichtern. Allerdings gibt es einige ungewöhnliche Aspekte hinsichtlich NTCP als HBV-Rezeptor [150,151], die darauf hinweisen, dass NTCP nicht der alleinige Rezeptor, sondern vielmehr Bestandteil eines Rezeptorkomplexes ist. So weisen stabil humanes NTCP-exprimierende Zellen eine nur geringe Suszeptibilität für eine HBV-Infektion auf, welche zudem stark von der Zelllinie abhängt, in der NTCP ektopisch exprimiert wird [139,140,152]. Weiterhin ergab eine Studie, dass Menschen mit einem homozygoten genetischen Polymorphismus im NTCP-Gen – eine Mutation, die *in vitro* den Verlust der HBV-Rezeptorfunktion von NTCP zur Folge hat [155] – dennoch mit HBV infiziert sein können [151,156,157]. Daraus erschließt sich die Existenz bisher unbekannter Co-Rezeptoren, deren Identifizierung für das umfassende Verständnis des HBV-Zelleintritts essentiell ist. Als potentiell für den HBV-Entry-Prozess relevantes Protein konnte α -Taxilin (Txlna) identifiziert werden. Vorausgegangene Untersuchungen belegen, dass Txlna Spezies-spezifisch an die PreS1PreS2-Domäne des großen viralen Oberflächenproteins bindet [226]. So interagiert Txlna mit einem die PreS1PreS2-Domäne umfassenden Peptid des humanen Hepatitis-B-Virus (HBV), nicht jedoch mit der PreS-Domäne des Enten-Hepatitis-B-Virus (DHBV). Weiterhin konnte eine direkte Interaktion von Txlna mit einem die Aminosäuren 2–47 der PreS1-Domäne umfassenden Peptid von HBV beobachtet werden, mit einem homologen Peptid des Waldmurmeltier-Hepatitis-Virus (WHV) interagiert Txlna nicht [226]. Darüber hinaus konnte das ehemals als potentieller HBV-Rezeptor und *Entry*-relevanter Faktor beschriebene Protein Annexin A5 (AnxV) als direkter Interaktionspartner von Txlna identifiziert werden [227]. Basierend auf diesen Beobachtungen sollte im Rahmen dieser Arbeit die Relevanz von Txlna für den HBV-Entry-Prozess umfassend untersucht werden.

Um die Aminosäuren (AS) der PreS1PreS2-Domäne zu identifizieren, an welche Txlna spezifisch bindet, wurde ein PreS-Peptid-Microarray verwendet. Txlna bindet spezifisch an fünf verschiedene Bereiche in der PreS1PreS2-Aminosäuresequenz (Abb. 13). Dabei fällt auf, dass Txlna mit der Rezeptorbindedomäne (AS 2–48) interagiert und sowohl an die essentielle Region der RBD (AS 9–15) als auch an den carboxyterminalen Bereich der zweiten akzessorischen Region (AS 39–48) bindet (Abb. 13). Die Interaktion von Txlna mit der viralen RBD deutet sehr auf eine funktionelle Beteiligung von Txlna am HBV-Entry-Prozess hin. Weiterhin konnten mit diesem Ansatz drei weitere Regionen der PreS1PreS2-Domäne

identifiziert werden – eine im C-terminalen Bereich von PreS1 und zwei weitere innerhalb der PreS2-Domäne –, an die Txlna bindet. Interessanterweise bindet Txlna im aminoterminalen Bereich der PreS2-Domäne (AS 114–128) genau an das lineare Epitop, welches auch von monoklonalen PreS2-spezifischen Antikörpern der Gruppe I erkannt wird [237,238] und dem eine Rolle bei der Anlagerung (*Attachment*) des Hepatitis-B-Virus an die Hepatozyten-Plasmamembran zugeschrieben wird [239,240]. Darüber hinaus interagiert Txlna auch mit einem Bereich der PreS2-Domäne (AS 114–128), welcher mit dem Epitop PreS2-spezifischer Antikörper überlappt, die zumindest im Schimpansen Virus-neutralisierende Eigenschaften zeigten [241]. Dies unterstreicht weiterhin die potentielle Beteiligung von Txlna während des HBV-Infektionsprozesses.

Interaktionsstudien ergaben eine für die Bindung von PreS an Txlna spezifische Dissoziationskonstante K_d von $8,5 \times 10^{-7}$ M (Abb. 14), was auf eine moderate Affinität dieser Interaktion schließen lässt, wie sie bei den meisten Protein-Protein-Interaktionen vorliegt. Für die Bindung zwischen Myrcludex B, einem myristoylierten, die AS 2–48 der PreS1-Domäne umfassenden Peptid, an NTCP konnte eine K_d von $6,71 \times 10^{-10}$ M ermittelt werden [242], eine andere Studie konnte für die Bindung von myristoyliertem PreS1 an NTCP eine K_d von $5,56 \times 10^{-9}$ M berechnen [243]. PreS bindet folglich mit höherer Affinität an NTCP als an Txlna, was auf das Vorhandensein eines hoch-affinen Rezeptors (NTCP) und eines nieder-affinen Rezeptors (Txlna) hindeutet. Allerdings ist zu beachten, dass die Kalkulation der K_d der Bindung von Myrcludex B an NTCP durchflusszytometrisch erfolgte und nicht – wie in dieser Arbeit – mittels SPR-Spektroskopie, weshalb ein Vergleich dieser Ergebnisse diffizil ist. Des Weiteren wurden zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten jeweils verschiedene PreS-Derivate verwendet, was einen Vergleich der Konstanten zusätzlich erschwert. Zur besseren Abbildung der physiologischen Interaktion zwischen PreS und Txlna könnten die SPR-spektroskopischen Untersuchungen mit myristoyliertem PreS-Peptid durchgeführt werden.

Anders als NTCP, das hauptsächlich in Leberzellen exprimiert wird, wird Txlna ubiquitär exprimiert. Es konnte aber eine verstärkte Expression von Txlna in Lebergewebe nachgewiesen werden [213]. Im Verlauf der Differenzierung von HepaRG-Zellen, welche zur Suszeptibilität dieser Zellen für eine HBV-Infektion führt, steigt die relative Txlna-Proteinmenge im Gegensatz zu der des *bona fide* Rezeptors NTCP nicht an (Abb. 16). Zwar kann eine Zunahme der relativen Menge Txlna-spezifischer mRNA-Transkripte im Zuge der HepaRG-Differenzierung detektiert werden, diese ist aber nicht annähernd so stark ausgeprägt, wie der Anstieg NTCP-spezifischer Transkripte (Abb. 15). Mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie (CLSM) konnte aber eine drastische Änderung der subzellulären Distribution von Txlna in suszeptiblen Zellen im Vergleich zu nicht suszeptiblen nachgewiesen werden. Es konnte beobachtet werden, dass Txlna in HBV-infizierbaren Zellen

an der Plasmamembran lokalisiert ist, wo es zudem mit NTCP colokalisiert (Abb. 17, Abb. 20, Abb. 21). Dabei konnten sowohl für TxIna als auch für NTCP im Bereich der Plasmamembran differenzierter primärer humaner Hepatozyten (PHH) sehr hohe WCC-Werte ermittelt werden, die ein hohes Maß an Colokalisation indizieren (Abb. 21). Demnach befinden sich TxIna und NTCP in suszeptiblen Zellen in enger räumlicher Nähe, was auf ein potentielles Wechselspiel dieser beiden Proteine – als Teil des HBV-Rezeptorkomplexes – hindeutet. Eine direkte Interaktion zwischen NTCP und TxIna konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 23), ist aber auch zwischen Proteinen innerhalb eines Rezeptorkomplexes nicht zwingend nötig. Des Weiteren konnte TxIna sowohl mikroskopisch als auch biochemisch an der Oberfläche HBV-suszeptibler Zellen detektiert werden (Abb. 22), wodurch die Grundvoraussetzung der Oberflächenexposition als Rezeptor erfüllt ist.

Da TxIna weder eine klassische Signal-Peptidsequenz noch eine Transmembrandomäne besitzt [213], stellt sich die Frage, wie TxIna an die Zelloberfläche gelangt und dort an der Plasmamembran verankert wird. Eine Möglichkeit bestünde in der Verankerung von posttranslational myristoyliertem TxIna mit Hilfe der Myristyl-Gruppe. Eine Studie konnte zehn potentielle Myristoylierungsseiten in der TxIna-Sequenz vorhersagen, experimentelle Evidenz einer Myristoylierung α -Taxilins gibt es allerdings nicht [213]. Eine weitere Möglichkeit der Immobilisierung α -Taxilins an der Zelloberfläche besteht über eine Interaktion mit einem Protein, was sowohl an TxIna als auch an die extrazelluläre Seite der Plasmamembran bindet. Eine solche Rolle nimmt wahrscheinlich das Protein Annexin A5 (AnxV) ein, welches in früheren Studien als für den HBV-Entry relevanter Faktor und potentieller HBV-Rezeptor diskutiert wurde [206–211] und in vorherigen Untersuchungen affinitätschromatographisch und massenspektrometrisch als direkter Interaktionspartner von TxIna identifiziert werden konnte [227]. Eine direkte Interaktion zwischen TxIna und AnxV konnte weiterhin im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 23). Darüber hinaus konnte auch für AnxV eine Suszeptibilitäts-abhängige Lokalisation an der Plasmamembran detektiert werden (Abb. 18). Für die Verankerung von TxIna an der Plasmamembran über eine Bindung mit AnxV spricht weiterhin, dass diese beiden Proteine an besagtem Kompartiment in HBV-suszeptiblen Zellen colokalisieren (Abb. 19). Es ist bekannt, dass AnxV an der Zelloberfläche lokalisiert und dort Ca^{2+} -abhängig an Phospholipide, insbesondere an Phosphatidylserin, der Plasmamembran bindet [200,202]. Weiterhin konnten diverse Studien die Assemblierung von AnxV zu zweidimensionalen Netz-Strukturen beobachten, welche nicht nur in membrandynamische Prozesse involviert sind, sondern auch als eine Art Membranplattform zur Rekrutierung weiterer Proteine fungieren können [201,202]. Auf diese Weise könnte AnxV TxIna an der Zelloberfläche fixieren. Die Bindung von AnxV an die Plasmamembran erfolgt über an der C-terminalen Kerndomäne gebundene Calcium-Ionen (Abb. 10), der N-Terminus von AnxV dient der Interaktion mit anderen Proteinen [200,203,204]. Tatsächlich konnte unter

Verwendung eines AnxV-spezifischen Peptid-Microarrays eine Bindung von Txlna an den N-Terminus von AnxV detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurde auch eine Bindung von Txlna an AnxV im Bereich der Aminosäuren 159–167 beobachtet (Daten nicht gezeigt), welche sich in der Tertiärstruktur als *Loop* neben dem N-Terminus befinden (Abb. 10). Allerdings ist zu beachten, dass mit dem Peptid-Microarray lediglich lineare Epitope erkannt werden können, sodass es weiterer Experimente zur genauen Identifikation der Txlna-Bindestelle von Annexin A5 bedarf.

Neben der Funktion als Verankerungs-Plattform für Txlna könnte AnxV auch die Internalisierung des Virus vermitteln. So wurde ein endozytotischer Prozess beschrieben, welcher durch Phosphatidylserin-AnxV-Strukturen induziert wird [244]. Dabei wird die Plasmamembran nanomechanisch durch zweidimensional polymerisiertes AnxV so gebogen, dass es zur Abschnürung und Internalisierung endozytotischer Vesikel kommt [244]. Um diese Hypothese zu überprüfen, bedarf es allerdings weiterer, detaillierter Untersuchungen mit besonderem Fokus auf frühe *Post-Entry*-Schritte. Gegen die AnxV-vermittelte Endozytose spricht allerdings eine kürzlich publizierte Studie, die den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) als HBV-*Entry*-relevanten Faktor identifiziert hat, welcher durch eine direkte Interaktion mit NTCP die Internalisierung der Virionen vermittelt [245,246].

Um zu untersuchen, ob Txlna funktionell in den *Entry*-Prozess des Hepatitis-B-Virus involviert ist, wurde versucht, die HBV-Infektion mittels Txlna-spezifischer Antikörper zu inhibieren. Dafür wurden suszeptible Zellen vor und während der Infektion mit Txlna-spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Inkubation mit Txlna-spezifischen Antikörpern führt sowohl in HepaRG-Zellen als auch in PHH zu einer signifikant verminderten Infektion (Abb. 26). In beiden Infektionssystemen kann die HBV-Infektionseffizienz signifikant um etwa die Hälfte reduziert werden, wenn die Zellen mit einem Txlna-spezifischen Antikörper inkubiert werden, wobei sich die beiden verwendeten Txlna-spezifischen Antikörper hinsichtlich des Potentials, die Infektion zu vermindern, unterscheiden. Die Infektion von HepaRG-Zellen kann durchschnittlich effektiver durch den monoklonalen Txlna-spezifischen Antikörper (E2) reduziert werden, eine Inkubation mit dem polyklonalen Txlna-spezifischen Antikörper (HPA045383) führt aber ebenfalls zur signifikanten Verminderung der Infektion (Abb. 26). In PHH verhält sich das Inhibitions-Potential der verwendeten Txlna-spezifischen Antikörper konträr. So vermag der polyklonale Txlna-spezifische Antikörper die Infektion deutlich stärker zu vermindern und wirkt damit in vergleichbarem, inhibitorischem Maß, wie ein NTCP-spezifischer Antikörper (Abb. 26). Beide Antikörper – sowohl der polyklonale Txlna-spezifische als auch der NTCP-spezifische – können die Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus allerdings nicht gänzlich verhindern, was auf die Existenz eines HBV-Rezeptorkomplexes, bestehend

aus mehreren *Entry*-relevanten Komponenten, hinweist. Die Untersuchung des Effekts einer kombinierten Inkubation suszeptibler Zellen gleichzeitig mit TxIna-spezifischem und NTCP-spezifischem Antikörper auf die HBV-Infektion stellt einen interessanten, weiterführenden Ansatz dar.

Die Unterschiede hinsichtlich der Inhibitionseffizienz der beiden verwendeten TxIna-spezifischen Antikörper könnten durch ihre Klonalität bedingt sein. Beide Antikörper binden an den carboxyterminalen Bereich von TxIna. Als monoklonaler Antikörper bindet der TxIna-spezifische Antikörper E2 nur ein einziges Epitop, welches die Aminosäuren 505–511 umfasst (Daten nicht gezeigt). Der polyklonale Antikörper hingegen bindet an diverse Epitope im Bereich der Aminosäuren 478–531. Durch die Inkubation mit dem polyklonalen Antikörper könnte so die Bindestelle, welche für die Interaktion von TxIna mit PreS von Bedeutung ist, verstärkt okkupiert sein, was in einer effizienteren Hemmung der Infektion resultiert. Weiterhin deuten diese Ergebnisse auf eine essentielle Rolle des C-Terminus von TxIna für die Bindung der viralen RBD hin. Warum allerdings der monoklonale TxIna-spezifische Antikörper die HBV-Infektion von HepaRG-Zellen effizienter zu mindern vermag und warum der NTCP-spezifische Antikörper bei der Infektion von HepaRG-Zellen keinerlei inhibitorisches Potential besitzt, bleibt offen. Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse auf eine relevante Beteiligung α -Taxilins am HBV-*Entry*-Prozess hin. Allerdings könnte diese partielle Hemmung der HBV-Infektion nach Inkubation mit TxIna-spezifischen Antikörpern auch schlichtweg durch eine sterische Hinderung der Interaktion von HBV mit NTCP bedingt sein. Um diesen Aspekt zu adressieren, wurden Infektionsexperimente durchgeführt, bei welchen HBV oder die zu infizierenden Zellen mit rekombinantem TxIna-Protein vorinkubiert wurden. Eine Präinkubation von HBV mit rekombinantem TxIna führt dosisabhängig zu einer Hemmung der Infektion (Abb. 27), was die Bindung von TxIna an für den HBV-*Entry*-Prozess relevante Domänen des Virus belegt. Wie mittels Peptid-Microarray ermittelt, bindet TxIna an die virale RBD (Abb. 13). Durch die Bindung von TxIna an HBV wird die RBD maskiert und kann anschließend nicht mehr an Komponenten des Rezeptorkomplexes (u. a. NTCP) binden, was zur Hemmung der Infektion führt. Dafür spricht auch, dass TxIna unter anderem genau in dem Bereich an die virale PreS1-Domäne bindet, an den auch der monoklonale LHBs-spezifische Antikörper MA18/7 bindet (AS 18–25) [105,247], dessen neutralisierende Wirkung bekannt ist und auch in dieser Arbeit demonstriert werden konnte (Abb. 25). Die Tatsache, dass eine Inkubation von HBV mit rekombinantem TxIna nicht zur gänzlichen Inhibition der Infektion führt, könnte mit einer nicht vollständigen Absättigung des Virus erklärt werden. Auch ist die Bindung α -Taxilins an PreS deutlich weniger affin als die Bindung eines Antikörpers, weshalb das inhibitorische Potential α -Taxilins, verglichen mit dem eines neutralisierenden Antikörpers, geringer ausfällt. Weiterhin bindet TxIna neben der viralen RBD auch an andere Bereiche innerhalb der PreS1PreS2-Domäne, sodass teilweise – trotz TxIna-Bindung – die RBD noch für zelluläre

Rezeptoren zugänglich sein könnte. Auch eine Inkubation primärer humaner Hepatozyten mit rekombinantem Txl_{na}-Protein vor der Inkubation führt zu einer signifikanten Verminderung der Infektionseffizienz (Abb. 28). Dieser partiell inhibitorische Effekt könnte durch eine Dimerisierung des rekombinanten α -Taxilins mit Txl_{na}, was auf der Hepatozyten-Oberfläche exponiert ist, zustande kommen. Bedingt durch die Bildung von Txl_{na}-Dimeren könnte die die Interaktion mit HBV vermittelnde Domäne von Txl_{na} nicht mehr zugänglich sein. Mittels Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) konnte zumindest bestätigt werden, dass Txl_{na} durchaus als Dimer oder Oligomer vorliegen kann (Daten nicht gezeigt). Da die HBV-Infektion allerdings durch die Präsenz von NTCP allein möglich ist, kann sie durch die Inhibition des zellulären α -Taxilins lediglich vermindert, jedoch nicht gänzlich verhindert werden. Die kombinierte Präinkubation von Virus und Zellen mit rekombinantem Txl_{na} hatte dahingegen keinen zusätzlichen Effekt (Abb. 28). Auffällig ist zudem, dass lediglich die Inkubation von PHH zu einer signifikanten Hemmung der Infektion führt, eine Inkubation von HepaRG-Zellen hat dahingegen allenfalls eine leichte Verminderung der Infektionseffizienz zur Folge (Abb. 28). HepaRG-Zellen stellen nach Differenzierung ein heterogenes Zellsystem dar, das aus Hepatozyten-artigen und Epithelzell-artigen Zellen besteht [154]. Da nicht nur die Differenzierung in Hepatozyten-artige Zellen, sondern auch deren Polarisierung für die Suszeptibilität für eine HBV-Infektion von essentieller Bedeutung ist [188], kann nur eine bestimmte Subpopulation der heterogenen differenzierten HepaRG-Zellen infiziert werden. Dies könnte den deutlich kleiner ausfallenden Effekt einer Inkubation von HepaRG-Zellen mit rekombinantem Txl_{na} im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten erklären. Die Heterogenität spiegelt sich auch in der Lokalisation von Txl_{na} an der Plasmamembran wider. So können im Vergleich zu PHH grundsätzlich weniger HepaRG-Zellen detektiert werden, die Txl_{na} an der Plasmamembran exponieren. Weiterhin konnte mittels CLSM-Analysen in differenzierten HepaRG-Zellen weniger Txl_{na} an der Plasmamembran detektiert werden als in PHH (Abb. 17, Abb. 18, Abb. 19, Abb. 20). Somit könnte die Wahrscheinlichkeit einer Txl_{na}-Dimerisierung in HepaRG-Zellen schlichtweg deutlich geringer ausfallen als dies für PHH der Fall ist.

Eine weitere Erklärung für den ausbleibenden Effekt einer Vorinkubation differenzierter HepaRG-Zellen mit rekombinantem Txl_{na}-Protein könnte die Präsenz von freiem AnxV an der Zelloberfläche sein, welches nicht mit Txl_{na} assoziiert ist. Dieses würde nach Präinkubation mit rekombinantem Txl_{na} mit selbigem interagieren, wodurch sich zunächst die Menge an Txl_{na} auf der Zelloberfläche erhöhen würde, was dem inhibitorischen Effekt der Txl_{na}-Dimerisierung entgegenwirken würde. Der inhibitorische Effekt der Txl_{na}-Dimerisierung würde durch die die Infektion begünstigende Assoziation des rekombinanten α -Taxilins mit freiem AnxV aufgehoben, sodass netto keine Auswirkung einer Präinkubation der Zellen mit rekombinantem Txl_{na}-Protein auf die HBV-Infektion beobachtet werden kann. Allerdings

konnten mittels CLSM-Analyse im Rahmen dieser Arbeit keine differenzierten HepaRG-Zellen detektiert werden, die AnxV, aber kein Txlna an der Plasmamembran aufweisen. Es bedarf daher weiterer, detaillierterer Untersuchungen der Plasmamembran differenzierter HepaRG-Zellen, um diese Hypothese zu überprüfen.

Um die essentielle Relevanz von Txlna für den HBV-*Entry*-Prozess eindeutig zu klären, wurde untersucht, ob HepaRG-Zellen, die kein Txlna-Protein exprimieren, suszeptibel für eine HBV-Infektion sind. Für diesen Zweck wurden mittels CRISPR/Cas9-System HepaRG-Zelllinien generiert, die einen stabilen TXLNA-Gen-*Knockout* besitzen. Es konnten insgesamt zwei Zelllinien mit TXLNA-*Knockout* und eine Zelllinie mit TXLNA-*Knockdown* generiert werden (Abb. 29). Keine der beiden TXLNA-*Knockout*-Zelllinien (T1K6 und T3K6) konnte mit dem Hepatitis-B-Virus infiziert werden, die Zellen des *Knockdown*-Klons T6K1 wiesen eine stark verminderte Suszeptibilität auf (Abb. 30). Diese Ergebnisse weisen zunächst auf eine essentielle funktionelle Beteiligung α -Taxilins am HBV-*Entry*-Prozess hin. Allerdings ist zu beachten, dass der Verlust der Suszeptibilität der HepaRG-TXLNA-*Knockout*-Zellen nicht imperativ durch das Fehlen α -Taxilins als Teil des Rezeptorkomplexes bedingt sein muss, sondern auch durch den Verlust der Differenzierbarkeit der HepaRG-Zellen zustande kommen kann. So konnten während der Kultivierung und Differenzierung Unterschiede der HepaRG-TXLNA-*Knockout*-Zellen hinsichtlich der Morphologie und des Wachstums im Vergleich zu wildtypischen HepaRG-Zellen beobachtet werden. HepaRG-Zellen mit TXLNA-*Knockout* wachsen im Vergleich zu wildtypischen Zellen nur sehr langsam. Darüber hinaus konnten bei T1K6- und T3K6-Zellen nur vereinzelt für eine Differenzierung typische morphologische Änderungen während des Differenzierungsprozesses beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Txlna könnte folglich auch funktionell in den Differenzierungsprozess der HepaRG-Zellen involviert sein. CLSM-Analysen der HepaRG-TXLNA-*Knockout*-Klone ergaben zudem, dass diese Zellen erheblich geringere Mengen an NTCP aufweisen (Abb. 31), was für eine verminderte Differenzierung spricht. Der Verlust der Suszeptibilität dieser Zellen könnte somit aber auch durch die drastische Reduktion des *bona fide* Rezeptors NTCP verursacht werden. Es ist bekannt, dass Txlna ein in das intrazelluläre *Trafficking* involviertes Protein ist, was insbesondere am Transport von Vesikeln zur Plasmamembran beteiligt ist [213,214,221,223]. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass Txlna mit Mikrotubuli interagiert [222]. So könnte Txlna beispielsweise in den Transport von NTCP zur Plasmamembran eingebunden sein, der folglich nach TXLNA-*Knockout* nicht mehr einwandfrei funktioniert, was eine Reduktion der Plasmamembran-lokalisierten NTCP-Menge zur Folge hätte. Zumindest für Ntcp der Ratte wurde ein Mikrotubuli-basierter Transport zur Plasmamembran beschrieben [248]. Allerdings kann in den HepaRG-TXLNA-*Knockout*-Zellen mittels CLSM keine intrazelluläre Akkumulation von NTCP beobachtet werden, wie sie bei einem dysfunktionalen Transport zur

Plasmamembran bei gleicher Expression des Proteins zu erwarten wäre. Der TXLNA-Gen-*Knockout* könnte sich demnach eher auf die NTCP-Transkription oder die Translation NTCP-spezifischer mRNA auswirken, was die drastisch verminderte NTCP-Proteinmenge zur Folge hat. Evidenz für eine – wenn auch indirekte – Beteiligung α -Taxilins an der Transkription oder der Translation bietet eine Studie, die eine Interaktion von Txlna mit dem *nascent-polypeptide-associated-complex* (NAC) beschreibt [249]. Der NAC besteht aus zwei Untereinheiten (α -NAC und β -NAC), die als Heterodimer an Ribosomen sowie neu gebildete Polypeptide binden [250]. Beiden Untereinheiten alleine wird darüber hinaus eine Rolle als transkriptioneller Co-Aktivatoren zugeschrieben [250,251]. Txlna interagiert mit monomerem α -NAC, was dessen Retention im Zytoplasma bedingt, und damit eine Inhibition der Translokation der α -NAC-Untereinheit in den Zellkern zur Folge hat [249]. Somit fungiert Txlna anscheinend als Repressor des transkriptionellen Co-Aktivatoren α -NAC [249]. Die durch einen TXLNA-*Knockout* ausbleibende Txlna-vermittelte Regulation der Co-Aktivatoren-Funktion von α -NAC kann allerdings die in HepaRG-TXLNA-*Knockout*-Zellen beobachtete verminderte NTCP-Expression nicht erklären. Weiterhin ist die physiologische Bedeutung der Interaktion von Txlna mit dem NAC für die Translation nicht bekannt [249]. Evidenz für einen Zusammenhang zwischen TXLNA-*Knockout* und verminderter NTCP-Proteinmenge – insbesondere an der Plasmamembran – ergibt sich aber aus der Beobachtung, dass in Zellen des mittels Western Blot identifizierten TXLNA-*Knockdown*-Klons T6K1 (Abb. 29), welcher eine verminderte Suszeptibilität zeigte (Abb. 30), mittels CLSM-Analyse NTCP an der Plasmamembran detektiert werden konnte (Abb. 31). Basierend auf eingehenden Untersuchungen dieser Zellen mittels konfokaler Mikroskopie kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass es sich bei den T6K1-Zellen vielmehr um einen Mischklon handelt als um Zellen mit nur noch einem intakten TXLNA-Allel, was zu dem Phänotyp eines *Knockdowns* führen würde. So können mittels CLSM zwei verschiedene Zellpopulationen detektiert werden – eine mit annähernd normaler Txlna-Proteinmenge und eine, die kein Txlna-Protein aufweist – die sich auch hinsichtlich der NTCP-Proteinmenge und -Lokalisation unterscheiden. Die verminderte Infektionseffizienz bei T6K1-Zellen ist demnach wahrscheinlich schlicht durch eine Reduktion der Anzahl der suszeptiblen Zellen begründet und nicht durch die Verminderung der Suszeptibilität selbst.

Zusammengenommen konnte mittels HepaRG-TXLNA-*Knockout*-Zellen die Relevanz von Txlna für den Zelleintritt des Hepatitis-B-Virus nicht evident geklärt werden. Insbesondere die Tatsache, dass auch die korrespondierenden Kontrollzellen (HepaRG-*off target*-Zellen) nicht mit HBV infiziert werden konnten (Abb. 30) und ebenso eine mittels CLSM detektierte, verminderte NTCP-Proteinmenge aufwiesen (Abb. 31), macht diese Ergebnisse nicht verlässlich. Letztlich weisen die Beobachtungen darauf hin, dass bei der Herstellung der HepaRG-TXLNA-*Knockout*-Zellen – bis auf den Klon T6K1 – sowie der korrespondierenden

Kontrollzellen fast ausschließlich die Epithel-artigen Zellen selektioniert wurden, welche ohnehin keine Suszeptibilität für eine HBV-Infektion aufweisen.

Die allgemein anerkannte Grundvoraussetzung für einen funktionellen HBV-Rezeptor ist dessen Eigenschaft, Zellen, die nicht mit HBV infiziert werden können, Suszeptibilität für eine HBV-Infektion zu verleihen. Für den *bona fide* Rezeptor NTCP konnte dies in den Hepatomzelllinien HepG2 und Huh7 demonstriert werden [139,140]. Eine alleinige stabile Überexpression von humanem Txl α in der Hepatomzelllinie Huh7.5 führt nicht zum Erlangen von Suszeptibilität für eine HBV-Infektion (Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass Txl α während des Infektionsprozesses eher eine Rolle innehat, die der von NTCP untergeordnet ist. Allerdings ist anzumerken, dass im Rahmen dieser Arbeit eine Infektion der stabil humanes NTCP exprimierenden Huh7-Zellen (Huh7-hNTCP) – im Gegensatz zu stabil humanes NTCP exprimierenden HepG2-Zellen – ebenfalls nicht erfolgreich war. Obwohl die Überexpression von Txl α allein anscheinend keine HBV-Suszeptibilität vermittelt, wirkt sich eine Überexpression von Txl α in HepG2-hNTCP-Zellen zusätzlich zu NTCP eindeutig förderlich auf die Infizierbarkeit dieser Zellen aus. So können signifikant mehr infizierte Zellen detektiert werden – eine etwa sechsfach höhere Anzahl –, wenn HepG2-hNTCP-Zellen neben NTCP auch Txl α überexprimieren (Abb. 33). Eine potentiell durch die Txl α -Überexpression bedingte verstärkte Lokalisation von NTCP an der Plasmamembran, welche ebenfalls zu einer erhöhten Suszeptibilität der Zellen führen würde, kann dabei ausgeschlossen werden. Die Menge an exponiertem NTCP wird durch die Überexpression von Txl α nicht beeinflusst (Abb. 34). Diese Ergebnisse deuten sehr stark auf eine funktionelle Beteiligung α -Taxilins am HBV-Entry-Prozess hin, während diesem Txl α sehr wahrscheinlich als Co-Rezeptor fungiert. Dennoch konnten auch nach kombinierter NTCP-Txl α -Überexpression in HepG2-Zellen nicht alle Zellen infiziert werden (Abb. 33), was auf die Existenz weiterer Co-Rezeptoren hindeutet.

Ingesamt konnte in dieser Arbeit α -Taxilin als für den Zelleintritt des Hepatitis-B-Virus relevantes Protein identifiziert werden. Biochemische und biophysikalische Untersuchungen konnten nicht nur die in einer vorherigen Studie beschriebene Interaktion zwischen Txl α und PreS1 bestätigen, sondern darüber hinaus eine Bindung von Txl α sowohl an die essentielle als auch an die akzessorische Region der viralen Rezeptorbindedomäne ermitteln. Intensive Untersuchungen der subzellulären Distribution von Txl α haben ergeben, dass sich Txl α unter physiologischen Bedingungen differenzierungsabhängig an der Plasmamembran HBV-susceptibler Zellen befindet, an der es wahrscheinlich durch Annexin A5 verankert wird. Dort lokalisiert Txl α in räumlicher Nähe zu dem *bona fide* HBV-Rezeptor NTCP. Evidenz für eine funktionelle Relevanz α -Taxilins für den Entry-Prozess des Hepatitis-B-Virus liefern Beobachtungen, dass eine HBV-Infektion nicht nur durch Txl α -spezifische Antikörper,

sondern auch durch rekombinantes Txlna-Protein inhibiert werden kann. Nicht zuletzt die Tatsache, dass durch die Überexpression von Txlna in HepG2-hNTCP-Zellen deren Suszeptibilität für eine HBV-Infektion erheblich gesteigert werden konnte, unterstreicht die Bedeutung α -Taxilins für den HBV-Entry-Prozess.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit α -Taxilin als Co-Rezeptor für das Hepatitis-B-Virus identifiziert werden, was maßgeblich zum Verständnis des HBV-Entry-Prozesses und zur Charakterisierung des viralen Lebenszyklus beiträgt.

Eine graphische Darstellung des anhand der Ergebnisse dieser Arbeit erstellten Modells des HBV-Rezeptorkomplexes unter Berücksichtigung des aktuellen Forschungsstandes ist in Abbildung 35 zu sehen.

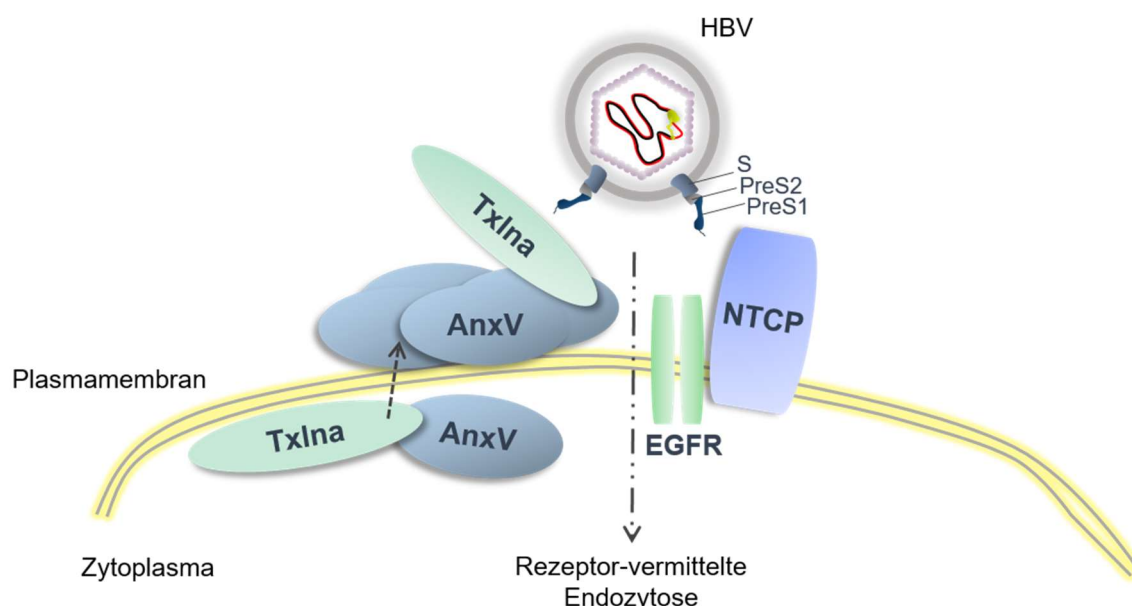


Abbildung 35: Modell des HBV-Rezeptorkomplexes.

In Zellen, die suszeptibel für eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus sind, befindet sich α -Taxilin (Txlna) an der Plasmamembran in räumlicher Nähe zu NTCP exponiert. Da es selbst keine Transmembrandomäne besitzt, könnte es über Annexin A5 (AnxV), welches Ca^{2+} -abhängig an Phospholipide, präferentiell an Phosphatidylserin, bindet, an der extrazellulären Seite der Plasmamembran fixiert werden. Das Hepatitis-B-Virus kann im Zuge einer Infektion nach initialer Anreicherung über Heparansulfat-Proteoglykane an den Co-Rezeptor Txlna und den hoch-affinen Rezeptor NTCP binden, woraufhin das Virus wahrscheinlich über EGFR-vermittelte Endozytose in die Zelle gelangt. Wie genau Txlna an die Zelloberfläche gelangt und wie genau die Endozytose vermittelt wird, bleibt zu klären.

7. Zusammenfassung

Trotz vorhandener prophylaktischer Vakzinierung stellt eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus noch immer ein Gesundheitsproblem globalen Ausmaßes dar. Weltweit sind etwa 257 Millionen Menschen chronisch mit HBV infiziert. Eine chronische HBV-Infektion führt zu schwerwiegenden Schädigungen der Leber und oftmals zur Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms, an dem jährlich etwa 800.000 Menschen sterben. Aufgrund der Persistenz des viralen Genoms als episomales Minichromosom in infizierten Hepatozyten ist eine chronische Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus bis heute nicht heilbar, was die Notwendigkeit eines ganzheitlichen Verständnisses des viralen Lebenszyklus verdeutlicht. Während die Replikation von HBV einen sehr gut erforschten Teil des HBV-Lebenszyklus darstellt, ist der *Entry*-Prozess bislang nur ansatzweise verstanden. Ein bedeutender Beitrag zum Verständnis des viralen Zelleintritts konnte durch die Identifizierung des Gallensäuretransporters NTCP als funktioneller HBV-Rezeptor geleistet werden. Eine ektopische Expression von NTCP in Zellen, die basal nicht suszeptibel für eine HBV-Infektion sind, verleiht diesen partielle Suszeptibilität, ein *Knockdown* von NTCP in infizierbaren Zellen resultiert in einer verminderten Suszeptibilität. Dennoch gibt es einige ungewöhnliche Aspekte hinsichtlich NTCP als HBV-Rezeptor, die darauf schließen lassen, dass es für die Etablierung einer effizienten Infektion neben NTCP weiterer Co-Rezeptoren bedarf. Ein solches potentiell *Entry*-relevantes Protein ist α -Taxilin. Präliminäre Studien ergaben, dass Txlna Spezies-spezifisch mit der PreS1-Domäne des großen viralen Oberflächenproteins LHBs interagiert. Als weiterer Interaktionspartner α -Taxilins konnte das ehemals als potentiell *Entry*-relevanter Faktor beschriebene Protein Annexin A5 identifiziert werden. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde eine Beteiligung von Txlna am HBV-Zelleintritt erwogen. In dieser Arbeit sollte schließlich die potentielle funktionelle Relevanz α -Taxilins für den *Entry*-Prozess des Hepatitis-B-Virus eingehend untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Epitop-*Mapping*-Experimente ergaben, dass Txlna spezifisch im Bereich der viralen Rezeptorbindedomäne sowohl an die essentielle als auch an die zweite akzessorische Region bindet. Darüber hinaus konnten drei weitere Bereiche der PreS1PreS2-Domäne identifiziert werden, die für die Bindung an Txlna von Bedeutung sind. Weiterhin ergaben SPR-spektroskopische Interaktionsstudien, dass PreS mit moderater Affinität, wie sie den meisten Protein-Protein-Interaktionen zugrunde liegt, an Txlna bindet. Txlna befindet sich physiologisch an der Plasmamembran von Zellen, die suszeptibel für eine HBV-Infektion sind (differenzierte HepaRG-Zellen und differenzierte PHH), nicht jedoch an der Plasmamembran nicht mit HBV infizierbarer Zellen (undifferenzierte HepaRG-Zellen und dedifferenzierte PHH). Darüber hinaus konnte eine Exposition α -Taxilins an der Zelloberfläche HBV-suszeptibler Zellen detektiert werden, womit es die Grundvoraussetzung einer

Oberflächenexposition als Rezeptor erfüllt. Da Txlna selbst keine Transmembrandomäne besitzt, wird angenommen, dass es über eine Interaktion mit AnxV an die äußere Seite der Plasmamembran gebunden wird. CLSM-Analysen ergaben, dass Txlna an der Plasmamembran suszeptibler Zellen mit AnxV colokalisiert, eine direkte Interaktion beider Proteine konnte mittels CoIP bestätigt werden. Des Weiteren colokalisiert Txlna in hohem Maße mit dem *bona fide* Rezeptor NTCP an der Plasmamembran suszeptibler Zellen, was auf ein Wechselspiel dieser beiden Proteine innerhalb eines HBV-Rezeptorkomplexes hinweist. Eine direkte Interaktion zwischen Txlna und NTCP konnte nicht nachgewiesen werden.

Evidenz für die funktionelle Beteiligung α -Taxilins am HBV-*Entry*-Prozess basiert auf Beobachtungen, dass eine HBV-Infektion sowohl durch Txlna-spezifische Antikörper als auch durch rekombinantes Txlna-Protein signifikant inhibiert werden kann. Mittels CRISPR/Cas9-System generierte HepaRG-TXLNA-*Knockout*-Zellen weisen zudem keinerlei Suszeptibilität für eine HBV-Infektion auf. Ob der Verlust der HBV-Suszeptibilität dieser TXLNA-*Knockout*-Zellen allerdings unmittelbar durch den Verlust α -Taxilins als Rezeptor bedingt ist oder aber vielmehr aufgrund einer durch den TXLNA-*Knockout* bedingten dysfunktionalen Differenzierung der HepaRG-Zellen zustande kommt, konnte nicht gänzlich geklärt werden. Durch zusätzliche Überexpression von Txlna in stabil humanes NTCP exprimierenden HepG2-Zellen (HepG2-hNTCP) konnte die nur limitierte Suszeptibilität dieser Zellen für eine HBV-Infektion signifikant erhöht werden.

Zusammengefasst konnte im Rahmen dieser Arbeit α -Taxilin als ein funktionell in den *Entry*-Prozess involvierter Co-Rezeptor für das Hepatitis-B-Virus identifiziert werden. Diese Entdeckung trägt maßgeblich zum Verständnis des *Entry*-Prozesses des Hepatitis-B-Virus bei und stellt einen wesentlichen Beitrag zur Charakterisierung des viralen Lebenszyklus dar.

8. Referenzen

1. **World Health Organisation (WHO)**. 2017. *Global hepatitis report, 2017*. World Health Organization.
2. **Hepatitis B Foundation**. What is Hepatitis B? Available at: <https://www.hepb.org/what-is-hepatitis-b/what-is-hepb/>. Accessed 18 February 2020.
3. **World Health Organisation (WHO)**. 2019. Hepatitis B. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>. Accessed 17 February 2020.
4. **Nelson NP, Easterbrook PJ, McMahon BJ**. 2016. Epidemiology of Hepatitis B Virus Infection and Impact of Vaccination on Disease. *Clin Liver Dis* **20**(4): 607–28.
5. **Hwang EW, Cheung R**. 2011. Global Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) Infection. *N A J Med Sci*.(4(1)): 7–13.
6. **Jefferies M, Rauff B, Rashid H, Lam T, et al**. 2018. Update on global epidemiology of viral hepatitis and preventive strategies. *World J Clin Cases* **6**(13): 589–99.
7. **Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R**. 2004. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* **127**(5 Suppl 1): S5-S16.
8. **Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, et al**. 2015. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet* **386**(10003): 1546–55.
9. **Bond WW, Favero MS, Petersen NJ, Gravelle CR, et al**. 1981. Survival of hepatitis B virus after drying and storage for one week. *Lancet* **1**(8219): 550–1.
10. **Gerlich WH**. 2013. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology* **10**: 239.
11. **Liang TJ**. 2009. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology* **49**(5 Suppl): S13-21.
12. **Garfein RS, Bower WA, Loney CM, Hutin YJF, et al**. 2004. Factors associated with fulminant liver failure during an outbreak among injection drug users with acute hepatitis B. *Hepatology* **40**(4): 865–73.
13. **Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, et al. eds**. 2018. *Hepatology – A clinical textbook*, 9th edn.
14. **O'Grady JG**. 2005. Acute liver failure. *Postgrad Med J* **81**(953): 148–54.
15. **Krugman S, Overby LR, Mushahwar IK, Ling CM, et al**. 1979. Viral hepatitis, type B. Studies on natural history and prevention re-examined. *N Engl J Med* **300**(3): 101–6.
16. **Liang TJ, Ghany M**. 2002. Hepatitis B e Antigen--the dangerous endgame of hepatitis B. *N Engl J Med* **347**(3): 208–10.
17. **Rehermann B, Nascimbeni M**. 2005. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* **5**(3): 215–29.
18. **Tabor E, Hoofnagle JH, Barker LF, Pineda-Tamondong G, et al**. 1981. Antibody to hepatitis B core antigen in blood donors with a history of hepatitis. *Transfusion* **21**(3): 366–71.

19. **Barthel S.** 2015. *Influence of Hepatitis B Virus on Insulin Receptor Signaling and Liver Regeneration.* Dissertation.
20. **Chisari FV.** 2000. Viruses, Immunity, and Cancer: Lessons from Hepatitis B. *Am J Pathol* **156**(4): 1117–32.
21. **Guidotti LG, Chisari FV.** 2006. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* **1**: 23–61.
22. **Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF.** 2010. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol* **58**(4): 258–66.
23. **Wieland S, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV.** 2004. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(17): 6669–74.
24. **Wieland SF, Chisari FV.** 2005. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Virol* **79**(15): 9369–80.
25. **Chang JJ, Lewin SR.** 2007. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol* **85**(1): 16–23.
26. **Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J,** et al. 2003. CD8+ T Cells Mediate Viral Clearance and Disease Pathogenesis during Acute Hepatitis B Virus Infection†. *J Virol* **77**(1): 68–76.
27. **Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B,** et al. 1996. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* **4**(1): 25–36.
28. **Guidotti LG, Ando K, Hobbs MV, Ishikawa T,** et al. 1994. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(9): 3764–8.
29. **Webster GJ, Reignat S, Maini MK, Whalley SA,** et al. 2000. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* **32**(5): 1117–24.
30. **Oh IS, Park S-H.** 2015. Immune-mediated Liver Injury in Hepatitis B Virus Infection. *Immune Netw* **15**(4): 191–8.
31. **Kawatani T, Suou T, Tajima F, Ishiga K,** et al. 2001. Incidence of hepatitis virus infection and severe liver dysfunction in patients receiving chemotherapy for hematologic malignancies. *Eur J Haematol* **67**(1): 45–50.
32. **Lok ASF, McMahon BJ.** 2007. Chronic hepatitis B. *Hepatology* **45**(2): 507–39.
33. **Lok AS, Zoulim F, Dusheiko G, Ghany MG.** 2017. Hepatitis B cure: From discovery to regulatory approval. *Hepatology* **66**(4): 1296–313.
34. **Chu C-M, Liaw Y-F.** 2007. Spontaneous relapse of hepatitis in inactive HBsAg carriers. *Hepatol Int* **1**(2): 311–5.
35. **Liaw Y-F, Chu C-M.** 2009. Hepatitis B virus infection. *The Lancet* **373**(9663): 582–92.
36. **Chang JJ, Wightman F, Bartholomeusz A, Ayres A,** et al. 2005. Reduced hepatitis B virus (HBV)-specific CD4+ T-cell responses in human immunodeficiency virus type 1-HBV-coinfected individuals receiving HBV-active antiretroviral therapy. *J Virol* **79**(5): 3038–51.

37. **Rehermann B, Pasquinelli C, Mosier SM, Chisari FV.** 1995. Hepatitis B virus (HBV) sequence variation of cytotoxic T lymphocyte epitopes is not common in patients with chronic HBV infection. *J Clin Invest* **96**(3): 1527–34.
38. **Rehermann B.** 2013. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. *Nat Med* **19**(7): 859–68.
39. **Kondo Y, Ninomiya M, Kakazu E, Kimura O,** et al. 2013. Hepatitis B surface antigen could contribute to the immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *ISRN Gastroenterol* **2013**: 935295.
40. **Boni C, Fisticaro P, Valdatta C, Amadei B,** et al. 2007. Characterization of Hepatitis B Virus (HBV)-Specific T-Cell Dysfunction in Chronic HBV Infection ▽. *J Virol* **81**(8): 4215–25.
41. **Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S,** et al. 2003. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* **109**(4): 487–95.
42. **Zheng BJ, Zhou J, Qu D, Siu KL,** et al. 2004. Selective functional deficit in dendritic cell-T cell interaction is a crucial mechanism in chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* **11**(3): 217–24.
43. **van der Molen RG, Sprengers D, Binda RS, Jong EC de,** et al. 2004. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* **40**(3): 738–46.
44. **Xu Y, Hu Y, Shi B, Zhang X,** et al. 2009. HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol Immunol* **46**(13): 2640–6.
45. **Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, van der Laan LJW,** et al. 2005. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* **41**(4): 771–8.
46. **Xu D, Fu J, Jin L, Zhang H,** et al. 2006. Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol* **177**(1): 739–47.
47. **Assad S, Francis A.** 1999. Over a decade of experience with a yeast recombinant hepatitis B vaccine. *Vaccine* **18**(1-2): 57–67.
48. **Cornberg M, Protzer U, Petersen J, Wedemeyer H,** et al. 2011. Aktualisierung der S 3-Leitlinie zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion. *Z Gastroenterol* **49**(7): 871–930.
49. **Koumbi L.** 2015. Current and future antiviral drug therapies of hepatitis B chronic infection. *World J Hepatol* **7**(8): 1030–40.
50. **Lin C-L, Kao J-H.** 2016. Review article: novel therapies for hepatitis B virus cure - advances and perspectives. *Aliment Pharmacol Ther* **44**(3): 213–22.
51. **Sokal EM, Conjeevaram HS, Roberts EA, Alvarez F,** et al. 1998. Interferon alfa therapy for chronic hepatitis B in children: A multinational randomized controlled trial☆. *Gastroenterology* **114**(5): 988–95.
52. **Manesis EK, Hadziyannis SJ.** 2001. Interferon alpha treatment and retreatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **121**(1): 101–9.

53. **Carreño V, Marcellin P, Hadziyannis S, Salmerón J**, et al. 1999. Retreatment of chronic hepatitis B e antigen-positive patients with recombinant interferon alfa-2a. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP). *Hepatology* **30**(1): 277–82.
54. **Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ**. 2001. Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* **8**(5): 311–21.
55. **Dienstag JL**. 2008. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* **359**(14): 1486–500.
56. **Zoulim F**. 2012. Are novel combination therapies needed for chronic hepatitis B? *Antiviral Res* **96**(2): 256–9.
57. **Lok ASF, Lai C-L, Leung N, Yao G-B**, et al. 2003. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **125**(6): 1714–22.
58. **Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, Pokornowski KA**, et al. 2009. Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology* **49**(5): 1503–14.
59. **van Zonneveld M, Zondervan PE, Cakaloglu Y, Simon C**, et al. 2006. Peg-interferon improves liver histology in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B: no additional benefit of combination with lamivudine. *Liver Int* **26**(4): 399–405.
60. **La Janssen H, van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S**, et al. 2005. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *The Lancet* **365**(9454): 123–9.
61. **Fisicaro P, Boni C, Barili V, Laccabue D**, et al. 2018. Strategies to overcome HBV-specific T cell exhaustion: checkpoint inhibitors and metabolic re-programming. *Curr Opin Virol* **30**: 1–8.
62. **Fanning GC, Zoulim F, Hou J, Bertoletti A**. 2019. Therapeutic strategies for hepatitis B virus infection: towards a cure. *Nat Rev Drug Discov* **18**(11): 827–44.
63. **Akbar SMF, Chen S, Al-Mahtab M, Abe M**, et al. 2012. Strong and multi-antigen specific immunity by hepatitis B core antigen (HBcAg)-based vaccines in a murine model of chronic hepatitis B: HBcAg is a candidate for a therapeutic vaccine against hepatitis B virus. *Antiviral Res* **96**(1): 59–64.
64. **Zahn T, Akhras S, Spengler C, Murra RO**, et al. 2020. A new approach for therapeutic vaccination against chronic HBV infections. *Vaccine* **38**(15): 3105–20.
65. **Akhras S, Toda M, Boller K, Himmelsbach K**, et al. 2017. Cell-permeable capsids as universal antigen carrier for the induction of an antigen-specific CD8+ T-cell response. *Sci Rep* **7**(1): 9630.
66. **Tu T, Budzinska MA, Shackel NA, Urban S**. 2017. HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Viruses* **9**(4).
67. **Lupberger J, Hildt E**. 2007. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol* **13**(1): 74–81.
68. **Bloom K, Maepa MB, Ely A, Arbuthnot P**. 2018. Gene Therapy for Chronic HBV-Can We Eliminate cccDNA? *Genes (Basel)* **9**(4).
69. **Weber ND, Stone D, Sedlak RH, Silva Felixge HS de**, et al. 2014. AAV-mediated delivery of zinc finger nucleases targeting hepatitis B virus inhibits active replication. *PLoS ONE* **9**(5): e97579.

70. **Maepa MB, Roelofse I, Ely A, Arbuthnot P.** 2015. Progress and Prospects of Anti-HBV Gene Therapy Development. *Int J Mol Sci* **16**(8): 17589–610.
71. **Seeger C, Sohn JA.** 2016. Complete Spectrum of CRISPR/Cas9-induced Mutations on HBV cccDNA. *Mol Ther* **24**(7): 1258–66.
72. **BLUMBERG BS, ALTER HJ, VISNICH S.** 1965. A "NEW" ANTIGEN IN LEUKEMIA SERA. *JAMA* **191**: 541–6.
73. **London WT, Sutnick AI, BLUMBERG BS.** 1969. Australia antigen and acute viral hepatitis. *Ann Intern Med* **70**(1): 55–9.
74. **Prince AM.** 1968. Relation of Australia and SH antigens. *Lancet* **2**(7565): 462–3.
75. **Blumberg BS.** 1976. *Australia Antigen and the Biology of Hepatitis B: Nobel Lecture.*
76. **Dane DS, Cameron CH, Briggs M.** 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* **1**(7649): 695–8.
77. **Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ.** 1971. New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet* **2**(7736): 1225–7.
78. **Glebe D, Bremer CM.** 2013. The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* **33**(2): 103–12.
79. **Schaefer S.** 2007. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* **13**(1): 14–21.
80. **Mason WS, Seal G, Summers J.** 1980. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* **36**(3): 829–36.
81. **Sprengel R, Kaleta EF, Will H.** 1988. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol* **62**(10): 3832–9.
82. **Pult I, Netter HJ, Bruns M, Prassolov A, et al.** 2001. Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology* **289**(1): 114–28.
83. **Chang SF, Netter HJ, Bruns M, Schneider R, et al.** 1999. A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA. *Virology* **262**(1): 39–54.
84. **Vaudin M, Wolstenholme AJ, Tsiquaye KN, Zuckerman AJ, et al.** 1988. The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *J Gen Virol* **69** (Pt 6): 1383–9.
85. **Warren KS, Heeney JL, Swan RA, Heriyanto, et al.** 1999. A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J Virol* **73**(9): 7860–5.
86. **Norder H, Ebert JW, Fields HA, Mushahwar IK, et al.** 1996. Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus. *Virology* **218**(1): 214–23.
87. **Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB, et al.** 1998. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(10): 5757–61.
88. **Summers J, Smolec JM, Snyder R.** 1978. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(9): 4533–7.

89. **Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH**, et al. 1980. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(5): 2941–5.
90. **Testut P, Renard CA, Terradillos O, Vitvitski-Trepo L**, et al. 1996. A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J Virol* **70**(7): 4210–9.
91. **Sunbul M**. 2014. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol* **20**(18): 5427–34.
92. **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. *Semin Liver Dis* **33**(2): 97–102.
93. **Dryden KA, Wieland SF, Whitten-Bauer C, Gerin JL**, et al. 2006. Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy. *Mol Cell* **22**(6): 843–50.
94. **Seitz S, Urban S, Antoni C, Böttcher B**. 2007. Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions. *EMBO J* **26**(18): 4160–7.
95. **Schädler S, Hildt E**. 2009. HBV life cycle: entry and morphogenesis. *Viruses* **1**(2): 185–209.
96. **Tong S, Revill P**. 2016. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. *J Hepatol* **64**(1 Suppl): S4-S16.
97. **Crowther RA, Kiselev NA, Böttcher B, Berriman JA**, et al. 1994. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* **77**(6): 943–50.
98. **Nassal M, Schaller H**. 1993. Hepatitis B virus replication. *Trends Microbiol* **1**(6): 221–8.
99. **Beck J, Nassal M**. 2007. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* **13**(1): 48–64.
100. **Gerlich WH, Robinson WS**. 1980. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* **21**(3): 801–9.
101. **Kann M, Gerlich WH**. 1994. Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *J Virol* **68**(12): 7993–8000.
102. **Kau JH, Ting LP**. 1998. Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase. *J Virol* **72**(5): 3796–803.
103. **Wittkop L, Schwarz A, Cassany A, Grün-Bernhard S**, et al. 2010. Inhibition of protein kinase C phosphorylation of hepatitis B virus capsids inhibits virion formation and causes intracellular capsid accumulation. *Cell Microbiol* **12**(7): 962–75.
104. **Siegler VD, Bruss V**. 2013. Role of transmembrane domains of hepatitis B virus small surface proteins in subviral-particle biogenesis. *J Virol* **87**(3): 1491–6.
105. **Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T**, et al. 1984. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol* **52**(2): 396–402.
106. **Bruns M, Miska S, Chassot S, Will H**. 1998. Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J Virol* **72**(2): 1462–8.
107. **Seeger C, Mason WS**. 2000. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(1): 51–68.

108. **Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, Belloni L, et al.** 2011. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol* **55**(5): 996–1003.
109. **Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, et al.** 1979. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* **281**(5733): 646–50.
110. **Block TM, Guo H, Guo J-T.** 2007. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clin Liver Dis* **11**(4): 685–706, vii.
111. **Berting A, Hahnen J, Kröger M, Gerlich WH.** 1995. Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein. *Intervirology* **38**(1-2): 8–15.
112. **Stirk HJ, Thornton JM, Howard CR.** 1992. A topological model for hepatitis B surface antigen. *Intervirology* **33**(3): 148–58.
113. **Short JM, Chen S, Roseman AM, Butler PJG, et al.** 2009. Structure of hepatitis B surface antigen from subviral tubes determined by electron cryomicroscopy. *J Mol Biol* **390**(1): 135–41.
114. **Glebe D, Urban S.** 2007. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* **13**(1): 22–38.
115. **Schmitt S, Glebe D, Tolle TK, Lochnit G, et al.** 2004. Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus. *J Gen Virol* **85**(Pt 7): 2045–53.
116. **Schmitt S, Glebe D, Alving K, Tolle TK, et al.** 1999. Analysis of the pre-S2 N- and O-linked glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus. *J Biol Chem* **274**(17): 11945–57.
117. **Oess S, Hildt E.** 2000. Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. *Gene Ther* **7**(9): 750–8.
118. **Glebe D, Urban S, Knoop EV, Cag N, et al.** 2005. Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology* **129**(1): 234–45.
119. **Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C, et al.** 1999. Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J Virol* **73**(3): 2052–7.
120. **Gripon P, Le Seyec J, Rumin S, Guguen-Guillouzo C.** 1995. Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology* **213**(2): 292–9.
121. **Bruss V, Hagelstein J, Gerhardt E, Galle PR.** 1996. Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity. *Virology* **218**(2): 396–9.
122. **Neurath AR, Kent SB, Strick N, Parker K.** 1986. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* **46**(3): 429–36.
123. **Paran N, Geiger B, Shaul Y.** 2001. HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment. *EMBO J* **20**(16): 4443–53.
124. **Gripon P, Cannie I, Urban S.** 2005. Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol* **79**(3): 1613–22.

125. **Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R, Zoulim F.** 2014. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. *Gastroenterology* **147**(1): 48–64.
126. **Li W, Urban S.** 2016. Entry of hepatitis B and hepatitis D virus into hepatocytes: Basic insights and clinical implications. *J Hepatol* **64**(1 Suppl): S32-S40.
127. **ClinicalTrials.gov.** Phase 3 Study of Bulevirtide in Patients With CHD. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03852719?term=NCT03852719&draw=2&rank=1>. Accessed 11 March 2020.
128. **Prange R, Streeck RE.** 1995. Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *EMBO J* **14**(2): 247–56.
129. **Bruss V, Lu X, Thomssen R, Gerlich WH.** 1994. Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *EMBO J* **13**(10): 2273–9.
130. **Ostapchuk P, Hearing P, Ganem D.** 1994. A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *EMBO J* **13**(5): 1048–57.
131. **Lambert C, Prange R.** 2001. Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation. *J Biol Chem* **276**(25): 22265–72.
132. **Lambert C, Mann S, Prange R.** 2004. Assessment of determinants affecting the dual topology of hepadnaviral large envelope proteins. *J Gen Virol* **85**(Pt 5): 1221–5.
133. **Bruss V.** 1997. A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J Virol* **71**(12): 9350–7.
134. **Hildt E, Munz B, Saher G, Reifenberg K,** et al. 2002. The PreS2 activator MHBst of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J* **21**(4): 525–35.
135. **Schulze A, Gripon P, Urban S.** 2007. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* **46**(6): 1759–68.
136. **Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D.** 2008. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol* **10**(1): 122–33.
137. **Sureau C, Salisse J.** 2013. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatology* **57**(3): 985–94.
138. **Huang H-C, Chen C-C, Chang W-C, Tao M-H,** et al. 2012. Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Virol* **86**(17): 9443–53.
139. **Yan H, Zhong G, Xu G, He W,** et al. 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* **1**: e00049.
140. **Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S,** et al. 2014. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* **146**(4): 1070–83.

141. **Drexler JF, Geipel A, König A, Corman VM**, et al. 2013. Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(40): 16151–6.
142. **König A, Döring B, Mohr C, Geipel A**, et al. 2014. Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes. *J Hepatol* **61**(4): 867–75.
143. **Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH**, et al. 2014. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem Biophys Res Commun* **443**(3): 808–13.
144. **Shimura S, Watashi K, Fukano K, Peel M**, et al. 2017. Cyclosporin derivatives inhibit hepatitis B virus entry without interfering with NTCP transporter activity. *J Hepatol* **66**(4): 685–92.
145. **Yan Y, Allweiss L, Yang D, Kang J**, et al. 2019. Down-regulation of cell membrane localized NTCP expression in proliferating hepatocytes prevents hepatitis B virus infection. *Emerg Microbes Infect* **8**(1): 879–94.
146. **Nkongolo S, Ni Y, Lempp FA, Kaufman C**, et al. 2014. Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor. *J Hepatol* **60**(4): 723–31.
147. **Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S**, et al. 2014. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Hepatology* **59**(5): 1726–37.
148. **Bouezzedine F, Fardel O, Gripon P**. 2015. Interleukin 6 inhibits HBV entry through NTCP down regulation. *Virology* **481**: 34–42.
149. **Yan H, Liu Y, Sui J, Li W**. 2015. NTCP opens the door for hepatitis B virus infection. *Antiviral Res* **121**: 24–30.
150. **Li J, Zong L, Sureau C, Barker L**, et al. 2016. Unusual Features of Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide as a Hepatitis B Virus Receptor. *J Virol* **90**(18): 8302–13.
151. **Li J, Tong S**. 2015. From DCPD to NTCP: the long journey towards identifying a functional hepatitis B virus receptor. *Clin Mol Hepatol* **21**(3): 193–9.
152. **Meredith LW, Hu K, Cheng X, Howard CR**, et al. 2016. Lentiviral hepatitis B pseudotype entry requires sodium taurocholate co-transporting polypeptide and additional hepatocyte-specific factors. *J Gen Virol* **97**(1): 121–7.
153. **Gripon P, Diot C, Guguen-Guillouzo C**. 1993. Reproducible high level infection of cultured adult human hepatocytes by hepatitis B virus: effect of polyethylene glycol on adsorption and penetration. *Virology* **192**(2): 534–40.
154. **Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J**, et al. 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15655–60.
155. **Yan H, Peng B, Liu Y, Xu G**, et al. 2014. Viral entry of hepatitis B and D viruses and bile salts transportation share common molecular determinants on sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J Virol* **88**(6): 3273–84.

156. **Peng L, Zhao Q, Li Q, Li M**, et al. 2015. The p.Ser267Phe variant in SLC10A1 is associated with resistance to chronic hepatitis B. *Hepatology* **61**(4): 1251–60.
157. **Hu H-H, Liu J, Lin Y-L, Luo W-S**, et al. 2016. The rs2296651 (S267F) variant on NTCP (SLC10A1) is inversely associated with chronic hepatitis B and progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B. *Gut* **65**(9): 1514–21.
158. **Stoeckl L, Funk A, Kopitzki A, Brandenburg B**, et al. 2006. Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(17): 6730–4.
159. **Blanchet M, Sureau C**. 2007. Infectivity determinants of the hepatitis B virus pre-S domain are confined to the N-terminal 75 amino acid residues. *J Virol* **81**(11): 5841–9.
160. **Gudima S, Meier A, Dunbrack R, Taylor J**, et al. 2007. Two potentially important elements of the hepatitis B virus large envelope protein are dispensable for the infectivity of hepatitis delta virus. *J Virol* **81**(8): 4343–7.
161. **Lepère C, Régeard M, Le Seyec J, Gripon P**. 2007. The Translocation Motif of Hepatitis B Virus Envelope Proteins Is Dispensable for Infectivity ∇ . *J Virol* **81**(14): 7816–8.
162. **Ni Y, Sonnabend J, Seitz S, Urban S**. 2010. The pre-s2 domain of the hepatitis B virus is dispensable for infectivity but serves a spacer function for L-protein-connected virus assembly. *J Virol* **84**(8): 3879–88.
163. **Berting A, Fischer C, Schaefer S, Garten W**, et al. 2000. Hemifusion activity of a chimeric influenza virus hemagglutinin with a putative fusion peptide from hepatitis B virus. *Virus Res* **68**(1): 35–49.
164. **Lepère-Douard C, Trotard M, Le Seyec J, Gripon P**. 2009. The First Transmembrane Domain of the Hepatitis B Virus Large Envelope Protein Is Crucial for Infectivity ∇ . *J Virol* **83**(22): 11819–29.
165. **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. *J Virol* **80**(11): 5465–73.
166. **Schmitz A, Schwarz A, Foss M, Zhou L**, et al. 2010. Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket. *PLoS Pathog* **6**(1): e1000741.
167. **Kann M, Bischof A, Gerlich WH**. 1997. In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. *J Virol* **71**(2): 1310–6.
168. **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. *World J Gastroenterol* **19**(44): 8000–10.
169. **Köck J, Rösler C, Zhang J-J, Blum HE**, et al. 2010. Generation of covalently closed circular DNA of hepatitis B viruses via intracellular recycling is regulated in a virus specific manner. *PLoS Pathog* **6**(9): e1001082.
170. **Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L**, et al. 2009. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol* **51**(3): 581–92.

171. **Seeger C, Mason WS.** 2015. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology* **479-480**: 672–86.
172. **Nassal M.** 1992. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol* **66**(7): 4107–16.
173. **Köck J, Nassal M, Deres K, Blum HE,** et al. 2004. Hepatitis B virus nucleocapsids formed by carboxy-terminally mutated core proteins contain spliced viral genomes but lack full-size DNA. *J Virol* **78**(24): 13812–8.
174. **Gerelsaikhan T, Tavis JE, Bruss V.** 1996. Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J Virol* **70**(7): 4269–74.
175. **Prange R.** 2012. Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. *Med Microbiol Immunol* **201**(4): 449–61.
176. **Patient R, Hourieux C, Roingeard P.** 2009. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell Microbiol* **11**(11): 1561–70.
177. **Lambert C, Döring T, Prange R.** 2007. Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J Virol* **81**(17): 9050–60.
178. **Kian Chua P, Lin M-H, Shih C.** 2006. Potent inhibition of human Hepatitis B virus replication by a host factor Vps4. *Virology* **354**(1): 1–6.
179. **Watanabe T, Sorensen EM, Naito A, Schott M,** et al. 2007. Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(24): 10205–10.
180. **Hoffmann J, Boehm C, Himmelsbach K, Donnerhak C,** et al. 2013. Identification of α -taxilin as an essential factor for the life cycle of hepatitis B virus. *J Hepatol* **59**(5): 934–41.
181. **Huovila AP, Eder AM, Fuller SD.** 1992. Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J Cell Biol* **118**(6): 1305–20.
182. **Patzer EJ, Nakamura GR, Simonsen CC, Levinson AD,** et al. 1986. Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum. *J Virol* **58**(3): 884–92.
183. **Jiang B, Himmelsbach K, Ren H, Boller K,** et al. 2015. Subviral Hepatitis B Virus Filaments, like Infectious Viral Particles, Are Released via Multivesicular Bodies. *J Virol* **90**(7): 3330–41.
184. **Morikawa K, Suda G, Sakamoto N.** 2016. Viral life cycle of hepatitis B virus: Host factors and druggable targets. *Hepatol Res* **46**(9): 871–7.
185. **Gripon P, Diot C, Thézé N, Fourel I,** et al. 1988. Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Virol* **62**(11): 4136–43.
186. **Rijntjes PJ, Moshage HJ, Yap SH.** 1988. In vitro infection of primary cultures of cryopreserved adult human hepatocytes with hepatitis B virus. *Virus Res* **10**(1): 95–109.
187. **Walter E, Keist R, Niederöst B, Pult I,** et al. 1996. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology* **24**(1): 1–5.

188. **Schulze A, Mills K, Weiss TS, Urban S.** 2012. Hepatocyte polarization is essential for the productive entry of the hepatitis B virus. *Hepatology* **55**(2): 373–83.
189. **Le Vee M, Noel G, Jouan E, Stieger B,** et al. 2013. Polarized expression of drug transporters in differentiated human hepatoma HepaRG cells. *Toxicol In Vitro* **27**(6): 1979–86.
190. **Kotani N, Maeda K, Debori Y, Camus S,** et al. 2012. Expression and transport function of drug uptake transporters in differentiated HepaRG cells. *Mol Pharm* **9**(12): 3434–41.
191. **Gripon P, Diot C, Corlu A, Guguen-Guillouzo C.** 1989. Regulation by dimethylsulfoxide, insulin, and corticosteroids of hepatitis B virus replication in a transfected human hepatoma cell line. *J Med Virol* **28**(3): 193–9.
192. **Hagenbuch B, Meier PJ.** 1994. Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J Clin Invest* **93**(3): 1326–31.
193. **Geyer J, Wilke T, Petzinger E.** 2006. The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **372**(6): 413–31.
194. **Hagenbuch B, Dawson P.** 2004. The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch* **447**(5): 566–70.
195. **Döring B, Lütteke T, Geyer J, Petzinger E.** 2012. The SLC10 carrier family: transport functions and molecular structure. *Curr Top Membr* **70**: 105–68.
196. **Hallén S, Mareninova O, Brändén M, Sachs G.** 2002. Organization of the membrane domain of the human liver sodium/bile acid cotransporter. *Biochemistry* **41**(23): 7253–66.
197. **Stieger B, Hagenbuch B, Landmann L, Höchli M,** et al. 1994. In situ localization of the hepatocytic na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology* **107**(6): 1781–7.
198. **Weinman SA, Carruth MW, Dawson PA.** 1998. Bile acid uptake via the human apical sodium-bile acid cotransporter is electrogenic. *J Biol Chem* **273**(52): 34691–5.
199. **Moss SE, Morgan RO.** 2004. The annexins. *Genome Biol* **5**(4): 219.
200. **Bouter A, Carmeille R, Gounou C, Bouvet F,** et al. 2015. Review: Annexin-A5 and cell membrane repair. *Placenta* **36 Suppl 1**: S43-9.
201. **Gerke V, Creutz CE, Moss SE.** 2005. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(6): 449–61.
202. **van Genderen HO, Kenis H, Hofstra L, Narula J,** et al. 2008. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochim Biophys Acta* **1783**(6): 953–63.
203. **Huber R, Berendes R, Burger A, Schneider M,** et al. 1992. Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins. *J Mol Biol* **223**(3): 683–704.

204. **Huber R, Römisch J, Paques EP.** 1990. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J* **9**(12): 3867–74.
205. **Boersma HH, Kietselaer BLJH, Stolk LML, Bennaghmouch A,** et al. 2005. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med* **46**(12): 2035–50.
206. **Hertogs K, Leenders WP, Depla E, Bruin WC de,** et al. 1993. Endonexin II, present on human liver plasma membranes, is a specific binding protein of small hepatitis B virus (HBV) envelope protein. *Virology* **197**(2): 549–57.
207. **Hertogs K, Depla E, Crabbé T, Bruin W de,** et al. 1994. Spontaneous development of anti-hepatitis B virus envelope (anti-idiotypic) antibodies in animals immunized with human liver endonexin II or with the F(ab')₂ fragment of anti-human liver endonexin II immunoglobulin G: evidence for a receptor-ligand-like relationship between small hepatitis B surface antigen and endonexin II. *J Virol* **68**(3): 1516–21.
208. **Neurath AR, Strick N.** 1994. The putative cell receptors for hepatitis B virus (HBV), annexin V, and apolipoprotein H, bind to lipid components of HBV. *Virology* **204**(1): 475–7.
209. **Meyer S de, Depla E, Maertens G, Soumillion A,** et al. 1999. Characterization of small hepatitis B surface antigen epitopes involved in binding to human annexin V. *J Viral Hepat* **6**(4): 277–85.
210. **Meyer S de, Gong Z, Depla E, Maertens G,** et al. 1999. Involvement of phosphatidylserine and non-phospholipid components of the hepatitis B virus envelope in human Annexin V binding and in HBV infection in vitro. *J Hepatol* **31**(5): 783–90.
211. **Gong ZJ, Meyer S de, van Pelt J, Hertogs K,** et al. 1999. Transfection of a rat hepatoma cell line with a construct expressing human liver annexin V confers susceptibility to hepatitis B virus infection. *Hepatology* **29**(2): 576–84.
212. **Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS,** et al. 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**(13): 1605–12.
213. **Nogami S, Satoh S, Nakano M, Shimizu H,** et al. 2003. Taxilin; a novel syntaxin-binding protein that is involved in Ca²⁺-dependent exocytosis in neuroendocrine cells. *Genes Cells* **8**(1): 17–28.
214. **Nogami S, Satoh S, Tanaka-Nakadate S, Yoshida K,** et al. 2004. Identification and characterization of taxilin isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* **319**(3): 936–43.
215. **Ohtomo N, Tomiya T, Tanoue Y, Inoue Y,** et al. 2010. Expression of α -taxilin in hepatocellular carcinoma correlates with growth activity and malignant potential of the tumor. *Int J Oncol* **37**(6): 1417–23.
216. **Mashidori T, Shirataki H, Kamai T, Nakamura F,** et al. 2011. Increased alpha-taxilin protein expression is associated with the metastatic and invasive potential of renal cell cancer. *Biomed Res* **32**(2): 103–10.
217. **Kanamori A, Imai Y, Ihara K, Nagata H,** et al. 2017. α -taxilin overexpression correlates with proliferation activity but not with prognosis of colorectal cancer. *Oncol Lett* **14**(2): 1471–6.

218. **Nakajima H, Hirata A, Ogawa Y, Yonehara T**, et al. 1991. A cytoskeleton-related gene, *uso1*, is required for intracellular protein transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **113**(2): 245–60.
219. **Sapperstein SK, Lupashin VV, Schmitt HD, Waters MG**. 1996. Assembly of the ER to Golgi SNARE complex requires *Uso1p*. *J Cell Biol* **132**(5): 755–67.
220. **Tsukada M, Will E, Gallwitz D**. 1999. Structural and Functional Analysis of a Novel Coiled-Coil Protein Involved in *Ypt6* GTPase-regulated Protein Transport in Yeast. *Mol Biol Cell* **10**(1): 63–75.
221. **Nogami S, Satoh S, Nakano M, Terano A**, et al. 2003. Interaction of taxilin with syntaxin which does not form the SNARE complex. *Biochem Biophys Res Commun* **311**(4): 797–802.
222. **Horii Y, Nogami S, Kawano Y, Kaneko-Kawano T**, et al. 2012. Interaction of α -taxilin localized on intracellular components with the microtubule cytoskeleton. *Cell Struct Funct* **37**(2): 111–26.
223. **Sakane H, Horii Y, Nogami S, Kawano Y**, et al. 2014. α -Taxilin interacts with sorting nexin 4 and participates in the recycling pathway of transferrin receptor. *PLoS ONE* **9**(4): e93509.
224. **Elgner F, Donnerhak C, Ren H, Medvedev R**, et al. 2016. Characterization of α -taxilin as a novel factor controlling the release of hepatitis C virus. *Biochem J* **473**(2): 145–55.
225. **Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN**, et al. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* **10**(6): 845–58.
226. **Hoffmann J**. 2013. *Charakterisierung der Rolle von α -Taxilin für den Zelleintritt und die Morphogenese von Hepatitis B*. Dissertation.
227. **Röttger H**. 2012. *Etablierung eines Verfahrens zur Identifizierung α -Taxilin und IL-14 bindender Proteine*. Masterarbeit.
228. **Ladner SK, Otto MJ, Barker CS, Zaifert K**, 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. *Antimicrob Agents Chemother* **41**(8): 1715–20.
229. **Kappen M**. 2016. *Charakterisierung der Interaktion von α -Taxilin mit zellulären und viralen Proteinen des Hepatitis-B- und Hepatitis-C-Virus*. Masterarbeit.
230. **Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V**, et al. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* **8**(11): 2281–308.
231. **Birnboim HC, Doly J**. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513–23.
232. **Bradford MM**. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–54.
233. **Laemmli UK**. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680–5.

234. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350–4.
235. **Kyhse-Andersen J.** 1984. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polycrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **10**(3-4): 203–9.
236. **MANDERS EMM, VERBEEK FJ, ATEN JA.** 1993. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy* **169**(3): 375–82.
237. **Mimms LT, Floreani M, Tyner J, Whitters E,** et al. 1990. Discrimination of hepatitis B virus (HBV) subtypes using monoclonal antibodies to the PreS1 and PreS2 domains of the viral envelope. *Virology* **176**(2): 604–19.
238. **Meisel H, Sominskaya I, Pumpens P, Pushko P,** et al. 1994. Fine mapping and functional characterization of two immuno-dominant regions from the preS2 sequence of hepatitis B virus. *Intervirology* **37**(6): 330–9.
239. **Gerlich WH, Lu X, Heermann KH.** 1993. Studies on the attachment and penetration of hepatitis B virus. *J Hepatol* **17**: S10-S14.
240. **Pontisso P, Petit MA, Bankowski MJ, Peeples ME.** 1989. Human liver plasma membranes contain receptors for the hepatitis B virus pre-S1 region and, via polymerized human serum albumin, for the pre-S2 region. *J Virol* **63**(5): 1981–8.
241. **Neurath AR, Kent SB, Parker K, Prince AM,** et al. 1986. Antibodies to a synthetic peptide from the preS 120-145 region of the hepatitis B virus envelope are virus neutralizing. *Vaccine* **4**(1): 35–7.
242. **Meier A, Mehrle S, Weiss TS, Mier W,** et al. 2013. Myristoylated PreS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes. *Hepatology* **58**(1): 31–42.
243. **Xiao Y, Liu C, Tang W, Zhang H,** et al. 2019. Evans Blue Inhibits HBV Replication Through a Dual Antiviral Mechanism by Targeting Virus Binding and Capsid Assembly. *Front Microbiol* **10**: 2638.
244. **Kenis H, van Genderen H, Bennaghmouch A, Rinia HA,** et al. 2004. Cell surface-expressed phosphatidylserine and annexin A5 open a novel portal of cell entry. *J Biol Chem* **279**(50): 52623–9.
245. **Iwamoto M, Saso W, Sugiyama R, Ishii K,** et al. 2019. Epidermal growth factor receptor is a host-entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**(17): 8487–92.
246. **Iwamoto M, Saso W, Nishioka K, Ohashi H,** et al. 2020. The machinery for endocytosis of epidermal growth factor receptor coordinates the transport of incoming hepatitis B virus to the endosomal network. *J Biol Chem* **295**(3): 800–7.
247. **Sominskaya I, Pushko P, Dreilina D, Kozlovskaya T,** et al. 1992. Determination of the minimal length of preS1 epitope recognized by a monoclonal antibody which inhibits attachment of hepatitis B virus to hepatocytes. *Med Microbiol Immunol* **181**(4): 215–26.
248. **Sarkar S, Bananis E, Nath S, Anwer MS,** et al. 2006. PKCzeta is required for microtubule-based motility of vesicles containing the ntcp transporter. *Traffic* **7**(8): 1078–91.

249. **Yoshida K, Nogami S, Satoh S, Tanaka-Nakadate S**, et al. 2005. Interaction of the taxilin family with the nascent polypeptide-associated complex that is involved in the transcriptional and translational processes. *Genes Cells* **10**(5): 465–76.
250. **Rospert S, Dubaquié Y, Gautschi M**. 2002. Nascent-polypeptide-associated complex. *Cell Mol Life Sci* **59**(10): 1632–9.
251. **Moreau A, Yotov WV, Glorieux FH, St-Arnaud R**. 1998. Bone-Specific Expression of the Alpha Chain of the Nascent Polypeptide-Associated Complex, a Coactivator Potentiating c-Jun-Mediated Transcription. *Mol Cell Biol* **18**(3): 1312–21.

9. Abkürzungen

ϵ	Enkapsidierungssignal
λ	Wellenlänge
aa	<i>amino acid</i>
AHV	<i>Arctic squirrel hepatitis virus</i>
ALT	Alanin-Aminotransferase
AnxV	Annexin A5
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
ASBT	<i>apical sodium-dependent bile acid transporter</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
AuAg	<i>Australia Antigen</i>
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Cas9	<i>CRISPR-associated endonuclease 9</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i>
CHB	chronische Hepatitis B
CLSM	konfokales <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskop
CoIP	Co-Immunpräzipitation
Cp	<i>crossing point</i>
c-Raf	<i>rat fibrosarcoma 1</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i>
Cy	Cyanin
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phenylindol
ddH ₂ O	<i>double-distilled water</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHBV	<i>Duck hepatitis B virus</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpi	<i>days post infection</i>
DR	<i>direct repeats</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	<i>ER-Golgi intermediate compartment</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ESCRT	<i>endosomal-sorting complex required for transport</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
fwd	<i>forward</i>
GSHV	<i>Ground squirrel hepatitis virus</i>
gt	Genotyp
HBcAg	<i>hepatitis B core antigen</i>
HBeAg	<i>hepatitis B e antigen</i>
HBsAg	<i>hepatitis B surface antigen</i>
HBx	<i>hepatitis B x protein</i>
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBVcpz	Schimpanzen-Hepatitis-B-Virus
HBVgbn	Gibbon-Hepatitis-B-Virus
HBVoru	Orang-Utan-Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDV	Hepatitis-D-Virus, Hepatitis-Delta-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HHBV	<i>Heron hepatitis B virus</i>
hNTCP	humanes NTCP
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>

Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
IC₅₀	halb maximale inhibitorische Konzentration
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-10	Interleukin-10
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
K_d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LB-Medium	<i>lysogeny broth medium</i>
LHBs	<i>large hepatitis B surface protein</i>
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
MEK	<i>MAPK/ERK-kinase</i>
MHBs	<i>middle hepatitis B surface protein</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVB	<i>multivesicular body</i>
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NA	Nukleosid-/Nukleotidanaloga
NAC	<i>nascent-polypeptide-associated-complex</i>
Nedd4	<i>E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
NP40	Nonidet-P40, Nonoxynol-40
ns	nicht signifikant
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTCP	<i>sodium taurocholate co-transporting polypeptide</i>
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
P	Polymerase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

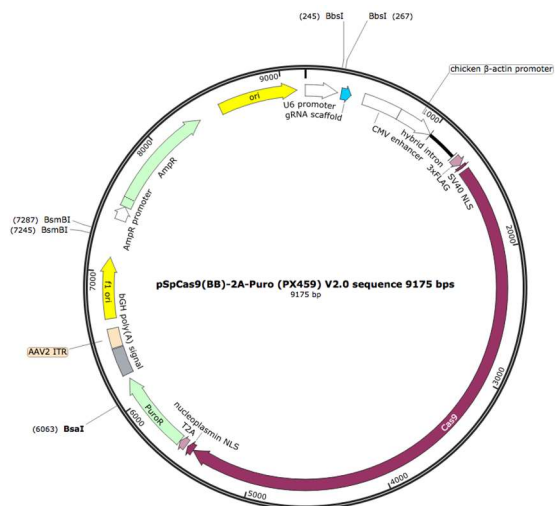
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>programmed death 1</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
PD-L1	<i>PD-1 ligand</i>
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
pgRNA	prägenomische RNA
PHH	primäre humane Hepatozyten
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	<i>polynucleotide kinase</i>
pol	Polymerase
pr	Primase
PS	Phosphatidylserin
PTH	primäre <i>Tupaia belangeri</i> Hepatozyten
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RBD	Rezeptorbindedomäne
RCC	Nierenzellkarzinom
rcDNA	<i>relaxed circular DNA</i>
rev	<i>reverse</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Rpl27	<i>Ribosomal protein L27</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RU	<i>response units</i>
s/co	<i>signal/cut-off</i>
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SGHBV	<i>Snow goose hepatitis B virus</i>
sgRNA	<i>single guide RNA</i>
SHBs	<i>small hepatitis B surface protein</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLC10	<i>solute carrier 10</i>

SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
SOAT	<i>sodium-dependent organic anion transporter</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
SSC	<i>side scatter</i>
STHBV	<i>Stork hepatitis B virus</i>
SVP	Subvirale Partikel
T	Triangulationszahl
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TfnR	Transferrin-Rezeptor
TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>
Thr	Threonin
TLM	<i>Translocation Motif</i>
TM	Transmembrandomäne
TNFα	<i>Tumor necrosis factor α</i>
TP	<i>Terminal protein</i>
Tsg101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
Txlna	α -Taxilin
ÜE	überexprimierend
UV	ultraviolett
VLP	<i>virus like particle</i>
Vps4	<i>vacuolar protein sorting-associated protein 4</i>
w/o	<i>without</i>
WB	Western Blot
WCC	<i>weighted colocalisation coefficient</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WHV	<i>Woodchuck hepatitis virus</i>
WMHBV	<i>Woolly monkey hepatitis B virus</i>

10. Anhang

10.1 Protokoll zur Generierung monoklonaler *Knockout*-Zelllinien mittels CRISPR/Cas9-System

- Design der entsprechenden sgRNA-Oligomere und Primer
- Klonierung der sgRNA-Oligomere in das CRISPR/Cas9-Plasmid PX459 (siehe Vektorkarte) wie im Folgenden beschrieben



Es ist zu beachten, dass aufgrund des simultanen Digestions-Ligations-Schrittes die sgRNA-Oligomere keine BbsI-Restriktionsstelle aufweisen dürfen!

1. Phosphorylierung und *Annealing* der Oligo-Paare:

- 1 µl oligo fwd (100 µM)
- 1 µl oligo rev (100 µM)
- 1 µl 10x T4 Ligation Buffer (NEB)
- 6,5 µl ddH₂O
- 0,5 µl T4 PNK (NEB)
- 10 µl total

Das *Annealing* erfolgt im Thermocycler bei folgenden Parametern:

37 °C 30 min

95 °C 5 min

auf eine finale Temperatur von 25 °C herunterregeln mit 5 °C/min

Die *annealten* Oligomere werden anschließend 1:250 verdünnt.

2. Digestions-Ligations-Reaktion:

- X µl PX459 (100 ng)
- 2 µl phosphorylierte und *annealte* Oligomere (1:250 Verdünnung aus Schritt 1)
- 2 µl 10x Tango buffer (oder FastDigest Buffer)
- 1 µl DTT (10 mM; finale Konzentration: 1 mM)
- 1 µl ATP (10 mM; finale Konzentration: 1 mM)
- 1 µl FastDigest *BbsI* (Thermo Fisher Fermentas)
- 0,5 µl T7 DNA ligase
- Y µl ddH₂O
- 20 µl total

Der Reaktionsansatz wird im Thermocycler unter folgenden Bedingungen inkubiert:

37 °C 5 min

23 °C 5 min

Die beiden Temperaturschritte werden sechsmal wiederholt

(Gesamtdauer der Inkubation: 1 h)

4 °C

- c) Transformation des Klonierungsproduktes in kompetente *E. coli*
- d) Sequenzierung transformierter Klone und der präparierten Plasmide
(Sequenzierungsprimer: Human U6 Seq F_Insert; #1073)
- e) Transfektion der Zellen mit den generierten CRISPR/Cas9-Plasmiden
- f) Bestimmung der *Genome Targeting*-Effizienz der sgRNAs

48 Stunden nach Transfektion wird die genomische DNA der transfizierten Zellen mittels DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) extrahiert. Etwa 100 ng genomische DNA werden für die folgend beschriebene PCR-Reaktion eingesetzt.

Komponente	Volumen	Finale Konzentration
Q5 Hot Start DNA Polymerase	0,5 µl	0,02 U/µl
10 mM dNTPs	1 µl	200 µM
5x Q5 Reaction Buffer	10 µl	1x
10 µM Forward Primer	2,5 µl	0,5 µM
10 µM Reverse Primer	2,5 µl	0,5 µM
genomische DNA	variabel	100 ng
Nuklease-freies Wasser	ad 50 µl	

Die PCR-Reaktion wird mit folgenden Parametern durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec
35 Zyklen	98 °C	5 sec
	50–72 °C	10 sec
	72 °C	20–60 sec
Finale Extension	72 °C	2–5 min
	4 °C	

10 µl des PCR-Produktes werden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese hinsichtlich Größe und entsprechender Amplifizierung analysiert. Der restliche Ansatz wird mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt und für die Digestionsreaktion mit der T7 Endonuklease I verwendet.

DNA	200 ng
10x NEBuffer 2	2 µl
Nuklease-freies Wasser	ad 19 µl

Der Ansatz wird unter folgenden Bedingungen inkubiert, wodurch die PCR-Produkte *annealt* werden:

Schritt	Temperatur	Steigung	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C		5 min
<i>Annealing</i>	95–85 °C	-2 °C/sec	
	85–25 °C	-0,1 °C/sec	
	4 °C		

Zugabe von T7 Endonuklease I zu den *annealten* PCR-Produkten:

<i>Annealtes</i> PCR-Produkt	19 µl
T7 Endonuklease I (M0302)	1 µl
Inkubationszeit	15 min
Temperatur	37 °C

Die Reaktion wird durch Zugabe von 1,5 µl einer 0,25 M EDTA-Lösung beendet. Die Digestionsprodukte werden mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt. Die Analyse der fragmentierten PCR-Produkte erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese.

10.2 Aminosäuresequenz von mCherry-markiertem α -Taxilin

MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVMHEGVSNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWD
 ILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLLKLSFPEGFKWERMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKL
 RGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKP
 VQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKARAAATVLDICRIPPHWTSGS
 MKNQDKKNGAA**Q**QSNPKSSPGQPEAGPEGAQERPSQAAPAVEAEGPGSSQAPRKPEGAQAR
 TAQSGALRDVSEELSRQLEDILSTYCVDDNNQGGPGEDGAQGEPAEPEDA EKSRTYVARNGEPE
 PTPVVNGEKEPSKGDPNTEEIRQSDEVGDRDHRRPQEKKKAKGLGKEITLLMQLNLTSTPEEK
 LAALCKKYAELLEHRNSQKQMKLLQKKQSQLVQEKDHLRGEHSAVLARSKLESCLRELQRHN
 RSLKEEGVQRAREEEEEKRKEVTSHFQVTLNDIQLQMEQHNERNSKLRQENMELAERLKKLIEQY
 ELREEHIDKVFHKHDLQQQLVDAKLQQAQEMLKEAEERHQREKDFLLKEAVESQRMCELMKQQ
 ETHLKQQLALYTEKFEFFQNTLSKSSEVFTTF**E**QEMEKMTKKIKKLEKETTMYRSRWESSNKALL
 EMAEKTVRDKELEGLQVKIQRLEKLCRALQTERNDLNKRVQDLSAGGQGS LTDSGPERRPEG
 PGAQAPSSPRVTEAPCYPGAPSTEASGQTGPQEPTSAR**RSELGTKLKFKPLISLDCAF**

Abbildung 36: Aminosäuresequenz von mCherry-markiertem α -Taxilin.

Dargestellt ist die durch das Plasmid pcDNA3.1(-)_mCherryTxlna kodierte Aminosäuresequenz von N-terminal mCherry-markiertem Txlna. Die AS-Sequenz von mCherry ist in rot dargestellt, die von Txlna in schwarz. Ein die beiden Proteine verbindender *Linker* ist grau markiert. Zu beachten sind sowohl die beiden Aminosäuresubstitutionen K12Q und K412E (*fett*) im Vergleich zur wildtypischen AS-Sequenz (UniProtKB – P40222), welche aber allgemein bekannt sind, als auch die 20 zusätzlichen Aminosäuren am C-Terminus (*fett*), die im wildtypischen Txlna-Protein nicht vorkommen. Diese Mutationen hatten aber keinerlei Auswirkungen auf die Expression des Fusionsproteins und die Funktionalität α -Taxilins.

11. Danksagung

12. Lebenslauf

Persönliches

Name Catrina Spengler
Geburtsdatum 05.12.1989
Geburtsort Frankfurt am Main

Ausbildung

02/2017 – 01/2020 **Doktorandin**
Paul-Ehrlich-Institut, Langen
Abteilung Virologie, Gruppe von [REDACTED]
*Charakterisierung der funktionellen Relevanz des zellulären
Proteins α -Taxilin als potentieller Co-Rezeptor für das
Hepatitis-B-Virus*

10/2014 – 01/2017 **Master of Science in Molekulare Medizin**
Goethe-Universität, Frankfurt
Schwerpunkte: Molekulare Pharmakologie,
Molekulare Onkologie, Immunologie
Masterarbeit am Paul-Ehrlich-Institut, Langen
Abteilung Virologie, Gruppe von [REDACTED]
Relevanz von P62 und P62 pS349 für den HCV Lebenszyklus

04/2010 – 09/2013 **Bachelor of Science in Molekulare Biologie**
Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz
Schwerpunkte: Molekulargenetik, Entwicklungsbiologie
Bachelorarbeit am Institut für Genetik, JGU Mainz,
Gruppe von [REDACTED]
*Charakterisierung des Gens ‚Another transcription unit‘ (Atu) und
dessen Einfluss auf Neuroblasten im larvalen Nervensystem von
Drosophila melanogaster*

06/2009 **Abitur**
Friedrich-Dessauer-Gymnasium, Frankfurt

Publikationen

Regina Medvedev, Daniela Ploen, Catrina Spengler, Fabian Elgner, Humei Ren, Sarah Bunten, Eberhard Hildt, 2017. HCV-induced oxidative stress by inhibition of Nrf2 triggers autophagy and favors release of viral particles. *Free radical biology & medicine*. 110:300–315. PMID: 28673615

Bingfu Jiang, Qingyan Wu, Lisa Kuhnhenh, Sami Akhras, Catrina Spengler, Klaus Boller, Kai-Henrik Peiffer, Eberhard Hildt, 2019. *Formation of semi-enveloped particles as a unique feature of a hepatitis B virus PreS1 deletion mutant*. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 50:940–954. PMID: 31240738

Tobias Zahn, Sami Akhras, Catrina Spengler, Robin Oliver Murra, Thomas Holzhauser, Eberhard Hildt, 2020. A new approach for therapeutic vaccination against chronic HBV infections. *Vaccine*. 38:3105–3120. PMID: 32113806

Präsentationen

Retreat on Biomedical Research des Paul-Ehrlich-Instituts, 2018, Ronneburg
Characterizing the role of α -Taxilin for the HBV entry process

Retreat on Biomedical Research des Paul-Ehrlich-Instituts, 2020, Ronneburg
Alpha-Taxilin is a protein relevant for the hepatitis B virus entry process

Poster

27th Annual Meeting of the Society of Virology, 2017, Marburg

[REDACTED], Catrina Spengler, and [REDACTED]
Hepatitis C virus-induced oxidative stress triggers autophagy via impaired Nrf2 signaling.

28th Annual Meeting of the Society of Virology, 2018, Würzburg

Catrina Spengler, [REDACTED]
Characterizing the role of α -taxilin for the hepatitis B virus entry process

6th Translational DZIF school, 2018, Lübeck

Catrina Spengler, [REDACTED]
Characterizing the role of α -taxilin for the hepatitis B virus entry process

29th Annual Meeting of the Society of Virology, 2019, Düsseldorf

Catrina Spengler, [REDACTED]
 α -taxilin is a protein relevant for the hepatitis B virus entry process

13. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle Textstellen, Bilder und Zeichnungen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder anderen fremden Texten entnommen wurden, habe ich als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen und wurde als Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form an einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht.

Frankfurt, den 22. Mai 2020

Catrina Spengler