



Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

Untersuchung der Effekte von Core Protein Allosteric Modulators auf intrazelluläre Lokalisation und Modulation der Immunogenität des Hepatitis B Virus Core Proteins.

Christoph Karl Friedrich Blossey

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Carsten Schmidt-Weber

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Ulrike Protzer
2. Prof. Dr. Sevil Weinkauf (schriftliche Beurteilung)
Prof. Dr. Aphrodite Kapurniotu (mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 17.12.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.02.2022 angenommen.

Für Otto.

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	8
Zusammenfassung.....	10
Abkürzungen.....	12
1 Einleitung.....	14
1.1 Hepatitis B und das Hepatitis B Virus.....	14
1.1.1 Epidemiologie.....	15
1.1.2 Das Viruspartikel, Genom und Lebenszyklus.....	17
1.1.3 Therapien.....	25
1.2 Antivirale Abwehr des Immunsystems.....	27
1.2.1 Antivirale Komponenten des angeborenen Immunsystems.....	27
1.2.2 Antivirale Mechanismen des adaptiven Immunsystems.....	29
1.3 Proteinhomöostase.....	35
1.3.1 Proteasomaler Proteinabbau.....	35
1.3.2 Alternative Proteinabbauwege.....	37
1.4 Core protein Allosteric Modifiers und ihre Wirkweisen.....	38
1.4.1 Typ I CAMs.....	39
1.4.2 Typ II CAMs.....	40
1.4.3 Vergleich mit Nukleos(t)idischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTIs) ..	42
1.5 Hypothese der Wirkweise von CAMs und Fragestellung dieser Arbeit.....	42
2 Ergebnisse.....	44
2.1 Wirkmechanismen von CpAMs und Nukleosid-/Nukleotidanaloga und des Capsidassemblymodells.....	44
2.1.1 Effektivität der CpAMs in unterschiedlichen Modellen.....	44
2.1.2 Untersuchung des Wirkmechanismus und Virusgenesemodell.....	48
2.1.3 Lokalisation von Core bei CAMBehandlung.....	50
2.2 Auswirkungen von CAMs auf den Wirt.....	57
2.2.1 Analyse der Antigenpräsentation (Peptid C18-27) auf dem T- Zellrezeptorkomplex.....	57
2.2.2 Effekt der CAM-Behandlung auf CD8 Effektor T-Zell-Zytotoxizität.....	58
2.2.3 Auswirkungen der CAM Behandlung auf intrazellulären Core Abbau.....	65
2.2.4 Auswirkungen der CAM Behandlung auf das Proteinstressniveau in der Zelle	66
2.2.5 Auswirkungen der CAM Behandlung von infizierten Hepatozyten auf die Induktion der angeborenen Immunantwort.....	68
2.2.6 Nukleäre Lokalisation von Core bei CAM-Behandlung.....	55
3 Diskussion.....	71
3.1 CAMs inhibieren HBV Replikation und Virusproduktion in infizierten und transgenen Modellsystemen.....	71
3.2 Vergleich der Wirkmechanismen – Typ I und Typ II CAMs gegen NRTIs.....	73
3.3 Lokalisation von Core im Nukleus bei Typ II CAMs.....	76

3.3.1	Entstehung des Lokalisationsmusters	77
3.4	Effekt auf T-Zellerkennung – Zerstörung vs. IFN- γ Sekretion	81
3.4.1	Erkennung infizierter Zellen durch T-Zellen	81
3.4.2	Effekte der Erkennung.....	82
3.5	Effekte von CAM-aggregiertem Core auf die Wirtszelle	83
3.5.1	Zelluläre Toleranz der Core Produktion und Einfluss von CAMs.....	86
3.5.2	Immunevasion des Virus	86
3.6	Lokalisation von Core im Nukleus und Kolokalisation mit PML-Körpern	79
3.7	Weitere Ansätze und Ausblick.....	87
3.7.1	Bestimmung der MHC Präsentierten Peptide	87
3.7.2	Bestimmung des Abbauweges und Implikationen dessen	88
3.7.3	Medizinische Aspekte der unterschiedlichen Mechanismen der CAMs und NRTIs	89
3.8	Fazit	90
4	Material und Methoden.....	92
4.1	Materialien	92
4.1.1	Chemikalien	92
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	93
4.1.3	Kits.....	95
4.1.4	Geräte.....	95
4.1.5	Puffer	96
4.1.6	Zellkulturmedien.....	98
4.1.7	Zelllinien (E. R. Verrier et al., 2016).....	99
4.1.8	Antikörper.....	100
4.1.9	Primer	100
4.1.10	Antivirale Substanzen.....	101
4.1.11	Software.....	102
4.2	Methoden	103
4.2.1	Zellkultur	103
4.2.2	Antiviraler Assay	103
4.2.3	Bestimmung der Zellviabilität.....	104
4.2.4	DNA Extraktion.....	104
4.2.5	RNA Extraktion.....	104
4.2.6	Proteinextraktion	104
4.2.7	Native Agarose-Gelelektrophorese.....	105
4.2.8	Retrovirale Transduktion	106
4.2.9	T-Zell Kokulturassays.....	106
4.2.10	Analyse der angeborenen Immunantwort	107
4.2.11	qPCR	108
4.2.12	RT-PCR	108

4.2.13	Western Blot	108
4.2.14	DIG-Hybridisierung und Detektion	109
4.2.15	Immunfluoreszenz Mikroskopie	109
4.2.16	Bildanalyse.....	110
4.2.17	Durchflusszytometrie.....	110
4.2.18	Proteaseinhibition.....	110
4.2.19	Radioisotopenmarkierung und Analyse (Pulse-Chase Experiment).....	111
4.2.20	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA).....	111
4.2.21	Statistische Analyse	112
4.2.22	Densitometrie	112
	Abbildungen	113
	Literaturverzeichnis	115
	Danksagung	126
	Veröffentlichungsliste	128

Abstract

The Hepatitis B Virus poses a global threat to world health. In many geographic areas around the globe case numbers are high and the infection can lead to chronic hepatitis and liver cancer. The available vaccination is effective and generates a robust immunity. However, the demands regarding transport and storage cause it not to be widely available. Current therapies with Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs) and Interferon are unable to cure the chronic infection. NRTI and Interferon application usually occur over long time periods, NRTI-therapy potentially life long. This increases the risk of resistant mutants of the virus emerging in the patient. Because of this risk, alternative therapeutic concepts are being researched.

The class of Capsid Allosteric Modulators (CAMs) was found only recently. CAMs interact with the capsid forming core protein of HBV (HBc) and cause formation of empty capsids or aberrant polymeric structures of HBc. In anti-viral assays, they show the same effect as NRTIs. Both substance classes are equally able to suppress virus secretion. A cytoplasmic accumulation of HBc occurs which probably causes an increased rate of degradation of it. This degradation we wish to utilize immunologically.

Here, we focused on the effects of CAM on immune recognition of HBV producing cells and on the localization of HBc intracellularly.

Our results showed, that the immune recognition of HBV producing and CAM treated cells by T-cells is only weakly increased. We analysed the presentation of the immunodominant peptide C18-27. We found, that T-cells are specifically and dose dependently stimulated to secrete interferon- γ , albeit an increase in cytotoxic efficacy was not observed. Whether the weak stimulation, that caused the interferon secretion poses an opportunity to develop new therapies has to be evaluated in further studies.

The influence of CAM on HBc subcellular localization was initially observed by analysis of cytoplasmic fractions of HBV infected cells. It became apparent, that type II CAM are able to completely abolish cytoplasmic HBc and capsids. Type I CAM and NRTI exhibited similar effects in that they were able to induce the formation of empty and pgRNA filled capsids, respectively. In immunofluorescence experiments these results were examined closer. Treatment with type I CAMs caused a localisation pattern in HBV infected cells, that was basically indistinguishable from the NRTI treated cells. Type II CAMs caused a localization pattern in which HBc was completely removed from the cytoplasm and created sharply defined intranuclear granules. These granules colocalized with PML-bodies. The cause and effect of the association of HBc and PML-bodies is not clear yet.

Summarily, we could show, that CAMs are unable to cause the expected strong effects on T-cell recognition of HBV infected cells. CAMs cause cytoplasmic elimination of HBc and a distinct nuclear localization pattern which colocalizes with PML-bodies.

CAMs have diverse effects on HBc and appear to be a promising approach to further understand the biology of this virus. Possibly they even are a candidate class to develop therapeutics against HBV infection.

Zusammenfassung

Das Hepatitis B Virus stellt eine globale Bedrohung der Weltgesundheit dar, da es nach wie vor in einigen Gebieten der Welt hohe Fallzahlen gibt und die Infektion zu chronischer Hepatitis und Leberkrebs führen kann. Die verfügbare Impfung ist wirksam und erzeugt eine robuste Immunität, sie ist jedoch aufgrund der Lagerungsanforderungen nicht überall verfügbar. Die aktuell verfügbaren Therapien sind nicht in der Lage, die chronische Infektion zu heilen. Es werden hier die Reverse Transkriptase des HBV inhibierende Nukleosidanaloga (NRTIs) und Interferon verwendet. Die NRTI und die Interferonbehandlungen erfolgen jeweils über lange Zeiträume, die NRTI-Behandlung potenziell lebenslang. Hierbei steigt die Häufigkeit von Resistenzmutationen des Virus an, weshalb andere Therapieansätze gesucht werden.

Die Substanzklasse der Capsid Allosteric Modulators (CAMs) wurde erst in diesem Jahrtausend entdeckt. Die CAMs interagieren mit dem kapsidbildenden HBc und sorgen für die Entstehung leerer Kapside oder aberranter Polymerstrukturen aus HBc. Sie zeigen in antiviralen Tests die gleiche Wirkung wie NRTIs. Beide Substanzklassen verhindern die Sekretion infektiöser Viren. Es wird eine Akkumulation von HBc verursacht, die vermutlich zu einer erhöhtem Degradationsrate führt. Diesen Abbau hofften wir immunologisch nutzen zu können. In dieser Arbeit wurde auf die Effekte von CAMs auf die Immunerkennung von HBV produzierenden Zellen und auf die Lokalisation des HBc in den Zellen fokussiert.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Immunerkennung durch T-Zellen von HBV produzierenden Zellen durch eine CAM Behandlung nur schwach verändert wurde. Betrachtet wurde hier die Präsentation des Immunodominanten Peptids C18-27. Wir fanden, dass die Zellen spezifisch und dosisabhängig zur Interferonsekretion angeregt werden, eine Verstärkung der zytotoxischen Effektorfunktion konnte nicht beobachtet werden. Ob die schwache Anregung, die zur Interferonsekretion geführt hat, einen Ansatz für die Entwicklung von neuen Therapien darstellt, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Der Einfluss der CAMs auf die Lokalisation wurde zuerst durch Analyse des Zytoplasmas infizierter Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Typ II CAMs in der Lage sind, zytoplasmatisches HBc und Kapside vollständig zu eliminieren. CAMs des Typ I und NRTIs zeigen jeweils ähnlich Effekte, sie erzeugen leere, respektive pgRNA gefüllte Kapside. In Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte diese Ergebnisse näher untersucht werden. Die Behandlung mit CAMs des Typ I erzeugt ein Lokalisationsmuster, das sich von dem von NRTIs erzeugten nur unwesentlich unterscheidet. CAMs des Typ II erzeugten ein Muster, in dem das HBc vollständig aus dem Zytoplasma eliminiert war und sich im Nukleus der Zellen scharf abgegrenzte Granula bildeten. Diese Granula kolokalisierten mit PML-Körpern. Die Ursachen der Entstehung und die Bedeutung dieser Assoziation sind unklar.

Insgesamt konnten wir zeigen, dass die erhofften starken Effekte auf die Immunerkennung von HBV infizierten Zellen nicht durch CAMs ausgelöst werden können. Weiterhin findet eine durch CAMs des Typ II ausgelöste zytoplasmatische Elimination und nukleäre Lokalisation von HBc statt, die mit PML-Körper assoziiert.

CAMs haben vielfältige Effekte auf HBc und stellen einen vielversprechenden Ansatz dar, die Biologie dieses Virus weiter zu erforschen. Eventuell stellen sie auch einen Ansatz dar, neue Therapeutika zu entwickeln.

Abkürzungen

Da auch im deutschen, allgemeinen wissenschaftlichen Sprachgebrauch fast ausschließlich die auf der englischen Sprache basierenden Abkürzungen verwendet werden, wurden auch hier, der einfacheren Verständlichkeit halber, die auf dem Englischen basierenden Abkürzungen verwendet.

CAM	Core protein Allosteric Modulator
cccDNA	covalently closed circular DNA
CD	Cluster of Differentiation
Da	Dalton
dHepaRG	differentiated HepaRG cells
DMSO	dimethyl sulfoxide
dpi	days post-infection
DR1	direct repeats 1
DR2	direct repeats 2
dsIDNA, DSL	double-stranded linear DNA
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EN1	enhancer 1
EN2	enhancer 2
ER	endoplasmic reticulum
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
HBc, Cp	HBV core protein, Capsid protein
HBeAg	HBV e antigen
HBsAg	HBV surface antigen
HBV	hepatitis B virus
HCC	hepatocellular carcinoma
HLA	human leukocyte antigen
HSP	heat shock protein
HSR	heat shock response
IFN γ	interferon γ
IL-10	interleukin 10
L	large envelope protein
M	middle envelope protein
MHC	Major histocompatibility complex
MOI	multiplicity of infection

mRNA	messenger RNA
NRTI	Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, Nucleoside analogue
NTCP	sodium taurocholate cotransporting polypeptide
ORF	open reading frame
P	HBV polymerase
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
PF-rcDNA	protein-free rcDNA
pgRNA	pregenomic RNA
rcDNA	relaxed circular DNA
RT	reverse transcriptase
S	small envelope protein
ssDNA	single-stranded DNA
SVPs	subviral particles
TCR	T-cell receptor
UPR	unfolded protein responses
wtHBV	wild-type HBV

1 Einleitung

1.1 Hepatitis B und das Hepatitis B Virus

Das Hepatitis B Virus (HBV) ist ein hepatotropes Virus mit partiell doppelsträngigem DNA-Genom; es wird in die Familie der Hepadnaviridae eingeordnet. Das Virus ist ein behülltes Virus und das Virion, auch Dane-Partikel genannt, trägt in der äußeren Membranhülle das virale Oberflächenprotein (surface protein, S-protein) in drei Varianten unterschiedlicher Länge. Das short, medium and large surface protein ist jeweils in die Membran eingebettet, die von der Wirtszelle stammt. Die Membran umhüllt das virale Kapsid, welches aus 240 Kopien des gleichen Proteins, des Core oder Capsid proteins (genannt Core) besteht, die in einer ikosaedrischen Konformation angeordnet sind.

Im Kapsid des Virions befindet sich das Genom des Virus in Form eines teilweise doppelsträngigen DNA-Moleküls, welches kovalent an das virale Polymeraseprotein (P-Protein) gebunden ist. Die Oberflächenproteine allein sind in der Lage, Partikel – ähnlich Mizellen – zu bilden, die sich auch im Blut von infizierten Patienten finden. Diese Partikel werden als subvirale Partikel oder „Hepatitis B surface antigen“ (HBsAg) bezeichnet, welches zuerst in australischen Ureinwohnern (Aborigines) gefunden und deshalb auch als „Australia Antigen“ bezeichnet wird (B. S. Blumberg et al., 1966; B. S. Blumberg et al., 1969). Erst später wurde das Virion des Hepatitis B Virus von Dane et al. in den Seren infizierter Patienten entdeckt (D. S. Dane et al., 1970) und als Pathogen identifiziert, woraus die Bezeichnung „Dane Partikel“ resultiert.

Das Hepatitis-B-Virus gehört zur Familie der Hepadnaviridae und darin zur Gattung Orthohepadnaviridae. In der Familie gibt es zudem den Genus Avihepadnaviridae mit Viren, die Vögel befallen (z.B. das Duck Hepatitis B Virus (DHBV)). Auch erwähnenswert ist das Murmeltier-HBV als nicht-humanes Orthohepadnavirus (J. Summers et al., 1978) und das Makaken-HBV (T. Dupinay et al., 2013), welche wichtige Modellsysteme zur Erforschung des HBV beim Menschen darstellen.

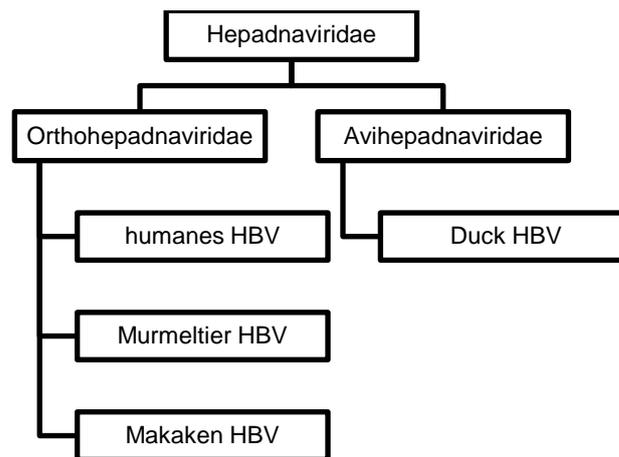


Abbildung 1.1: Systematik der Familie der Hepadnaviren.

Es ist ein Teil der bekannten Hepadnaviren verzeichnet.

HBV gehört zur Gruppe der retroiden Viren (Pararetroviren), da die Replikation des Genoms über ein RNA-Intermediat erfolgt und somit einen reversen Transkriptionsschritt erfordert (J. Summers and W. S. Mason, 1982), den die virale Polymerase mit einer ihrer Domänen ausführt.

1.1.1 Epidemiologie

Hepatitis-B-Virus Infektionen sind ein großes globales Gesundheitsproblem. Aktuell schätzt die Weltgesundheitsorganisation (WHO), dass 257 Millionen Menschen mit dem Virus infiziert sind und dass es für 887.000 Todesfälle pro Jahr ursächlich ist (WHO, 2017), die zu großen Teilen auf Leberzirrhose und Leberzellkarzinom (HCC, hepatocellular carcinoma) (R. P. Beasley, 1988; B. J. McMahon et al., 2001) als Spätfolgen einer HBV-Infektion zurückgehen.

HBV wird durch Blut-Blut-Kontakt übertragen. Die häufigsten Übertragungswege hierbei sind der perinatale Übertragungsweg von der Mutter auf das Kind während der Geburt, die Übertragung während des Geschlechtsverkehrs und HBV-kontaminierte Blutprodukte oder Nadeln (C. W. Shepard et al., 2006).

Die Infektion mit HBV führt bei erwachsenen Patienten oft zu einer akuten Hepatitis (40-50%), kann aber auch asymptomatisch verlaufen. Es besteht bei Erwachsenen nur ein geringes Risiko, eine chronische Hepatitis B zu entwickeln; diese ist durch die Nachweisbarkeit von HBsAg im Blut des Patienten, mindestens sechs Monaten nach Auftreten der ersten Symptome charakterisiert (P. Marcellin, 2009). Bei Säuglingen und Kleinkindern, die mit HBV infiziert werden, ist das Risiko, eine chronische Hepatitis B (CHB) zu entwickeln hingegen bei >90% (B. J. McMahon et al., 1985) und die meisten Patienten mit einer CHB wurden als Kinder infiziert.

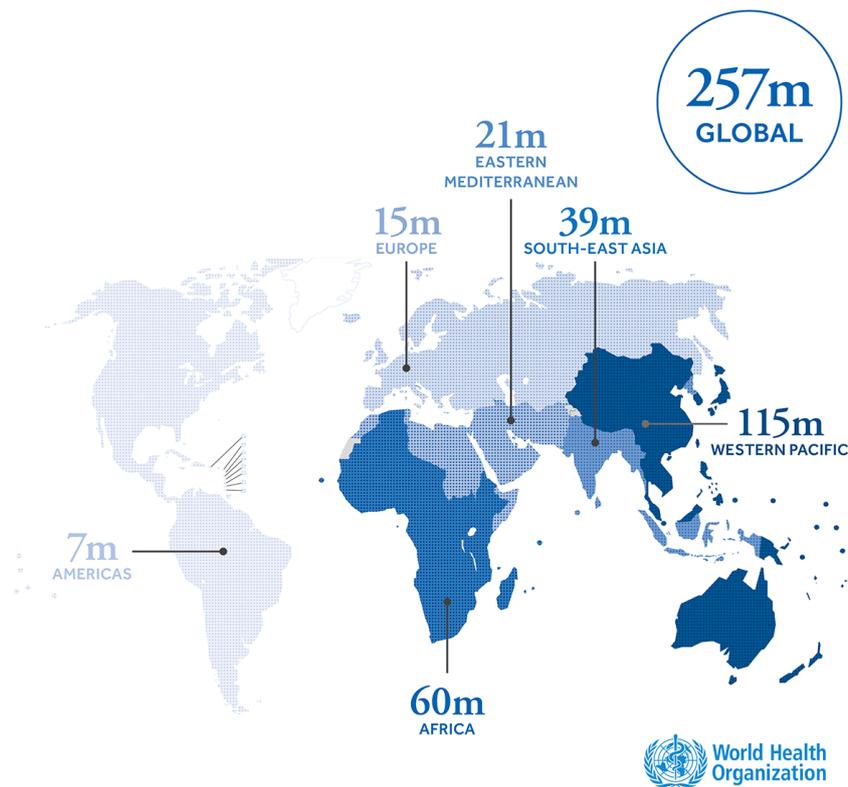


Abbildung 1.2: Übersichtskarte der globalen HBV-Infektionsraten.
(übernommen aus Global hepatitis report, 2017, WHO 2017)

HBV ist höchst wirtsspezifisch und als Erregerreservoir sind ausschließlich der Mensch und Menschenaffen bekannt (D. L. Sly et al., 1979).

In den Hochendemiegebieten Ostasien, Zentral- und Westafrika (Abbildung 1.2) mit einer Durchseuchung von 2 bis 10 Prozent der Bevölkerung erfolgen 90 Prozent der Infektionen perinatal. Im Gegensatz dazu sind in den meisten Industriestaaten prozentual deutlich weniger Menschen mit HBV infiziert (0,5-2%). In diesen Staaten ist die Hauptrisikogruppe für eine Infektion medizinisches Personal, das mit infizierten Patienten und kontaminierten Kanülen in Kontakt kommt.

Um geografische Ausbreitung und Transfer von Ansteckungen zu verfolgen, wurden – wie bei vielen Pathogenen – Typisierungen vorgenommen. Dies war hier besonders mit einem antikörperbasierten – also serologischen – Test erfolgreich. Beim HBV werden vier unterschiedliche Serotypen unterschieden, welche durch differentielle Antikörperbindung des S-Proteins festgelegt wurden. Es werden drei Determinanten unterschieden, wobei die erste Determinante konstant ist und als „a“ Determinante bezeichnet wird. Die zweite Determinante kann „d“ oder „y“ sein und die dritte „r“ oder „w“. Kombinatorisch ergeben sich daraus vier Hauptserotypen: adr, adw, ayr und ayw. Die Determinante w wird in vier Subdeterminanten 1-4 unterteilt, die jedoch in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurden. Interessant ist vor allem die zweite Determinante (d/y), die in einem

Aminosäurebereich des S-Proteins liegt, der für die Proteinfaltung und Ausbildung von Disulfidbrücken verantwortlich ist. Mutationen in diesem Bereich können die Faltung des Proteins und somit auch die Antikörperbindung verändern, jedoch nicht in dem Maße, dass eine vorhandene (polyklonale) Immunität durch einen anderen Serotyp unterlaufen werden kann. Unabhängig von den Serotypen wurden für globale epidemiologische Untersuchungen acht Genotypen festgelegt. Der serologische Typ ist grundsätzlich unabhängig vom Genotyp, jedoch haben Analysen einige Überschneidungen ergeben. Die Genotypen unterscheiden sich zu mindestens acht Prozent in ihrer Basensequenz und wurden mit den Buchstaben A bis H benannt. In den Hochendemiegebieten China und Alaska ist Genotyp B besonders verbreitet, Genotyp C kommt hauptsächlich in Südostasien vor und Genotyp E ist in Westafrika für die meisten Infektionen verantwortlich. Es werden weiterhin Subgenotypen, besonders im Genotyp A gefunden, die für diese Arbeit jedoch ohne Relevanz sind.

1.1.2 Das Viruspartikel, Genom und Lebenszyklus

Das Virus ist hoch spezies- und zellspezifisch und infiziert nur Hepatozyten der Hominidae. In infizierten Zellen wird das Virus repliziert und über intrazelluläre, multivesikuläre Körper (multivesicular bodies, golgiähnliche Strukturen in der Zelle) sezerniert. Diese werden wahrscheinlich von der Membran des endoplasmatischen Retikulums oder des Golgiapparates gebildet. Sie enthalten innerhalb eines membranumhüllten Kompartiments viele membranöse Vesikel bzw. Virionen. Die Viren werden aus den Zellen direkt in die Blutbahn sezerniert, das Virus ist somit nicht zytopathisch.

Im Blut und Serum infizierter Patienten können pro Milliliter bis zu 10^9 infektiöse Virionen, 10^{13} nichtinfektiöse sphärische und 10^9 filamentöse HBsAg-Partikel enthalten sein

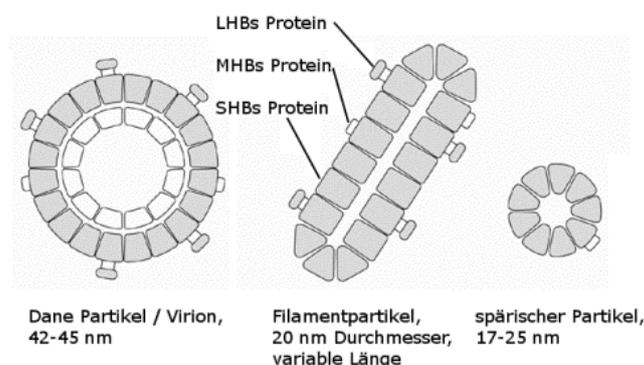


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Virions (Dane Partikel) und der nicht infektiösen membranösen HBs-Partikel.

Links ist der Dane Partikel, wie das HBV-Virion auch genannt wird. Dargestellt ist die äußere Membranhülle und darin das Kapsid. Das Genom ist nicht dargestellt. In der Mitte befindet sich eine Darstellung des filamentösen Partikels. Erkennbar ist die Zusammensetzung aus L, M und S Form des HBs Proteins. Rechts ist ein sphärischer Partikel schematisch abgebildet. Diese Partikel bestehen hauptsächlich aus S-Protein und geringen Mengen der M-Protein. Die unterschiedlichen Formen des HBs Proteins L, M und S sind im Schema markiert. (aus (J. M. Lee and S. H. Ahn, 2011))

Zusätzlich zu den Virionen und membranösen Partikeln wird das Hepatitis B e-Antigen (HBeAg) sezerniert. Dieses Protein ist eine um jeweils 10 Aminosäuren N-terminal längere und C-terminal kürzere Variante von HBc.

Es ist nicht abschließend geklärt, welchen Zweck diese sezernierten, nicht infektiösen Proteine erfüllen, doch gibt es Hinweise darauf, dass beide – das HBsAg und das HBeAg – das Immunsystem des Wirtes manipulieren. Die sezernierten subviralen Partikel fangen neutralisierende Antikörper des Wirtes ab und erzwingen wahrscheinlich eine Art Immuntoleranz des Wirtes gegenüber den HBsAg-Epitopen, was analog für HBeAg vermutet wird.

Der erste direkte Nachweis des Viruspartikels erfolgte 1970 durch Dane et al. im Rahmen von elektronenmikroskopischen Aufnahmen aus dem Blut infizierter Patienten (D. S. Dane et al., 1970). Später konnte die Struktur des Viruskapsides durch kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen rekonstruiert werden (B. Bottcher et al., 1997; R. A. Crowther et al., 1994). 1999 konnte röntgenkristallografisch die Struktur von HBc bestimmt und in die Kapsidstruktur eingepasst werden (S. A. Wynne et al., 1999).

Das Viruspartikel hat einen Durchmesser von etwa 42 nm. Die äußerste Hülle wird von einer Lipid-Membran gebildet, die von der sezernierenden Zelle stammt, in der das jeweilige Virion produziert wurde und dadurch auch zelluläre Lipide und Proteine enthält. Diese Membran enthält die viralen Oberflächenproteine S-, M- und L-Protein in hoher Dichte (Abbildung 1.4). Es gibt nur ein Hüllprotein, das aber in drei unterschiedlichen Varianten hergestellt werden kann, je nachdem, welches Startcodon genutzt wurde. Die Varianten unterscheiden sich in der Länge und haben daher unterschiedliche Massen (L 39 kDa, M 35 kDa, S 24 kDa) (A. R. Neurath et al., 1985). Für die Sekretion infektiöser Virionen ist besonders das L-Protein essenziell, da es mit den darunter liegenden Kapsidproteinen in Wechselwirkung treten kann. Zusätzlich ist es wahrscheinlich auch für die Rezeptorbindung bei der Infektion verantwortlich.

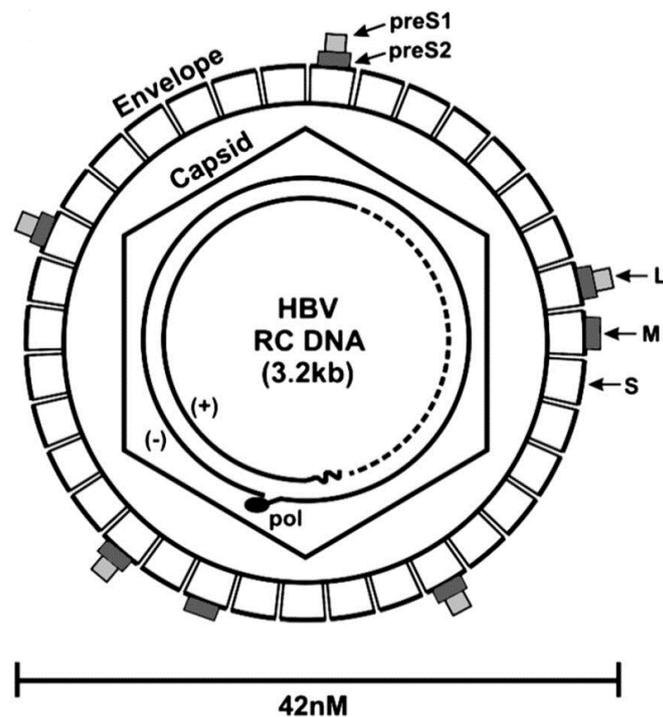


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des HBV Virions.

Erkennbar ist das teilweise doppelsträngige Genom im Kapsid (Capsid) mit dem gebundenen P-Protein (pol). Dann das als Hexagon gezeichnete, ikosaedrische Kapsid und außen die Membranhülle mit den Komponenten L-, M- und S-Protein. (aus Block et al. 2007 (T. M. Block et al., 2007))

Unter der Membranhülle liegt das Kapsid, welches einen Durchmesser von 28 nm hat und das virale Genom enthält. Das Kapsid besteht aus 240 Kopien des viralen Kapsidproteins Core.

Das Hbc ist ein 183 AS langes Protein (je nach Genotyp variiert die Länge) welches eine Masse von etwa 21 kDa hat. Das Protein wird in zwei Domänen unterteilt. Die ersten 140 AS bilden die sogenannte „assembly domain“, die für die Bildung der Dimere und des Kapsides unerlässlich ist. Dann folgt eine 9 AS lange Linkersequenz. Die zweite Domäne, 34 AS bis 36 AS lang, bildet die Argininreiche C-terminale Domäne (CTD). In dieser Domäne finden sich Nuclear Localization und Export Sequences und verschiedene Phosphorylierungsstellen, die bei der Reifung eine wichtige Rolle spielen und deren Bindung an die Polymerase für die reverse Transkription essentiell ist. Zusätzlich kann diese Domäne durch die vielen Argininseitenketten unspezifisch Polynukleotide binden (J. Z. Porterfield et al., 2010).

Das native, funktionelle Kapsid ist ein Ikosaeder aus 240 Monomeren mit der Triangulationsnummer $T=4$; dabei gibt es 12 pentamerische und 30 hexamerische Kapsomere (D. L. Caspar and A. Klug, 1962). Das Hbc hat eine stark konservierte Aminosäuresequenz (S. A. Wynne et al., 1999). Es bildet extrem stabile Dimere, welche als Bausteine des Kapsids fungieren (P. T. Wingfield et al., 1995). Die Dimere binden jeweils mit ihren N-terminalen Domänen aneinander und die beiden dort vorhandenen α -Helices bilden charakteristische Spikes auf der Kapsidoberfläche. Das Dimer ähnelt in seiner Form einer Spitzhacke, wobei die vier N-terminalen Helices der Monomere den Stiel bilden und der Rest den Kopf. Jede der vier Helices ist stark amphipatisch und die

hydrophoben Flächen assoziieren bei der Dimerbildung. Es wird dabei eine Fläche von etwa 2000 Å² (S. A. Wynne et al., 1999) bedeckt.

Im HBV Kapsid bilden vier unabhängige Monomere die ikosaedrische Repetiereinheit. In dieser Einheit wurden durch elektronenmikroskopische Untersuchung vier quasiäquivalente Konformationen des HBc gefunden, die sich in ihrer chemischen Umgebung und dadurch auch in ihrer Konformation leicht unterscheiden (X. Yu et al., 2013). Das Kapsid bildet eine Proteinhülle mit einem inneren Radius von 130 Å und einer Stärke von 20 Å. Die Helixbündel bilden auf dieser Hülle Spikes von etwa 25 Å Länge und 20 Å Dicke.

In vitro wurden T=3 Kapsidstrukturen beschrieben, die aus 180 Monomeren bestehen (A. Zlotnick et al., 1999), welche jedoch keine infektiösen Partikel bilden können und daher für das Virus in der Natur keine Rolle zu spielen scheinen.

Die C-terminale Domäne ist zur Bildung des Kapsids nicht essenziell. Sie interagiert jedoch mit dem Komplex aus viralem P-Protein und viraler prägenomischer RNA (pre genomic RNA, pgRNA), um den intrazellulären Zusammenbau korrekt zu initiieren und zu infektiösen Partikeln zu führen. Die Initiation der Kapsidbildung findet an einem Core-Hexamer (Trimer aus Dimeren) statt, dieser Vorgang wird als Nukleation bezeichnet (A. Zlotnick et al., 2015). Einige Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Kapsid, speziell die argininreiche C-terminale Domäne, auch bei der reversen Transkription der pgRNA in rcDNA eine Rolle spielt. Besonders die Argininpatches mit ihrer positiven Teilladung scheinen für den Prozess essentiell zu sein (E. B. Lewellyn and D. D. Loeb, 2011).

Es konnte verschiedentlich nachgewiesen werden, dass das HBc über die CTD an die episomale cccDNA bindet (C. T. Bock et al., 2001). Die Funktion dieser Bindung konnte noch nicht geklärt werden. Einige Eigenschaften dieser Bindung konnten jedoch bestimmt werden. So bindet Core an Cytosin-polyGuanosin-Inseln (CpG-Islands) in der cccDNA und erzeugt einen epigenetisch permissiven Zustand in der Zelle, wirkt hier also pro-viral (Y. H. Guo et al., 2011). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass Core bei der immuninduzierten Zerstörung von cccDNA durch zelluläre Deaminasen eine Adapterfunktion hat und hier eine antivirale Wirkung vermittelt (J. Lucifora et al., 2014).

Das Kapsid wird von zellulären Kinasen spezifisch phosphoryliert (A. Deroubaix et al., 2014), was die korrekte Interaktion mit dem IHBs-Protein in der zu äußerst liegenden Membranhülle und somit die Sekretion des Virions ermöglicht. Im sezernierten Virion befinden sich im Raum zwischen Kapsid und Membran zusätzlich geringe Mengen HBeAg. Es konnte bisher nicht festgestellt werden, welche Aufgabe dieses Protein an dieser Stelle übernimmt.

Das Genom des Virus liegt im Virion als ein teilweise doppelsträngiges DNA-Molekül in einer relaxiert zirkulären Form vor (relaxed circular DNA, rcDNA). Die DNA ist am 5'-Ende kovalent an das P-Protein gebunden und nur der (-)-Strang liegt in voller Länge vor. Der (+)-Strang ist nur

teilweise vorhanden in Abhängigkeit davon, wie viele Nukleotide bzw. beladene tRNAs zum Zeitpunkt der Sekretion aus der Zelle im Virion vorhanden waren. Die Länge des (+)-Stranges schwankt zwischen ~1600 Basen und maximal ~2600 Basen (H. Delius et al., 1983). Der fehlende Bereich hat eine Mindestlänge von ~700 Basen (H. Delius et al., 1983). Wie bereits erwähnt findet zudem eine Interaktion zwischen den Kapsidproteinen und dem DNA-Molekül statt. Die rcDNA ist transkriptionell nicht aktiv.

Die Persistenzform des Virusgenoms ist eine kovalent geschlossene, zirkuläre DNA (covalently closed circular DNA (cccDNA)), welches sich im Zellkern der Wirtszelle befindet. Die offenen Leseraster (ORFs) auf dem etwa 3200 bp umfassenden Genom (je nach Subtyp gibt es unterschiedliche Längen) sind wie folgt:

- **c** (Core Protein, Strukturprotein, Kapsidbildung)
- **pol** (P-Protein, reverse Transkriptase und virale Polymerase mit RNase Aktivität)
- **env** (Hüllprotein, Strukturprotein, drei Startcodons)
 - **preS1** (large HBs Protein, essentiell für Virionformation und Infektion)
 - **preS2** (medium HBs Protein)
 - **S** (small HBs Protein, Hauptkomponente der nichtinfektiösen sphärischen Partikel)
- **x** (X Protein, Nichtstrukturprotein, viele unterschiedliche Bindepartner und Effekte beschrieben, putatives Onkogen, wahrscheinlich regulatorische Funktion)
- **preC** (HBeAg) (Nichtstrukturprotein, posttranslational N-terminal gekürzt, sezerniertes Protein)

Die Proteine werden ausgehend von vier verschiedenen mRNAs übersetzt, die von der cccDNA transkribiert werden (Abbildung 1.5). Die längste virale mRNA, von der alle Proteine übersetzt werden können, ist die prägenomische RNA (pgRNA) mit etwa 3500 bp. Für diese RNA gibt es zwei Transkriptionsstarts, wodurch zwei Typen dieser RNA hergestellt werden können. Der Start der längeren RNA liegt vor dem Startcodon der preCore-Sequenz und erlaubt so die Translation des HBe-Proteins. Der zweite Start liegt in der preCore-Sequenz und erlaubt so nur die Translation von Core.

Die pgRNA (beide Varianten) kann die virale Polymerase (P-Protein) binden und im Kapsid verpackt werden und dient als Template für das Genom im Virion.

Es gibt zwei mRNAs mittlerer Länge (2400 bp und etwa 2100 bp), von denen erst ab der PräS2 bzw. S-Sequenz übersetzt wird. Die kürzeste mRNA mit 700 bp, codiert nur für das X Protein. Das Ende aller mRNAs liegt im Beginn der Core-Sequenz. Der Startpunkt der pgRNA liegt in der Enhancer 2 Region hinter der PräC Sequenz. Nur von der pgRNA können das Core und das P Protein hergestellt werden.

Erwähnenswert ist die Tatsache, dass der größte Teil des Genoms doppelt mit Information belegt ist (R. H. Miller et al., 1989). Das bedeutet, dass die gleiche Basensequenz, in ihrer Lesart durch

einen Frameshift geändert, für zwei unterschiedliche Proteine kodiert. Vom c Gen zum pol Gen liegt ein Frameshift +1 vor und vom pol zu den env Genen (preS1, preS2 und S) ebenfalls ein Frameshift +1. Das bedeutet, dass sich die 3er-Gruppen, die Kodons, in denen die DNA-Sequenz in Aminosäuren übersetzt wird, vollständig ändert und aus der gleichen DNA-Sequenz nicht mehr die gleiche Aminosäuresequenz entsteht. Beim HBV liegen in den überlappenden Bereichen nicht nur Füllsequenzen sondern funktionelle Teile (strukturelle Domänen und aktive Zentren) der Proteine. Bemerkenswert ist, dass die Hüllproteinsequenzen vollständig im Leserahmen der pol-Sequenz liegen. Auch Strukturbereiche des Genoms und funktionelle Sequenzen wie die Enhancerregionen oder die ε-Stelle kodieren für alternative funktionelle Proteinprodukte. Diese hohe Informationsdichte erlaubt es dem HBV, ein kleineres DNA-Molekül zu haben, als es durch Aneinanderreihung der Leserahmen möglich wäre.

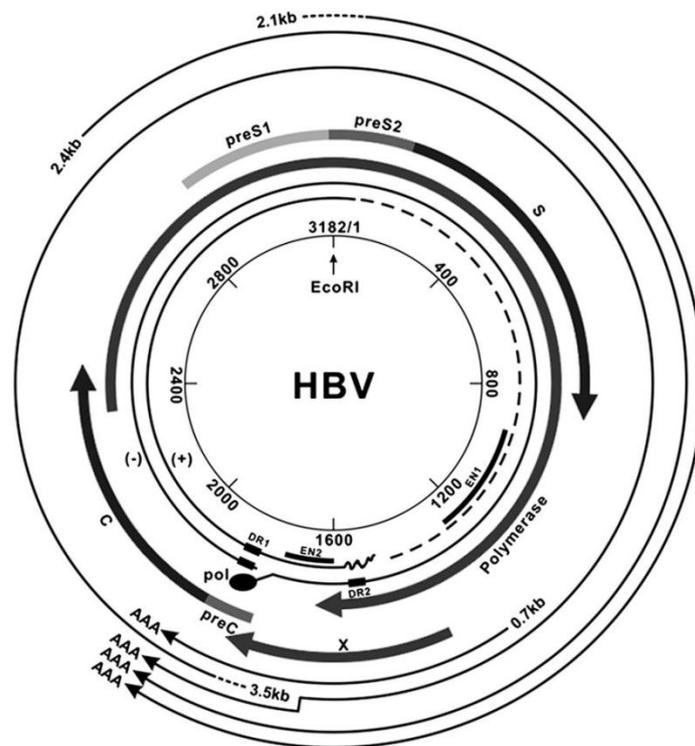


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des HBV Genoms in der rcDNA Form.

Die translatierten Proteinprodukte sind als konzentrische Pfeile angegeben. Die von der cccDNA transkribierten mRNAs sind als äußere Ringe eingezeichnet. Die dargestellte Basenzählung folgt der veralteten Regel, an der EcoRI Schnittstelle zu beginnen. Die aktuelle Zählweise beginnt in dieser Darstellung bei Base 1901 als 1. Die EcoRI läge demnach bei Base 1282. (aus Block et al., 2007 (T. M. Block et al., 2007))

Der genaue Infektionsweg ist für HBV nicht geklärt. Bekannt ist, dass bei der Infektion die HBs-Proteine der Virusmembran zuerst unspezifisch an Heparansulfatketten auf der Zelloberfläche und dann an spezifische Rezeptoren auf der Wirtszellmembran binden. Das Oberflächenprotein „Natrium-Taurocholat Cotransporting Peptide“ (NTCP) konnte als ein funktioneller Rezeptor identifiziert werden (H. Yan et al., 2012). Das Virus wird wahrscheinlich über einen caveolin-1 vermittelten Mechanismus internalisiert (A. Macovei et al., 2010). Alternativ wurde auch ein Mechanismus

postuliert, bei dem das Virion über Clathrin coated Pits endozytiert wird (H. C. Huang et al., 2012). Nach der Endozytose findet eine Membranfusion der Hüllproteine mit der Endosomenmembran statt und das Kapsid wird in das Zytoplasma entlassen. Dank des Nuclear Localization Signal (NLS) des HBc wird das Kapsid zum Nukleus transportiert. Am Zellkern angekommen wird das Kapsid in einen der Kernporenkomplexe transportiert (M. Kann et al., 1999), welchen es aber aufgrund seiner Größe nicht passieren kann. Der genaue Mechanismus hierbei ist unbekannt, aber das Genom (rcDNA mit P-Protein) wird aus dem Kapsid in den Zellkern transportiert und dort wird wahrscheinlich durch die virale Polymerase die rcDNA komplettiert (M. Kann et al., 1997). Danach wird das virale P-Protein entfernt und es entsteht proteinfreie DNA (protein free DNA, pfDNA). Zelluläre DNA-Reparaturenzyme ligieren dann den Strangbruch der rcDNA und erzeugen dadurch die ringförmige cccDNA (S. Schadler and E. Hildt, 2009), die wiederum als Transkriptionsmatrize für die viralen mRNAs dient. Die kürzeste mRNA kodiert für das X-Protein, welches in der Frühphase der Infektion hauptsächlich hergestellt wird und Einfluss auf den Zellzyklus und den Immunstatus der Zelle nimmt (A. Arzumanyan et al., 2011; S. Benhenda et al., 2013; C. M. Kim et al., 1991; M. M. Minor and B. L. Slagle, 2014; Z. Zhang et al., 2004). Es wird vermutet, dass durch diese Interaktionen eine optimale Umgebung für die Virusproduktion geschaffen wird.

Später, es ist nicht klar wann genau und ob es ein Signal gibt, werden auch die längeren mRNAs inklusive der pgRNA erzeugt. Von diesen langen Transkripten können die Oberflächenproteine, die virale Polymerase und das Kapsidprotein translatiert werden.

Die Oberflächenproteine werden im Endoplasmatischen Retikulum direkt in die Membran translatiert und es bilden sich die charakteristischen multivesicular bodies (MVBs) aus. In ihnen lagern die viralen Membranproteine als mizellenartige Partikel ohne Nucleokapsid, die sogenannten subviralen Partikel (SVBs). Die SVBs bestehen aus länglich filamentösen und sphärischen Partikeln (siehe Abbildung 1.3). Sie unterscheiden sich in ihrem Gehalt an L, M und S Varianten des HBs-Proteins, wobei nur die filamentösen Partikel L-HBs-Protein enthalten. Das Kompartiment, welches den MVB mit den SVPs enthält, stammt vom ER und dem Golgiapparat ab (R. Prange, 2012). Dieser Prozess findet unabhängig von der Behüllung der Virionen statt und etabliert sich auch in Zellen, die nur das HBs-Gen exprimieren.

Ebenfalls von der langen mRNA wird das HBc translatiert. Das HBc bildet sehr stabile Dimere im Cytoplasma und bildet das Kapsid um den P-Protein/pgRNA-Komplex, sobald dieser vorliegt. Nach dem initialen Vorlagenwechsel (template switch) und reverser Transkription des (–)-Stranges und dem zweiten Vorlagenwechsel ändert das Kapsid seine Konformation in Abhängigkeit von dem enthaltenen Nukleotidtyp (RNA, DNA) und das Phosphorylierungsmuster ändert sich durch Änderungen der Affinitäten zu zellulären Kinasen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Reifung und das reife Kapsid nimmt von hier an einen von zwei Wegen.

Zu einem geringen Teil können die reifen Kapside wieder zurück in den Nukleus transportiert werden, wo sie, analog zum Infektionsweg, entpackt werden und die rcDNA-Moleküle zu cccDNA-Molekülen vervollständigt werden und so den cccDNA-Pool aufbauen und vergrößern.

Der Hauptweg führt über die Interaktion mit den viralen Membranproteinen, um ein neues Virion zu erzeugen. Dies passiert im *Endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT)-Komplex an der Membranoberfläche von MVBs (R. Prange, 2012). Die reifen Virionen liegen in der Zelle ebenfalls in MVBs vor, jedoch nicht zusammen mit den SVPs. Wie die differenzielle Sortierung der Partikel erfolgt, ist bisher nicht geklärt. Die Virionen werden dann sezerniert, auf einem ebenfalls bisher nicht geklärten Weg, der jedoch wahrscheinlich Teile des ESCRT-Systems (C. Lambert et al., 2007) und möglicherweise des Autophagie-Systems (J. Inoue et al., 2015) einschließt.

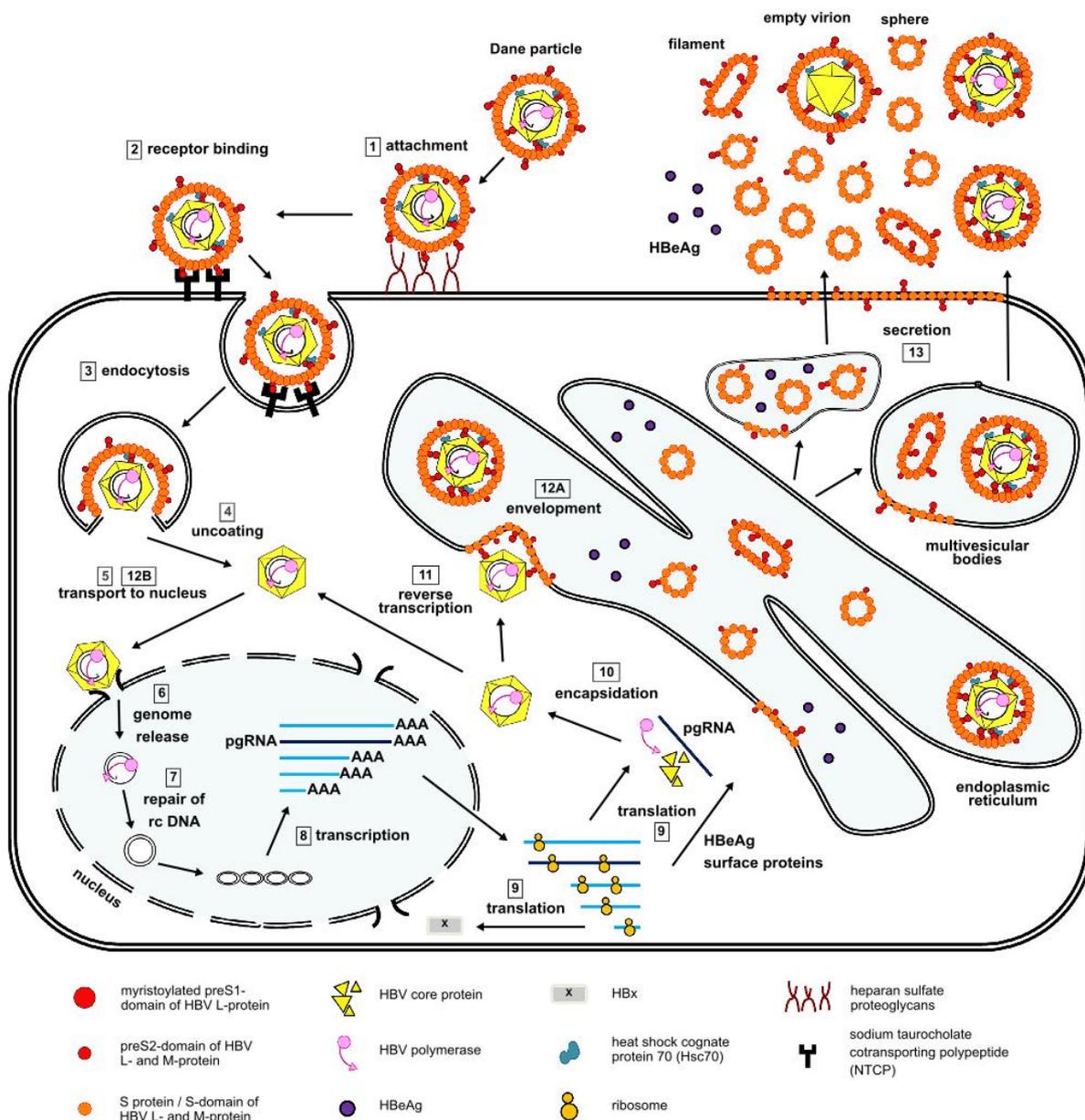


Abbildung 1.6: Replikationszyklus des Hepatitis B Virus.

Dargestellt ist ein Schema des Replikationszyklus des Hepatitis B Virus in einem Hepatozyt. Begonnen bei Attachment (1) und der Rezeptorbindung (2) und der Sekretion (13) sind alle Schritte konsekutiv nummeriert. Zu beachten ist die Divergenz nach der reversen Transkription (11) zum Behüllen (12A) und zum Kerntransport (12B). (aus Ko et al., 2017 (C. Ko et al., 2017))

1.1.3 Therapien

Es ist seit vielen Jahren eine proteinbasierte dreistufige Impfung verfügbar (enthält das HBs-Antigen), die eine robuste Immunität erzeugt. Vor kurzem wurde eine neue, zweistufige Impfung in den USA zugelassen (HEPLISAV-B, Dynavax (S. G. Lim, 2008)). Diese neue Impfung verspricht mit nur zwei Impfdosen im Abstand von einem Monat einen Impfschutz zu erreichen.

Es gibt ein ambitioniertes Programm der WHO, das zum Ziel hat, die Hepatitis B bis zum Jahr 2030 als Gefährdung der öffentlichen Gesundheit zu eliminieren (WHO, 2017). Experten bezweifeln allerdings, dass das gelingt, da bis heute nur 10% der Infizierten diagnostiziert und weniger als 5% behandelt sind.

Eine akute Hepatitis B Infektion bedarf in der Regel keiner gesonderten Therapie, neben einer allgemeinen symptomatischen, da sie bei adulten Patienten nach 1-2 Monaten abklingt und der Patient als geheilt gilt. Zwischen fünf und zehn Prozent der Infektionen bei adulten Patienten verlaufen allerdings als fulminante Hepatitis mit zum Teil fatalem Ausgang.

Ein bei adulten Patienten kleiner Anteil (5-10 %), bei Kindern und Jugendlichen höherer Anteil (>90 %), entwickelt eine chronische Hepatitis B Infektion. Die aktuell verfügbaren Therapien gegen die chronische Hepatitis B beschränken sich auf Ansätze zur viralen Kontrolle und Reduktion der Entzündung, bewirken aber nicht die Heilung der Infektion. Besonders die intranukleare, episodische cccDNA kann mit den verfügbaren Therapieansätzen nur reduziert aber nicht eliminiert werden.

Es ist vor allem die Interferontherapie weit verbreitet. Dazu wird biotechnologisch hergestelltes und auch PEGyliertes Interferon- α (pegIFN- α) verabreicht. Die Modifikation des peptidischen Wirkstoffes mit Polyethylenglykol (PEG) mit hohem Molekulargewicht sorgt für einen verlangsamten Abbau im Körper der Patienten. Das Zytokin hat normalerweise eine sehr kurze physiologische Serum-Halbwertszeit, bevor es von Proteasen zerstört wird.

IFN- α sorgt für die Aktivierung allgemeiner, antiviraler Mechanismen im menschlichen Körper und erhöht u.a. die Expression des Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse I Komplexes und induziert die Bildung eines modifizierten Proteasoms, des Immunoproteasoms, was für eine veränderte Präsentation intrazellulär hergestellter Peptide auf den MHC Klasse I Komplexen sorgt. Man vermutet, dass es dadurch für das Immunsystem insgesamt leichter gemacht wird, virusinfizierte Zellen und andere intrazelluläre Pathogene zu erkennen.

Der heutige therapeutische Goldstandard sind Nukleosid-/tid-Analoga (NA), welche auch als „Nucleosidic Reverse Transcriptase Inhibitor“ (NRTI) bezeichnet werden. Diese Substanzen ähneln in ihrer Molekülstruktur und Reaktivität den Nukleotiden oder Nukleosiden, die das Substrat für die virale reverse Transkriptase sind. Die Analoga lassen jedoch keine reguläre Reaktion zu, sondern hemmen kompetitiv in reversibler oder irreversibler Art. Dieser Ansatz ist besonders aus der HIV-Therapie bekannt und es werden teilweise Substanzen, die gegen HIV gerichtet sind, erfolgreich in der HBV Therapie verwendet. Beispiele hierfür sind Lamivudine (GlaxoSmithKline) und Tenofovir (Gilead). Ein HBV spezifisches NRTI ist Entecavir (Bristol-Myers Squibb).

Keiner der genannten Therapieansätze konnte bisher nachweislich das cccDNA Reservoir in den infizierten Zellen eliminieren und daher kommt es nach Absetzen einer solchen Therapie oder einer Immunsuppression des Patienten oft zu einem Rebound der HBV-Infektion. Sogar bei

Patienten, die Antikörper gegen das Virus entwickelt haben oder keine nachweisbare virale DNA mehr im Blut hatten, konnte unter bestimmten Bedingungen, z.B. bei Gabe von cluster of differentiation 20 (CD20) bindenden Antikörpern in der Lymphomtherapie bzw. Rheumatherapie, ein Rebound festgestellt werden (A. Jasmine Bullard et al., 2018).

1.2 Antivirale Abwehr des Immunsystems

Der menschliche Körper hat ein komplexes System zur Abwehr von Pathogenen allgemein und Viren im Besonderen entwickelt. Viren sind, neben einigen Bakterienarten, schwierig zu bekämpfen, da sie sich ausschließlich intrazellulär vermehren und nur das extrazelluläre Virion durch Antikörper zu neutralisieren ist. Spezialisierte Zellen des Immunsystems sind jedoch in der Lage, infizierte Zellen zu töten und dadurch die Infektion zu bekämpfen.

1.2.1 Antivirale Komponenten des angeborenen Immunsystems

Das angeborene oder innate Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie in der Verteidigung gegen Pathogene dar. Es besteht aus zellulären Komponenten, wie den Makrophagen und den Natural-Killer Zellen (NK-Zellen) und Proteinen, wie dem Komplementsystem, welches hauptsächlich in löslicher Form im Serum vorliegt. Diese Komponenten können körperfremde Zellen von körpereigenen unterscheiden und unmittelbar eliminieren. Oft werden eingedrungene Pathogene von diesen Komponenten neutralisiert, bevor es zur Etablierung einer Infektion kommt.

1.2.1.1 *Detektion einer viralen Infektion*

Die Unterscheidung zwischen „selbst“ und „fremd“ des angeborenen Immunsystems erfolgt hauptsächlich über Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs) die pathogenassoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) erkennen. Diese Rezeptoren aktivieren die Expression von MHC-Molekülen, kostimulatorischen Molekülen, Entzündungssignalmolekülen wie Zytokinen und Chemokinen und finden sich auf verschiedenen professionellen Immunzellen und nicht-Immunzellen.

PAMPs lassen sich einerseits in bestimmte molekulare Muster (repetitive Strukturen, z.B. Lipopolysaccharide (LPS); prokaryotenspezifische Moleküle, z.B. Formylmethionin (fMet) in bakteriellen Polypeptiden; virusspezifische Moleküle, z.B. doppelsträngige RNA (dsRNA)) und andererseits in die Lokalisation von Molekülen in Kompartimenten, an denen sie bei gesunden Zellen nicht sein sollten (z.B. DNA im Zytoplasma oder in Endolysosomen), einteilen.

PRRs werden abhängig von ihren strukturellen Eigenschaften in Gruppen eingeteilt. Die Gruppen umfassen die Toll like Rezeptoren (TLRs) (R. Medzhitov et al., 1997; K. Murphy and C. Weaver, 2017; A. Poltorak et al., 1998), RIG-I like Rezeptoren (RLRs), NOD like Rezeptoren (NLRs)

(Inohara et al., 2005), C-Typ Lektin Rezeptoren (CLRs) sowie zytosolische DNA Rezeptoren, zu denen auch Stimulator of Interferon Genes (STING) gehört (P. Nakhaei et al., 2010; S. Pandey et al., 2014). In der jüngeren Vergangenheit wurde PRRs auch die Fähigkeit nachgewiesen, sog. damage associated molecular patterns (DAMPs) zu erkennen, also Schäden an zellulären Komponenten, verursacht durch Pathogene (D. Tang et al., 2012).

PRRs befinden sich an unterschiedlichen Stellen einer Zelle und erkennen jeweils ein spezifisches molekulares Muster, entsprechend der Lokalisation. Als für die Erkennung von HBV besonders relevant hat sich der TLR-4 Rezeptor herausgestellt.

Die Expression der TLRs sowie der PRRs allgemein ist streng reguliert und breite Repertoires sind vor allem in Zellen des Immunsystems zu finden, aber auch parenchymale Zellen verschiedener Organe tragen PRRs (D. Droemann et al., 2003). So exprimieren zum Beispiel Hepatozyten auch TLRs, da die Leber als Pforte vom Verdauungstrakt zum Organismus fungiert (R. Broering et al., 2011).

Wenn virale Komponenten wie z.B. dsRNA im Zytoplasma (Rezeptoren: MDA-5, RIG-I) oder im Endosom (Rezeptor: TLR-3) erkannt werden, werden die Transkriptionsfaktoren Interferon Regulatory Factor (IRF) 3 und IRF7 aktiviert, die dann zur Transkription und Expression von IFN- α (s.o.) und IFN- β führen (K. Murphy and C. Weaver, 2017). Der so aktivierte Signalweg wird als STAT-Signalweg bezeichnet, weil er das Signal-Transducing Activator of Transcription (STAT) Protein aktiviert und einer von zwei Hauptsignalwegen der antiviralen Immunantwort ist.

Der andere Hauptsignalweg für die Induktion antiviraler Antworten ist der Signalweg, der den Nuclear factor κ B (NF κ B) aktiviert. Durch ihn werden unter anderem die Proteine und Chemokine IL-8, IL-6, A20 und IL-1 β induziert. All diese bewirken direkt oder indirekt einen antiviralen Zustand in der Zelle.

1.2.1.2 Allgemeine Antivirale Reaktionen

Interferone beeinflussen alle Zellen im Körper und lösen eine allgemeine antivirale Reaktion aus. Diese Reaktion ist nicht virusspezifisch und wird daher dem angeborenen Immunsystem zugeordnet.

Die antiviralen Interferone oder auch Typ I Interferone sind IFN- α , IFN- β und IFN- ω . Diese werden nach einer viralen Infektion und deren Detektion (durch TLRs oder andere Rezeptoren) von fast allen Zellen des menschlichen Körpers produziert. Sie wirken autokrin und parakrin, indem sie an den Interferon Rezeptor binden, den alle Zellen tragen.

Dieser Rezeptor besteht aus zwei Membranproteinen IFNAR1 und IFNAR2, die nach IFN-Bindung dimerisieren und eine gekoppelte Janus Kinase (JAK) aktivieren (J. Piehler et al., 2012). Die aktivierte JAK aktiviert durch Phosphorylierung die *Signal-Transducing Activators of Transcription-Proteine 1* und 2 (STAT1 und STAT2), die dann homo- und heterodimere bilden und in den Nukleus translozieren. Dort aktivieren sie die Transkription mehrerer Proteine der sog. *IFN response*

factors (IRFs). Eines dieser Proteine ist die 2'-5'-Oligoadenylatsynthase, die 2'-5'-verknüpfte Oligomere aus Adenosintriphosphat bildet, die dann die Expression von Endoribonukleasen induzieren. Diese Endoribonukleasen verdauen virale RNA. Zusätzlich wird auch das Protein Mx induziert, welches in der Abwehr des Influenzavirus eine große Rolle spielt. Ein durch IFN bzw. den STAT-Weg induziertes, antivirales Chemokin ist IP10, ein Membranprotein, welches zu einer Akkumulation von Immunzellen um die exprimierende Zelle führt.

Die Interferone stellen zudem eine Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem dar, indem sie die Produktion von MHC Klasse I Molekülen verstärken.

1.2.2 Antivirale Mechanismen des adaptiven Immunsystems

Wenn eine Infektion nicht vom angeborenen Immunsystem neutralisiert werden kann, sorgt die Ausschüttung von Zytokinen dafür, dass das adaptive Immunsystem aktiviert wird. Diese Aktivierung dauert mehrere Tage. Bevor das adaptive Immunsystem in Aktion tritt, findet eine Reihe von komplexen Stimulations- und Selektionsprozessen statt.

Das adaptive Immunsystem bzw. die adaptive Immunantwort wird in eine antikörperbasierte (humorale) und eine zelluläre Antwort eingeteilt. In dieser Arbeit wurde besonders die zelluläre Antwort als Indikator für Effekte von Behandlungen genutzt.

1.2.2.1 *Spezifische antivirale Reaktionen*

Die humorale Immunantwort stellt den Teil der Immunantwort dar, der nicht direkt durch Zellen vermittelt wird und besteht u.a. aus der Produktion und Sekretion von Antikörpern durch Plasmazellen. Die Entstehung von Plasmazellen aus reifen B-Zellen wird über den B-Zell-Rezeptor (BCR) initiiert. Dieser Rezeptor ähnelt in seiner Struktur den Antikörpern und wird auch als Oberflächenimmunglobulin (surface Immunglobulin, sIg) bezeichnet, da er in der Membran der B-Zelle verankert ist. Wie alle Immunglobuline entsteht der BCR auch durch die Umlagerung der V, D und J Gensegmente bei der somatischen DNA-Rekombination in der Entstehungsphase der Zellen im Knochenmark. Zusätzlich tragen physikalische Effekte bei der Anlagerung der leichten und der schweren Kette des Antikörpers zur Vielfalt der Antigenbindestelle bei und ermöglichen so eine quasi uneingeschränkte Vielfalt der Antikörper-Spezifität. Um die Produktion autoreaktiver Antikörper zu verhindern, wird bei B-Zellen eine strenge Selektion durchgeführt, bei der autoreaktive Zellen bereits im Knochenmark abgetötet werden (zentrale Toleranz).

Wenn die unreifen B-Zellen diese Selektion durchlaufen haben, wandern sie in die Peripherie und werden noch einmal auf Autoreaktivität positiv selektiert. Das bedeutet, dass Zellen die jetzt Antigene erkennen, körpereigene Ziele haben und getötet werden müssen. Dies bezeichnet man als periphere Toleranz. Erst wenn die Zellen dies auch durchlaufen haben, ohne aktiviert zu werden

und in Apoptose zu gehen, können sie durch Antigenbindung aktiviert werden. In dieser Form liegen B-Zellen in einem nicht infizierten Menschen vor.

In der Peripherie werden B-Zellen nach Bindung eines Liganden an ihren spezifischen B-Zell-Rezeptor und Kostimulation der BCR-Komplexmoleküle CD19 und CD21 aktiviert. CD21 ist ein Rezeptor für die gespaltenen Formen von Complementprotein 3 (C3d und C3dg), was sich auch auf den Oberflächen der am BCR gebundenen Pathogene bzw. Antigene befindet. CD21 ist mit CD19 assoziiert und dieses Dimer wird in die Nähe des aktivierten BCRs gebracht. Die intrazelluläre Domäne des BCRs hat Kinaseaktivität und phosphoryliert CD19, wodurch eine aktivierende Signalkaskade angestoßen wird.

Nach Bindung des Antigens und den zusätzlichen Signalen internalisiert die B-Zelle das an den BCR gebundene Antigen, um es im Endolysosom abzubauen und die resultierenden Peptide auf MHC Klasse II Komplexe zu laden und auf der Zellmembran zu präsentieren. Hier sieht man eine zusätzliche Funktion der B-Zellen, nämlich auch Antigen präsentierende Zellen (antigen presenting cells, APCs) zu sein. Mit dieser Beladung migrieren die B-Zellen in Lymphknoten, wo sie auf folliculäre T-Helferzellen (T_{FH} -Zellen) treffen. Diese Zellen prüfen die MHC Klasse II Komplexe auf den B-Zellen, ob sie mit ihren T-Zellrezeptoren (TCRs) ihr spezifisches Antigen erkennen. Findet eine ausreichend starke Bindung statt wird die B-Zelle durch Bindung von CD40 Ligand (CD40L) auf der T-Zelle an CD40 auf der B-Zelle und die Ausschüttung von IL-21, IL-6, TGF- β , LFN- γ und IL-4 durch die T_{FH} -Zelle aktiviert und reift zum Plasmablasten, der sich teilt und einen Primärfollikel bildet, aus dem Plasmazellen und B-Gedächtniszellen hervorgehen.

Ab dem Stadium des Plasmablasten sind die Zellen in der Lage, Antikörper zu sezernieren. Zunächst produzieren diese Zellen immer Antikörper der IgD- und IgM-Isotypen und abhängig von den Signalen, die die T_{FH} -Zellen bei der Reifung abgeben, findet ein Isotypenwechsel hin zu IgA, IgE oder IgG Antikörpern statt. Wenn der Isotypenwechsel abgeschlossen ist, wandern einige B-Zellen aus den Lymphknoten aus und differenzieren zu Plasmazellen, die Antikörper in großen Mengen herstellen und sezernieren. Andere Zellen produzieren keine löslichen Antikörper, sondern weiterhin membrangebundene Immunglobuline, sind sehr langlebig und teilen sich nur sehr langsam. Diese Zellen werden als B-Gedächtniszellen bezeichnet (Y. J. Liu et al., 1991).

Die zelluläre Immunantwort wird durch T-Zellen bewirkt und basiert auf der Präsentation von prozessierten Proteinfragmenten (Peptiden) auf MHC Molekülen und Erkennung dieser Peptide durch spezifische T-Zell-Rezeptoren (TCRs).

Diese Mechanismen werden im Folgenden detaillierter beschrieben, da sie in der Arbeit eine zentrale Rolle spielen.

1.2.2.2 Der MHC Klasse I Komplex

Wie erwähnt sind in der zellulären Immunantwort besonders MHC Moleküle von Bedeutung. Hierbei sind die MHC Klasse I Moleküle dafür zuständig, dem Immunsystem anzuzeigen, dass eine Zelle ordnungsgemäß funktioniert. Der MHC Klasse II Komplex wird fast ausschließlich von Antigen-Präsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen exprimiert. Er dient primär dazu, phagozytiertes extrazelluläres Antigen zu präsentieren.

Der MHC Klasse I Komplex wird von allen Zellen des Körpers exprimiert und T-Zellen prüfen ständig, ob abnorme Peptide präsentiert werden. Die präsentierten Peptide zeigen ein Abbild dessen, was in der Zelle auf Proteinebene vorhanden ist bzw. aktuell produziert wird. Hierzu ist die Beladung der MHC Klasse I Komplexe sehr eng an das Proteinhomöostasesystem der Zelle gebunden. Wie später noch im Detail beschrieben wird, ist das Proteasom bzw. sind die Proteasome der Zelle dafür zuständig, nicht mehr benötigte, gealterte oder fehlerhafte Proteinprodukte (sog. DRIPs, defective ribosomal products) abzubauen. Die entstehenden Oligopeptide von unterschiedlicher Länge, je nach Lage der erkannten Schnittstellen, werden in einer Bindekerbe auf dem MHC Molekül gebunden und dort dann den T-Zellen präsentiert.

Da die MHC Gensequenzen nicht, wie die Antikörper- und TCR-Sequenzen, rekombiniert werden, ist die Ladungsverteilung und die chemische Umgebung in dieser Kerbe für jede allelische Variante konstant. Die chemische Umgebung lässt die Bindung unterschiedlicher Peptide zu, jedoch gibt es einige Einschränkungen. Die Ausrichtung des Peptides in der Bindekerbe ist vorgegeben, denn das MHC Molekül hat spezifische Affinitäten für den Amino- und den Carboxyterminus eines beliebigen gebundenen Peptides. Analysen von gebundenen Peptiden haben gezeigt, dass es sog. Ankerpositionen gibt und dass die Eigenschaften der Aminosäuren an diesen Stellen für ein gegebenes MHC Klasse I Molekül sehr ähnlich sind (polar vs. unpolar; räumlich groß vs. klein; negative vs. positive Ladung). Die Länge der gebundenen Peptide bewegt sich zwischen 9 und 13 Aminosäuren. Dies wird bedingt durch die Länge der Bindekerbe, die eine gewisse Mindestlänge vorgibt, damit Amino- und Carboxyterminus binden können und andererseits damit, dass längere Peptide mit ihrem Peptidrückgrat außerhalb der Kerbe Schleifen bilden oder am Carboxyterminus heraus ragen, was erkannt wird und diese dann entfernt.

Das beladene MHC Molekül wird dann an die Zelloberfläche transportiert. MHC-Peptidkomplexe („beladene MHCs“) haben dabei eine längere Verweildauer auf der Zelle als unbeladene MHCs. Das MHC Klasse I Molekül besteht beim Menschen aus einem Heterodimer aus zwei Aminosäureketten. Die schwere, längere Kette hat drei Domänen (α_1 , α_2 und α_3) und ist in der Membran verankert. Die kürzere Kette bildet eine Domäne, das β_2 -Mikroglobulin, welches keinen Membrananker besitzt und über Disulfidbrücken an die schwere Kette bindet. Beim Menschen bezeichnet man das Protein, welches die MHC-Funktion ausübt als humanes Leukozytenantigen (human leucocyte antigen, HLA). Es gibt dabei drei unterschiedliche Moleküle, die als MHC Klasse I

fungieren, HLA-A, HLA-B und HLA-C. Diese liegen in unterschiedlichen Varianten vor und werden allelisch vererbt, d.h. jeder Mensch trägt sechs HLA-Gene, jeweils drei vom Vater und drei von der Mutter. Diese Gene rekombinieren nicht, wie die TCR- und Antikörpergene, sind allerdings in großer Vielfalt in der Population vorhanden.

1.2.2.3 Beladung des MHC Klasse I Komplexes

Die Beladung des MHC Klasse I Komplexes erfolgt im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER), da das MHC-Molekül als Membranprotein von den Ribosomen auf dem rauen ER direkt in die Membran synthetisiert wird. Nach der abgeschlossenen Peptidkettensynthese der schweren Kette wird das noch ungefaltete Protein von Calnexin, einem Chaperon und ERp57 gebunden. Calnexin stabilisiert die schwere Kette während ERp57 die Bildung von Disulfidbrücken zwischen dem β_2 -Mikroglobulin und der schweren Kette katalysiert. Diese Bindung verursacht eine Konformationsänderung der schweren Kette, was die Bindungstasche zugänglich macht. Calnexin dissoziiert dann von dem Komplex und Calretikulin bindet daran.

Kurze Peptide, die hauptsächlich vom Proteasom erzeugt wurden, aber auch von anderen Peptidasen in der Zelle stammen können, werden vom *transporter associated with antigen processing* (TAP) Komplex kontinuierlich in das ER-Lumen transportiert. Der TAP Komplex besteht aus zwei Komponenten, den membrangebundenen Proteinen TAP1 und TAP2, welche auf der ER-Membran sitzen und bildet zusammen mit dem MHC-Assemblykomplex, Tapasin und Calretikulin den Peptide-Loading Complex (PLC) (Abbildung 1.7). Die TAP Proteine binden Peptide aus dem Zytoplasma und transportieren sie aktiv (d.h. es wird ATP dabei verbraucht) ins ER-Lumen und dort direkt auf das MHC-Molekül.

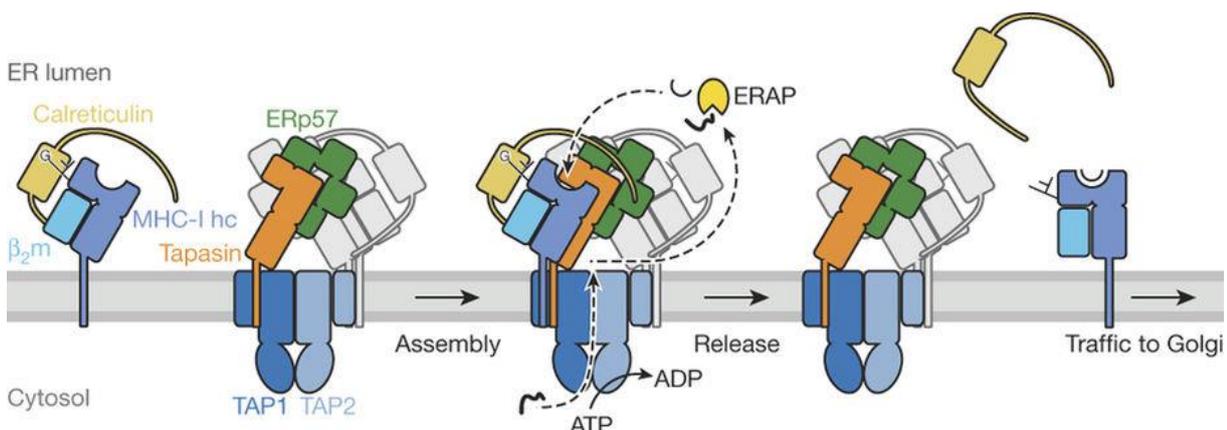


Abbildung 1.7: Der MHC Klasse I Peptidladekomplex (PLC) in einer schematischen Darstellung.

Im ER-Lumen wird das MHC-Heterodimer von Calretikulin zum PLC geführt. Dort bindet es an Tapasin und ERp57 und die TAP-Transporter werden aktiviert. Peptide werden unter ATP-Verbrauch ins ER-Lumen transloziert und von dem Enzym ERAP so gekürzt, dass es in die MHC I-Bindetasche passt. Nach erfolgter Bindung an das MHC dissoziiert der Komplex und das beladene MHC wird über den Golgi zur Zelloberfläche transportiert. (aus Blees et al., 2017 (A. Blees et al., 2017))

Die TAP-Proteine transportieren präferenziell Peptide von acht bis fünfzehn Aminosäuren (L. Sompayrac, 2008) mit hydrophoben oder basischen Seitenketten am Carboxyterminus und kein

Prolin in den ersten drei Positionen (K. Murphy and C. Weaver, 2017). Nach der Translokation und Positionierung in der Bindetasche werden die Peptide, die zu lang für die Bindetasche des MHC sind, von der Protease ERAP gekürzt, da die Bindetasche beim MHC Klasse I Molekül an beiden Enden geschlossen ist und keinen Überhang gestattet.

Nicht alle Peptide korrekter Länge tragen zu den MHC-Ankerpositionen passende Aminosäureseitenketten, deshalb werden nicht alle generierten Peptide mit hoher Affinität gebunden. Um unspezifische Antigenpräsentation zu vermeiden, werden freie Peptide sehr effektiv wieder aus dem ER-Lumen heraustransportiert und dem zellulären Aminosäuremetabolismus zugeführt.

1.2.2.4 T-Zellen

T-Zellen sind diejenigen Zellen, die die MHC Klasse I und II Komplexe von anderen Zellen binden und die Identität der präsentierten Antigene kontrollieren. Die Bezeichnung T-Zellen rührt da her, dass diese Zellen im Thymus auf ihre Spezifität gegen körpereigene Antigene geprüft werden und nur, wenn sie körpereigene Antigene nicht erkennen, in die Peripherie entlassen werden (negative Selektion).

Es wurden unterschiedliche Gruppen von T-Zellen gefunden, die sich in ihren Aufgaben und Fähigkeiten unterscheiden. Es werden zwei Gruppen unterschieden, T-Zellen, die das CD4-Molekül auf ihrer Oberfläche tragen und T-Zellen, die das CD8-Molekül auf ihrer Oberfläche tragen. T-Zellen, die das CD4-Molekül auf ihrer Oberfläche tragen, binden den MHC Klasse II Komplex, also Zellen, die fremde Antigene präsentieren (DCs, Makrophagen), die sie per Endozytose aufgenommen haben. Diese Zellen schütten hauptsächlich Botenstoffe aus und aktivieren andere Komponenten des Immunsystems. Sie werden auch T-Helferzellen (T_H -Zellen) genannt und es gibt sie als CD4- T_H1 , CD4- T_H2 und CD4- T_H17 -Zellen. Zusätzlich gibt es noch regulatorische T-Zellen (T_{reg}), die auch CD4 exprimieren und hemmend auf das Immunsystem wirken. Sie sind in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt.

Die CD8 exprimierenden T-Zellen werden auch zytotoxische T-Zellen oder Effektor-T-Zellen genannt. Diese Zellen binden den MHC Klasse I:Peptid-Komplex mit ihrem T-Zellrezeptor (TCR) und mit Hilfe ihres CD8-Korezeptors, der mit der konstanten Domäne des MHC Klasse I Moleküls interagiert. Diese T-Zellen sind besonders in die antivirale Antwort des adaptiven Immunsystems eingebunden, da sie in der Lage sind, infizierte körpereigene Zellen durch Ausschüttung von proapoptotischen Signalmolekülen zu töten.

Nach erfolgter Bindung des TCR mit MHC Klasse I und CD8 in ausreichender Zahl, bildet sich eine immunologische Synapse. In den synaptischen Spalt werden Signalmoleküle aus Vesikeln, die im Inneren der T-Zelle lagerten, entlassen und lösen so in der gebundenen Zelle Apoptose, die organisierte Selbstzerstörung der Zelle, aus.

1.2.2.5 Der T-Zellrezeptorkomplex

Das TCR-Molekül befindet sich auf allen T-Zellen des Menschen und erkennt MHC Klasse I und Klasse II-Peptidkomplexe. Ob es jedoch zu einer Aktivierung der T-Zelle kommt, hängt von mehreren Faktoren ab. Die Korezeptoren, die auf der Oberfläche der jeweiligen T-Zelle vorhanden sind, spielen dabei eine Rolle, wie auch die Intensität des Signals.

Zellen, die durch MHC Klasse I:Peptid-Komplexe aktivierbar sind, zeichnen sich primär dadurch aus, dass auf ihrer Oberfläche neben dem TCR auch das CD8 Molekül, ein Korezeptor des TCR, zu finden ist. Die MHC Bindedomäne aus α - und β -Kette des TCR ist jedoch nicht in der Lage, Signale in das Innere der Zelle zu vermitteln. Die Transmembrandomänen ragen nur etwa drei Aminosäuren weit in das Zytoplasma. Um Signale zu vermitteln, sind an die TCR α - und β -Kette auf der T-Zelle verschiedene weitere Membranproteine assoziiert, die gemeinsam als CD3 bezeichnet werden (

Abbildung 1.8). Diese Proteine sind γ , δ , ϵ , ϵ , ζ , ζ . Hierbei haben die ϵ -Proteine, sowie γ - und δ -Proteine extra- und intrazelluläre Domänen.

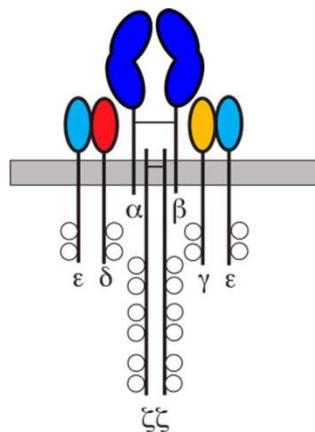


Abbildung 1.8: Schematische Struktur des T-Zellrezeptorkomplexes

Dargestellt ist der TCR (Dunkelblau: α , β) mit den Bestandteilen des CD3-Komplexes (Gelb, γ ; Rot, δ , Hellblau, ϵ) und den zwei ζ -Ketten. Die α - und β - sowie die zwei ζ -Ketten sind jeweils mit einer Disulfidbrücke verbunden. ITAMs sind durch jeweils zwei leere Kreise verdeutlicht. (aus Zimmermann et al. 2017 (K. Zimmermann et al., 2017))

Die intrazellulären Domänen tragen sog. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) Sequenzen. Die ζ -Ketten, die keine extrazelluläre Domäne haben, tragen sogar drei ITAMs. Erkennt der TCR sein Antigen auf einer Zelle in ausreichend großer Zahl und mit ausreichender Affinität, so werden die TCRs im Bereich der Kontaktfläche in räumlicher Nähe zueinander aktiviert. Zusätzlich bindet für jeden TCR auch ein Korezeptormolekül, hier CD8, an den MHC-Komplex. Durch die Zusammenlagerung der TCRs mit ihrer CD3-Entourage und den CD8-Molekülen, können die ITAMs durch die Kinasen Fyn und Lck phosphoryliert werden und lösen die Signalkaskade, angefangen bei ZAP-70, aus. Ultimativ führt diese Signalkaskade zur Aktivierung der T-Zelle und zur Zerstörung der Zielzelle. Die geschieht durch Ausschüttung von Granzym B und Perforin enthaltenden Vesikeln, die die Zellmembran der Zielzelle durchdringen und dort Apoptose

auslösen. Alternativ kann auch der Fas-Ligand auf der Oberfläche der T-Zelle an Fas auf der Zielzelle binden und auf diesem Wege die Apoptose auslösen.

In dieser Arbeit wurden T-Zellen als Indikator der Peptidpräsentation eingesetzt. Diese T-Zellen trugen TCRs die von Wisskirchen et al. (K. Wisskirchen et al., 2017) identifiziert wurden. Gefunden wurden die Rezeptoren in Patienten mit einer ausgeheilten Hepatitis B Virus Infektion. Sie sind gegen ein Peptid von AS18 bis AS27 aus der Core Aminosäuresequenz (C18-27) reaktiv. Diese TCRs wurden in Vektoren kloniert und mit deren Hilfe wurden retrovirale Vektoren hergestellt, mit denen T-Zellen eines Spenders transduziert werden können, um diesen TCR zu exprimieren. In den hier verwendeten, rekombinanten TCRs wurde die konstante Domäne der β -Kette durch die Domäne aus der Maus ersetzt, um eine spätere durchflusszytometrische Identifikation der transduzierten Zellen zu ermöglichen.

1.3 Proteinhomeostase

In eukaryotischen Zellen werden in jeder Sekunde viele tausend Proteine hergestellt, die sich korrekt falten müssen und dann zu dem Ort in der Zelle transportiert werden, wo sie ihre Aufgabe verrichten sollen. Aber viele Proteine werden nur selten und nur für eine sehr bestimmte Aufgabe gebraucht, davor und danach nicht. Andere Proteine altern, während sie Reaktionen katalysieren oder oxidieren spontan. Diese nicht mehr funktionellen oder benötigten Proteine werden von der Zelle in einem genau regulierten Prozess abgebaut. Auch Proteinprodukte, die spontan oder aufgrund äußerer Einflüsse in großer Zahl falsch falten, werden von der Zelle erkannt und abgebaut.

1.3.1 Proteasomaler Proteinabbau

Der Hauptabbauweg für Proteine in Zellen führt über das Proteasom, das Proteine in Oligopeptide unterschiedlicher Länge spaltet. Das Proteasom ist ein großes intrazelluläres Makromolekül (2,5 MDa), das aus einer Kerneinheit (central particle, CP; 20S Untereinheit) und zwei kleineren regulatorischen Einheiten (regulatory particle, RP; 19S Untereinheit) zusammengesetzt ist. Die Kerneinheit besteht aus vier Ringen mit jeweils sieben Untereinheiten, die Untereinheiten werden mit α 1- α 7 bzw. β 1- β 7 bezeichnet. Die Ringe sind konzentrisch aufeinander gestapelt mit zwei α -Ringen in der Mitte und an den Enden jeweils einem β -Ring und bilden den CP. Die RPs setzen sich oben und unten auf diesen Stapel. Das aktive Zentrum des Proteasoms befindet sich im Inneren der durch die Ringe erzeugten Fass-ähnlichen Struktur. Das Reaktive Zentrum bildet bei allen Untereinheiten ein N-terminales Threonin als Nukleophil. Die β 1-Untereinheit zeigt Caspase-ähnliche Aktivität, die β 2-Untereinheit Trypsin-ähnliche und die β 5-Untereinheit Chymotrypsin-ähnliche

Aktivität. Der RP erfüllt Kontrollfunktionen und vermittelt auch die Entfaltung der abzubauenen Proteine in das Innere des Proteasoms (J. M. Berg et al., 2006).

Das Proteasom hat keine Substratspezifität. Die abzubauenen Proteine werden in der Zelle mit dem Protein Ubiquitin markiert und dann zum Proteasom transportiert und dort abgebaut. Die Modifikation eines Proteins mit Ubiquitin läuft allgemein über die E1-Ligase, die das Ubiquitinmolekül aktiviert, die E2-Ligase, die das Ubiquitinmolekül bindet und über eine Vielzahl an E3-Ligasen, die den spezifischen Transfer des aktivierten Ubiquitins von der E2-Ligase auf das Zielprotein vermittelt (Abbildung 1.9). Mono-Ubiquitinierung signalisiert einen Schutz vor Abbau, poly-Ubiquitinierung signalisiert den Abbau des derart modifizierten Moleküls. Mit diesem Mechanismus wird fast der gesamte Proteinabbau in der Zelle bewältigt und er ist essentiell für den Zellzyklus, Signaltransduktion, Zelltod, Metabolismus und Proteinqualitätskontrolle (K. Tanaka, 2009).

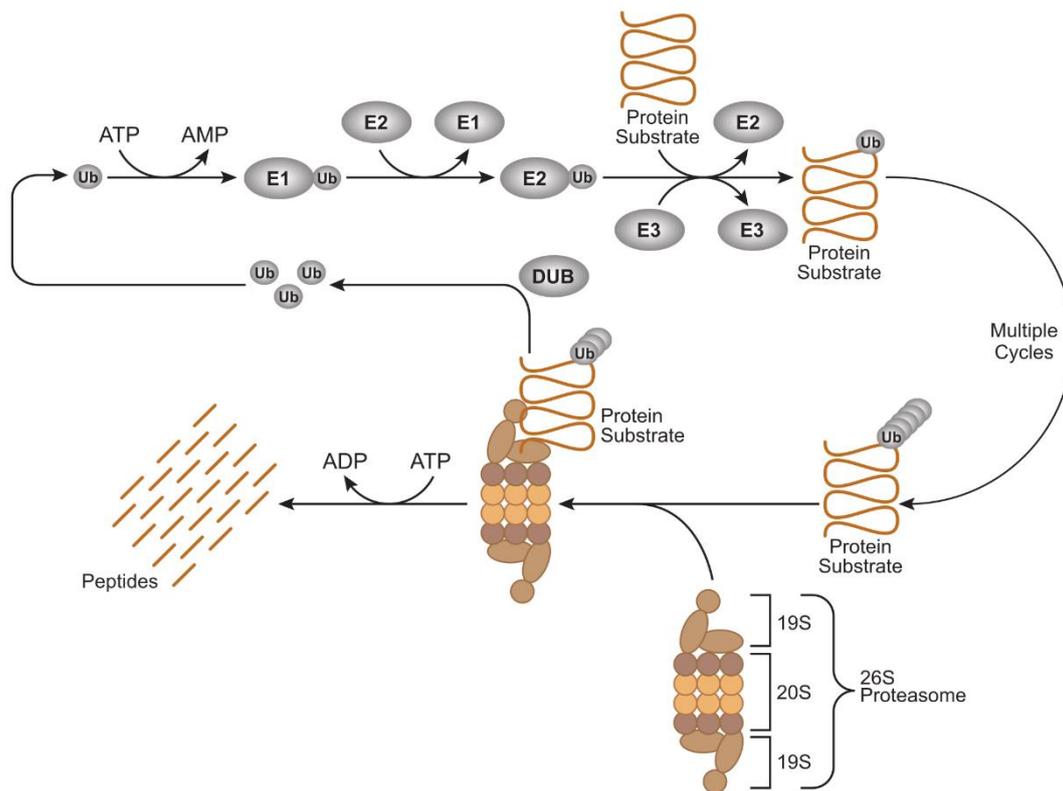


Abbildung 1.9: Das Ubiquitin-Proteasom-System in einer Übersicht.

Zunächst wird ein Ubiquitinmonomer (Ub) durch E1 und E2 aktiviert bevor es von einer spezifischen Ligase (E3) auf ein Zielprotein übertragen wird. Dies passiert in mehreren Zyklen wodurch verzweigte Ubiquitinketten am Substrat entstehen. Das mit Ub markierte Substrat wird von ubiquitinabhängigen Transportern zum 26S-Proteasom transloziert und dort in Peptide zerlegt. Die Ubiquitinmonomere werden jedoch nicht zerstört, sondern von deubiquitinierenden Enzymen (DUB) abgetrennt und als Monomere ins Zytoplasma entlassen. (©Cell Signaling Technology, 2014)

1.3.2 Alternative Proteinabbauwege

Neben dem Proteasom gibt es noch eine weitere Maschinerie in der Zelle, die auf den Abbau von Proteinen spezialisiert ist, das Lysosom. Bis vor einigen Jahren dachte man, dass nur endozytierte Vesikel in Kontakt mit dem Lysosom kommen, welches ein spezialisiertes, Degradationskompartiment im Zytoplasma ist. Das Lysosom ist durch eine Membran vom Zytoplasma getrennt und aktive Protonenpumpen sorgen für einen sehr niedrigen pH in diesem Kompartiment (pH~4,6). Dies ist notwendig für die Funktion der lysosomalen Hydrolasen, die ihr pH-Optimum bei diesem pH-Wert haben. Proteine, die in diese Umgebung kommen, werden nicht nur von Proteasen abgebaut, sondern sind auch einem pH ausgesetzt, der fast drei Stufen niedriger ist als im Zytoplasma, was für spontane Denaturierung sorgt, bevor Hydrolasen die Peptidkette spalten. Das Lysosom ist ein essenzielles Kompartiment bei der Nährstoffaufnahme durch Phagozytose oder Endozytose, da es die aufgenommenen Stoffe in für die Zelle verwertbare Einheiten zerlegt.

1.3.2.1 Vesikuläre Autophagie

Aber auch aus der Zelle selbst können Vesikel kommen, die mit dem Lysosom fusionieren. Große Proteinaggregate oder schadhafte bzw. verbrauchte Organellen (z.B. ganze Mitochondrien) können von zelleigenen Membranen umschlossen und dann dem Lysosom zugeführt werden. Autophagie wird durch die Bildung eines Phagophors gestartet (D. Glick et al., 2010). Der Phagophor ist ein Komplex aus Proteinen und Membranvesikeln, wobei die Herkunft der Membranvesikel nicht abschließend geklärt ist und bisher verschiedene Quellen (ER, Golgi u.A.) beschrieben wurden (D. Glick et al., 2010). Die Doppelmembran nimmt eine schüsselartige Form an, die sich vergrößert und eine Hohlkugel bildet und umschließt so einen Bereich des Zytoplasmas oder bildet sich um eine verbrauchte Organelle (oft Mitochondrien) herum. Die Bildung des Phagophors wird ausgelöst durch die Bildung zweier Multiproteinkomplexe an der Stelle im Zytoplasma, wo sich abzubauen Proteine befinden. Diese Komplexe induzieren die Membranbildung. Die Bildung eines Vesikels ist abhängig von Ubiquitin-ähnlichen Ligationen der Autophagie assoziierten Gene (Atg)-Proteine 7, 5 und 12 und dem Vorhandensein von Phosphatidylinositol. Die so entstandene Doppelmembranfläche schließt sich dann zu einem Vesikel mit einer Doppelmembran, um das Autophagosom zu erzeugen. Das Autophagosom fusioniert mit einem Lysosom zu einem Autolyso-som, in dem der Inhalt des Autophagosoms dann abgebaut wird (D. Glick et al., 2010; B. Levine and G. Kroemer, 2008; N. Mizushima et al., 2008).

1.3.2.2 Chaperonvermittelte Autophagie

In der jüngeren Vergangenheit konnte ein weiterer Proteinabbauweg identifiziert werden, die Chaperon-vermittelte Autophagie (Chaperone Mediated Autophagy, CMA). Dieser Abbauweg kommt ohne Bildung eines Vesikels mitten im Zytoplasma aus und führt die Proteine dem Lysosom zu. Dies geschieht über die Interaktion mit dem Chaperon Hsc70 (heat shock cognate protein of 70

kDa) und einem Pentapeptidmotiv in der Sequenz des Zielproteins. Aufgrund seiner Aminosäuresequenz spricht man vom KFERQ-Motiv (A. M. Cuervo and E. Wong, 2014). Nach Bindung des Hsc70 und weiteren Cochaperonen an dieses Motiv transloziert der Komplex an die lysosomale Membran, wo er an das lysosomale Membranassoziierte Protein 2A (LAMP-2A) bindet. LAMP-2A rekrutiert weitere LAMP-2A Moleküle und es bildet sich eine Pore aus LAMP-2A Molekülen. Das Zielprotein wird daraufhin entfaltet und durch die Pore transportiert. Im Lumen des Lysosoms wird die Peptidkette von der lysosomalen Form des Hsc70 (Lys-Hsc70) gebunden und von den dortigen Hydrolasen verdaut.

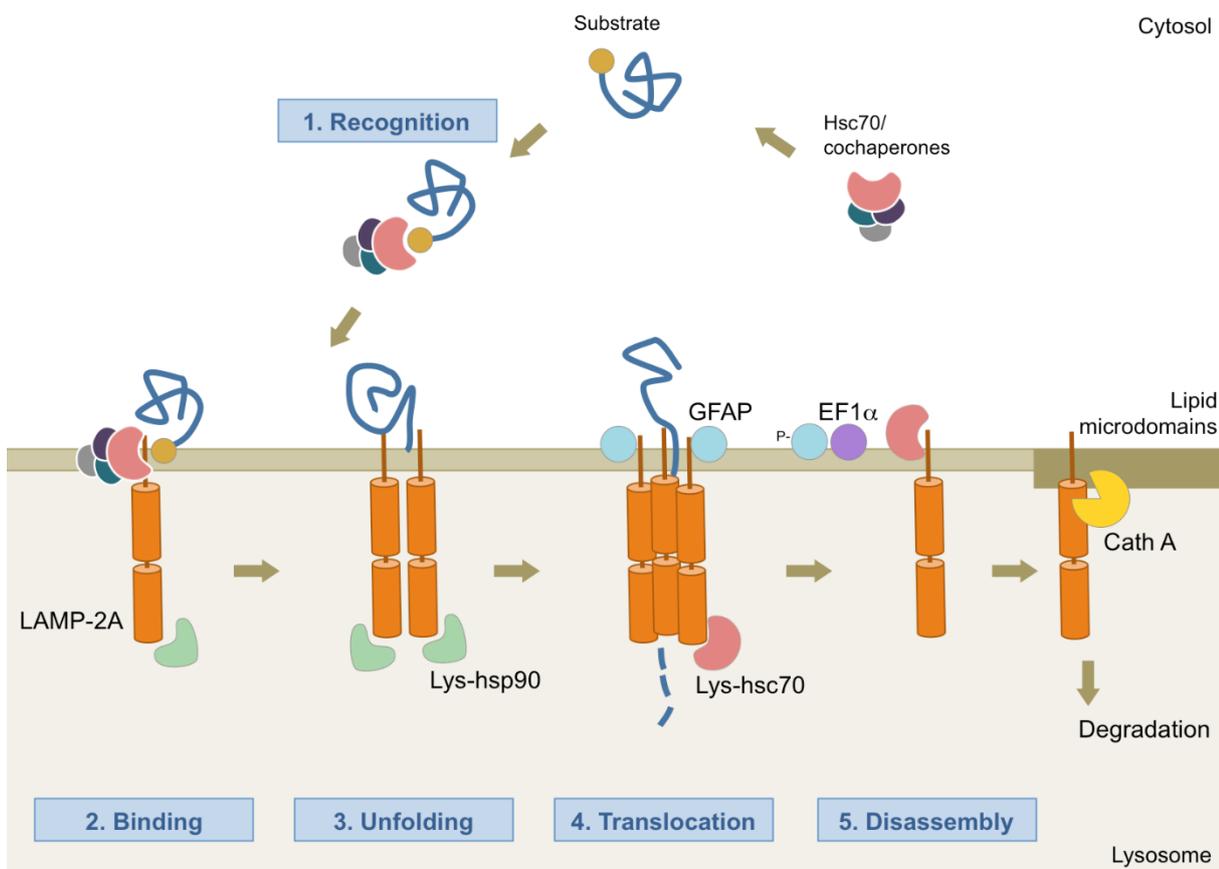


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der chaperonvermittelten Autophagie.

1. Das Substrat mit der KFERQ-Signalsequenz wird vom Hsc70-Komplex gebunden. 2. Der Hsc70-Substratkomplex bindet an ein LAMP-2A-Molekül. 3. Das Substrat wird entfaltet und weitere LAMP-2A Moleküle werden rekrutiert. 4. Das entfaltete Substrat wird durch die von LAMP-2A Molekülen gebildete Pore in das Lumen des Lysosoms transloziert, dort vom lysosomalen Hsc70 in Empfang genommen und zu Peptiden verdaut. 5. Der Komplex zerfällt und LAMP-2A Monomere werden von Cathepsin A (Cath A) ebenfalls verdaut.

(By Cuervolab - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://en.wikipedia.org/w/index.php?curid=37860235>)

1.4 Core protein Allosteric Modifiers und ihre Wirkweisen

Es ist aus pharmakologischer Sicht vorteilhaft, nicht die Faktoren des Wirtes (d.h. des Patienten) zu beeinflussen, sondern Faktoren des Pathogens bzw. Virus direkt, da man dadurch das Risiko für schwere Nebenwirkungen reduziert. Nach diesem Konzept wurden *Direct Acting Antivirals*

(DAAs) entwickelt, zu denen auch die Gruppe der *Capsid Protein Allosteric Modifiers* (CAMs) gehört. Diese Substanzen greifen nicht in zelluläre oder andere Mechanismen ein oder binden an Proteine des Wirtes, sondern binden nur an das virale HBc und verhindern so die korrekte Bildung von Kapsiden. Das Konzept der Kapsid Assembly Inhibitoren ist aus der HIV-Forschung (K. Braun et al., 2008; J. Sticht et al., 2005; F. Ternois et al., 2005) und anderen Bereichen bereits bekannt (N. Inoue et al., 2012; B. Moss et al., 1969). Aktuell werden pharmazeutisch aber nur CAMs gegen HBV entwickelt (A. Bertoletti and L. Rivino, 2014; K. Deres et al., 2003; C. Ko et al., 2017; R. B. Perni et al., 2000; J. Stölting et al., 2000).

Die Klasse der CAMs im Bereich des HBV wird, basierend auf ihrer Wirkung *in vitro*, in zwei Klassen unterteilt, Typ I und Typ II. Beiden gemein ist die Bindestelle am viralen Kapsid-Protein (S. P. Katen et al., 2013). Alle bisher gefundenen CAMs binden in der Assemblydomäne des HBc, nicht in der Dimerisierungsdomäne.

1.4.1 Typ I CAMs

Die Moleküle der Typ I CAMs erzeugen *in vitro* ein distinkt natives Aggregationsmuster des HBc. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind Strukturen zu erkennen, die in Form und Größe denen von nativen Kapsiden entsprechen.

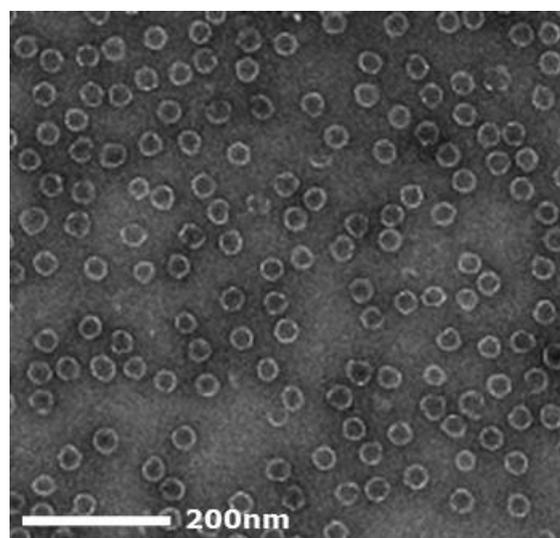


Abbildung 1.11: Elektronenmikroskopische Aufnahme von HBc, mit AT130 behandelt.

Die ringartigen Strukturen entsprechen in Durchmesser und Form nativen HBV Kapsiden und die dunkle Färbung in der Mitte deutet darauf hin, dass keine RNA verpackt wurde. (aus Berke et al., 2017 (J. M. Berke et al., 2017))

Typ I CAMs binden in eine Tasche des HBc, die an der Dimer/Dimer-Kontaktfläche liegt (S. P. Katen et al., 2013). Die Substanzen dieser Klasse verursachen eine Beschleunigung der Kapsidbildung, wodurch die Entstehung von Kapsiden derart beschleunigt und stabilisiert wird,

dass die HBce in *in vivo* Experimenten mit infizierten Zellen zur Bildung neuer Virionen nicht mehr verfügbar sind, sie werden der Reaktion entzogen (S. P. Katen et al., 2013)(Abbildung 1.12).

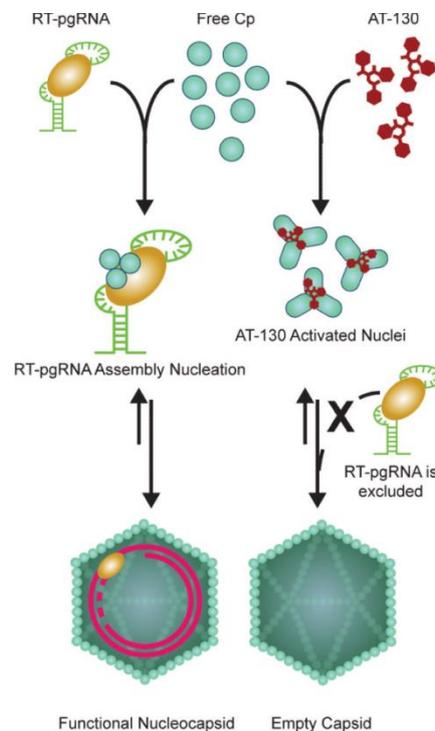


Abbildung 1.12: Reaktionsschema des Kapsidassemblies mit CAMs.

Der normalen Reaktionsweg, in dem der P-Protein (RT)/pgRNA Komplex an freies HBc bindet und so den Nukleationskern für den Kapsidassembly bildet ist links dargestellt. Bei Behandlung mit AT130 bilden sich, durch AT130 ausgelöst, aktivierte Nuclei, die dann zum Zusammenbau von Kapsiden ohne P-Protein/pgRNA führen. (aus Katen et al. 2013 (S. P. Katen et al., 2013))

1.4.2 Typ II CAMs

Die Typ II CAMs erzeugen bei Inkubation mit HBc *in vitro* aberrante Kapsidstrukturen, die auch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen sind (Abbildung 1.13). Zudem wurde in chromatographischen Experimenten gezeigt, dass bei CAM Typ II behandeltem HBc eine starke Elutionsbande im Säulentotvolumen detektiert wird, was für das Vorhandensein extrem großer Komplexe spricht die mit dem Säulensubstrat nicht interagieren (S. J. Stray and A. Zlotnick, 2006).

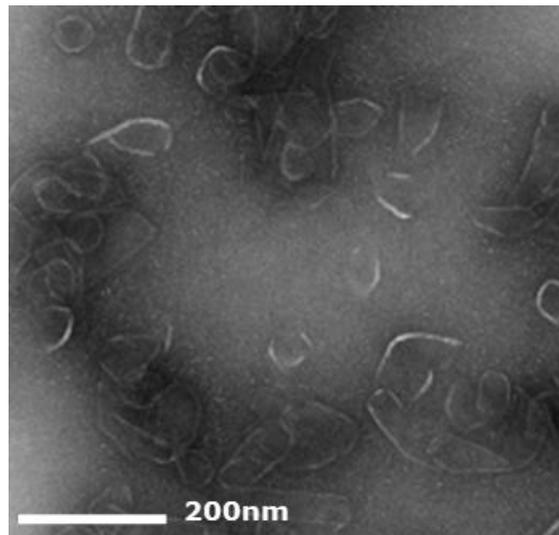


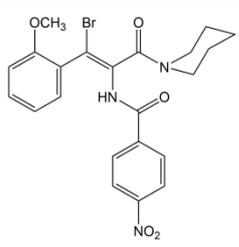
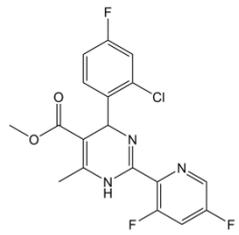
Abbildung 1.13: Elektronenmikroskopische Aufnahme von HbC, mit Bay41-4109 behandelt.

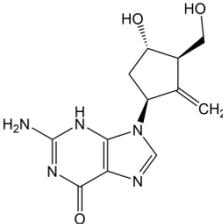
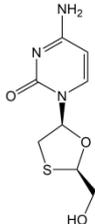
Auf dem Bild sind Strukturen zu sehen, die übergroßen Kapsiden mit nicht definierter Struktur ähneln. Es sind keine regelmäßigen Partikel zu erkennen. (modifiziert aus Berke et al., 2017 (J. M. Berke et al., 2017))

Analysen von elektronenmikroskopischen Bildern ergaben eine sechssachsig Symmetrie innerhalb der gefundenen Strukturen (S. J. Stray et al., 2005) und ein Modell für die Entstehung der großen Strukturen, das darauf aufbaut, dass HbC Hexamere (Trimer aus Dimeren) stabilisiert werden, die sich dann wiederum aneinander anlagern, um spiralförmige und flache Strukturen zu erzeugen (S. J. Stray et al., 2005).

Es wurde ebenfalls herausgefunden, dass CAMs in unterschiedlichen Konzentrationen auch unterschiedliche Effekte haben können. In niedrigen Konzentrationen von Typ II CAMs wurde eine Beschleunigung der Kapsidgeneration beobachtet und erst in höheren Konzentrationen kam es zur Beobachtung der zuvor beschriebenen Riesenkomplexe (S. J. Stray and A. Zlotnick, 2006).

Tabelle 1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Moleküle und deren Struktur.

Name	Molekülstruktur	Typ
AT130		Typ I CAM
Bay41-4109		Typ II CAM

Entecavir		NRTI
Lamivudine		NRTI
CpAM_1	n.a.	CAM
CpAM_2	n.a.	CAM
CpAM_3	n.a.	CAM

1.4.3 Vergleich mit Nukleos(t)idischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTIs)

Die Effekte der CAMs und NRTIs auf das HB-Virus sind bei rein äußerlicher Beobachtung der Virusreplikation nicht zu unterscheiden. Die NRTIs bewirken eine Inhibition der reversen Transkriptase, wie bereits bei den Therapien zur HBV-Infektion beschrieben. Hierbei wird das Verpacken des P-Protein/pgRNA Komplexes nicht verhindert, ein unreifes Kapsid bildet sich. Da aber die Reifung des Kapsids und die damit einhergehenden Strukturänderungen nur stattfinden können, wenn die RNA im Inneren des Kapsids in DNA umgeschrieben wurde, wird durch NRTI-Behandlung die Reifung des Kapsids verhindert. Intrazellulär akkumulieren dann unreife Kapside anstelle von leeren Kapsiden oder anderen Strukturen. Dies liegt daran, dass nur das reife Kapsid mit den viralen Membranproteinen interagieren kann, um sezerniert zu werden.

1.5 Hypothese der Wirkweise von CAMs und Fragestellung dieser Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit war wenig über die Wirkmechanismen von CAMs in eukaryotischen Zellumgebungen bekannt. Experimente *in vitro* hatten gezeigt, welche Wirkung CAMs auf das isolierte HBc haben, aber es gab keine Informationen darüber, was bei der Behandlung von Zellen

auf molekularer Ebene passiert. Dies zu beantworten ist Gegenstand dieser Arbeit. Die Ausgangshypothese war, dass CAMs die Aggregation bzw. Akkumulation von HBc im Zytoplasma auslösen und dass HBc demzufolge verstärkt abgebaut wird.

Die Vorliegende Arbeit sollte in diesem Kontext drei Aspekte bearbeiten:

Experimente unseres Kooperationspartners und aus der Literatur hatten gezeigt, dass infizierte Zellen keine Viren mehr produzieren, aber nicht sterben, obwohl das Virus in ihnen akkumulieren und dadurch zu Apoptose oder gar Nekrose führen müsste.

Hypothese: Das durch CAM-Behandlung akkumulierende HBc wird durch einen bisher nicht bekannten proteolytischen Weg abgebaut und so die Zelle vor der Apoptose bewahrt.

Die Akkumulation von viralem Kapsidprotein und damit die Präsenz von exogenen, repetitiven Strukturen ist ein geeigneter Auslöser für die PRRs des angeborenen Immunsystems.

Hypothese: CAM behandelte Zellen zeigen Zeichen der Induktion von antiviralen Mechanismen des angeborenen Immunsystems.

Zusätzlich wird durch vermehrten Abbau eines Proteins auch die Menge an Peptiden erhöht, die von diesem Protein stammen und auf MHC Klasse I Komplexen präsentiert werden. Eine verbesserte Immunerkennung wäre die Folge. Dies sollte mit Hilfe von HBc-spezifischen T-Zellen analysiert werden.

Hypothese: Der vermehrte Abbau von HBc im Inneren von HBV exprimierenden und CAM-behandelten Hepatozyten führt zu einer verstärkten Erkennung und Zerstörung durch HBc spezifische, zytotoxische T-Zellen.

Zusätzlich wurden immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen gemacht, um die Lokalisation von HBc nach CAM-Behandlung zu analysieren. Da dies ein explorativer Ansatz war, konnte hierzu keine Hypothese aufgestellt werden.

2 Ergebnisse

2.1 Wirkmechanismen von CpAMs und Nukleosid-/Nukleotidanaloga und des Capsidassemblymodells

2.1.1 Effektivität der CpAMs in unterschiedlichen Modellen

Zu Beginn wurden die Wirksamkeit und die Effektivität antiviraler Substanzen in unterschiedlichen Modellsystemen bestimmt.

Als Modellsysteme wurden Zelllinien gewählt, die das HBV Genom als Transgen stabil integriert im zellulären Genom tragen und Zelllinien, die mit HBV infizierbar sind. Als transgene Zelllinien wurden die HepG2.2.15 und die HepG2H1.3 Zelllinien gewählt, die sich in den für diese Arbeit relevanten Eigenschaften gleich verhalten und damit als äquivalent angesehen werden können. Die Verwendung in den Assays richtete sich nach der Verfügbarkeit der Zellen. Als infizierbare Zelllinie wurden die HepG2-NTCP k7 Zelllinie gewählt, die hier als HepG2-NTCP bezeichnet wird. Diese Zelllinie wurde von Daniela Stadler in unserem Labor hergestellt und trägt transgen den HBV-Rezeptor NTCP; k7 bezeichnet den Klon 7, der sich in Tests als am besten infizierbar herausstellte. Das eingesetzte Virus wurde in einem von Jochen Wettengel in unserem Labor entwickelten Verfahren produziert und aufgereinigt.

Getestet wurden in der Literatur beschriebene Substanzen wie Lamivudine, Entecavir, AT130 und Bay41-4109 und diese mit bisher nicht beschriebenen Substanzen aus der Klasse der CpAMs verglichen. Die neuen Substanzen, die von den Firmen Janssen und Roche entwickelt und zur Verfügung gestellt wurden, werden im Folgenden mit CpAM_1 (Roche), CpAM_2 und CpAM_3 (jeweils Janssen) bezeichnet. Da die Substanzen von Kooperationspartnern im Rahmen von Projekten zur Verfügung gestellt wurden und nur während laufender Projekte verfügbar waren, konnten nicht alle Experimente mit allen Substanzen durchgeführt werden. Da die Überlappungsphase der individuellen Projekte kurz war, gibt es nur wenige Experimente, bei denen alle Substanzen gleichzeitig getestet wurden. Der Fokus der Arbeit liegt deswegen auf dem Vergleich der CAM Typen, vertreten durch AT130 und Bay41-4109 und es werden jeweils Schlüsse auf die Eigenschaften bzw. Typen der neuen Substanzen gezogen.

Zunächst wurde die Grundtoxizität der Substanzen für die gewählten Zelllinien in den geplanten Konzentrationen bestimmt. Stellvertretend für die transgenen Zelllinien wurde hier nur HepG2.2.15 getestet, da wir davon ausgingen, dass diese Zelllinie aufgrund der Kontrolle des HBV-Genoms durch einen CMV-Promotor mehr HBV-Proteine produziert und darum eine Toxizität, die durch HBV-Protein-Aggregate vermittelt würde, hier eher auftritt als in HepG2H1.3 Zellen, bei denen die viralen Transkripte nur durch die viruseigenen Promotoren kontrolliert werden. Die Untersuchung der Zellviabilität zeigte keine nennenswerte Toxizität der Substanzen im Bereich der verwendeten

Konzentrationen (Abbildung 2.1). In dem hier verwendeten Cell Titer Blue Assay wird die Umwandlung eines Farbstoffes durch ein zelluläres Enzym in einen anderen Farbstoff als Maß für die Menge der vorhandenen gesunden Zellen verwendet. Je mehr gesunde Zellen vorhanden sind, desto mehr Farbstoff wird in einem Zeitraum umgewandelt und desto stärker ist das Signal. Als Kontrolle für 100 % Toxizität (also 0 % Umwandlung) diente eine Probe, die nicht auf Zellen gegeben wurde.

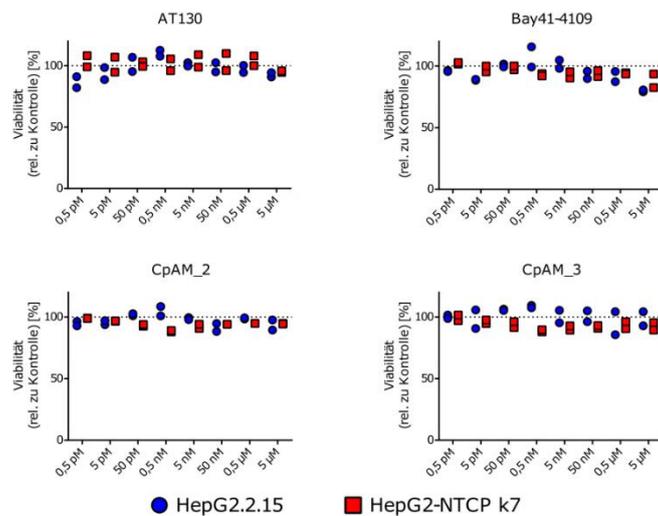


Abbildung 2.1: Zellviabilität HBV exprimierender Zellen bei CAM-Behandlung.

Die Zellen wurde hierfür sechs Tage mit den entsprechenden Substanzen behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, denen 2,5 % DMSO ins Medium zugegeben wurden. Für diese wurde eine Viabilität von 100 % festgelegt.

In unserem Toxizitätstest zeigte sich nur bei Bay41-4109 ab 5 μ M eine geringe Toxizität für HepG2.2.15 Zellen. Die reduzierte Viabilität bei der AT130 Konzentration von 0,5 pM führen wir auf eine Schwankung oder Verdunstungseffekte im Brutschrank zurück. Bei dieser geringen Konzentration erwarten wir keinerlei Effekt der Substanz.

Nachdem die Toxizität als tolerabel festgestellt wurde, untersuchten wir die Effektivität und Effizienz der Substanzen. Auch hierbei wurden transgene (HepG2.2.15, HepG2H1.3) und infizierte Zellen (HBV infizierte HepG2-NTCP k7) verglichen. Die Zellen wurden wie in der Methodensektion beschrieben vorbehandelt und infiziert und wir ließen die Infektion sich für sechs Tage etablieren, bevor eine Behandlung durchgeführt wurde.

Als allgemein akzeptiertes Maß der Effektivität und Effizienz einer Substanz wird die EC50 bzw. IC50 angesehen. EC50 steht für „effective concentration 50%“, also die Konzentration eines Wirkstoffes, bei der 50 % der gewünschten oder beobachteten Wirkung eintritt. Analog verhält es sich für Substanzen mit einer inhibitorischen Wirkung: hier wird die „inhibitory concentration 50%“ angegeben (IC50). In dieser Untersuchung geht es nicht nur darum, ob eine Substanz wirkt (Effektivität), sondern auch bei welcher Konzentration 50% des Effektes erreicht werden (Effizienz). Dies wurde deshalb gewählt, da 0% und 100% jeweils willkürlich festgelegte Werte sind bzw. sein

können und nur das Erreichen des Umschlagpunktes (d.h. 50 % des Effektes) eine spezifische Eigenschaft eines Stoffes ist. Um die Verwendbarkeit der eigenen Assays festzustellen, eignet sich hier der Vergleich der selbst gemessenen Werte mit in der Literatur publizierten Werten für bekannte Substanzen.

Da hier Modulatoren des Virusassembly untersucht wurden, die effektiv die Virusproduktion verhindern, also inhibieren, wurde hier die IC50 bestimmt. Hierzu wird die Menge an viraler DNA im Zellkulturüberstand mittels quantitativer PCR (qPCR) gemessen. Dies ist ein allgemein akzeptierter Test für die Wirkung von Antiviralia, wie z.B. Entecavir.

Die IC50 wurde für die Substanzen bestimmt (Abbildung 2.2, Abbildung 2.3, Abbildung 2.4). Es konnte gezeigt werden, dass die antivirale Aktivität aller Substanzen auch in unserem Modell vorhanden ist. Die IC50-Werte der jeweiligen Substanzen lagen in vergleichbaren Bereichen, wobei Bay41-4109 mit 7,65 nM in HepG2H1.3 Zellen und 122,3 nM in HBV-infizierten HepG2-NTCP k7 Zellen die niedrigsten IC50-Werte der bekannten CpAMs zeigte. Die IC50 Werte der neuen CAMs sind schwer zu vergleichen, da sie nicht in allen Modellsystemen getestet wurden. Jedoch liegen sie in Konzentrationsbereichen, wie die bekannten CAMs.

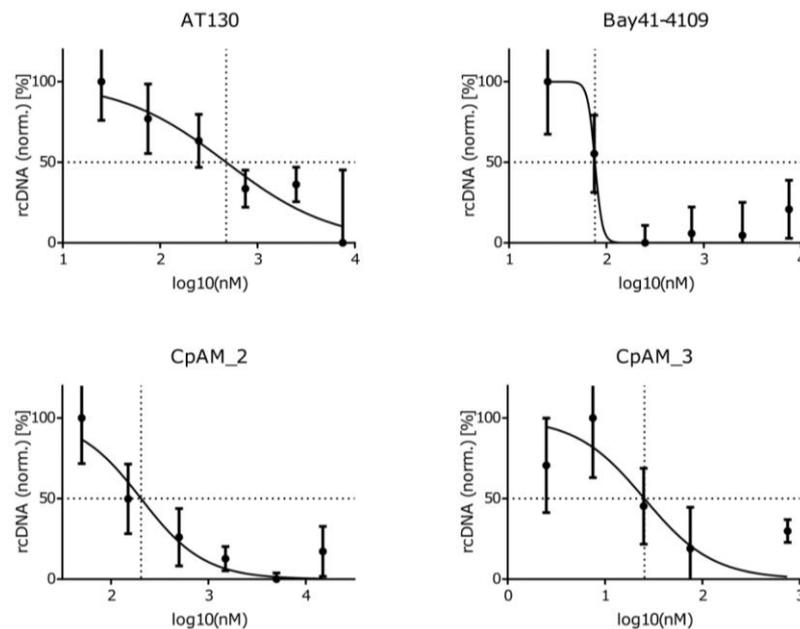


Abbildung 2.2: IC50 Werte der CpAMs in HepG2.2.15 Zellen.

HepG2.2.15 Zellen wurden ausgesät (T0) und dann für zwei Tage (T1, T2) in D-MEM complete mit 2,5% DMSO differenziert. An Tag 3 wurden den Zellen verschiedene Konzentrationen der CpAMs zugesetzt, die Ernte der Überstände zur DNA-Extraktion erfolgte an Tag 9. Es wurde die absolute HBV-DNA Menge in der extrahierten DNA bestimmt und zur logarithmischen Konzentration aufgetragen. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Streubreite aus drei Replikaten.

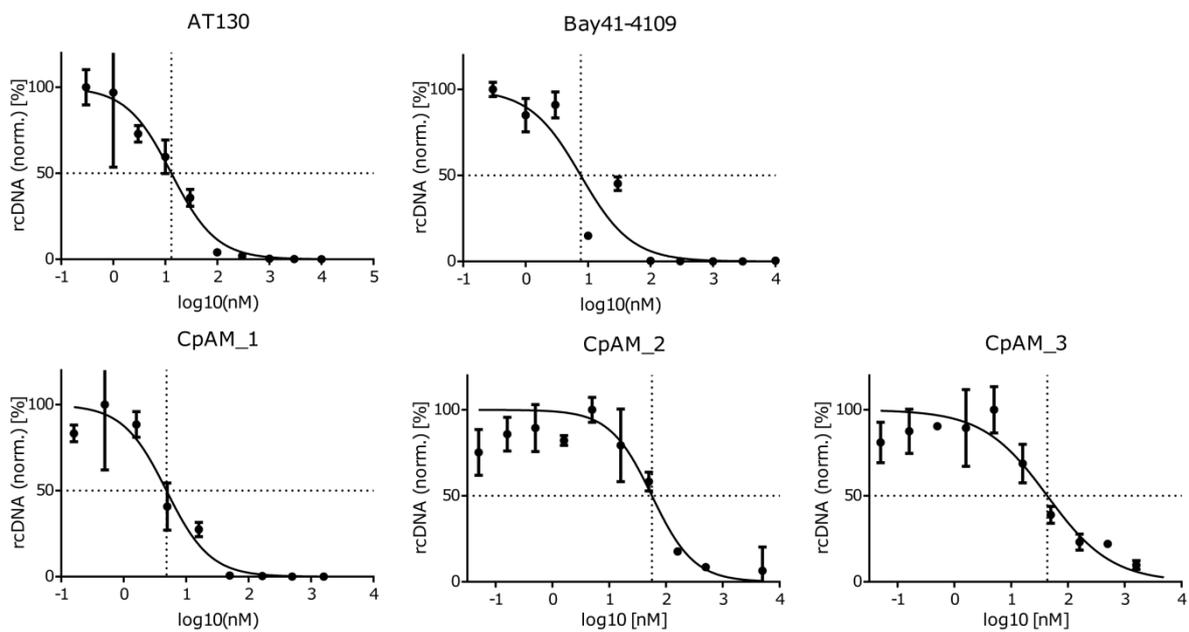


Abbildung 2.3: IC50 Werte der CpAMs in HepG2H1.3 Zellen.

Experiment analog zu dem in

Abbildung 2.2 gezeigten, durchgeführt mit HepG2H1.3 Zellen.

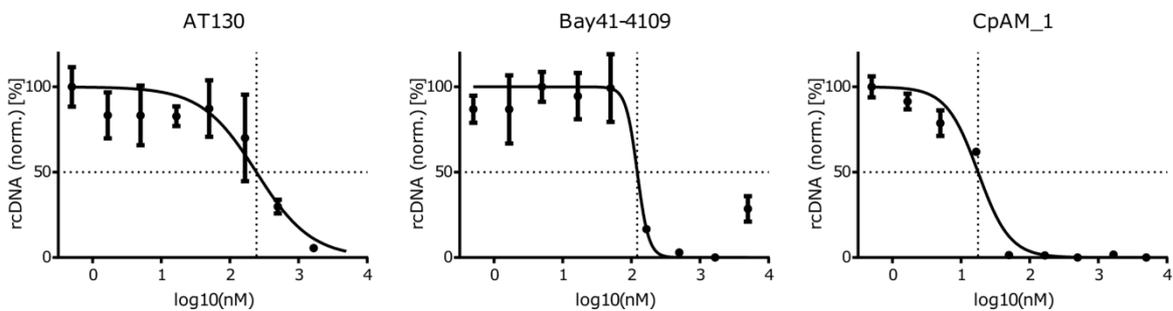


Abbildung 2.4 IC50 Werte der CpAMs in HBV-infizierten HepG2-NTCP k7 Zellen.

Experiment analog zu dem in Abbildung 1 gezeigten, durchgeführt mit HepG2-NTCP k7 Zellen.

Insgesamt fällt auf, dass die IC50-Werte in HBV-transgenen Zelllinien niedriger sind als im Infektionssystem (vergleiche Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht der IC50-Werte der CpAMs.

Substanz	IC50 nach Zelllinien			
	HepG2.2.15	HepG2H1.3	HepG2-NTCP k7 (HBV infiziert)	Literaturwerte
AT130	477 nM	13,12 nM	244,1 nM	2400 nM (HepG2, HBV transduced via Baculovirus) (W. E. Delaney et al., 2002)
Bay41-4109	76,4 nM	7,65 nM	122,3 nM	202 nM (HepG2.2.15) (N. Brezillon et al., 2011)

CpAM_1	n.b.	4,86 nM	17,73 nM	nicht verfügbar
CpAM_2	203,8 nM	56,56 nM	n.b.	<391 nM*
CpAM_3	25,42 nM	43,25 nM	n.b.	38 nM*
Entecavir				5,3 nM (HepG2, HBV transfected via Plasmid) (D. R. Langley et al., 2007)

n.b. = nicht bestimmt

*vom Kooperationspartner bestimmt

2.1.2 Untersuchung des Wirkmechanismus und Virusgenesemodell

Um die Hypothese zum unterschiedlichen Wirkmechanismus der CpAMs gegenüber den NRTIs zu untersuchen, bestimmten wir die Menge an intrazellulärer viraler pgRNA in HBV infizierten HepaRG Zellen, da dieses Modellsystem sowohl eine Infektion als auch die pgRNA-Produktion optimal unterstützt (persönliche Kommunikation von U. Protzer). Die Hypothese fordert, dass bei Entecavirbehandlung mehr pgRNA vorhanden ist als bei CpAM-Behandlung. Dies geschieht, da die pgRNA bei Entecavirbehandlung im Kapsid verpackt aber nicht sezerniert wird und bei CpAM-Behandlung die pgRNA nicht verpackt werden kann und deshalb von zellulären RNasen abgebaut wird.

Um eine effektive Inhibition der Virusproduktion sicher zu stellen, wurden Konzentrationen gewählt, die etwa der 10-fachen IC50 entsprachen bzw. bei Entecavir der 200-fachen IC50.

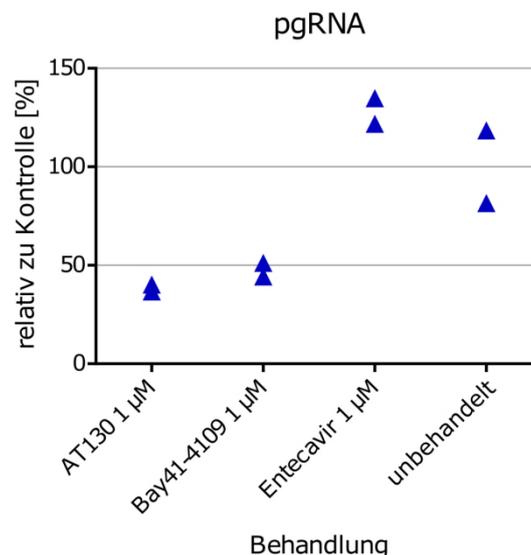


Abbildung 2.5: Intrazelluläre pgRNA nach CAMund NRTI Behandlung.

HBV infizierte HepaRG Zellen wurden mit AT130, Bay41-4109 und Entecavir für sechs Tage behandelt und dann die zelluläre Gesamt-RNA präpariert. Per RT-qPCR wurde die pgRNA Menge relativ zur GAPDH mRNA Menge bestimmt. Im Diagramm sind zwei Replikate pro Behandlung abgebildet.

Obwohl alle getesteten Substanzen die HBV Produktion, den vorhergehenden Experimenten zufolge, effektiv inhibieren konnten, war in der Entecavir behandelten Probe mehr pgRNA vorhanden

als in den CAMbehandelten Proben. Aufgrund der Streuung der Werte der unbehandelten Probe ist es schwer, eine definitive Aussage zu treffen, doch liegen die Werte der Entecavir behandelten Probe über diesen, was für eine Akkumulation über das normale Maß hinaus spricht .

Die Hypothese zum Einfluss der CAMBehandlung auf die Kapsidbildung und RNA-Herstellung in Abgrenzung zu NRTIs konnte in unserem Setup experimentell bestätigt werden.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob sich intakte Kapside nach Behandlung mit Typ I CpAMs oder aberrante Kapside bei Typ II CpAM-Behandlung im Zytoplasma der Zellen ansammeln.

Hierzu wurden nicht-denaturierte Lysate von HBV-infizierten und CAMbehandelten HepG2-NTCP k7 Zellen auf ein natives Agarose-Gel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran übertragen und Kapsid-Protein und HBV-DNA nacheinander detektiert (Abbildung 2.6).

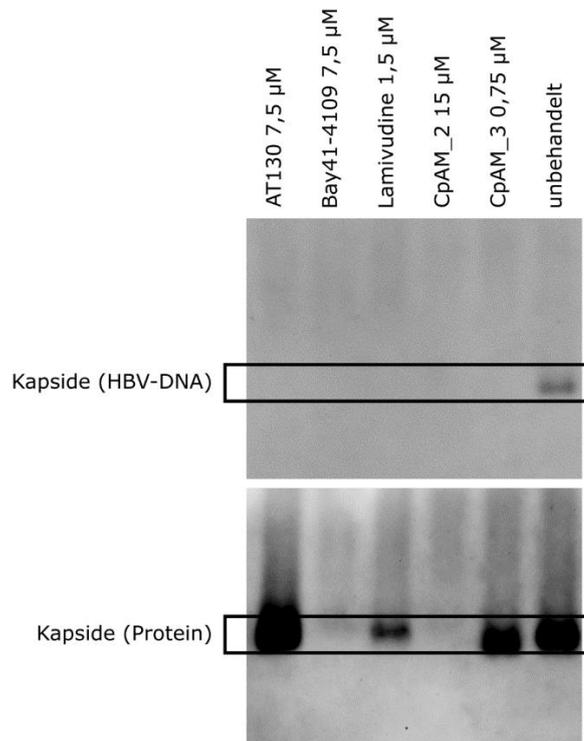


Abbildung 2.6: Natives Gel von Zelllysaten.

In diesem Experiment wurden HepG2-NTCP k7 Zellen mit HBV infiziert. Die Behandlung begann an Tag 6 nach der Infektion und wurde für 6 Tage aufrechterhalten. Die Konzentrationen der CpAMs wurden entsprechend dem 10-fachen der bestimmten IC50-Werte für jede Substanz individuell angewendet. Danach wurden die Zellen mit einem nicht-denaturierenden Lysepuffer lysiert und das Lysat auf ein natives Agarose-Gel (1,2 %) aufgetragen. Die aufgetrennten Proteine wurden dann per Kapillartransfer auf eine PVDF-Membran übertragen. Es wurden die HBV-Kapside und nach UV-crosslinken auch die HBV-DNA auf der gleichen Membran detektiert.

Es konnte nur in der unbehandelten Kontrolle HBV-DNA nachgewiesen werden, alle Behandlungen verhinderten effektiv die Bildung nukleotid-haltiger Kapside.

Nach Behandlung mit AT130 als bereits bekanntes Typ I CAM findet sich auf der Protein-Membran eine starke Kapsid-Bande, nach Behandlung mit Bay41-4109 als Typ II CAM können keine Kapside im Zellysat detektiert werden.

Bei CpAM_2 ist keine Kapsid-Bande zu erkennen, demnach handelt es sich hier mit großer Wahrscheinlichkeit um einen Typ II CpAM. Die Bande bei CpAM_3 deutet darauf hin, dass es sich bei dieser Substanz um einen Typ I CAM handelt.

In der Lamivudin (NRTI) behandelten Probe konnte man ebenfalls eine Protein-Kapsidbande erkennen, die allerdings schwächer war. Die schwächere Bande kann damit erklärt werden, dass die durch Lamivudinebehandlung erzeugten RNA-haltigen Kapside intrazellulär instabiler sind, als die durch AT130 erzeugten leeren Kapside und abgebaut werden. Die fehlende Bande auf der DNA-Membran zeigt, dass die HBV-DNA-Sonde nicht an RNA bindet bzw. zu wenig, um ein detektierbares Signal zu erzeugen.

Für CpAM_1 wurde vom Kooperationspartner angegeben, dass es sich um einen Typ II CAM handelt und von C. Ko in einem ähnlichen Experiment bestätigt (C. Ko et al., 2019).

2.1.3 Lokalisation von HBc bei CAM Behandlung

Die bisherigen Studien betrachteten primär die Effekte der CpAMs auf die Virusproduktion durch HBV-infizierte Zellen und *in vitro* auf aufgereinigtes rekombinantes HBc. Im Folgenden wurde die intrazelluläre Lokalisation des Kapsidproteins in HBV replizierenden Zellen unter Behandlung mit CpAMs betrachtet.

Neben AT130 und Bay41-4109 wurden in den folgenden Experimenten die Effekte der Substanz CpAM_1 analysiert, da diese die effektivste der uns zur Verfügung stehenden Substanzen war.

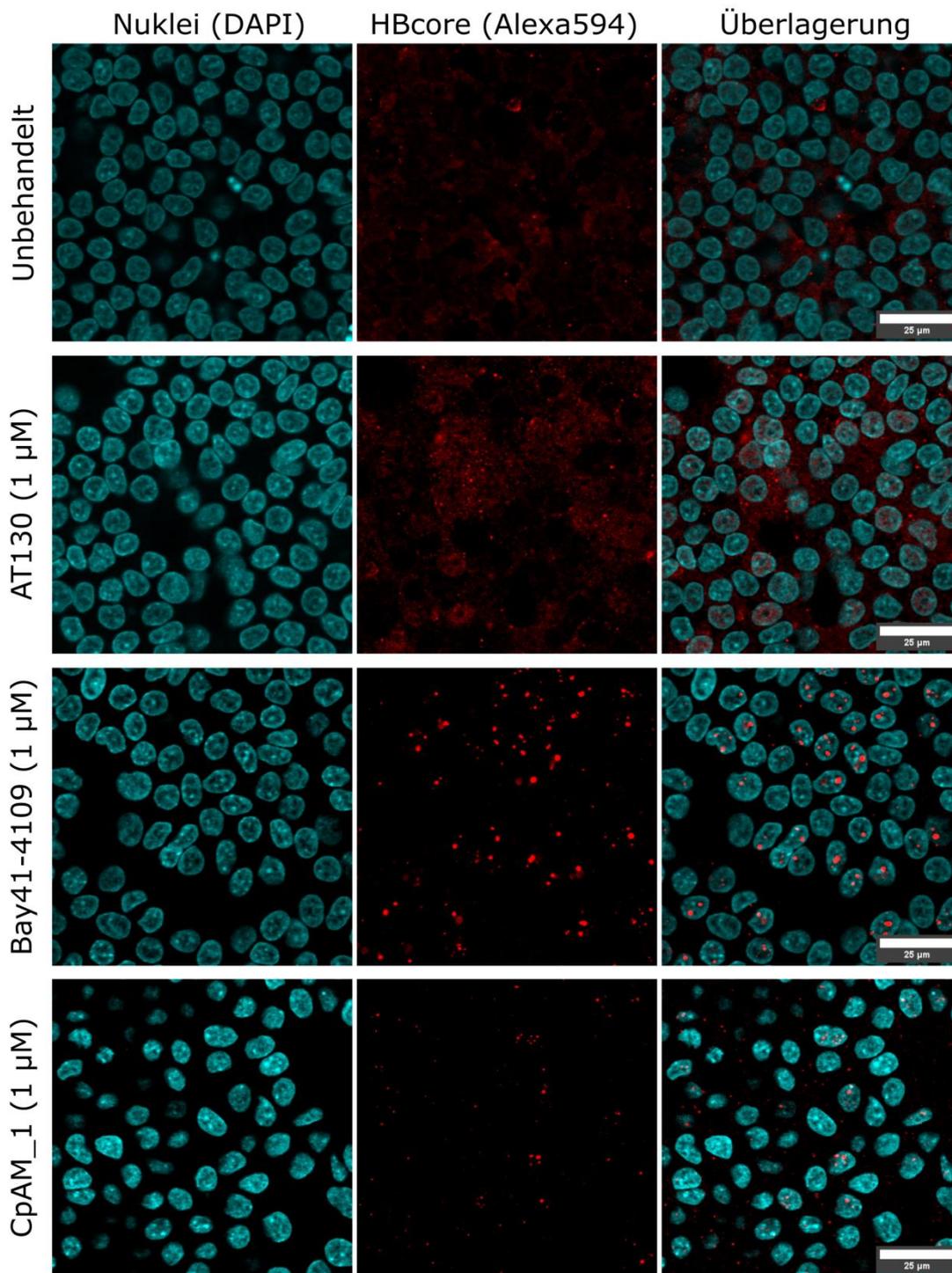


Abbildung 2.7: Immunfluoreszenzaufnahmen von HepG2H1.3 Zellen.

HepG2H1.3 Zellen wurden auf kollagenisierten Deckgläsern kultiviert und nach Erreichen der Konfluenz sechs Tage bei den angegebenen Konzentrationen mit CpAMs behandelt. Die Zellen wurden daraufhin fixiert und mit einem anti- HBc Antikörper (Dako) gefärbt. Der Sekundärantikörper trug Alexa594 als Konjugat. Die so erstellten Proben wurden dann im Konfokalmikroskop analysiert. Hierbei wurde die DAPI-Angefärbte DNA in Cyan und der Alexa594-Farbstoff in Rot dargestellt. Die Maßstabsleiste entspricht 25 µm.

In der unbehandelten Kontrolle kann man die normale Kapsidproteinverteilung im Zytoplasma und teilweise auch dem Zellkern gut erkennen (Abbildung 2.7). Das HBc trägt sowohl eine Nuclear

Export Sequence (NES) als auch ein Nuclear Localisation Signal-Sequence (NLS), was sowohl zu einer Proteindetektion im Zytoplasma als auch zu einer Detektion im Zellkern führt.

Wurden die Zellen mit AT130 behandelt, sah das Lokalisationsmuster weitgehend gleich aus. Eine leicht erhöhte Granularität der Färbung war bei einigen Zellen zu beobachten.

Eine Behandlung der Zellen mit dem Typ II CAMBay41-4109 führte zu einer starken Veränderung der HBc Lokalisation mit einer völligen Abwesenheit des Proteins im Zytoplasma und optisch kompakten Ansammlungen des Proteins im Zellkern. Dies zeigte sich in gleicher Weise auch bei CpAM_1 behandelten Zellen. Die Akkumulationen in den Zellkernen sind nicht sehr zahlreich, selten sind mehr als fünf zu sehen. Projektionen in der Z-Dimension der Zelle erlaubten uns auszuschließen, dass es sich um perinukleare Ansammlungen handelt (Abbildung 2.8). Das Signal kam eindeutig aus dem DAPI (ein an DNA bindender Farbstoff) positiven Bereich des Zellkerns.

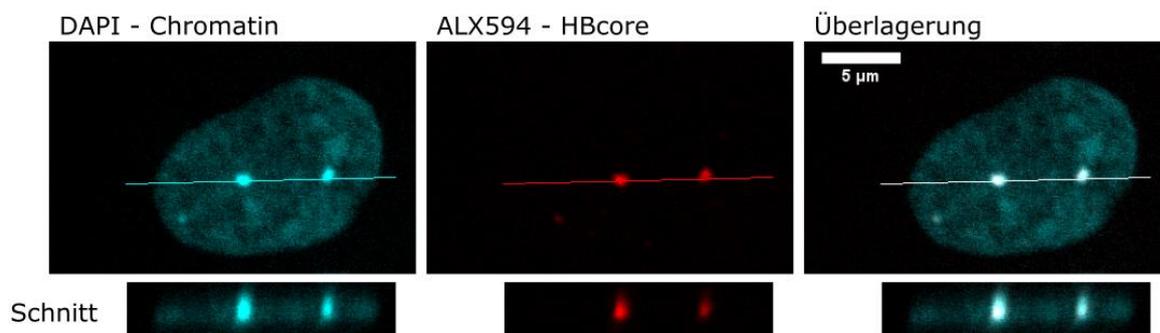


Abbildung 2.8: Darstellung eines isolierten Zellkerns mit Tiefenprojektion.

Ein einzelner Zellkern wurde in mehreren Ebenen der Z-Achse (ein Z-Stapel) aufgenommen. Der nominelle Abstand der Ebenen betrug $0,1 \mu\text{M}$. Der Schnitt durch das Bild wurde an der mit einer Linie gekennzeichneten Stelle durchgeführt. Es ist der DAPI und der Alexa594 Kanal dargestellt. Nicht nur in der Draufsicht, sondern auch im Schnitt zeigte sich eine Lokalisation der HBc Akkumulate im Bereich des Zellkerns. Zusätzlich ist hier auch eine starke DNA-Akkumulation in den HBc Akkumulaten zu erkennen. Dies erzeugt in der Überlagerung ein weißes Signal. Die Zellen wurden, wie bei Abbildung 2.7 beschrieben, präpariert. Die Maßstabsleiste entspricht $5 \mu\text{m}$. (Probenvorbereitung: C. Ko, Aufnahme und Bildanalyse: C. Blossey)

Ebensolche Beobachtungen konnten auch für jeweils HBV infizierte HepaRG-NTCP und HepG2-NTCP k7 Zellen gemacht werden (Abbildung 2.9, Abbildung 2.10). Hierbei wurde jeweils einmal CpAM_1 und einmal CpAM_2 und CpAM_3 verwendet, was durch die jeweilige Verfügbarkeit von Zellen und Substanz bedingt war.

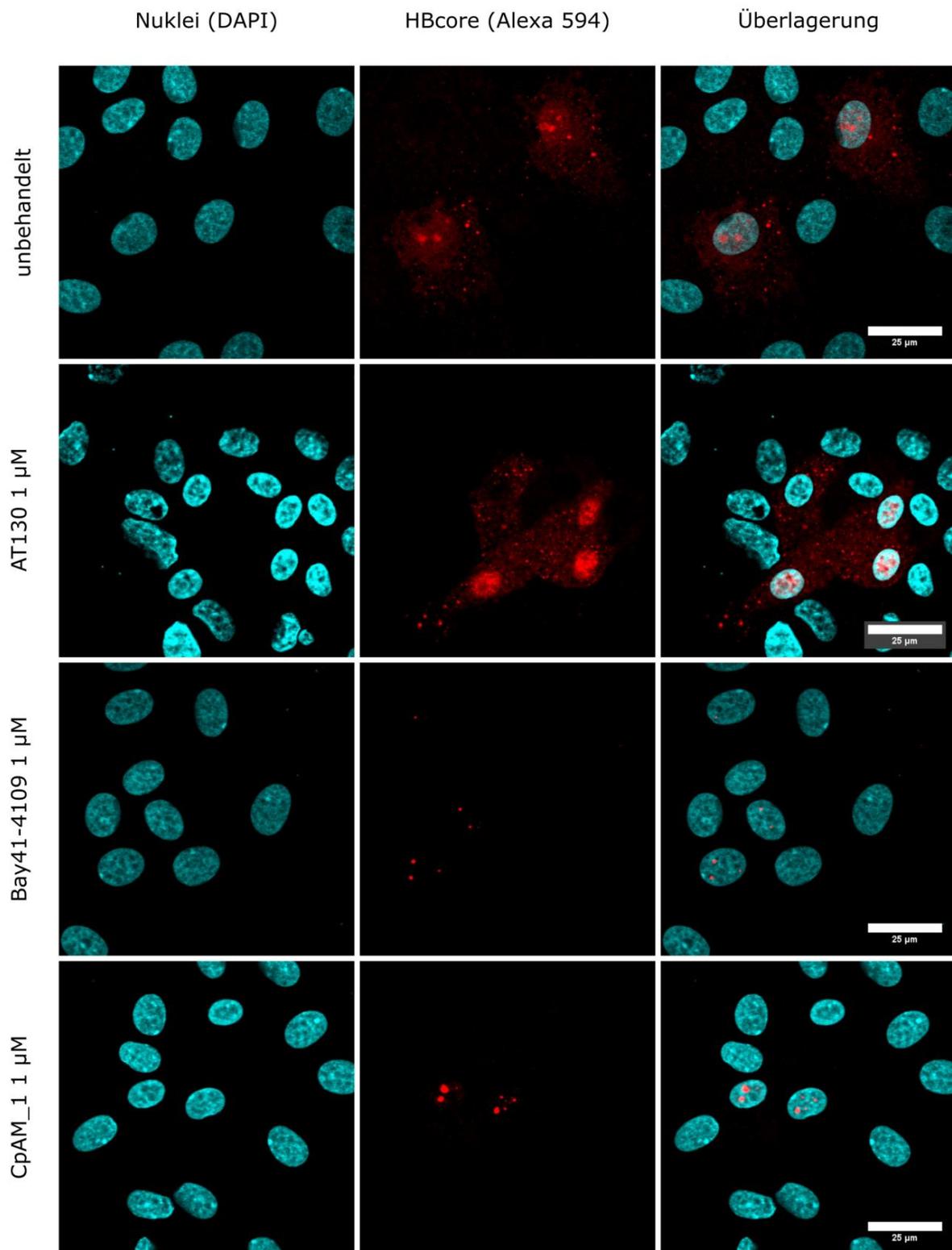


Abbildung 2.9: Immunfluoreszenzaufnahmen von HepaRG-NTCP Zellen.

HepaRG-NTCP k7 Zellen wurden auf kollagenisierte Glasplättchen ausgesät. Nach Ende der Differenzierung wurden die Zellen mit HBV infiziert und sechs Tage weiterkultiviert. Danach wurden die Zellen, wie bei Abbildung 2.7 beschrieben, behandelt, gefärbt und analysiert. Die Maßstabsleiste entspricht 25 µm.

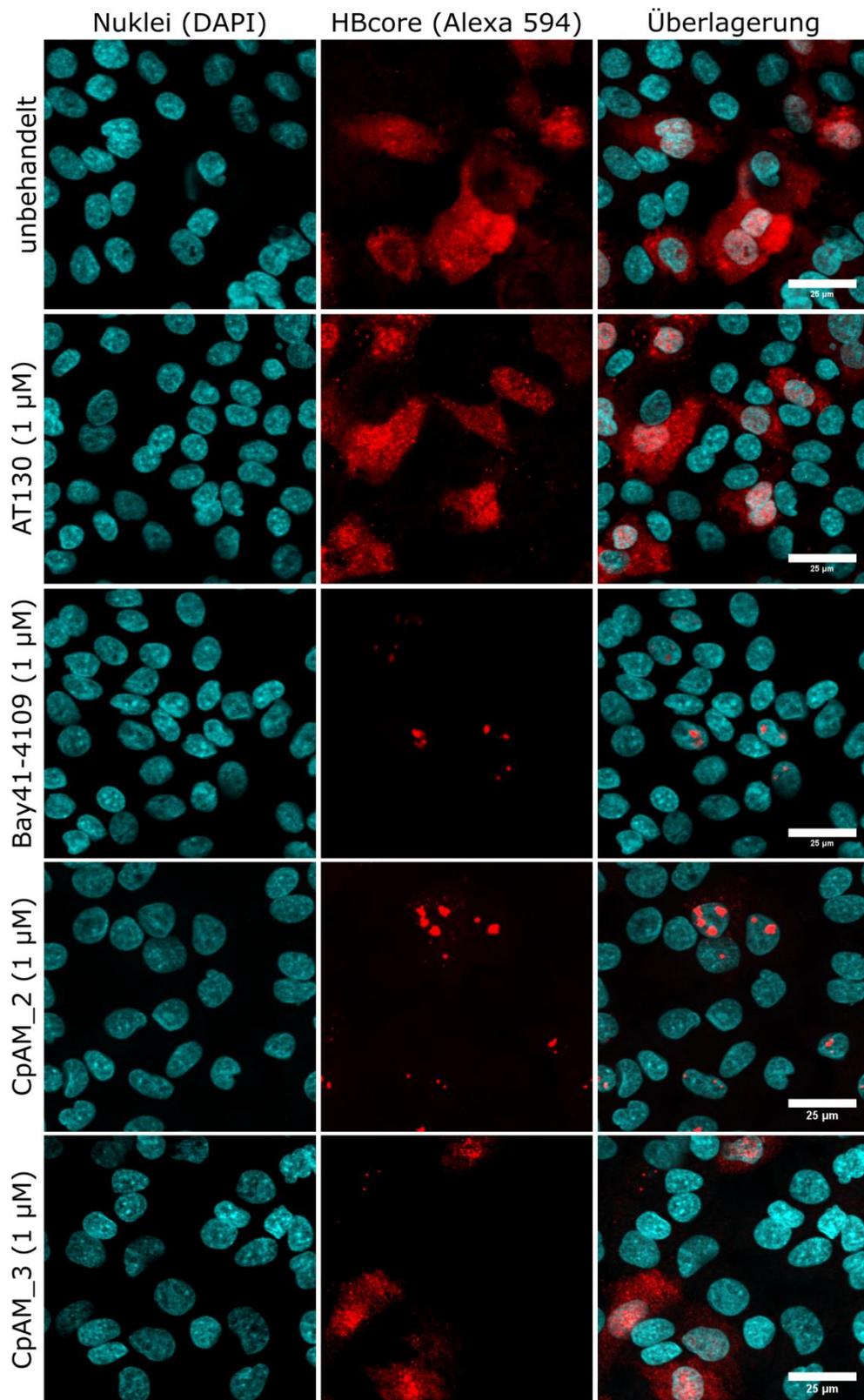


Abbildung 2.10: Immunfluoreszenzaufnahmen von HepG2-NTCP k7 Zellen.

HepG2-NTCP k7 Zellen wurden auf kollagenisierten Glasplättchen ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit HBV infiziert. Die Zellen wurden sechs Tage weiter in Kultur gehalten. Danach wurden die Zellen, wie bei Abbildung 7 beschrieben, behandelt, gefärbt und analysiert. Die Maßstabsleiste entspricht 25 µm.

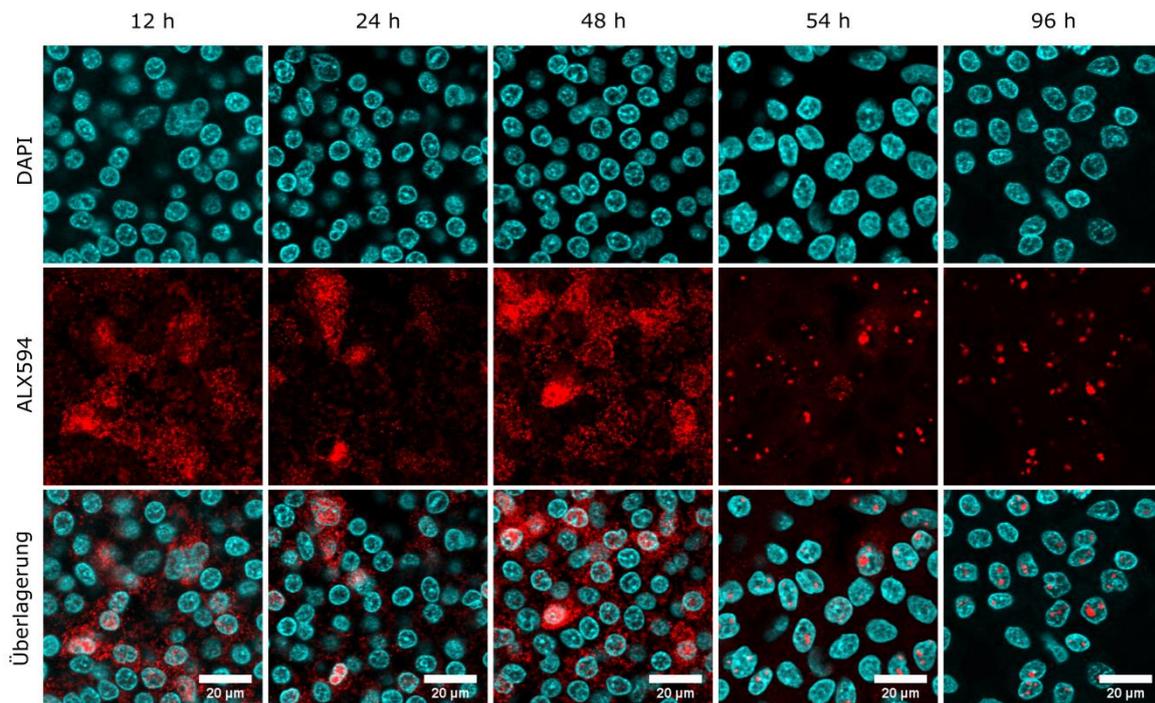


Abbildung 2.11: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Effekte von Bay41-4109 auf die intrazelluläre Lokalisation von HBc.

HepG2-NTCP k7 Zellen wurden auf kollagenisierten Glasplättchen ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit HBV infiziert. Die Zellen wurden sechs Tage weiter in Kultur gehalten und danach mit 1 µM Bay41-4109 behandelt. Die Zellen wurden nach den in der Titelzeile angegebenen Zeiten mit 4 % PFA fixiert. Die Zellen wurden daraufhin gefärbt und analysiert wie in Abbildung 2.7 beschrieben. Die Maßstabsleiste entspricht 20 µm.

Um den zeitlichen Ablauf der veränderten HBc Lokalisation unter Gabe eines Typ II CAM aufzulösen, wurden Experimente gemacht, bei denen HBV-infizierte HepG2-NTCP k7 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlungsstart (12 h, 24 h, 48 h, 54 h und 96 h) analysiert wurden. Hierbei stellte sich heraus, dass die Bildung der nukleären Granula zwischen 48 und 54 Stunden nach Behandlungsstart erfolgt und das zytoplasmatische HBc verschwindet. Ein Übergang oder die Bildung der Granula konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abbildung 2.11). Es scheint sogar so zu sein, dass bereits nach 12 Stunden Granula im Kern vorhanden sind, wobei dies aufgrund der flächigen Fluoreszenz im Kernbereich nur schwer zu entscheiden ist. In den hier gezeigten Bildern scheint es aber unmittelbar zur Bildung von granulären HBc-Strukturen im Zytoplasma zu kommen.

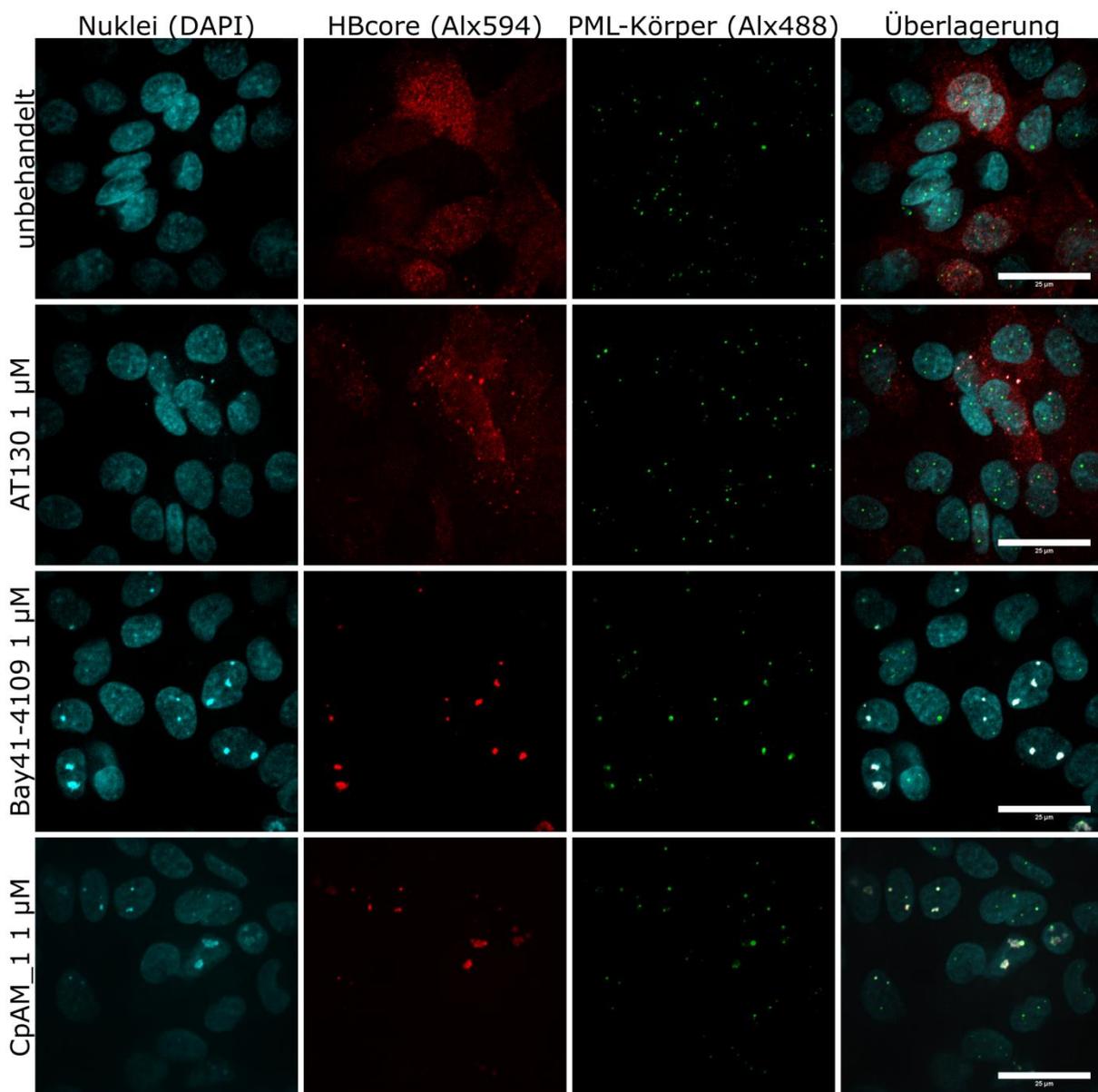
2.1.4 Nukleäre Lokalisation von HBc bei CAM-Behandlung.

Untersuchungen viraler Proteine von unterschiedlichen Viren zeigten eine Kolo-kalisation mit sog. PML-Körpern in den Zellkernen infizierter Zellen. Die Funktion der PML-Körper konnte bisher nicht herausgefunden werden. Im Kontext mit HBV und anderen Viren sind die Ursachen und auch die Bedeutung dieser Kolo-kalisation unklar.

Die PML-Körper bilden definierte Muster bzw. optisch klar abgegrenzte Foci in den Zellkernen. Diese Foci können, je nach Umweltbedingungen der Zelle (virale oder bakterielle Infektion, Stress, Verfügbarkeit von Nährstoffen) unterschiedliche Morphologien zeigen.

Da wir in unseren vorhergehenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen das HBc-Protein bei Behandlung mit CpAMs des Typ II in definierten und ebenfalls klar abgegrenzten Foci fanden, stellte sich die Frage, ob diese Foci mit PML-Körpern kolokalisierten.

Um dies zu untersuchen wurden, wie bereits beschrieben, behandelte Zellen nicht nur mit einem Antikörper gegen HBc, sondern auch mit einem Antikörper der PML-Protein markierte gefärbt. Im Immunfluoreszenzexperiment konnte gezeigt werden, dass HBc-Aggregate bei CAM Typ II Behandlung mit DNA-Ansammlungen aber auch PML-Körpern kolokalisieren (Abbildung 2.12).



Probenvorbereitung von C. Ko, Bildakquise von C. Blossey

Abbildung 2.12: Nukleäre Kolokalisation von PML-Nuclear Bodies und HBc bei CAM-Behandlung.

HepG2-NTCP k7 Zellen wurden wie unter Abbildung 2.7 beschrieben mit HBV infiziert und mit CpAMs behandelt. Nach der Behandlungsphase wurden die Zellen fixiert und mit anti-PML- und anti- HBC -Antikörpern gefärbt. Die präparierten Proben wurden dann in einem Spinning Disc Mikroskop analysiert. HBc ist in Rot, PML-NB in Grün und Nuclei in Cyan dargestellt. Der Maßbalken entspricht 25 µm.

Die Korrelation ist sehr stark. Es konnten keine HBc-Akkumulate gefunden werden, die nicht auch PML-positiv waren.

Bei Behandlung mit einem Typ I CAM wie AT130 konnte keine derart starke Kolokalisation gezeigt werden. Dies zeigt, dass sich die HBc-Aggregate bei CAM Typ I und II Behandlung nicht nur in ihrer Struktur (wie bereits durch elektronenmikroskopische und *in vitro* Untersuchungen gezeigt) sondern auch in ihren molekularen Eigenschaften unterscheiden und die Behandlung mit Typ II CAMs zu einer spezifischen Kolokalisation mit PML-Körpern führt.

2.2 Auswirkungen von CAMs auf den Wirt

Wie bereits in der Einleitung beschrieben und auch in den vorhergehenden Experimenten beobachtet, wird HBc, wenn es durch CAM Behandlung akkumuliert und nicht mehr sezerniert werden kann, im Zytoplasma auf einem bisher nicht identifizierten Pfad abgebaut. Die dadurch unweigerlich entstehenden Peptide werden, wie alle Produkte intrazellulär abgebauter Proteine, auf dem HLA-A2 Komplex der Zellen präsentiert. Da bei einer CAM Behandlung kein oder nur noch sehr wenig HBc in Form von Kapsiden die Zelle verlässt, bleibt das HBc in der Zelle. Es wird aber weiterhin produziert und die Zelle geht auch nicht in Apoptose in Folge von Proteinstress. Folglich muss HBc intrazellulär abgebaut werden. Dadurch sollte die Menge an HBc-Peptiden, die auf HLA-Komplexen präsentiert werden, steigen. Dies sollte die Erkennung und damit Tötung durch HBc-Spezifische T-Zellen steigern. Dies sollte man in einem Killing-Assay detektieren können. In unserem System wird die Bedeckung der Bodenfläche durch die adhärenen und HBV produzierenden Zellen direkt durch die Impedanz an im Lochboden befindlichen Elektroden gemessen. Findet Tötung durch die T-Zellen statt, reduziert sich die Bodenbedeckung und damit auch die Impedanz. Dies wird gemessen und als Zellindex angegeben. Zu Beginn der Experimente wird der Zellindex auf 100 % festgelegt, ein Zellindex von 0 zeigt eine Tötung von allen Zellen (100% killing) an.

2.2.1 Analyse der Antigenpräsentation (Peptid C18-27) auf dem T-Zellrezeptorkomplex

In den folgenden Experimenten wurde die Präsentation von HBc stammenden Peptiden im HLA Komplex auf HBV-produzierenden transgenen Zellen untersucht. Es war nicht möglich in den 96-

Loch Platten eine erfolgreiche Infektion von HepG2-NTCP k7 Zellen durchzuführen, da die Zellen nach der Infektion keine detektierbaren Virusmengen produzierten. Es wurde daher der Effekt der CAM-Behandlung auf die T-Zellerkennung von HBV transgen exprimierenden HepG2.2.15 Zellen in Ko-Kulturexperimenten untersucht. Hierbei werden die HBV-produzierenden Zellen zunächst in der Platte ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Danach werden die Zellen zur verstärkten Virusproduktion durch DMSO im Kulturmedium angeregt und danach mit den zu testenden Substanzen behandelt. Nach drei Tagen der Behandlung, um ausreichende Peptidmengen auf den HLA-Komplexen zu gewährleisten, werden parallel präparierte T-Zellen, die den jeweiligen spezifischen TCR tragen, zu den HBV-produzierenden und behandelten Zellen hinzu gegeben (sog. Ko-Kultur) und der Verlauf des Zellindex für bis zu 72 Stunden verfolgt.

2.2.2 Effekt der CAM-Behandlung auf CD8 Effektor T-Zell-Zytotoxizität.

In den Experimenten wurden unterschiedlichen T-Zellrezeptoren verwendet, die alle spezifisch für das Peptid C18-27 aus HBc im Komplex mit HLA-A2 waren. Diese TCRs wurden von K. Wisskirchen aus dem T-Zell-Repertoire von Patienten mit ausgeheilter HBV-Infektion kloniert (K. Wisskirchen et al., 2017). Empirisch wurde festgestellt, dass das Peptid C18-27 das immunogenste und am häufigsten präsentierte Peptid aus der AS-Sequenz von HBc ist.

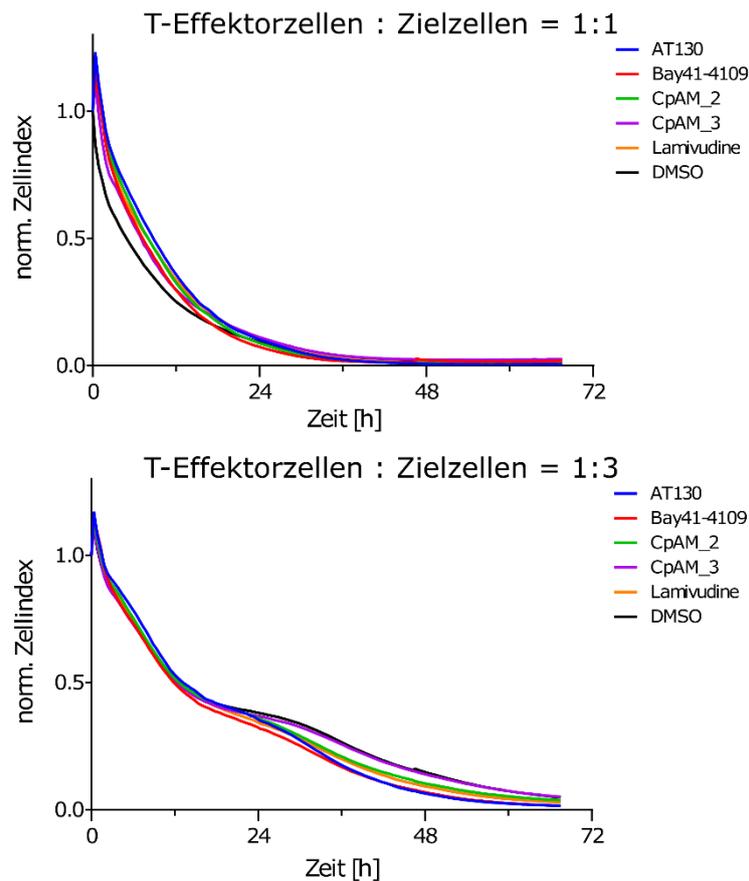


Abbildung 2.13: Ko-Kulturrexperiment mit HepG2.2.15 Zellen und transduzierten T-Zellen die den TCR_{C18-27-7D} trugen.

HepG2.2.15 Zellen wurden in einer 96-well-Platte ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz für drei Tage bei 300 nM mit den angegebenen Substanzen behandelt. Danach wurden die mit TCR_{C18-27-7D} transduzierten T-Zellen in den Effektorzell : Targetzell Verhältnissen 1:1 und 1:3 auf die Hepg2.2.15 Zellen gegeben und weitere drei Tage kultiviert. Der Verlauf des Zellindex wurde hierbei in regelmäßigen Intervallen aufgenommen (xCelligence Gerät). Es sind jeweils die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten abgebildet. Zum Zwecke der Übersichtlichkeit ist keine Standardabweichung dargestellt.

Im Ko-Kulturrexperiment mit dem hochaffinen TCR_{C18-27-7D} konnte kein Einfluss der CAM-Behandlung auf die Zytotoxizität der T-Zellen festgestellt werden (Abbildung 2.13). Der Abfall des Zellindexes ist für alle Behandlungen und beide Effektor- zu Zielzell-Verhältnisse etwa gleich steil. Dies zeigt, dass die Behandlung mit den CAMs oder dem NRTI keinen Einfluss auf die Erkennungintensität durch den TCR hatte. Es kann nichts darüber ausgesagt werden, ob mehr oder weniger Peptid auf den HLA-Komplexen präsentiert wurde, lediglich die Erkennung durch die Effektorzellen wurde weder reduziert noch intensiviert.

In dem Experiment, bei dem das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen Eins war, also eine Effektor- für je eine Zielzelle vorhanden war (E:T=1), nimmt das Signal sehr schnell und monophasisch ab. In dem Experiment, in dem das Verhältnis drei war, also für je drei Zielzellen eine Effektorzelle vorhanden war (E:T=0,33), ist eine frühe Phase in den ersten 18 h zu erkennen, dann ein kleines

Plateau und dann eine zweite Phase bis zum Schluss bei etwa 68 Stunden. Bei beiden Experimenten ist kein deutlicher Unterschied zwischen den Behandlungen zu erkennen.

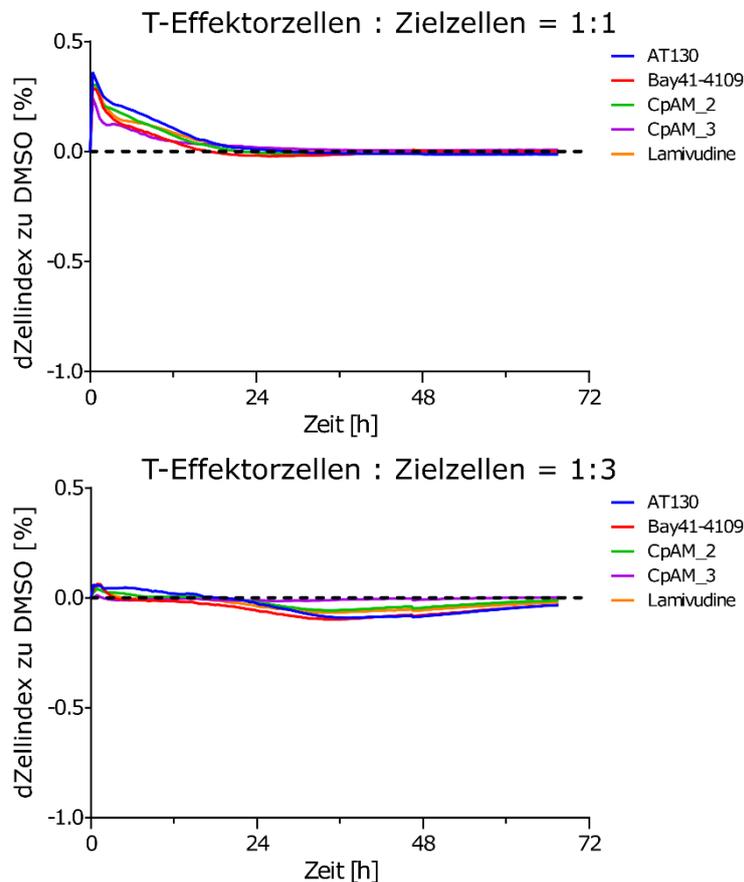


Abbildung 2.14: Differenzdarstellung der Graphen aus Abbildung 2.13.
Hier ist die Abweichung der Kurven von der DMSO-Kurve dargestellt. Die Werte sind absolut.

Zu genaueren Veranschaulichung stellten wir die Abweichung der behandelten Proben von der unbehandelten Probe dar. Die unbehandelte Probe ist als horizontaler Strich bei 0.0 dargestellt und die anderen Proben jeweils relativ dazu. Man kann gut erkennen, dass die Reduktion des gemessenen Zellindex der behandelten Proben sich nur geringfügig von der unbehandelten Kontrolle unterscheidet und nahezu deckungsgleich mit der NRTI behandelten Kontrolle war (Abbildung 2.14).

Um die Unterschiede deutlicher zu machen, wurde in Folgeexperimenten ein weniger affiner TCR, der TCR_{C18-27-5E} mit einer mittleren Affinität verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass auch unterschiedliche CAM-Konzentrationen keinen bedeutsamen Effekt auf die Zytotoxizität der transduzierten T-Zellen haben.

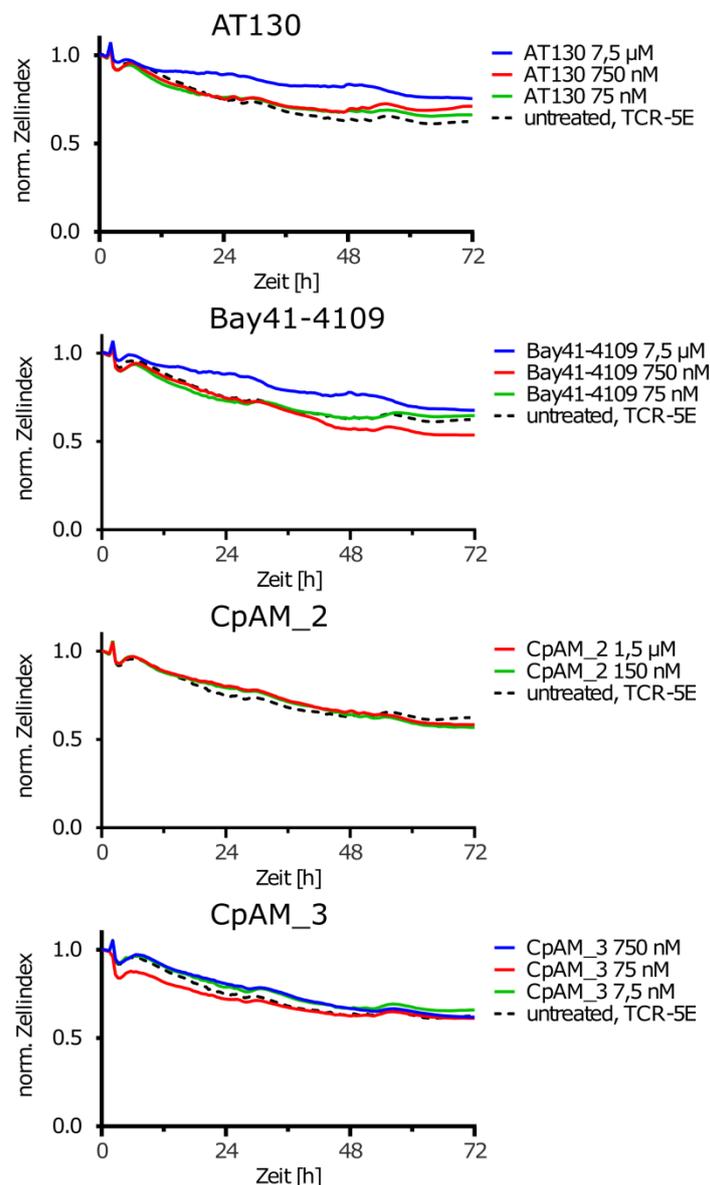


Abbildung 2.15: Ko-Kulturrexperiment mit HepG2.2.15 Zellen und transduzierten T-Zellen die den TCR_{C18-27-5E} trugen.

HepG2.2.15 Zellen wurden in einer 96-well e-Platte ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz für drei Tage mit CAMs behandelt. Danach wurden die mit TCR_{C18-27-5E} transduzierten T-Zellen in dem Effektorzell : Targetzell Verhältnis 1:3 auf die Hepg2.2.15 Zellen gegeben und weitere drei Tage kultiviert. Der Verlauf des Zellindex wurde hierbei in regelmäßigen Intervallen aufgenommen (xCelligence Gerät). Es sind jeweils die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten abgebildet.

Die Zellindizes der behandelten Proben blieben in Steigung und teilweise auch im Wert sehr nah an der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 2.15, gestrichelte Linie). Auffallend ist hier, dass kaum Killing stattgefunden hat. Der Zellindex reduziert sich nur um etwa 40 %, was auf eine unzureichende Viabilität der Effektorzellen hindeuten kann. Eine Positivkontrolle, in der 100 % Tötung erreicht wird, war in diesem Experiment nicht vorhanden und ist in diesem Assay auch nicht zuverlässig zu implementieren. Nach Rücksprache mit Experten für diese Art von Experimenten (K. Wisskirchen) wurde eine Tötung von 40 % zwar als gering, jedoch nicht als fehlgeschlagen

eingearbeitet. Da man bei diesen Experimenten T-Zellen von humanen Spendern verwendet, ist man Donoreffekten ausgeliefert, was zu derartigen Ergebnissen führen kann.

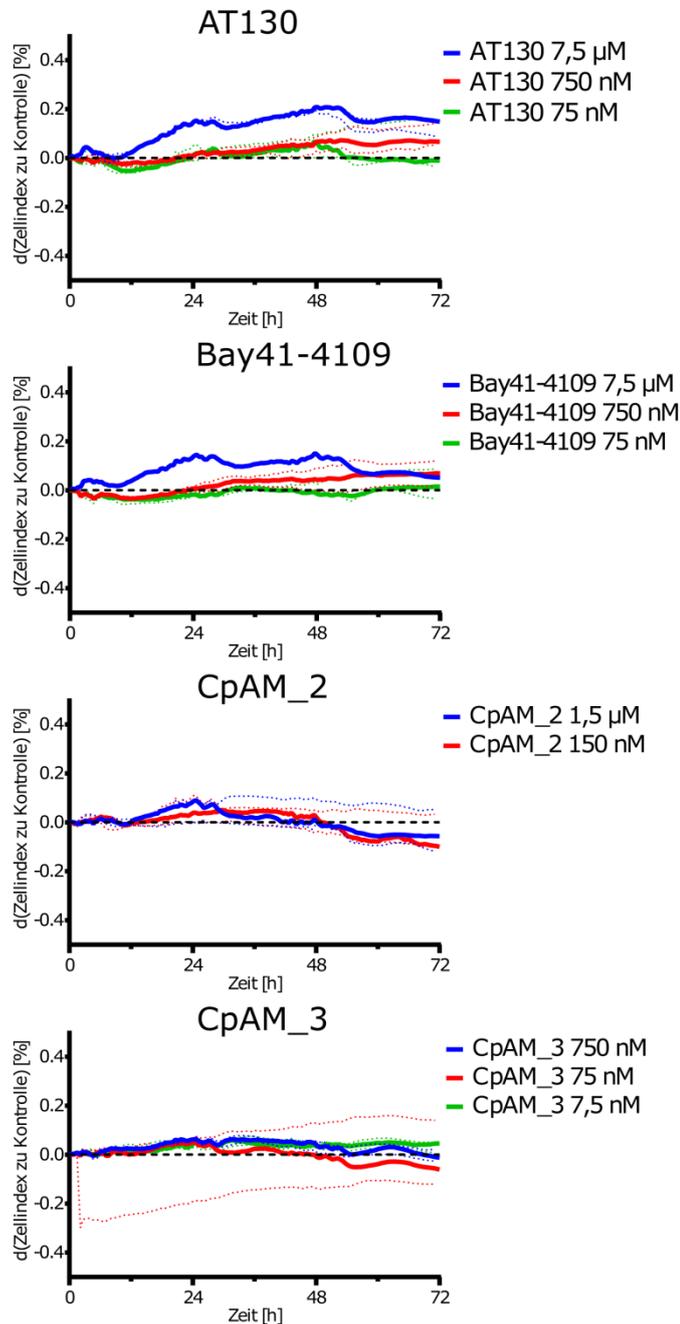


Abbildung 2.16: Detailanalyse des Ko-Kulturrexperiment mit HepG2.2.15 Zellen und transduzierten T-Zellen die den TCR_{C18-27-5E} trugen.

In dieser Darstellung der Daten aus der vorherigen Abbildung wurde die unbehandelte Kontrolle als Referenz verwendet und nur Abweichungen der behandelten Proben zu ihr dargestellt. Es ist der Mittelwert dargestellt mit der Streubreite als gepunktete Linie.

Auch hier wurden die Signale zur genaueren Analyse als Abweichung von der unbehandelten Kontrolle dargestellt. In dieser Darstellung (Abbildung 2.16), in der die unbehandelte Kontrolle als Referenz (Nulllinie) verwendet wird, kann man erkennen, dass die behandelten Probenwerte sich

nur sehr wenig von der Kontrolle unterscheiden. Die Abweichungen zu stärkerer Zytotoxizität (negative Werte) lagen innerhalb des Streubereiches und es waren, wenn überhaupt, Abweichungen zu geringerer Zytotoxizität (positive Werte) zu beobachten.

2.2.2.1 Effekt auf IFN- γ Sekretion

Nachdem kein relevanter Einfluss einer CAM-Behandlung auf die Zytotoxizität von CD-8 Effektor-T-Zellen festgestellt werden konnte, wurde der Einfluss auf die Zytokinsekretion überprüft.

Wenn CD8 Effektor-T-Zellen durch Bindung eines passenden HLA-Komplexes ausreichend aktiviert werden, wirken sie zytotoxisch und zerstören die Zielzelle. Zusätzlich sezernieren aktivierte T-Zellen das Zytokin IFN- γ und andere Zytokine. Diese Funktion ist nicht direkt an die zytotoxische Funktion gekoppelt und kann neben dem zytotoxischen Effekt auch als Maß für die Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen verwendet werden.

Hierfür wurde neben den vorher verwendeten TCRs 7D und 5E auch der TCR_{C18-27}-FLP14 verwendet, der zu den niedrig affinen TCRs aus dem Repertoire von K. Wisskirchen gehört und in ihren Analysen ein hohes Potential für Zytokininduktion zeigte.

Die Zytotoxizität wurde nicht mehr betrachtet und die Zellen wurden in 24-Loch Platten ausgesät. Wiederum wurden die Zellen nach Erreichen der Konfluenz für drei Tage behandelt und dann die T-Zellen in einem E:T-Verhältnis von 1:3 auf die Zielzellen gegeben. Die Ko-Kultur wurde für drei Tage durchgeführt. Nach Ablauf der drei Tage wurde der Überstand abgenommen und per ELISA die IFN- γ -Konzentration bestimmt.

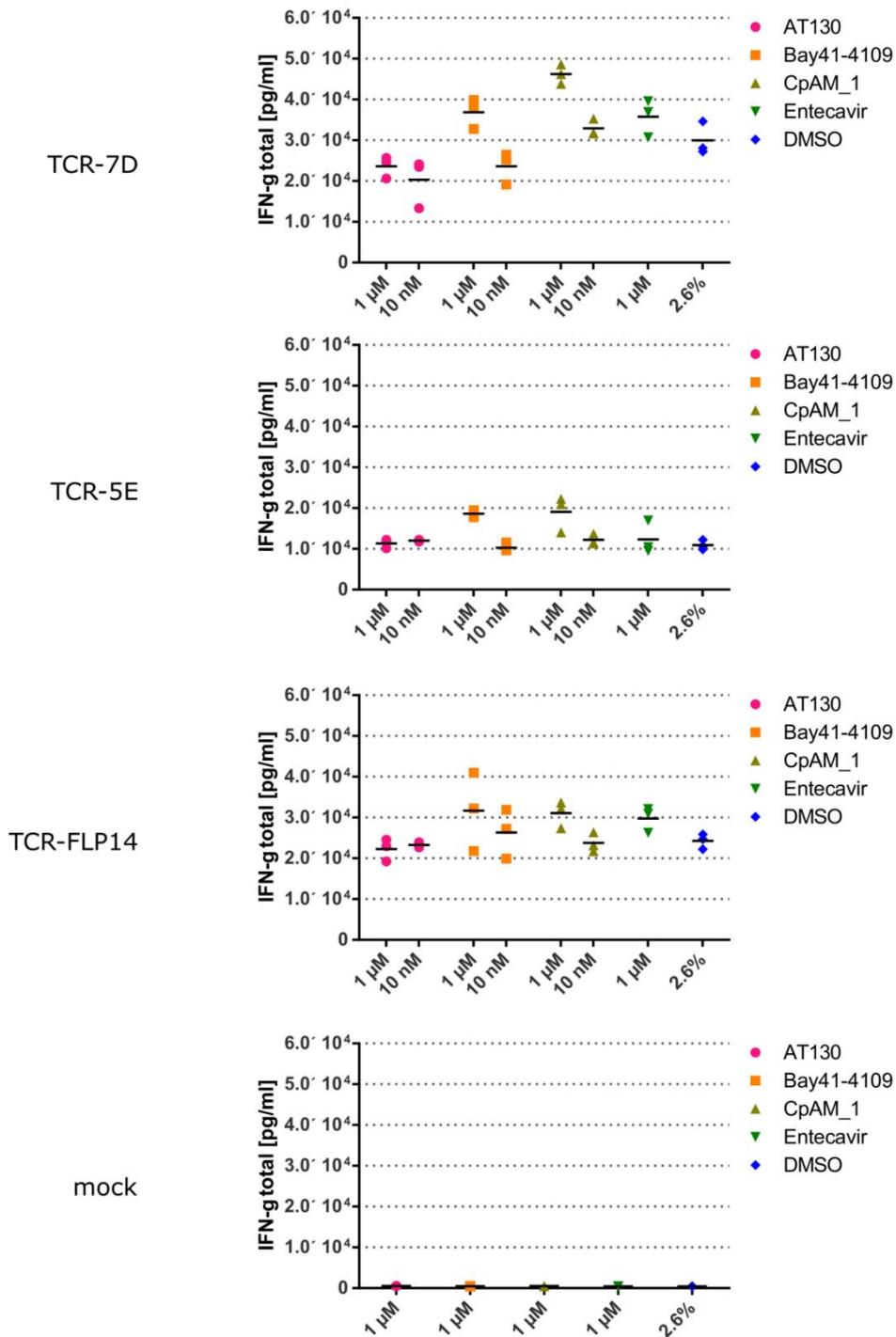


Abbildung 2.17: T-Zell-Aktivierungsexperiment mit TCR_{C18-27} transduzierten T-Zellen auf HepG2.2.15 Zellen mit CAM Behandlung.

In diesem Experiment wurden HepG2.2.15 Zellen in 24-well Platten ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit den jeweiligen Inhibitoren (CAMs und Entecavir) behandelt. DMSO diente als Kontrolle. Nach drei Tagen Behandlung wurden die mit TCR-7D, TCR-5, TCR-FLP14 und mock transduzierten T-Zellen auf die HepG2.2.15 Zellen gegeben und die Zellen drei Tage gemeinsam in Kultur gehalten. Nach Ende der Ko-Kultur wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und in einem ELISA zur Bestimmung der IFN-γ-Konzentration aufgetragen. Es sind jeweils der Mittelwert durch eine schwarze Linie und dazu individuelle Replikate dargestellt.

Die IFN- γ Konzentrationen waren bei Behandlung mit 1 μ M CpAM_1 bzw. Bay41-4109 gegenüber der Kontrollbehandlung um jeweils etwa 10000 pg/ml erhöht (Abbildung 2.17). Dies gilt für die TCRs 7D und 5E. Bei Verwendung des TCR-FLP14 war der Effekt geringer ausgeprägt. Die Behandlung mit Bay41-4109 sowie die Behandlung mit 10 nM Bay41_4109 oder CpAM_1 bewirkte keine verstärkte T-Zellaktivierung. Bei Behandlung mit AT130 fand sich eher eine allgemeine Reduktion der IFN- γ Sekretion, die unabhängig vom verwendeten vom TCR war und auch keine Korrelation zur CAM Konzentration zeigte. Auffällig ist, dass der TCR-5E auch in diesem Experiment eine schwache Aktivierung zeigte. Dies könnte darauf hindeuten, dass dieser TCR in dieser Art Assay oder mit der Behandlung inkompatibel ist. Die mock-transduzierten Zellen zeigten keinerlei IFN- γ Sekretion, was die Spezifität der T-Zellaktivierung zeigt.

Die Ergebnisse dieses und der Ko-Kulturexperimente zeigen, dass CAMs vom Typ II und NRTIs bei ausreichenden Konzentrationen (hier 1 μ M) in der Lage sind, bei entsprechend spezifischen T-Zellen eine Zytokinantwort, aber keine Effektorantwort (Tötung) auszulösen. CAMs vom Typ I sind nicht in der Lage, bei gleichen Konzentrationen, eine der beiden Reaktionen zu verursachen.

2.2.3 Auswirkungen der CAM Behandlung auf intrazellulären HBc Abbau

Nachdem zu Beginn gezeigt werden konnte, dass die Behandlung mit Typ II CAMs zu einer selektiven Reduktion des intrazellulären HBc führt, wurde der Abbauweg von HBc genauer untersucht. Durch Inhibitionsexperimente von C. Ko konnte gezeigt werden, dass Bortezomib und MG132 den Typ II-CAM induzierten HBc-Abbau nicht verhindern können (persönliche Mitteilung).

In einem weiteren Inhibitionsexperiment wurden HepG2-NTCP k7 Zellen mit HBV infiziert und der Abbauweg von HBc bei CAM-Behandlung weiter untersucht. Hierzu wurden nach CAM Behandlung die spezifischen Proteaseinhibitoren E-64 und AcLeu (N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO) verwendet. Der Inhibitor E-64 inhibiert Cysteinproteinasen wie Papain, Calpain und Cathepsine. AcLeu inhibiert Calpain I, Calpain II, Cathepsin L und andere neutrale Cysteinproteasen. Die Inhibitoren wurden mit einer Konzentration von 10 μ M angewendet.

Nach vier Tagen CAM-Behandlung und 2 Stunden Behandlung mit den Inhibitoren wurde ein 10-minütiger Puls mit Schwefel-35 markiertem Cystein und Methionin auf die Zellen gegeben. Danach wurde wieder normales Medium für drei Stunden auf die Zellen gegeben und die Zellen dann lysiert. Aus dem Lysat wurde mittels magnetischer Immunopräzipitation HBc isoliert.

Das Isolat wurde auf ein Gel aufgetragen, chromatografisch getrennt und dann getrocknet. Die Radioaktivität wurde mittels eines Phosphoscreens und eines Phosphoreaders sichtbar gemacht und densitometrisch ausgewertet.

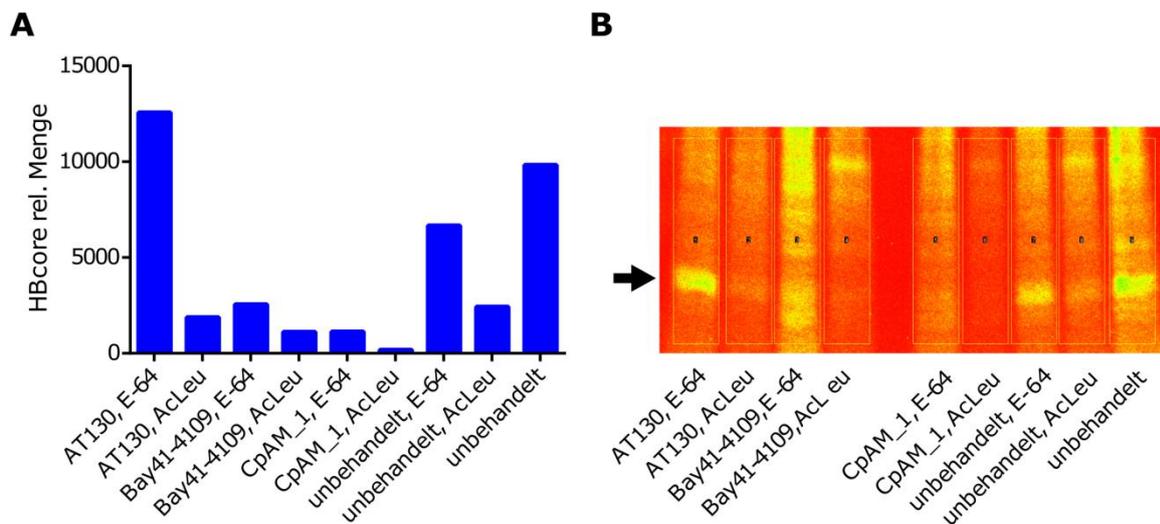


Abbildung 2.18: Experiment zur Bestimmung des HBc Abbauweges.

HepG2-NTCP k7 Zellen wurden mit HBV infiziert und sechs Tage nach der Infektion mit CAMs (AT130, Bay41-4109, CpAM_1 je 5 μ M) behandelt. Nach vier Tagen Behandlung wurden die Zellen für 2 Stunden mit den spezifischen Proteaseinhibitoren E-64 (10 μ M) und AcLeu (10 μ M) inkubiert. Während des gesamten Experiments wurde die CAM- und die Inhibitor-Behandlung weitergeführt. Zur Quantifizierung wurden die Proteine radioaktiv markiert. Nach der Markierungsphase (pulse) folgte eine dreistündige Folgephase (chase), die mit der Lyse der Zellen endete. Danach wurde HBc aus dem Lysat immunopräzipitiert und auf ein Gel aufgetragen. Dieses Gel wurde auf einem Phosphoscreen exponiert und danach wurde die kumulierte Aktivität densitometrisch quantifiziert.

A: In der Grafik ist die kumulierte optische Dichte jeweils einer Bande pro Probe abgebildet.

B: Falschfarbendarstellung der vom Phosphoscreen detektierten Strahlungsquanten. Der Pfeil zeigt an, wo sich das HBc im Gel befindet. Eine Smiley-Verzerrung ist zu erkennen.

In der densitometrischen Quantifizierung des Gels (Abbildung 2.18-A) war zu sehen, dass die Menge an markiertem HBc in der mit AT130 und E-64 behandelten Probe etwa doppelt so hoch war wie in der unbehandelten Probe. In den Bay41-4109 und CpAM_1 behandelten Proben war dagegen keine Wiederherstellung der intrazellulären HBc-Konzentration zu beobachten. Es war im Falschfarben-Gelbild zu erkennen, dass die AcLeu behandelten Proben allgemein niedrigere Proteinmengen aufwiesen als die E-64 behandelten Proben (Abbildung 2.18-B). Insgesamt sind die Ergebnisse jedoch nicht eindeutig und man kann aus diesen Daten keine belastbare Aussage über den Einfluss der inhibierten Proteasen sagen.

Auffallend ist die Probe mit Bay41-4109 und E-64 Behandlung. In dieser Probe gibt es einen starken und diffusen Hintergrund, den es in der Form in keiner der anderen Proben gibt. Dies ist auffallend, da durch den IP-Schritt der Hintergrund reduziert werden sollte.

2.2.4 Auswirkungen der CAM Behandlung auf das Proteinstressniveau in der Zelle

Akkumulation und erhöhte Abbauraten von Proteinen können in Zellen Stresssignale auslösen.

Um die Induktion von zytoplasmatischem und endoplasmatischem Proteinstress zu untersuchen,

wurde die Induktion von HSP70 und Grp78 analysiert. Diese Proteine sind homolog zueinander und stellen jeweils die zytoplasmatische und die endoplasmatische Variante voneinander dar. Hier auch den Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER) zu untersuchen, erschien relevant, da die viralen Oberflächenproteine im ER produziert werden und besonders das große und das mittlere Oberflächenprotein durch den Mangel an Kapsiden die Zelle nicht mehr verlassen können.

Als Positivkontrollen für die jeweiligen Stressarten wurden Cadmiumchlorid (CdCl_2 , toxisch, allgemeiner Stress) und Tunicamycin (ER-Stress) verwendet.

Die Induktion der Proteine wurde auf mRNA-Ebene per RT-qPCR analysiert.

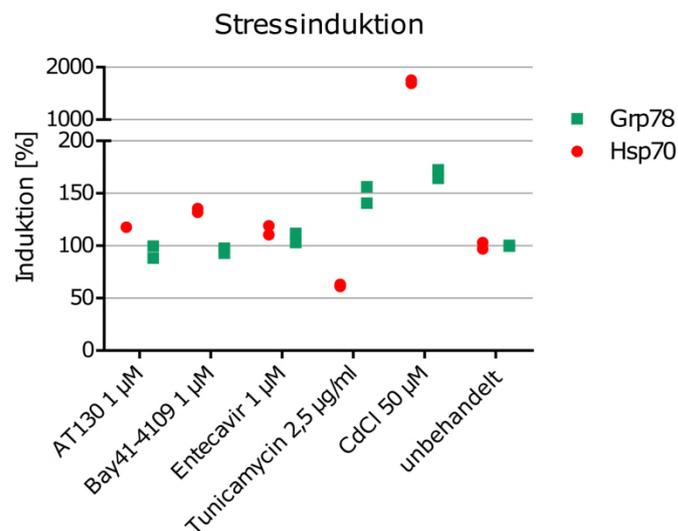


Abbildung 2.19: Stressinduktion bei CAM-Behandlung von infizierten Zellen.

HepG2-NTCP k7 Zellen wurden ausgesät und nach zwei Tagen Differenzierung in D-Mem complete mit 2,5% DMSO mit HBV infiziert. Die Behandlung der Zellen mit CAMs und Entecavir erfolgte nach 6 Tagen für 3 Tage, Tunicamycin wurde acht Stunden und CdCl_2 wurde 45 Minuten vor der Zellyse auf die Zellen gegeben. Aus den Lysaten wurde die RNA isoliert und in cDNA re-transkribiert. Die Expression von Grp78 und HSP70 wurde mit spezifischen Primern via qPCR analysiert. Es sind die einzelnen Replikate (n=2) abgebildet.

Die Werte für HSP70 sind in den Proben mit CAM-Behandlung leicht erhöht, aber immer noch in der Größenordnung der unbehandelten Kontrolle. Die CdCl -Probe zeigt, dass eine Induktion zu einer Verzwanzigfachung des Wertes führen kann und zeigt damit, dass die CAMs keinen starken Stress induzieren. Das Grp78 erscheint hingegen sehr stabil in seiner Expression zu sein, entfernen sich doch die Werte bei den CAM-Proben kaum vom Wert der unbehandelten Kontrolle. Bei Behandlung mit dem spezifischen ER-Stressor Tunicamycin hingegen ist eine Induktion auf einen Wert von etwa 150 zu beobachten und auch CdCl induziert Grp78 auf einen Wert von etwa 165. Hieran kann man erkennen, dass auch ein starker Stress wie CdCl den Wert nicht in der Art steigern kann, wie wir es bei Hsp70 beobachteten.

CAM-Behandlungen scheinen, wenn überhaupt nur schwachen zytoplasmatischen Proteinstress zu verursachen und keinen ER-Stress.

2.2.5 Auswirkungen der CAM Behandlung von infizierten Hepatozyten auf die Induktion der angeborenen Immunantwort

Das Vorhandensein viraler Proteine und viraler Polynukleotide kann Virus-unspezifische aber gezielte Reaktionen des angeborenen Immunsystems auslösen. Um die Induktion unterschiedlicher angeborener Immunstimulationswege bei CAM-Behandlung zu untersuchen wurde die Expression von IL-6, IL-8, IL-1 β , IP10, A20 und der 2'-5'-Oligoadenylatsynthase (2,5-OAS) via RT-qPCR untersucht. Durchgeführt wurde dieses Experiment in HBV infizierten HepaRG Zellen, da diese Zelllinie über eine funktionierende immunstimulatorische Maschinerie verfügt (R. Parent and L. Beretta, 2008), im Gegensatz zu HepG2 basierten Zelllinien (P. Keskinen et al., 1999). Es wurden die publizierten CAMs Bay41-4109 und AT130 mit den unbekanntenen CpAM_2 und CpAM_3 verglichen und zudem noch Entecavir als Vergleichssubstanz.

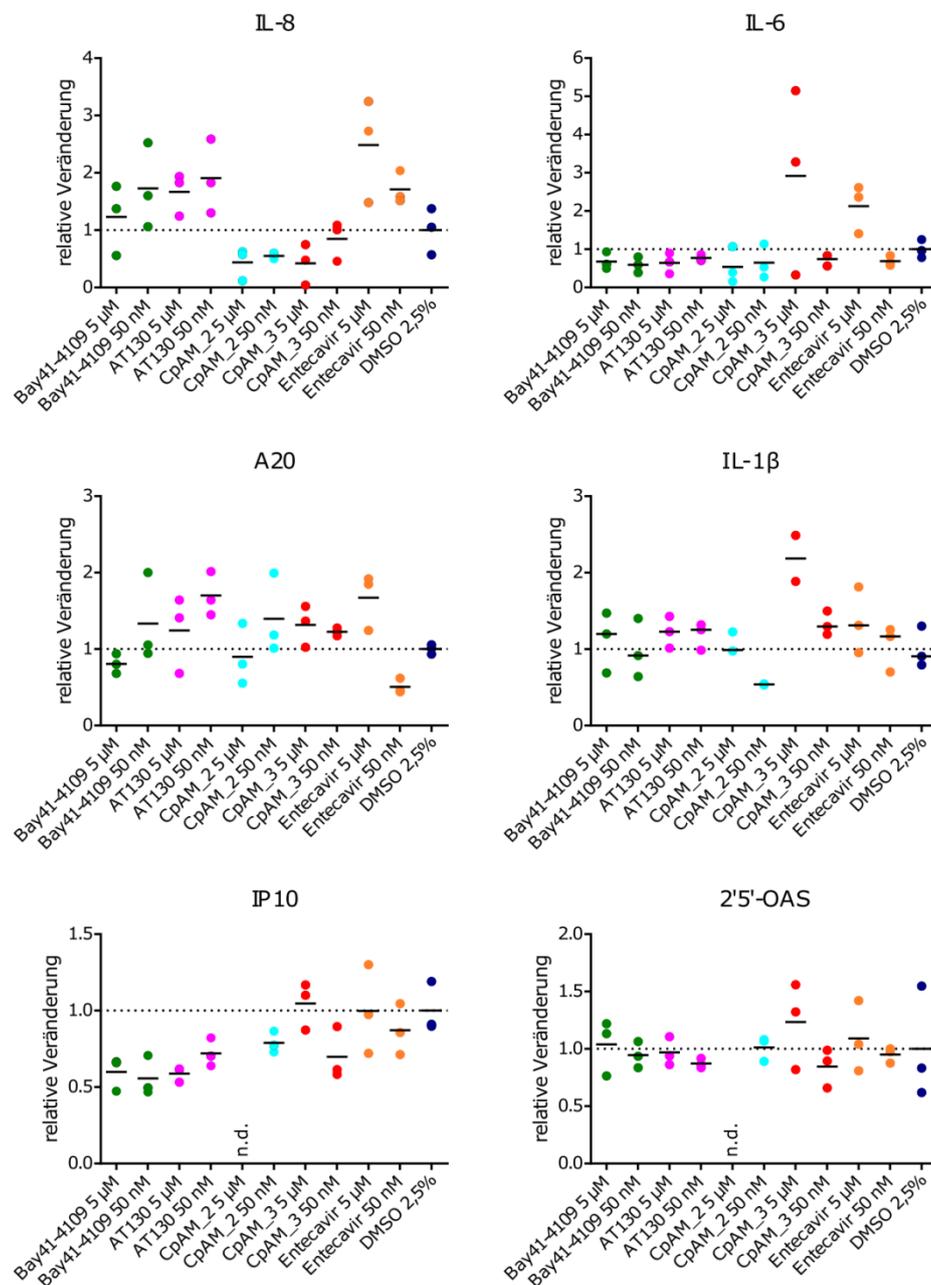


Abbildung 2.20: Induktion der angeborenen Immunantwort in HBV infizierten HepaRG Zellen.

Differenzierte HepaRG-Zellen wurden mit HBV infiziert und nach sechs Tagen mit CAMs behandelt. Nach sechs Tagen CAM-Behandlung wurden die Zellen lysiert und RNA präpariert. Aus der RNA wurde cDNA hergestellt. Die Induktion der Markergene wurde mittels qPCR untersucht. Angegeben ist der Mittelwert aus drei Replikaten und die einzelnen Replikatwerte als Punkt. Bei den Analysen für IP10 und 2'5'-OAS war es aufgrund eines technischen Fehlers nicht möglich, den Wert für CpAM_2 5 µM zu bestimmen.

Die Behandlung mit Bay41-4109 und AT130 zeigte eine dosisunabhängige Induktion von IL-8. Die Behandlung mit CpAM_2 und CpAM_3 führte zu einer Reduktion der IL-8 Expression in den Zellen. Bei Behandlung mit Entecavir konnte eine dosisabhängige Induktion festgestellt werden. Die Behandlung mit CAMs zeigte nur im Fall von CpAM_3 und Entecavir bei jeweils 5 µM einen Effekt. Die Induktion von A20 bei Behandlung mit Bay41-4109, AT130 und CpAM_2 zeigte ein invers

dosisabhängiges Induktionsmuster, was aber durch die große Streuung der Werte abgeschwächt wird. CpAM_3 führte zu einer dosisunabhängigen Induktion von A20. A20 wurde bei Behandlung mit Entecavir dosisabhängig induziert. IL-1 β wurde von Bay41-4109, AT130, CpAM_2 und Entecavir nicht in relevantem Maß induziert. CpAM_3 sorgte für eine schwache Induktion bei 5 μ M aber keine relevante Induktion bei 50 nM.

Die Expression der beiden IFN-induzierbaren Faktoren IP10 und 2'5'-OAS wurde durch keine der verwendeten Substanzen hochreguliert.

Die gemessene IP10-Expression war bei 50 nM CpAM_3 sowie AT130, Bay41-4109 und CpAM_2 geringer als die der unbehandelten Probe.

3 Diskussion

Die in der Einleitung erwähnten, etablierten Therapien stellen bisher kein zuverlässiges Werkzeug zur kurativen Behandlung einer Hepatitis B Virus Infektion dar (D. Ganem and A. M. Prince, 2004). Neben der unspezifischen Therapie mit PEGyliertem IFN- α ist die einzige spezifische für die Behandlung von HBV-Infektionen zugelassene Stoffklasse von antiviralen Medikamenten, die der NRTIs, in dieser Arbeit durch Entecavir und Lamivudine vertreten (D. Ganem and A. M. Prince, 2004; D. R. Langley et al., 2007). Das Ziel dieser Arbeit war, die Evaluierung der neuen Wirkstoffklasse der CAMs vorzunehmen. Von Interesse sind hierbei mögliche Effekte auf die Antigenpräsentation und die damit verbundene T-Zell Antwort, sowie intrazelluläre Effekte. Neben den bekannten und in der Literatur beschriebenen CAMs AT130 (W. E. Delaney et al., 2002; R. B. Perni et al., 2000) und Bay41-4109 (K. Deres et al., 2003) wurden in dieser Arbeit zusätzlich die neuen Substanzen CpAM_1, CpAM_2 und CpAM_3 untersucht.

3.1 CAMs inhibieren HBV Replikation und Virusproduktion in infizierten und transgenen Modellsystemen

Bei der Untersuchung der Wirksamkeit in unseren Infektionsmodellen konnten wir initial eine hohe Sensitivität der transgen Virus-exprimierenden Zellen für die getesteten antiviralen Substanzen feststellen (Abbildung 2.2, Abbildung 2.3). Die Zellen jedoch, die mit dem Virus infiziert wurden, benötigten höhere Konzentrationen, um die gleiche Reduktion der Virusproduktion zu erreichen (Abbildung 2.4). Im Detail stellte sich heraus, dass bei den HBV-transgenen Zelllinien HepG2-H1.3 und HepG2.2.15 die IC50 bei einer geringeren Konzentration erreicht wurde als bei infizierten HepG2-NTCP k7 Zellen (Tabelle 2). Dieser Effekt konnte für alle untersuchten CAMs nachgewiesen werden. Die Ursache für eine höhere Sensitivität für CAMs von transgenen Zellen ist derzeit nicht bekannt.

Dies ist insofern bemerkenswert, da die transgenen Zelllinien dafür bekannt sind, größere Mengen des Virus zu produzieren, als infizierte. Weiterhin ist die Infektion von Zellen in Kultur nicht so effizient, wie die Infektionseffizienz des Virus *in natura* suggeriert (Y. Komiya et al., 2008). Man könnte also eine höhere IC50 erwarten.

Eine Ursache des Effektes könnte sein, dass sich die transgenen Zellen durch die ständige Expression viraler Produkte in einem latent gestressten Zustand befinden (T. Severi et al., 2006; F. Yang et al., 2008) und daher stärker auf zusätzliche Stressreize, wie beispielsweise die Akkumulation von HBc, reagieren und damit in ihrer Viabilität reduziert sind was sich in einer höheren Sensitivität ggü. CAMs äußert.

Obwohl bekannt ist, dass HepG2-basierte Zelllinien keine messbare Immunantwort gegen HBV zeigen (J. Lucifora et al., 2010), kann eine Voraktivierung zelleigener antiviraler Mechanismen durch die dauerhafte Expression viraler Produkte in den transgenen Zellen nicht ausgeschlossen werden (H. Guo et al., 2009; J. Lucifora et al., 2010).

Eine weitere Ursache könnte sein, dass die Replikationsmechanismen sowohl der Zelle als auch des Virus durch die artifizielle Natur der transgene Modifikation nicht so robust sind, wie in infizierten Zellen in denen das Virus in einer nativeren Situation repliziert.

Alle Hintergrundeffekte könnten dazu führen, dass transgene Zellen wie beobachtet deutlich sensitiver auf die Behandlung mit CAMs reagieren.

Im Vergleich dazu müssen Zellen im Infektionsmodell vor der Infektion keine HBV-Produkte herstellen, sie sind also weniger lange dem Stress durch die Virusproduktion ausgesetzt. Zusätzlich sind die Zellen zum Zeitpunkt der Behandlung erst seit sechs Tagen infiziert, die mögliche Voraktivierung der zelleigenen, antiviralen Mechanismen ist daher schwächer ausgeprägt als in den transgenen Zellen.

Den beobachteten Effekt dadurch zu erklären, dass in einigen dieser Zellen cccDNA vorhanden ist und in anderen nicht, scheint ungerechtfertigt, da wir nicht abschließend ausschließen können, dass tatsächlich keine cccDNA gebildet wird. Es gibt keinen definitiven Grund, weshalb es in den transgenen Zellen nicht zur Etablierung von geringen Mengen cccDNA kommen kann.

Der beobachtete Unterschied zwischen HBV transgen exprimierenden HepG2-H1.3 und HepG2.2.15 Zellen könnte seine Ursache im transgenen Konstrukt selbst haben. HepG2.2.15 Zellen sind mit einem Konstrukt aus zwei vollständigen Genomen, von denen jeweils zwei hintereinander kodiert sind und zwei weitere palindromisch (Ende and Ende ($\leftarrow\leftarrow\rightarrow\rightarrow$)) angeordnet sind. Dies sorgt für eine sehr stabile HBV-Expression in diesen Zellen und wurde als robust gegenüber antiviralen Substanzen beschrieben (S. K. Ladner et al., 1997).

Eine Vorhersage des IC₅₀-Wertes in einem Modell mit primären Zellen fällt schwer, da die Ergebnisse in den hier verwendeten Modellsystemen nicht den Erwartungen entsprachen. Dabei ist zu beachten, dass die hier verwendeten Zelllinien von Krebszellen abstammen, ihr Metabolismus und ihre Zellbiologie also nicht der von regulären Hepatozyten entspricht. Daher muss beachtet werden, dass die antiviralen Substanzen auch Auswirkungen auf die Zellen selbst haben könnten (off-target Effekte) und dadurch die IC₅₀ ebenfalls verändert werden kann. Dies kann im Übrigen auch bei den obigen Betrachtungen nicht ausgeschlossen werden.

Die gefundenen IC₅₀-Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie die von Entecavir oder Lamivudine und bewegen sich somit in Bereichen, die auch eine spätere Anwendbarkeit in Tiermodellen oder in humanen Patienten gewährleisten.

3.2 Vergleich der Wirkmechanismen – Typ I und Typ II CAMs gegen NRTIs

Die unterschiedlichen Effekte der CAMs Typ I und Typ II auf den Assemblyprozess (B. Venkatakrishnan et al., 2016; Z. Zhou et al., 2017) welche in der Einleitung bereits erwähnt wurden, verhindern jeweils gleichermaßen, dass pgRNA in Kapside verpackt wird. Es besteht jedoch ein großer Unterschied im Vergleich zur NRTI-Behandlung.

Die Wirkung der NRTIs besteht in der Inhibition der reversen Transkriptase (RT)-Aktivität der viralen Polymerase. Daraus resultiert eine zytoplasmatische Akkumulation von Nucleokapsiden, welche pgRNA und HBV-Pol enthalten, jedoch keine virale DNA (D. R. Langley et al., 2007; R. Prange, 2012).

Unsere Analyse zeigte, dass in AT130 und Bay41-4109 behandelten Proben weniger pgRNA vorhanden war als in Entecavir behandelten Proben (Abbildung 2.5). Dies unterstützt den postulierten Unterschied im Wirkmechanismus von CAMs und NRTIs.

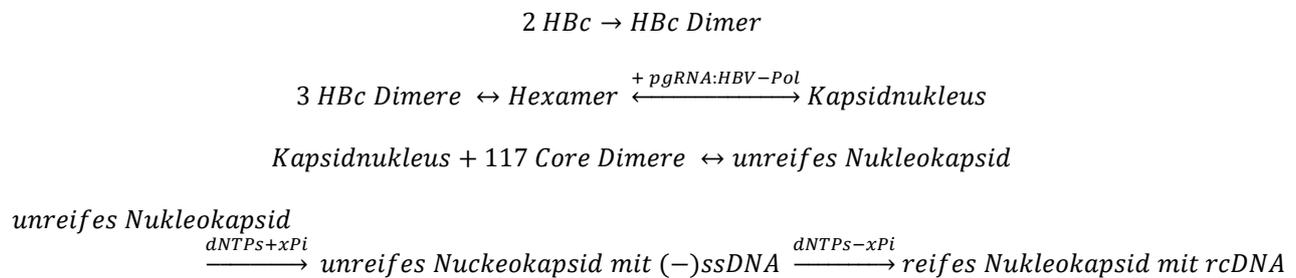
Während NRTIs den Assembly und das Verpacken der pgRNA zusammen mit der HBV-Polymerase im Nucleokapsid erlauben, wird dieser Prozess bei der Behandlung mit CAMs verhindert. Die pgRNA ist in der Kapsidhülle vor dem Abbau durch zytoplasmatische RNasen geschützt. Da sie aber nicht zu DNA transkribiert werden kann, weil die RT-Aktivität der HBV-Pol durch Entecavir inhibiert wird, akkumulieren die unreifen Nucleokapside im Zytoplasma.

Die Reifung des Kapsids und damit das Signal zum Weitertransport zur Membran und die darauffolgende Behüllung ist vom Vorhandensein der rcDNA im Kapsid abhängig. Die virale Polymerase schreibt die pgRNA in den (-)-Strang um. Der (-)-Strang interagiert mit den luminal orientierten CTDs der HBcs und löst dadurch eine Konformationsänderung aus (C. Packianathan et al., 2010; A. M. Roseman et al., 2005), die eine essentielle Phosphorylierung des Kapsids ermöglicht (J. Heger-Stevic et al., 2018; M. Kann and W. H. Gerlich, 1994; M. Melegari et al., 2005; L. Wittkop et al., 2010). Hierdurch wird der Start der Synthese des (+)-Stranges und damit der Herstellung der rcDNA ermöglicht (Z. Tan et al., 2015). Ist die rcDNA vorhanden, wird das Kapsid teilweise dephosphoryliert (D. H. Perlman et al., 2005; Q. Zhao et al., 2018). Diese Dephosphorylierung erlaubt den Transport zu den multivesikulären Körpern (R. Prange, 2012).

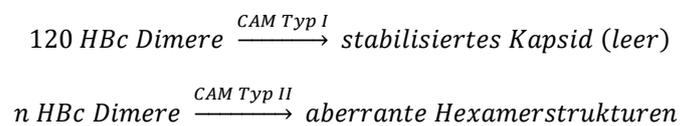
Bei CAM Behandlung kann die HBV-Pol die pgRNA wahrscheinlich binden, der Komplex wird dann aber nicht in ein Kapsid verpackt, da das HBc bzw. die stabilen HBc Dimere durch die von den CAMs beschleunigte Kapsidbildung bzw. Polymerbildung dem Prozess entzogen werden. Die Produktion von Virionen kann wie eine chemische Reaktion mit mehreren Komponenten betrachtet werden, die sich in einem Gleichgewicht zueinander befinden. Wird eine Komponente dem Gleichgewicht entzogen, so kann der Prozess, der in diesem Fall zur Bildung infektiöser Kapside

führt, nicht mehr ablaufen. Durch CAMs wird das HBc dem Prozess entzogen (C. Bourne et al., 2008; C. R. Bourne et al., 2006; S. J. Stray et al., 2005; S. J. Stray and A. Zlotnick, 2006; A. Zlotnick et al., 2002) und er kommt zum Erliegen. Obwohl ein Kapsidassembly von CAMs des Typ I nicht verhindert wird, werden keine infektiösen Virionen produziert, da die Interaktion mit dem HBV-Pol:pgRNA Komplex (R. Bartenschlager and H. Schaller, 1992; M. Junker-Niepmann et al., 1990) nicht mehr stattfinden muss (Kapsidnukleation) um das Assembly zu starten (C. R. Bourne et al., 2006; S. J. Stray et al., 2005; S. J. Stray and A. Zlotnick, 2006).

Zum besseren Verständnis wurden die oben erwähnten, dynamischen Prozesse als Reaktionsgleichungen dargestellt. Die Gleichungen entsprechend den Teilschritten die notwendig zur Bildung infektiöser viraler Partikel sind.



Kapsidbildung bei CAM-Behandlung:



Wir vermuten, dass in Zellen, welche mit CAMs behandelt wurden, die pgRNA nicht im Kapsid verpackt wird. Da die pgRNA starke Ähnlichkeit mit mRNA hat (R. Cattaneo et al., 1984) und die Lebensdauer von mRNA im Zytoplasma begrenzt ist, wird sie vermutlich über den beschriebenen ZAP-vermittelten Mechanismus degradiert (R. Mao et al., 2013). Dies erklärt die in unseren Assays gemessene Reduktion der pgRNA-Konzentration nach Behandlung mit CAMs. Der Effekt trat sowohl bei Behandlung mit AT130 als auch bei Behandlung mit Bay41-4109 auf und zeigte in beiden Fällen die gleiche Effektivität.

CAMs Typ I vs. NRTIs – Der Wirkmechanismus von CAMs des Typ I und NRTIs unterscheidet sich auf molekularer Ebene. Bei NRTI-Behandlung werden Nucleokapside erzeugt, die HBV-Pol und pgRNA enthalten. Durch die NRTI-Inhibition ist die HBV-Pol aber nicht in der Lage, die pgRNA in DNA umzuschreiben, wodurch die Reifung verhindert und die Produktion neuer Virionen blockiert wird. Dies verhindert zusätzlich den Rücktransport viraler DNA in den Nukleus, was als

ein Weg diskutiert wird, wie der cccDNA-Pool entsteht und aufrechterhalten wird (J. Kock et al., 2010).

Aus *in vitro* Experimenten wissen wir, dass CAMs des Typ I bei Inkubation mit HBc die Bildung leerer Kapside begünstigen (W. E. Delaney et al., 2002; S. P. Katen et al., 2013; R. B. Perni et al., 2000). Bei der Behandlung mit Typ I CAMs werden die HBc Untereinheiten in der Kapsidform stabilisiert, sodass das chemische Gleichgewicht zwischen den HBc Dimeren (die die funktionellen Bausteine des Kapsids darstellen) und dem vollständigen Kapsid stark in Richtung der Kapsidform verschoben ist (S. P. Katen et al., 2013). Hierdurch werden die HBc-Dimere effektiv aus dem Zytoplasma entfernt, sodass keine freien HBc Dimere mehr verfügbar sind, um den HBV-Pol:pgRNA Komplex zu binden. Die Bildung viraler Nucleokapside wird so stark reduziert, dass in unseren Untersuchungen teilweise keine Virionen mehr detektiert werden konnten. Dies stellt einen dem der NRTIs äquivalenten Effekt dar und ist in den üblichen Assays nicht zu unterscheiden, da in diesen meist die Menge von viraler DNA gemessen wird. Die Sekretion von viraler DNA in den Zellkulturüberstand oder das Serum von Patienten wird von beiden Substanzklassen gleichermaßen reduziert bzw. verhindert.

Ein Unterschied zwischen den Wirkmechanismen der NRTIs und den CAMs besteht darin, dass der HBV-Pol:pgRNA Komplex bei CAM Typ I-Behandlung im Zytoplasma verbleibt. Da die pgRNA, so wie die anderen viralen mRNAs, dem zellulären mRNA Turnover folgt, sollte ihre Akkumulation ohne Konsequenzen für die Zelle sein und stellt keinen potentiellen therapeutischen Ansatz dar. Die Akkumulierende HBV-Pol hingegen könnte ebenfalls, so wie es für das HBc vermutet wurde, einen therapeutischen Ansatz darstellen, wenn man T-Zellen findet oder generieren kann, die für von HBV-Pol stammende Peptide spezifisch sind.

Auf morphologischer Ebene unterschied sich der Effekt von NRTIs und Typ 1 CAMs nicht, wie unsere Immunfluoreszenz-Experimente zeigten. Die Lokalisation der Fluoreszenz war zwischen den NRTI und Typ I CAM behandelten Proben nicht zu unterscheiden. Die Daten weisen darauf hin, dass beide Typen der unreifen Kapside, die bei den jeweiligen Behandlungen entstehen, von der Zelle nicht unterschieden werden. Dies geschieht, obwohl die Nucleokapside, wie oben bereits erwähnt, durch den enthaltenen pgRNA:Pol-Komplex und die Interaktion zwischen diesem und dem Kapsid, eine andere Konformation (A. M. Roseman et al., 2005) und evtl. auch ein anderes Phosphorylierungsmuster als die leeren Kapside aufweisen müssten (A. Deroubaix et al., 2014; J. Heger-Stevic et al., 2018; M. Melegari et al., 2005; D. H. Perlman et al., 2005; Q. Zhao et al., 2018).

CAMs Typ II vs. NRTIs – Der Unterschied in der Wirkweise von CAMs des Typ II und NRTIs ähnelt dem bereits beschriebenen für CAMs des Typ I. Auch von Typ II CAMs wird das thermodynamische Gleichgewicht des Kapsidaufbaus verschoben, allerdings nicht hin zu regulären und leeren Kapsiden, sondern zu aberranten HBc-Komplexen. Aus *in vitro* Experimenten ist bekannt,

dass Typ II CAMs die Bildung von großen makromolekularen Proteinstrukturen verursachen, wenn HBc mit ihnen inkubiert wird (C. R. Bourne et al., 2006; Z. Qiu et al., 2017; S. J. Stray et al., 2005; S. J. Stray and A. Zlotnick, 2006; J. Tu et al., 2017; Z. Zhou et al., 2017). Diese großen Strukturen konnten elektronenmikroskopisch beobachtet werden (J. M. Berke et al., 2017; S. J. Stray et al., 2005) und wurden auch in chromatographischen Experimenten bestätigt (S. J. Stray and A. Zlotnick, 2006). In Zellkulturen konnten diese Strukturen intrazellulär bisher nicht beobachtet werden.

In einem antiviralen Assay, in dem nur die Reduktion viraler DNA im Zellkulturüberstand gemessen wird, ist dieser Effekt nicht von dem der NRTIs oder der Typ I CAMs zu unterscheiden. Da in diesem Assay nur die sezernierten Virusgenome quantifiziert werden, können intrazelluläre, molekulare Unterschiede zwischen Wirkmechanismen nicht differenziert werden.

Bei der Analyse von Zelllysaten von CAM Typ II (Bay41-4109, CpAM_2) behandelten Zellen durch native Gelelektrophorese stellten wir fest, dass keine Kapside in den Proben vorhanden waren (Abbildung 2.6). Bei Behandlung mit Typ I CAMs (AT130, CpAM_3) waren diese vorhanden, es konnte in ihnen jedoch keine DNA detektiert werden. Bei der Behandlung mit der Kontrollsubstanz Lamivudine wurden Kapside im Zelllysat gefunden, es konnte jedoch keine DNA detektiert werden. Dies kann damit zusammenhängen, dass die Kapside pgRNA enthielten, die aufgrund der Lamivudin-Behandlung nicht von der HBV-Pol retranskribiert werden konnte und deswegen von der Sonde nicht erkannt wurde oder degradiert war.

3.3 Lokalisation von HBc im Nukleus bei Typ II CAMs

Die Lokalisation von HBc im Zellkern wurde in verschiedenen Modellsystemen eingehend untersucht und hierbei wurden unterschiedliche Lokalisationsmuster gefunden, wobei HBc im Zellkern, im Zytoplasma und gleichzeitig in beiden Kompartimenten gefunden wurde (C. M. Chu and Y. F. Liaw, 1987; H. C. Li et al., 2010; H. Mabit et al., 2003; X. B. Pan et al., 2008; G. Yamada and P. K. Nakane, 1977). Die Lokalisation von HBc trägt auch zur Identifikation von Infektionen und der Verlaufsbeobachtung bei infizierten Patienten bei (C. M. Chu et al., 1995). Zudem wurde festgestellt, dass die Lokalisation von HBc vom Zellzyklus beeinflusst wird und z.B. während der S-Phase niedriger ist als in der G₁-Phase (C. T. Yeh et al., 1993).

Der Einfluss der CAM-Behandlung auf die intrazelluläre Lokalisation von HBc wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Dabei wurden sowohl das Infektionsmodell als auch das transgene Modell verwendet. Wir konnten hier keine Unterschiede hinsichtlich des Effektes der Substanzen auf die intrazelluläre Lokalisation des HBc zwischen den Zell-Modellen (transgen, infiziert) feststellen. Die Ergebnisse zeigten ein bemerkenswertes Muster der Lokalisation von HBc als Folge der Behandlung von HBV exprimierenden und infizierten Zellen mit Typ II CAMs (Bay41-4109, CpAM_1, CpAM_2) (Abbildung 2.7, Abbildung 2.9, Abbildung 2.10). HBc war im Zytoplasma nicht

nachweisbar und bildete granuläre Strukturen in den Zellkernen (Abbildung 2.8). Es waren bis zu fünf Granula pro Zellkern, mit einer Größe von etwa ein bis zwei Mikrometer vorhanden. In einem Zeitverlaufsexperiment stellten wir fest, dass sich die Granula nach etwa 48 Stunden nach Beginn der Behandlung bildeten (Abbildung 2.11). Im Kontext mit der Information, dass das HBc eine zytoplasmatische Halbwertszeit von über 24 h hat (pers. Komm. C. Ko), erscheint es plausibel, dass es so lange dauert, bis der Abbau vollständig erfolgt ist.

Die von uns festgestellte Elimination des zytoplasmatischen HBc in einer Zellkulturumgebung bestätigt die frühere Entdeckung, dass zytoplasmatisches HBc auch in HBV-exprimierenden Mäusen durch CAM Behandlung reduziert werden kann (O. Weber et al., 2002).

Die beobachteten HBc-Granula im Nukleus scheinen stabil zu sein, da wir sie auch zu deutlich späteren Zeitpunkten beobachten konnten (Abbildung 2.11). Es konnte nicht geklärt werden, ob die Persistenz auf der zeitlichen Stabilität beruht oder ob es einen dynamischen Turnover gibt und HBc stetig nachproduziert wird. Dies ist denkbar, da es bisher keine Hinweise darauf gibt, dass CAMs mit der Expression der viralen Proteine interferiert.

3.3.1 Entstehung des Lokalisationsmusters

Zytoplasmatische Elimination - Bei der Behandlung von HBc mit CAMs des Typ II bilden sich *in vitro* keine geschlossenen Kapside, sondern makromolekulare Strukturen die aus aneinander gelagerten HBc-Hexameren bestehen und strukturell 2D-Kristallen zu ähneln scheinen (S. J. Stray et al., 2005; S. J. Stray and A. Zlotnick, 2006). Da wir diese makromolekularen Strukturen, auch zu frühen Zeitpunkten, in unseren Zellkulturexperimenten nicht nachweisen konnten, gehen wir davon aus, dass sich diese Strukturen nicht in der Form ausbilden, wie sie *in vitro* gefunden wurden. Was jedoch denkbar ist, dass sich kleinere aberrante, aber stabile HBc-Polymere bilden, bei denen die CTD dauerhaft dem Zytoplasma exponiert ist. Die sorgt zunächst dafür, dass keine Kapside entstehen und die Virusproduktion verhindert wird. HBc liegt aber nun in einer Form vor, die im unbehandelten Zustand und auch bei NRTI oder CAM Typ I Behandlung nicht vorkommt. Die C-terminale, Arginin-reiche Nukleotidbindedomäne (C-terminal domain, CTD), die im Kapsid normalerweise im Inneren verborgen liegt, ist dauerhaft exponiert.

Da nachgewiesen werden konnte, dass HBV-Kapside in der Lage sind unspezifisch RNA zu binden und zu verpacken, (J. Z. Porterfield et al., 2010) ist es wahrscheinlich, dass die exponierten CTDs zytosolische RNAs binden können. Ob dies jedoch für den beobachteten Effekt eine Rolle spielt, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Was wir vermuten ist, dass durch die Exposition der CTD eine Interaktion entweder ermöglicht oder mindestens intensiviert wird, die zu einer Elimination des HBc führt.

Es ist unklar, ob dieses Lokalisationsmuster durch den im Detail ungeklärten, aber wahrscheinlich über das Proteasom verlaufenden Abbauweg des HBc (K. Deres et al., 2003; M. L. Garcia et al., 2009; M. M. Minor and B. L. Slagle, 2014) erzeugt wird. Die Analysen von Interaktionspartnern des HBc und des Kapsids konnten den Weg hin zur Proteasom-Maschinerie nicht aufzeigen (G. Qian et al., 2012). Lediglich durch die Inhibition des Proteasoms konnte gezeigt werden, dass es am Ende dieses Weges steht (K. Deres et al., 2003). Auch die Ubiquitinierung von HBc konnte bisher nicht gezeigt werden (M. L. Garcia et al., 2009) obwohl eine Interaktion mit dem Ubiquitin-System essentiell für die Virus-Sekretion ist (M. Rost et al., 2006).

Granula im Nucleus - Aufnahmen mit einem Laser-Scanning Mikroskop bestätigten nicht nur, dass das HBc vollständig aus dem Zytoplasma eliminiert wurde, sondern auch, dass die HBc-Granula mit Promyelozytenleukämie (PML)-Kernkörpern (auch PML-Körper, PML nuclear bodies) kolokalisieren und eine intensive DNA-Färbung aufweisen.

PML-Körper sind Strukturen der Kernmatrix in Eukaryoten und etwa 0,1 bis 1 μm groß. Strukturell bestehen sie aus einer Außenschicht aus PML-Protein wobei die Komposition der umschlossenen inneren Proteine variabel ist. Die Anzahl dieser Strukturen pro Zellkern ist hochvariabel von 2 bis etwa 30 (R. D. Everett and M. K. Chelbi-Alix, 2007).

Die Interaktion und Kolokalisation von HBc und cccDNA mit PML-Körpern wurde in der Vergangenheit beschrieben (Y. L. Chung and T. Y. Tsai, 2009) und hat sich auch in der Verknüpfung von HBV und der DNA-Reparaturmaschinerie (Y. L. Chung, 2013) sowie der Regulation der cccDNA (Y. H. Guo et al., 2011) als relevant herausgestellt. Des Weiteren wird dieser Kolokalisation und Interaktion eine Beteiligung bei der Karzinogenese durch HBV zugeschrieben (Y. L. Chung and M. L. Wu, 2013).

Ob das beobachtete Phänomen eine inhärente Eigenschaft des HBc-Proteins ist oder ob es durch die CAM-Behandlung erst dazu kommt, konnte nicht abschließend geklärt werden, denn über den Mechanismus, mit dem die Typ II CAMs diesen Effekt bewirken, ist bisher nichts bekannt.

Wir vermuten, dass der Effekt, der zur abnormen Lokalisation im Nucleus und dem Abbau des akkumulierten HBcs im Zytoplasma führt, kein primärer Effekt der CAMs Typ II ist, sondern ein sekundärer, der erst durch die aberrante Struktur entsteht.

In Zellen, die mit einem Plasmid transfiziert wurden, von dem eine gekürzten Variante des HBc exprimiert wird (Cp149), konnte keine Kernlokalisierung nach CAM Typ II Behandlung festgestellt werden (C. Ko, persönliche Mitteilung). Dieser kürzeren Version des HBc fehlt die CTD, die nach Position 149 der Aminosäuresequenz kodiert ist (F. Schodel et al., 1993). Diese Domäne enthält sowohl die Kern-Lokalisations-Signale als auch die Kern-Exportsignale (M. Kann et al., 2007; H. C. Li et al., 2010). Zusätzlich enthält diese Domäne mehrere Serin/Threonin-

Phosphorylierungsstellen (D. H. Nguyen et al., 2008) und die Nukleotid-bindenden Arginin-Inseln (E. B. Lewellyn and D. D. Loeb, 2011).

Wenn die granuläre Form der Kernlokalisierung durch die CTD verursacht wird, dann erklärt dies das Fehlen des Lokalisationsmusters im Experiment von C. Ko und das hier beschriebene Muster. Zusätzlich wird auch das Fehlen des Musters bei Typ I CAMs erklärt, da in diesem Wirkmodell die Exposition der CTD nicht stattfindet.

Versuche, durch Inhibition des Proteasoms (pers. Komm. von C. Ko) und Cysteinproteasen das normale Lokalisationsmuster wiederherzustellen waren initial nicht erfolgreich. Hierzu wurden CAM-Behandelte Zellen mit unterschiedlichen Inhibitoren des Proteasoms und anderer zellulärer Proteasen inkubiert und dann in einem Pulse-Chase-Experiment geprüft, ob HBc detektiert werden konnte. Es konnte mit keinem der verwendeten Proteaseinhibitoren die Stabilität von HBc bei Behandlung mit einem Typ II CAM (Bay41-4109 und CpAM_1) wiederhergestellt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Inhibitionsexperimente mit spezifischen Proteaseinhibitoren für Cysteinproteasen lieferten ein uneindeutiges Ergebnis (Abbildung 2.18).

Unsere Ergebnisse zeigten auch, dass NRTIs oder Typ I CAMs dieses Lokalisationsmuster nicht verursachen. Wir fanden eine zur Kontrolle unveränderte HBc Distribution in den Zellen, die mit NRTI oder CAM Typ I behandelt waren. Von Typ I CAMs werden leere Kapside erzeugt, wobei die CTD im Kapsid luminal orientiert ist und für zytoplasmatische Faktoren unzugänglich. Von NRTIs werden Nucleokapside erzeugt, bei denen die CTD ebenfalls luminal orientiert ist. Es scheint, als sei dies der ursächliche Unterschied für die abweichenden Lokalisationsmuster.

3.3.2 Lokalisation von HBc im Nukleus und Kolokalisation mit PML-Körpern

Kernkörper (Nuclear Bodies, NB) sind Proteinkomplexe auf der Kernmatrix (also Innenseite) des Zellkerns, die im Elektronenmikroskop gut sichtbar und etwa 0,2 bis 1 μm groß sind. Pro Zelle gibt es, je nach Differenzierungsgrad, Zellzyklusphase und Zelltyp zwischen einem und 30 dieser NBs (R. Bernardi and P. P. Pandolfi, 2007). Die Promyelozytenleukämie (PML) ist namensgebend für dieses Protein bzw. die Proteinstruktur. Das PML-Protein wurde zuerst als charakteristisches Fusionsprotein mit RAR α , im Rahmen der namensgebenden Leukämie beschrieben (C. Andre et al., 1996). Heute wird es als Tumorsuppressor geführt (R. Bernardi and P. P. Pandolfi, 2007). Erst spätere Untersuchungen mit Autoantikörpern und auch elektronenmikroskopisch zeigten die Verbindung zwischen den zuvor entdeckten nuclear-bodies (NB) und dem PML-Protein auf.

Das PML-Protein ist das Protein, was meist die äußere Struktur der NBs ausmacht. Allerdings können innerhalb dieser Hülle viele andere Proteine vorhanden sein. Das PML-Protein fungiert als struktureller Organisator der NB (R. Bernardi and P. P. Pandolfi, 2007).

Eine entscheidende Eigenschaft der Komponenten der PML-Körper ist die posttranslationale Modifikation mit dem SUMO-Protein („Small Ubiquitin-related Modifier“, kleiner Ubiquitin-verwandter Modifikator) (V. Lallemand-Breitenbach and H. de The, 2010). Dieses Protein ähnelt dem bekannten Ubiquitin und kann wie dieses an Proteine gebunden werden (V. Lallemand-Breitenbach and H. de The, 2010). Hierfür sind die vom Ubiquitin-System bekannten E3-Ligasen zuständig. Das PML-Protein wird SUMOyliert, um zum Kernkörper transportiert zu werden und die meisten Komponenten des PML-Körpers werden, um zu dem PML-Körper transportiert zu werden, ebenfalls SUMOyliert (R. Bernardi and P. P. Pandolfi, 2007).

Untersuchungen zeigten, dass sich die Morphologie der PML-Körper in Abhängigkeit von Zellzustand, Immunsystem-Aktivierung oder viralen Infektionen ändert (R. Bernardi and P. P. Pandolfi, 2007; J. J. Luciani et al., 2006) und auch die Komposition der PML-Körper-Komponenten nicht immer gleich ist. Unter anderem wird die PML-Komposition durch Interferonsignaling maßgeblich beeinflusst (R. Bernardi and P. P. Pandolfi, 2007; M. K. Chelbi-Alix et al., 1995; C. Gongora et al., 1997; T. Regad and M. K. Chelbi-Alix, 2001). Typ I und II Interferone sind die Hauptregulatoren der PML Transkription (R. Bernardi and P. P. Pandolfi, 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass auch HBV-Proteine an die PML-Körper binden und hier eine wichtige Funktion in der Verbindung zur DNA-Reparatur Maschinerie herstellen (Y. L. Chung, 2013; Y. L. Chung and T. Y. Tsai, 2009; Y. L. Chung and M. L. Wu, 2013).

Die Daten deuten darauf hin, dass durch die CAM Typ II Behandlung eine Affinität für eine Komponente des PML-Körpers erzeugt oder verstärkt wird (Abbildung 2.12). Da dies bei CAMs des Typ I nicht auftritt, kann es nicht an der reinen Beschleunigung der Kapsidbildung liegen.

PML-Körper verändern ihre Morphologie bei Infektion mit Viren in Abhängigkeit vom Virus. Die Morphologie ist beispielsweise bei Adenoviren (V. Doucas et al., 1996) anders als bei Herpesviren (N. Gaudreault and C. Jones, 2011).

Es wurde eine Interaktion mit verschiedenen viralen Proteinen und dem Immunsystem postuliert. Viele Viren inhibieren oder nutzen die PML-Körper anderweitig aus, um eine robuste und effiziente Replikation zu gewährleisten (J. Berscheminski et al., 2013; M. K. Chelbi-Alix and H. de The, 1999; A. Moller and M. L. Schmitz, 2003).

Die exponierten RNA-Bindedomänen, der nach CAM Typ II Behandlung vorliegenden HBc Komplexe, sind aufgrund ihrer positiven Teilladung in der Lage, DNA über das negativ geladene Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat zu binden (analog dem Ribosephosphat-Rückgrat bei RNA). Bemerkenswert ist hierbei nicht, dass HBc DNA im Zellkern bindet, sondern bei CAM-Behandlung mit den PML-Körpern kolokalisiert und in diesen anscheinend auch DNA vorhanden ist, wie die DAPI-Färbung zeigte. Demnach gibt es eine spezifische Interaktion zwischen einer Komponente des PML-Körpers und dem CAM behandelten HBc. Eine Interaktion zwischen nativem HBc und PML-Komponenten konnte bereits nachgewiesen werden (Y. L. Chung and T. Y. Tsai, 2009; Y. L.

Chung and M. L. Wu, 2013), erscheint bei CAM Typ II Behandlung aber überproportional verstärkt.

3.4 Effekt auf T-Zellerkennung – Zerstörung vs. IFN- γ Sekretion

Der Hauptmechanismus zur Bekämpfung viraler Infektionen im menschlichen Körper ist die zytotoxische T-Zellantwort. Hierbei werden die virusinfizierten Zellen durch die auf den MHC-Klasse I Komplexen präsentierten Peptiden von CD8-T-Zellen erkannt und durch Ausschüttung von Apoptose-induzierenden Signalstoffen in der immunologischen Synapse dazu gebracht, sich selbst zu zerstören. Hierbei erwähnenswert ist, dass bei Apoptose, anders als bei Nekrose oder Lyse, keine intrazellulären Komponenten, also auch keine Viren o.Ä., freigesetzt werden.

3.4.1 Erkennung infizierter Zellen durch T-Zellen

Die Hypothese besagt, dass die CAM Behandlung die T-Zellerkennung verbessern und damit die Zerstörung infizierter Zellen beschleunigen sollte. Zu diesem Zweck wurden T-Zellen verwendet, die einen rekombinanten T-Zellrezeptor gegen das Peptid von AS 18 bis AS 27 des HBc auf dem MHC-Klasse I Komplex tragen (K. Wisskirchen et al., 2017). Dieses Peptid wurde in Patientenproben als das dominante Antigen bestimmt (C. P. Desmond et al., 2008; K. Wisskirchen et al., 2017). In unseren Experimenten konnte keine Verbesserung der Erkennung von infizierten Zellen durch T-Zellen mit Rezeptoren gegen dieses spezifische Peptid gefunden werden (Abbildung 2.13, Abbildung 2.14).

Mit dem TCR-5E mit niedrigerer Affinität sollte eine Überaktivierung durch große Mengen präsentiertes Peptid vermieden werden und so ein Effekt auf die Präsentation detektiert werden und Unterschiede besser sichtbar gemacht. In den Ergebnissen war jedoch auch bei dem niedrig affinen TCR kein Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen festzustellen (Abbildung 2.15, Abbildung 2.16).

Hierbei zu beachten ist, dass dies keine allgemeine Aussage darüber trifft, ob mehr HBc Peptide präsentiert werden oder nicht. Es konnte für ein einziges Peptid mit 10 AS aus der 183 AS langen HBc-Sequenz keine Änderung festgestellt werden. Für die anderen Peptide, die präsentiert werden können, kann eine Änderung nicht ausgeschlossen werden. Es ist möglich, dass bisher wenig präsentierte Peptide ggf. auch mit einer reduzierten Affinität für die MHC-Klasse I Bindestelle vermehrt produziert und auch präsentiert werden.

Um die Möglichkeit der Präsentation alternativer Peptide zu untersuchen, ist es notwendig, eine polyklonale, HBc-spezifische T-Zellpopulation zu verwenden, die alternative Epitope (auf dem MHC Klasse I Komplex) erkennen kann. Nur wenn diese Experimente das gleiche Ergebnis

liefern, kann ein Einfluss der CAMs auf die Antigenpräsentation ausgeschlossen werden. Hierzu wäre es günstig, diese Experimente in murinen Mauszelllinien mit T-Zellen aus vakzinierten Mäusen zu machen. Dabei müsste auf zueinander passende MHC-Typen geachtet werden, um eine Alloreaktivität und damit eine Verfälschung des Ergebnisses auszuschließen. Diese Kombination aus passenden Mäusen und einer Zelllinie war für diese Arbeit nicht verfügbar.

Alternativ könnten auch HBc spezifische T-Zellen aus humanen Patienten mit einer ausgeheilten HBV-Infektion verwendet werden.

3.4.2 Effekte der Erkennung

Obwohl auf die Zytotoxizität kein Effekt gefunden werden konnte, wurde ein Effekt auf die Zytokinsekretion der T-Zellen festgestellt (Abbildung 2.17). Bei der Analyse des Zellkulturüberstandes, nach Ende des T-Zell-Experimentes, konnten dosisabhängige Unterschiede in der IFN γ -Konzentration festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die T-Zellen aktiviert wurden. Besonders Bay41-4109 und CpAM_1 führten zu IFN γ Konzentrationen, die über denen der DMSO-Kontrolle lagen. Hier deutet sich ein Unterschied der CAM Typen an, der weiter untersucht werden sollte. IFN- γ ist ein Zytokin, das von T-Zellen nach Erkennung ihres kognaten Epitops ausgeschüttet wird, um mit anderen Immunzellen zu kommunizieren und die Erkennung einer infizierten Zelle mitzuteilen (K. Murphy and C. Weaver, 2017; J. R. Schoenborn and C. B. Wilson, 2007). Eine Sekretion dieses Zytokins in Folge der CAM Behandlung könnte auf eine Änderung der Qualität der Antigenbindung hindeuten. Ob dies jedoch ausgehend von der Peptidbindung oder ausgehend von der Bindung von Korezeptoren passiert oder ein Priming der T-Zellen vorliegt, welches dann die IFN- γ -Ausschüttung begünstigt, ist bisher nicht bekannt.

T-Zellen, die keinen C18-27 spezifischen TCR trugen konnten nicht zur Sekretion angeregt werden, was auf eine spezifische Reaktion hinweist.

Die verwendeten TCRs 5E und FLP14 hatten unterschiedliche Affinitäten für das C18-Peptid in der MHC-Bindekerbe, wobei die Affinität von 5E höher war als die von FLP14. Zudem hatten sie jeweils unterschiedliche Potentiale bezüglich Zytotoxizität und Zytokinsekretion (pers. Komm K. Wisskirchen).

Eine der Ursachen für das Fehlen von Unterschieden zwischen CAM und NRTI behandelten und unbehandelten Proben könnte die große Menge an T-Zellen sein, die auf die Zielzellen gegeben wurden. Die große Menge an Zellen ist in der Lage die Zielzellen bei Erkennung sehr schnell zu zerstören und darum ist denkbar, dass kleine Unterschiede im Peptidpräsentationsprofil der Zielzellen untergehen. Hier könnte es sinnvoll sein, die Experimente in einem ähnlichen Aufbau aber mit weniger T-Zellen zu wiederholen. Weiterhin könnte es notwendig sein, eine polyklonale TCR-Population zur Detektion zu verwenden, da nicht sicher ist, dass eine Akkumulation von HBc auch zu einer Steigerung der Präsentation des C18-27 Peptides führt. Das Peptid wurde als

immunodominant identifiziert jedoch geschah dies in Patienten, deren HBV Infektion teilweise spontan ausgeheilt war und die auch nicht mit CAMs behandelt worden waren. Es ist also denkbar, dass die CAM Behandlung ein abweichendes Peptidrepertoire erzeugen kann. Daher ist der unvoreingenommene Ansatz der Immunopeptidomics gerade hier vielversprechender.

Insgesamt kann also nicht zweifelsfrei postuliert werden, dass CAMs keinen Einfluss auf die Präsentation HBc-entstammender Peptide haben, es konnten in unseren Experimenten jedoch keiner gefunden werden.

3.5 Effekte von CAM-aggregiertem HBc auf die Wirtszelle

Induktion von Stress – Die Produktion von viralen Proteinen und Nukleinsäuren infolge einer Virusinfektion stellt für Zellen und Organismen allgemein eine Stresssituation dar (S. Jindal and M. Malkovsky, 1994; K. B. Schwarz, 1996; F. Yang et al., 2008). Demnach sollten HBV infizierte Hepatozyten einen gestressten Phänotyp aufweisen und CAMs könnten diesen Zustand beeinflussen.

Um Aussagen über den Zustand der infizierten Zellen zu ermöglichen, wurden die Stressindikatoren HSP70 und Grp78 verwendet. Diese Proteine sind verwandt und gehören beide zur Klasse der molekularen Chaperone. HSP70 ist im Zytoplasma lokalisiert und dient als Indikator für zytoplasmatischen Stress (allgemein als „heat shock response“ (HSR) bezeichnet) (W. F. Salminen, Jr. et al., 1996). Grp78 ist strukturell eng verwandt mit HSP70 und ist im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. Es dient als Indikator für ER-Stress (unfolded protein response (UPR)) (A. S. Lee, 2005). Als Positivkontrollen wurden stressinduzierende Zellgifte verwendet (CdCl₂ für allgemeinen Stress und Tunicamycin für ER-Stress). Im Vergleich zu diesen und der unbehandelten Negativkontrolle, konnte in unseren Experimenten die CAM-Behandlung keine Steigerung der Expression von HSP70 oder Grp78 verursachen (Abbildung 2.19).

Es ist bekannt, dass die Infektion mit dem Hepatitis B Virus oxidativen Stress in den Hepatozyten auslöst (T. Severi et al., 2006; F. Yang et al., 2008). Es ist gezeigt worden, dass die HBV-Replikation die Proteinfaltungsmaschinerie der Zelle nutzt (H. W. Seo et al., 2018). Das HBV kontrolliert zelluläre Prozesse und Signalwege über das X-Protein (HBx), welches eine Vielzahl von zellulären Interaktionspartnern hat (J. Antunovic et al., 1993; S. Benhenda et al., 2013; A. Decorsiere et al., 2016; S. Lee et al., 2016; M. M. Minor and B. L. Slagle, 2014; C. Niu et al., 2017; Y. Yang et al., 1999) und auch bei der Karzinogenese durch HBV vermutlich eine Rolle spielt (A.

Arzumanyan et al., 2011; C. M. Kim et al., 1991). Es wäre interessant zu untersuchen, ob und auf welche Weise HBx auch für die zelluläre Toleranz der Kapsidakkumulation verantwortlich ist.

Diese Vermutung liegt nahe, da HBx auch mit dem Proteasomsystem interagiert (M. M. Minor and B. L. Slagle, 2014; Z. Zhang et al., 2004).

Induktion des angeborenen Immunsystems – Das angeborene Immunsystem besitzt intrazelluläre und extrazelluläre Mustererkennungs-Rezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs) für virale Komponenten (Proteine und RNA/DNA) und kann so eine Infektion mit den meisten Viren noch vor dem adaptiven Immunsystem detektieren. Die Detektion einer viralen Infektion setzt in den meisten Fällen die Interferon-Produktion in Gang, was zur Induktion eines allgemeinen antiviralen Zustands der Zellen in der näheren Umgebung führt (A. J. Sadler and B. R. Williams, 2008; C. E. Samuel, 2001).

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass HBV grundsätzlich eine sehr schwache oder keine Reaktion des angeborenen Immunsystems auslöst (P. Guo, 2013; R. J. Pei et al., 2014). Ob dies durch strukturelle Eigenschaften des Virus oder aufgrund von aktiver Inhibition erfolgt ist bisher nicht eindeutig geklärt (S. Faure-Dupuy et al., 2017; S. Luangsay et al., 2015; J. Lucifora et al., 2010).

Die hier analysierten Signalwege sind spezifisch für die Induktion immunologisch unterschiedlich relevanter Faktoren. Von uns wurden Produkte des NF κ B-Signalweges analysiert, der in weiten Teilen durch TNF α aktiviert werden kann und eine unspezifische Entzündungsreaktion z.B. als Antwort auf eine bakterielle Infektion auslösen kann. Weiterhin wurden Produkte des JAK/STAT-Signalweges analysiert, der durch Interferone und IL-6 aktiviert wird.

Die hier angewandte Detektion einer Transkriptionsinduktion mittels cDNA-Analyse ist eine sehr empfindliche Messmethode, mit der auch schwache Aktivierungen von Signalwegen detektiert werden können. Diese Methode ist im Vergleich zu proteinbasierten Messmethoden sensitiver, da durch die qPCR eine sehr starke Signalamplifikation erfolgt und auch ein möglicher Regulationseffekt auf mRNA-Translation keinen Einfluss hat. Was diese Methode demnach nicht zeigen kann, ist eine funktionelle Induktion, da hierzu immer das Proteinprodukt analysiert werden muss.

Unsere Hypothese zu diesen Experimenten besagte, dass die von CAMs verursachte Akkumulation des HBc oder der unreifen und leeren Kapside möglicherweise zu einer antiviralen Antwort führen könnte (IFN-Antwort). Diese Aktivierung sollte konzentrationsabhängig sein und bei Behandlung mit Entecavir nicht auftreten. Sie würde daher einen Vorteil der CAMs gegenüber den NRTIs darstellen.

Es konnte keine Induktion der NF κ B gesteuerten Faktoren IL-8, IL6, A20 und IL-1 β durch Bay41-4109, AT130 und CpAM_2 gefunden werden (Abbildung 2.20). Lediglich CpAM_3 führte zu einer Erhöhung der IL-6 Expression, die allerdings von einer hohen Varianz gekennzeichnet war. Diese hohe Varianz ist teilweise auf die kleine Stichprobengröße (n=3) zurückzuführen. Dadurch, dass kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden konnte, kann ein Einfluss auf die IL-6 Expression weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Da CpAM_3 wahrscheinlich ein Typ I CAM ist und AT130 zu keiner IL-6 Induktion geführt hat, wäre in weiteren Experimenten zu bestätigen, dass sich CpAM_3 in dieser Hinsicht von AT130 unterscheidet.

Die Expression von Zytokinen ist allgemein auf Immunzellen wie Makrophagen, Dendritische Zellen, T-Zellen und B-Zellen beschränkt. Klassischerweise zeigt die Expression von IL-6 in T_H17 Zellen eine Aktivierung an und IL-6 wirkt als Chemoattraktant für andere Immunzellen, hin zu Infektionsherden (K. Murphy and C. Weaver, 2017). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass IL-6 Produktion auch eine Reaktion der Leber auf immunologische Reize sein kann und Hepatozyten zur IL-6 Produktion fähig sind (C. A. Norris et al., 2014). Weitere Analysen sind hier notwendig, um zu klären, welche Signalwege in Hepatozyten zugänglich sind, um Ziel von Therapieansätzen zu werden.

Bei einer Konzentration von 5 µM führe CpAM_3 zu einer Erhöhung der IL-1β Expression (Abbildung 2.20). Dies ist ein Chemokin, von dem angenommen wird, dass es in Hepatozyten nur in sehr geringer Menge produziert wird (M. Uhlen et al., 2015). Hauptsächlich wird dieses Chemokin als Proprotein in Makrophagen produziert und durch Caspase 1 Spaltung in seine aktive Form umgesetzt (B. Mosley et al., 1987).

Die Transkription dieses von NFκB regulierten Gens ist möglicherweise durch die Aktivierung von PRRs zu erklären. Es konnte gezeigt werden, dass HBV einige TLRs schwach aktivieren kann, dies aber nicht über das Hintergrundniveau hinaus (C. Dunn et al., 2009). Auch hier unterschied sich CpAM_3 von AT130, welches keinen Effekt auf die IL-1β Translation hatte. Zu beachten ist hier, dass bei einer Konzentration von 5 µM Toxizitätseffekte nicht unbeachtet bleiben dürfen. Obwohl in den initialen Toxizitätsexperimenten auch bei hohen Konzentrationen keine Reduktion der Viabilität festgestellt wurde, kann es bei diesen hohen Konzentrationen zu off-target Effekten kommen. Auch hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um heraus zu finden, ob ein therapeutisch nutzbarer Effekt vorliegt.

Für die STAT1/2 kontrollierten und von Interferonen aktivierten Gene konnte keine Induktion festgestellt werden. Es kann für IP10 eine Reduktion der Expression bei CAM Behandlung beobachtet werden.

Dies bestätigt ein bekanntes Bild bei der HBV-Infektion, dass Interferonsignalwege inhibiert werden (S. Wieland et al., 2004). Wie hier gezeigt, wird durch die Behandlung mit CAMs an dieser Situation nichts geändert. Dies gilt gleichermaßen für Typ I und Typ II CAMs.

Allgemein muss hier angemerkt werden, dass in den hier verwendeten immortalisierten Zelllinien, wie in anderen artifiziellen Modellsystemen, viele zelluläre Signalwege unvollständig vorhanden sind, was zu abnormalen und *in vivo* nicht reproduzierbaren Resultaten führen kann. Es muss also vor der Übersetzung von Ergebnissen aus Zelllinien in komplexe Organismen mit großer Vorsicht und Bedacht vorgegangen werden.

3.5.1 Zelluläre Toleranz der HBc Produktion und Einfluss von CAMs

Eine HBV Infektion wirkt bei Hepatozyten in der Zellkultur nicht zytotoxisch. Bei Patienten wird davon ausgegangen, dass Hepatitis und Zirrhose und die allgemeine Pathogenese der HBV Infektion nicht primär vom Virus, sondern vom Immunsystem bzw. davon ausgelösten Effekten ausgeht (D. Ganem and A. M. Prince, 2004). Bei der Karzinogenese infolge einer HBV-Infektion hingegen, konnte gezeigt werden, dass das virale HBx-Protein die Entstehung begünstigt (A. Arzumanyan et al., 2011; C. M. Kim et al., 1991).

Weiterhin ist das HBV kein lytisches Virus, sondern die produzierten Virionen werden sezerniert und es kommt primär nicht zu Gewebeschäden. Das Virus scheint perfekt auf eine chronische Infektion ausgerichtet zu sein.

Bei der Behandlung von HBV infizierten Zellen mit NRTIs (Entecavir) und CAMs (AT130, Bay41-4109, CpAM_2, CpAM_3) konnte im CellTiter Blue Assay keine Reduktion der Zellviabilität festgestellt werden (Abbildung 2.1). Dies bestätigt die hohe zelluläre Toleranz gegenüber der Infektion mit HBV und dessen Komponenten. Nicht nur, dass die Infektion die Viabilität nicht reduzierte, auch die Behandlung mit den antiviralen Substanzen verminderte die Viabilität nicht.

3.5.2 Immunevasion des Virus

Das Hepatitis B Virus wurde lange Zeit als „stealth virus“ bezeichnet, da es bei einer Infektion vom Immunsystem unbemerkt zu bleiben schien und damit eine adäquate Immunantwort verhinderte. Man dachte, das Immunsystem registriert das Virus erst, wenn sich die Infektion schon etabliert hat und die Virusproduktion beginnt (T. M. Block et al., 2007; C. Seeger and W. S. Mason, 2000). In jüngerer Vergangenheit wurden jedoch einige Signalwege gefunden, die anscheinend sehr früh nach einer HBV Infektion aktiviert werden und die das Potential zu haben scheinen, die Infektion zu detektieren (H. Y. Liu and X. Y. Zhang, 2015). Das Virus scheint hierbei weniger die klassischen antiviralen Interferone zu aktivieren, sondern eher alternative pro-inflammatorische Signalwege (H. Y. Liu and X. Y. Zhang, 2015). Gleichzeitig werden aber auch anti-inflammatorische Signalwege initiiert (H. Y. Liu and X. Y. Zhang, 2015).

Es gibt Hinweise darauf, dass HBc in der Lage ist, intrazelluläre Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (TLR 3, Rig-I und andere) zu hemmen (S. Luangsay et al., 2015), aber insgesamt wurde davon ausgegangen, dass das Virus diese Rezeptoren nicht auslöst, indem es z.B. sein DNA-Genom erst im Nukleus exponiert und dort zelluläre Mechanismen nutzt, um das cccDNA Episom zu erstellen (Y. L. Chung and T. Y. Tsai, 2009). Zudem bindet das ringförmige Molekül an Histone (C. K. Chong et al., 2017) was als eine Eigenschaft von zellulärer DNA angesehen wird. Von der kürzesten und früh synthetisierten mRNA wird unmittelbar nach erfolgter Infektion das HBx-Protein hergestellt, welches viele beschriebene Bindungspartner hat und von dem vermutet

wird, dass es der zentrale Regulator des HBV ist, um die Zelle für die Virusproduktion zu optimieren und Immunantworten zu unterdrücken. Hinzu kommt, dass das HBx Protein eine promiskuitive Bindedomäne hat (J. Antunovic et al., 1993; D. Y. Gong et al., 2013; T. L. Tan et al., 2006; Y. Yang et al., 1999), also viele weitere Bindungspartner in der Zelle möglich sind. Das HBx-Protein ist weiterhin essenziell für eine erfolgreiche Virusproduktion nach der Infektion (J. Lucifora et al., 2011).

Derartiges ist vom HBc nicht in diesem Umfang bekannt. Es wird vermutet, dass HBc als Bindeglied zwischen der DNA-Reparaturmaschinerie und der rcDNA fungieren könnte und damit die Bildung der cccDNA ermöglicht (J. Kock et al., 2010). Hierfür konnten jedoch bisher keine eindeutigen Beweise gefunden werden. Guo et al. fanden heraus, dass HBc an die CpG-Inseln der cccDNA im Nukleus binden kann (Y. H. Guo et al., 2011). Die genaue Bedeutung dieser Bindung ist nicht bekannt, es konnte aber gezeigt werden, dass dadurch die Histonbindung beeinflusst wird, was Auswirkungen auf die Transkription hat.

3.6 Weitere Ansätze und Ausblick

Nach der Diskussion der Ergebnisse ist leicht zu erkennen, dass es noch viele ungeklärte Fragen gibt, deren Lösungen vielversprechende Einblicke in die Effekte der CAMs, aber auch die allgemeinen Interaktionen zwischen dem Hepatitis B Virus und seinem Wirt, dem Menschen, liefern könnten. Einige mögliche weitergehende Ansätze sollen nun vorgestellt werden.

3.6.1 Bestimmung der MHC Präsentierten Peptide

Es wurde gezeigt, dass die Intensität und Qualität der Immunantwort, besonders der adaptiven Immunantwort, entscheidend zum Verlauf der Infektion beiträgt (C. Boni et al., 2007; A. Busca and A. Kumar, 2014; S. Wieland et al., 2004).

Es wurden große Hoffnungen in die CAMs gesetzt, eine T-Zellantwort erzeugen oder verstärken zu können. Dies sollte durch die erhöhte Präsentation viraler Peptide auf den MHC-I-Komplexen, verursacht durch vermehrten Abbau des HBc, erreicht werden. Dies wurde bisher aber nicht gezeigt. Es konnte zwar für Tap II CAMs ein gesteigerter Abbau von HBc, aber kein Effekt auf die T-Zellerkennung nachgewiesen werden. Somit stellt sich die Frage, wo die entstandenen Peptidfragmente verblieben sind und ob sie nicht doch auf MHCs präsentiert werden.

Um den Effekt von CAMs auf die Antigenpräsentation, genauer, das Peptidrepertoire auf den MHC-Komplexen zu bestimmen, ist es notwendig, die Peptide direkt zu analysieren. Die unter Verwendung eines rekombinanten TCR durchgeführten T-Zell-Assays können zwar das Vorhandensein eines Peptides auf den MHCs analysieren, allerdings sind sie aufgrund der

Monoklonalität und damit Monospezifität des verwendeten TCRs nur in der Lage ein definiertes Peptid zu erkennen. Sollten nach CAM-Behandlung aber alternative Peptide präsentiert werden, so können diese nicht detektiert werden.

Die Methode, Peptide von den MHC-Komplexen zu isolieren und sequenzieren, genannt Immunopeptidomics, stellt eine Möglichkeit dar, einen Effekt der CAMs auf das präsentierte Peptidrepertoire zu detektieren.

Diese direkte Analyse von MHC-gebundenen Peptiden wurde bereits bei verschiedenen Fragestellungen angewendet und die Methode ist ausführlich in der Literatur beschrieben (M. Bassani-Sternberg et al., 2015; C. Dargel et al., 2015). Prinzipiell werden die MHC-Moleküle erst isoliert, dann das Peptid heruntergewaschen und anschließend werden die Peptide selbst noch mal gereinigt.

Ein Vergleich der MHC-präsentierten Peptide von Zellen, die HBV exprimieren und mit CAMs behandelt wurden und Zellen, die nur HBV exprimieren, könnte Hinweise darauf liefern, ob durch CAMs das Peptidrepertoire verändert oder vergrößert wird und ob Peptide präsentiert werden, die bisher als nicht zugänglich betrachtet wurden bzw. die erst durch einen alternativen Abbauweg, wie im Falle der Typ II CAMs, hergestellt werden können.

In diesem Zusammenhang muss auch die Situation im Patienten in Betracht gezogen werden. Das Immunopeptidom auf Hepatozyten von chronisch HBV infizierten Patienten und solchen die eine akute Hepatitis B Infektion haben, könnte im Vergleich miteinander wichtige Informationen dahingehend liefern, was die Ursache für die stark unterschiedlichen Immunantworten auf eine HBV Infektion ist. Die Intensität der Immunantworten ist möglicherweise der entscheidende Unterschied, der zur Entwicklung von Chronizität in Folge einer HBV Infektion führt (C. Ferrari, 2015; B. Ye et al., 2015).

3.6.2 Bestimmung des Abbauweges und Implikationen dessen

Es ist notwendig, den Mechanismus zu bestimmen, der zu dem von CAM Typ II induziertem Lokalisationsmuster führt, um die Interaktionen zwischen der Wirtszelle und dem Virus besser zu verstehen und mögliche therapeutische Ansätze aufzuzeigen. In humanen Patienten, Mäusen und Zellkulturen findet man unterschiedliche Lokalisationsmuster für HBc (C. T. Bock et al., 1996; S. Kakumu et al., 1989; T. Ozeki et al., 1987; D. E. Sansonno et al., 1988). In unseren Experimenten fanden wir unterschiedliche Lokalisationsmuster in infizierten Zellen, teilweise sogar in der gleichen Probe. Bei einigen ist nur der Nukleus oder nur das Cytoplasma und in manchen Fällen sogar beide Kompartimente HBc-positiv. Eine Verbindung dieses Musters zum Zellzyklus wurde bereits angesprochen (C. T. Yeh et al., 1993), auch ein Zusammenhang mit dem Zeitpunkt der Infektion ist denkbar, nachdem Hinweise auf eine frühe und ein spätere Phase der HBV Infektion

gefunden wurden (persönliche Kommunikation U. Protzer, C. Ko). Diese Phasen sind analog zu denen zu betrachten, die für andere Viren gefunden wurden (VZV (T. A. McKee et al., 1990), EBV (L. S. Young et al., 2007) und andere (M. F. Stinski and J. L. Meier, 2007)). Hierbei könnte das HBV X-Protein (HBx) eine Rolle spielen, was aber noch nicht näher untersucht wurde (persönliche Kommunikation von C. Ko und M. v. d. Klundert).

Abbau durch das Proteasom – Dass HBc durch das Proteasom abgebaut werden kann, erscheint bei einer Literaturrecherche wahrscheinlich, wurden doch einige Interaktionen mit dem Ubiquitin-Proteasom-Weg gefunden. HBc interagiert mit NIRF (G. Qian et al., 2012), welches einen negativen Einfluss auf die Virusreplikation hat. Im Gegensatz dazu hat die Interaktion mit Nedd4 und γ -Adaptin (C. Lambert et al., 2007; M. Rost et al., 2006) einen positiven Einfluss auf die Virusreplikation und -produktion.

Qian et al. (G. Qian et al., 2012) kommen zu dem Ergebnis, dass bisher kein direkter Nachweis für eine HBc-Ubiquitinierung erbracht werden konnte (Western-Blot, IP, etc.). Im Rahmen der Arbeiten am Institut konnte in Inhibitionsexperimenten mit MG132 initial kein Einfluss auf den Abbau von HBc bei CAM Typ II-Behandlung gefunden werden (persönliche Kommunikation von C. Ko).

3.6.3 Medizinische Aspekte der unterschiedlichen Mechanismen der CAMs und NRTIs

Neben den biochemischen und zellulären Effekten und Eigenschaften der CAMs und NRTIs, soll hier aber auch der medizinische Aspekt betrachtet werden. Wie in der Einleitung erwähnt, ist HBV ein global verbreitetes Virus, das eine große Gefährdung der Weltgesundheit darstellt. Aktuelle Therapien bestehen zumeist aus IFN- α und NRTIs in Kombination.

Die Entdeckung, dass Substanzen aus der HIV-Therapie aufgrund der molekularen Ähnlichkeit der reversen Transkriptasen (Y. Xiong and T. H. Eickbush, 1990) auch bei HBV wirken (S. F. Innaïmo et al., 1997) führte zu der Entwicklung HBV-spezifischer NRTIs wie Entecavir. Aktuell besteht die Standardtherapie gegen chronische HBV-Infektionen aus PEG-IFN α und einem NRTI (oft Entecavir) (N. A. Terrault et al., 2016). Diese Therapie verfolgt keinen Ansatz zur Heilung der Infektion, sondern nur der Unterdrückung und Verzögerung des Krankheitsverlaufs. Deshalb besteht weiterhin Bedarf für neue Therapieansätze, wie in der Einleitung erwähnt. CAMs stellen einen solchen neuen Ansatz dar und sind insofern interessant, da sie ein anderes virales Protein als die NRTIs als Ziel haben und daher orthogonal zu bestehenden Resistenzen gegen NRTIs angewendet werden können. Trotzdem sind CAMs in der Lage, die Virusproduktion zu unterdrücken. Man kann die CAMs analog zu sog. second line Antibiotika, als second line Antivirals betrachten. Im Folgenden Absatz soll kurz dargestellt werden, wie sich CAMs und NRTIs unterscheiden und welche Vorteile sie jeweils aus medizinischer Sicht bieten.

Der Effekt von NRTIs - Der Effekt von NRTIs auf den Replikationszyklus des HBV besteht in der Verhinderung der reversen Transkription der pgRNA in rcDNA, nachdem sich das Kapsid um den HBV-Pol:pgRNA Komplex geschlossen hat. Hierdurch werden keine Viren mehr in das Blut des Patienten abgegeben, was eine Ausbreitung der Infektion nicht nur innerhalb der Leber des Patienten verhindert, sondern auch dafür sorgt, dass das Blut nicht mehr infektiös ist und das Virus nicht weitergegeben werden kann. Auf die Sekretion der viralen Oberflächenproteine und das e-Antigen hat dies jedoch keinen Einfluss.

Effekte von CAMs – Die Lokalisationsmuster der viralen Komponenten in der Zelle und die Inhibition der Virusproduktion bei Behandlung sind identisch mit der Wirkung von NRTIs. Einen therapeutischen Wert haben die CAMs, denn sie stellen bei Resistenzentwicklung des Virus gegen die NRTIs eine Alternative dar, um die Virusproduktion auf einem anderen Weg effektiv zu unterdrücken. Resistenzentwicklung ist bei der NRTI-Behandlung von HBV eine große Herausforderung und wird auch bei dem noch jungen Wirkstoff Entecavir zunehmend zum Problem (W. E. Delaney et al., 2002; D. J. Tenney et al., 2004; D. J. Tenney et al., 2009). An dieser Stelle können CAMs sehr gut eingesetzt werden, denn die Resistenzentwicklung gegen diese stellt das Virus vor neue strukturelle Hürden, da die Bindestelle der meisten CAMs in der Bindefläche des HBc-Dimers mit anderen HBc-Dimer im Kapsid liegt (B. Venkatakrishnan et al., 2016). Hierdurch werden die möglichen Escape-Mutationen deutlich in ihrer Variabilität eingeschränkt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass auch Resistenzmutationen gegen CAMs möglich sind (S. P. Katen et al., 2013). Über die klinische Frequenz jedoch kann noch nichts gesagt werden, da es bisher keine zur Behandlung zugelassenen CAMs auf dem Markt gibt und demnach auch keine Langzeitbeobachtungsdaten vorliegen.

In unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass es zu den allgemeinen Eigenschaften der Typ II CAMs gehört, ein einzigartiges Lokalisationsmuster des HBc im Zellkern zu erzeugen und dabei das zytoplasmatische HBc bis unter das Detektionslimit zu reduzieren. Die Bedeutung dieses Effektes ist noch unklar, aber möglicherweise therapeutisch nutzbar.

Dieser Unterschied scheint sich jedoch auf das Zellinnere zu beschränken, da wir darüber hinaus keine Unterschiede fanden.

3.7 Fazit

Es konnte gezeigt werden, dass CAMs in Zellkultur von Hepatomazelllinien auch bei hohen Konzentrationen und im Bereich der Virus-inhibierenden Wirkung nicht toxisch sind. Die IC50 Werte

liegen teilweise im niedrigen nanomolaren Bereich. Diese Ergebnisse stellen die CAMs in ihrer Wirkung in der Zellkultur gleichwertig neben die NRTIs.

Unterschiede zwischen der Klasse der CAMs und den NRTIs tauchen auf, wenn man die Wirkmechanismen miteinander vergleicht. Phänotypisch und morphologisch sind NRTIs und Typ I CAMs nicht voneinander zu unterscheiden, trotz ihrer unterschiedlichen Wirkmechanismen.

Im Vergleich mit Typ II CAMs findet man jedoch bei der immunfluoreszenzmikroskopischen Betrachtung Unterschiede im Lokalisationsmuster des HBc-Proteins, welche etwa zwei bis drei Tage nach Behandlungsstart beobachtbar wird. Zu beobachten ist, dass HBc nach Behandlung mit CAMs Typ II nicht mehr im Zytoplasma und stattdessen granulär im Zellkern vorliegt.

Zudem ist im nativen Blot kein HBc bzw. Kapsid mehr in der zytoplasmatischen Fraktion detektierbar, was das mikroskopische Bild bestätigt.

Dieser Effekt scheint jedoch keinen Einfluss auf die Peptidpräsentation auf MHC-I Komplexen zu haben, die mit rekombinanten TCRs getestet wurde. Hierbei konnte keine Steigerung des T-Zell vermittelten zytotoxischen Effekts nach CAM-Behandlung gefunden werden. Ein schwach ausgeprägter Effekt auf die Interferonsekretion konnte gefunden werden. Hierauf aufbauend könnte man die immunmodulatorischen Effekte der CAMs weiter untersuchen.

Zu beachten ist, dass nur die Präsentation des C18-27 Peptides untersucht wurde. Das Vorhandensein alternativer Peptide aus der Aminosäuresequenz des Proteins konnte mit dieser Methode nicht ausgeschlossen oder analysiert werden. Ob dies für alle HBc Peptide zutrifft und ob es schwächere Effekte gibt, die in unserem System nicht detektiert werden konnten, muss in Zukunft geklärt werden. Hierzu bietet sich besonders die Methode der Immunozeptidomanalyse an.

Zusätzlich wurde die Aktivierung antiviraler Mechanismen des angeborenen Immunsystems und ein möglicher Effekt der CAMs hierauf mittels qPCR untersucht. Es konnten jedoch keine Hinweise gefunden werden, die auf einen ausgeprägten Effekt der CAMs auf die Induktion des angeborenen Immunsystems hindeutete.

Wenn man die medizinischen Implikationen der CAMs als neue Therapiesubstanzen betrachtet, fällt sogleich die konzeptionelle Ähnlichkeit zu Antibiotika auf. Unterschiedliche Substanzklassen haben unterschiedliche Moleküle des Pathogens als Ziel und wirken daher orthogonal zueinander. Dies trifft auch auf die NRTIs und die CAMs zu. Die hier beschriebenen Substanzen bilden eine Ergänzung zu den bestehenden NRTIs, die bei sich entwickelnden Resistenzen eine alternative und hocheffektive Behandlungsmethode darstellen können, sollte es zu einer Zulassung kommen.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, sofern nicht angegeben, wurden von Carl Roth GmbH + Co. KG bezogen.

Name	Hersteller
Collagen R 0,2%	SERVA Electrophoresis GmbH
Saponin	Merck KGaA
Paraformaldehydlösung 4% in PBS	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Agarose	VWR International GmbH
Amino-Capron-Säure	Merck KGaA
Bromphenolblau	Merck KGaA
DMSO HybriMax	Merck KGaA
DAPI Fluoromount-G®	Southern Biotechnology Associates, Inc.
Insulin „Insuman® Rapid“	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
Polyethylenglycol 8000	Promega GmbH
Protease Inhibitor "Complete"	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
Amino-Capron-Säure	Merck KGaA
Bromphenolblau	Merck KGaA
DMSO HybriMax	Merck KGaA
DAPI Fluoromount-G®	Southern Biotechnology Associates, Inc.
Insulin „Insuman® Rapid“	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
RNase Zap	Thermo Fisher Scientific Inc.

PBS für Zellkultur	Thermo Fisher Scientific Inc.
Dulbeccos Modified Eagle Medium	Thermo Fisher Scientific Inc.
RPMI 1640 Medium	Thermo Fisher Scientific Inc.
Non-essential Amino Acids	Thermo Fisher Scientific Inc.
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Inc.
Hepes für Zellkultur	Thermo Fisher Scientific Inc.
Fötale Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Hyclone Fetalclone II	GE Healthcare Life Sciences
RetroNectin	Takara Bio Inc.
Protease Inhibitor Complete	Roche Diagnostics GmbH
M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent	Pierce Biotechnology
N-acetyl-L-leucyl-N-[(1S)-1-formylpentyl]-L-leucinamide (AcLeu)	Enzo Life Sciences, Inc. (ALX-260-007)
L-trans-Epoxy succinyl-leucylamide-(4-guanido)-butane (E-64)	Enzo Life Sciences, Inc. (BML-P120)

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Non Tissue Cell Culture Plates	Thermo Fisher Scientific Inc
Einmalpipetten Cellstar	Greiner Bio-One International GmbH
Filter 0,45 µm	Sarstedt AG & Co

Hybond XL Membran	GE Healthcare Life Sciences
Kryogefäße	Greiner Bio-One International GmbH
Platten für Retronectin-Beschichtung	Greiner Bio-One International GmbH
Non-Tissue Culture Plates	Thermo Fisher Scientific Inc.
PVDF Membran	GE Healthcare Life Sciences
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Greiner und Eppendorf
Reaktionsgefäße 15 und 50 ml	Greiner Bio-One International GmbH
ELISA 96-Well-Platte	Thermo Fisher Scientific Inc
Erlenmeyerkolben	Brand GmbH
FACS Röhrchen	Bio-Rad Laboratories Ltd.
Handschuhe "Aloecare"	Meditrade GmbH
Laborflaschen	Schott AG
Laborflaschen/Bechergläser	Brand GmbH & Co KG
Laborflaschen/Bechergläser	DWK Life Sciences
Monolayer-Flaschen 75 cm ² /150 cm ²	TPP Techno Plastic Products
Pipettenspitzen	Starlab GmbH
Serologische Pipetten	Greiner Bio-One International GmbH
96-well ePlatten	ACEA Biosciences Inc.

4.1.3 Kits

Kit	Hersteller
Cell Titer-Blue	Promega GmbH
Enzygnost® HBe monoclonal	Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
NucleoSpin Tissue	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche Diagnostics GmbH
Super Script III First Strand Synthesis SuperMix	Thermo Fisher Scientific Inc.
Human IL-2 ELISA MAX™ Standard	BioLegend Inc.
Pierce™ Classic Magnetic IP/Co-IP Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
DIG Luminescent Detection Kit	Roche Diagnostics GmbH

4.1.4 Geräte

Gerätename	Hersteller
Plattenphotometer Infinite F200 Plate Reader	Tecan Trading AG
Diagnostikroboter BEP® III	Siemens Healthcare GmbH
qPCR-Gerät Lightcycler 480	Roche Diagnostics GmbH
qPCR-Gerät Lightcycler 96	Roche Diagnostics GmbH
Zellkulturinkubator Heracell 150	Thermo Electron LED GmbH
Ultrazentrifuge Optima K9	Beckman Coulter Biomedical GmbH
Zellanalysator FACSCanto II	Becton Dickinson GmbH
Tischzentrifuge 5417C/R	Eppendorf GmbH

Mikropipetten Research Plus	Eppendorf GmbH
Chemilumineszenzdetektor Chemocam Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH
Ultraview ERS Spinning Disc Mikroskop	PerkinElmer Inc.
Fluoview FV10i konfokales Mikroskop	Olympus GmbH
Phosphoscanner CR 35 Bio	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH
Laminarstrombänke	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Mikrophotometer NanoDrop One	Thermo Fisher Scientific Inc.
Geltrockner Model 583	Bio-Rad Laboratories Ltd.
Elektrophoresekammer PEQlab	VWR International GmbH
UV-Crosslinker Bio-Link BLX-254	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH
Echtzeitzellanalysegerät xCelligence SP	ACEA Biosciences, Inc.

4.1.5 Puffer

Puffer	Komposition
nativer Lysepuffer	50 mM Tris-Cl 100 mM NaCl 1 mM EDTA 1% NP-40 pH 8.0
TBS-T 10x	200 mM Tris-HCl 1,4 M NaCl 1% Tween 20 pH 7,4
Western Blot Anodenpuffer 1 (AP 1)	300 mM Tris 20% v/v Methanol
Western Blot Anodenpuffer 2 (AP 2)	25 mM Tris 20% v/v Methanol

Western Blot Kathodenpuffer	25 mM Tris 40 mM 6-Aminohexansäure 20% v/v Methanol
PAGE-Laufpuffer 10x	250 mM Tris 2 M Glycin 1% w/v SDS,
SDS Auftragspuffer 4x	25% Glycerin 150 mM Tris/HCl 5% w/v SDS 0,25% w/v Bromphenolblau pH 6,8
nativer Auftragspuffer 6x	50% Glycerin 0,1% Bromthymolblau
Prä-hybridisierungspuffer	1 % BSA 1 mM EDTA 500 mM NaPO ₄ 0.7 % SDS pH 7,2
PAGE-Laufpuffer 10x	250 mM Tris 2 M Glycin 1% w/v SDS
SSC 20x	3 M NaCl 300 mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ pH 7

4.1.6 Zellkulturmedien

Medienbezeichnung	Komposition
HepG2 Vollmedium (G2full)	Dulbeccos MEM 500ml Penicillin 100 I.U./ml Streptavidin 100 µg/ml L-Glutamin 2 mM Non Essential Amino Acids (100x) 5,5 ml Natriumpyruvat 1 mM FCS 10%
HepG2 Differenzierungsmedium (G2diff)	Dulbeccos MEM 500ml Penicillin 100 I.U./ml Streptavidin 100 µg/ml L-Glutamin 2 mM Non Essential Amino Acids (100x) 5,5 ml Natriumpyruvat 1 mM FCS 10% DMSO Hybrimax 2,5%
HepaRG Standard (RGstd)	Williams E medium 500 ml Penicillin 100 I.U./ml Streptavidin 100 µg/ml L-Glutamin 2 mM Hyclone FCS 10% Hydrocortisone 4.7 µg/ml Insulin 0.023 IE/mL Gentamicin 80 µg/ml
HepaRG Differenzierungsmedium (RGdiff)	Williams E medium 500 ml Penicillin 100 I.U./ml Streptavidin 100 µg/ml L-Glutamin 2 mM Hyclone FCS 50 ml Hydrocortisone 4.7 µg/ml

	Insulin 0.023 IE/mL Gentamicin 80 µg/ml DMSO 1,8%
Humanes T-Zell-Medium (hTCM)	RPMI 1640 500 ml Humanserum 50 ml Penicillin 100 I.U./ml Streptavidin 100 µg/ml L-Glutamin 2 mM Non Essential Amino Acids (100x) 5,5 ml Natriumpyruvat 1 mM Hepes (100x) 5,5 ml Gentamicin 208 µl

4.1.7 Zelllinien (E. R. Verrier et al., 2016)

HepaRG (T. B. Andersson et al., 2012; P. Gripon et al., 2002) wurden für Infektionsexperimente und immunologische Analysen verwendet. Die Zellen wurden nach der Aussaat zwei Wochen in RGstd Medium gehalten und danach zwei Wochen in RGdiff, um die Zellen in hepatozytenähnliche und gallenähnliche Zellen zu differenzieren. Nach der Differenzierungsphase sind die Zellen mit dem Hepatitis B Virus infizierbar.

HepG2-NTCP k7 Zellen wurden von K. Zhang hergestellt und von D. Stadler mit T. Asen wurde der Klon 7 als am geeignetsten für HBV Infektionen ausgewählt. Die Zellen wurden auf kollagenisierten Platten gehalten und nach Erreichen der Konfluenz mit 2,5% DMSO vordifferenziert, um die Infektionsrate zu verbessern.

HepG2H1.3 sind HepG2 Zellen, die stabil mit einem HBV-Genom in 1,3-facher Überlänge transfiziert wurden (U. Protzer et al., 2007). Die Zellen wurden in antiviralen Assays verwendet. Um die Adhäsion dieser Zellen zu begünstigen, wurden die Zellkulturplastikplatten mit einer 0,02%igen Kollagenlösung (in H₂O) kollagenisiert (10 Min. bei Raumtemperatur).

HepG2.2.15 (M. A. Sells et al., 1987) Zellen wurden mit head-to-tail HBV Doppellänge-Konstrukten stabil transfiziert und in antiviralen Assays sowie Ko-Kulturexperimenten verwendet. Die Zellen wurden auf kollagenisierten Platten gehalten.

HepAD38 (S. K. Ladner et al., 1997) Zellen tragen das HBV-Genom unter Kontrolle eines tet-off und Cytomegalivirus Promotors. Die Zelllinie ist HepG2 basiert und wurde auf kollagenisierten Zellkulturplatten gehalten.

293GP-R30 (K. Ghani et al., 2009) basieren auf HEK 293T-Zellen. Die Zellen produzieren RD114 pseudotypisierte retrovirale Vektoren, die zur Transduktion humaner hematopoietischer Zellen verwendet wurden.

4.1.8 Antikörper

Ziel	Spezies	Klon	Konjugat	Hersteller
Anti-HBcore	Kaninchen	polyklonal	Keins	Agilent Technologies, Inc.
Anti-PML	Maus	monoklonal	Keins	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-CD4	Maus	monoklonal	Allophycocyanin	Thermo Fisher Scientific Inc.
Anti-CD8	Maus	monoklonal	Pacific Blue	Agilent Technologies, Inc.
Anti-murine TCR β -Kette	Hamster	monoklonal	Phycoerythrin	BD Life Sciences
Anti-Kaninchen	Ziege	Monoklonal	Peroxidase	Merck KGaA
Anti-Maus	Ziege	Monoklonal	Peroxidase	Merck KGaA
Anti-Kaninchen	Ziege	Monoklonal	Alexa-594	Thermo Fisher Scientific Inc.
Anti-Maus	Ziege	Monoklonal	Alexa-488	Thermo Fisher Scientific Inc.
Anti-CD3 (OKT-3)	Maus	Monoklonal	Keins	von E. Kremmer
Anti-CD28	Maus	Monoklonal	Keins	von E. Kremmer
Anti-HBcore149SN	Kaninchen	Polyklonal	Keins	von M. Nassal

4.1.9 Primer

Oligonukleotide wurden bei MicroSynth und Thermo Fisher Scientific hergestellt.

Name	Sequenz von 5' nach 3'
cccDNA 2251 rück	AGCTGAGGCGGTATCTA
cccDNA 92 vor	GCCTATTGATTGGAAAGTATGT

rcDNA 1745 vor	GGAGGGATACATAGAGGTTTCCTTGA
rcDNA 1844 rück	GTTGCCCGTTTGCCTCTAATTC
pgRNA 383 vor	CTCCTCCAGCTTATAGACC
pgRNA 705 rück	GTGAGTGGGCCTACAAA
IL-8 vor	AAGAACTTAGATGTCAGTGC
IL-8 rück	ACTTCTCCACAACCCT
IL-6 vor	AAACAACCTGAACCTTCC
IL-6 rück	CAGGGGTGGTTATTGC
IL-1 β vor	GTACGATCACTGAACTGC
IL-1 β rück	GAGTGGGCTTATCATCTTT
A20 vor	GCTCAACTGGTGTCTGAAG
A20 rück	ATGAGGCAGTTTCCATCACC
2'5'-OAS vor	CAGTTAAATCGCCGGG
2'5'-OAS rück	AGGTTATAGCCGCCAG
Prnp fw	GACCAATTTATGCCTACAGC
Prnp rev	TTTATGCCTACAGCCTCCTA
GAPDH fw	ACCAACTGCTTAGCCC
GAPDH rev	CCACGACGGACACATT

4.1.10 Antivirale Substanzen

Die hier verwendeten antiviralen Substanzen gehören der Substanzgruppe der „Capsid protein Assembly Modulators“ oder „Allosteric Modulators“ (zu Deutsch: Capsidprotein Zusammenbau Modulatoren oder allosterische Modulatoren), kurz: CpAM(s) an. Diese Substanzen wirken direkt antiviral, das heißt, dass sie direkt an ein Produkt des Virus binden, um ihren Effekt zu entfalten. Das Konzept der Assembly Inhibition ist bereits aus der Therapie des Humanen Immunodefizienz-Virus (HIV) bekannt. Ebenso ist das Konzept der direkt wirkenden Virustatika bekannt aus der Humanen Herpes-Virus Therapie und auch der HIV Therapie in Form von Inhibitoren der reversen Transkriptase bzw. der viralen Polymerase (Nukleosid/-tid-Analoga).

Die Referenzsubstanzen, das Dihydropyrimidin Bay41-4109 und das Phenylpropenamid AT130, wurden erstmals von Stölting et al. (J. Stölting et al., 2000) und Perni et al. (R. B. Perni et al., 2000) beschrieben. Die beiden Substanzen stehen stellvertretend für die beiden CpAM Typen, die zu unterschiedlichen Strukturen führen, wenn aufgereinigtes Capsid protein (Cp) mit ihnen inkubiert wird. Typ I CpAMs führen zu leeren, aber intakten Capsiden (T=4, \varnothing 32 nm) (S. P. Katen et al., 2013). Typ II CpAMs führen zu großen, zweidimensionalen Strukturen oder stark vergrößerten Capsiden (S. J. Stray and A. Zlotnick, 2006). Die Effekte der CpAMs auf das Capsid Protein in infizierten Zellen sind bisher weitgehend unbekannt. Phänotypisch sind Typ I und Typ II CpAMs voneinander und von Nukleosid/-tid-Analoga wie Entecavir oder Lamivudine nicht zu unterscheiden. Entecavir und Lamivudine wurden als Kontrollsubstanzen parallel zu den CpAMs verwendet. Zusätzlich zu den publizierten CpAMs wurden unbekannte CpAMs von zwei verschiedenen Kooperationspartnern aus der pharmazeutischen Industrie verwendet und deren Effekte untersucht. Von Kooperationspartner A kamen CpAM_2 und CpAM_3, von Kooperationspartner B kam CpAM_1.

Tabelle 3 Die verwendeten CpAMs und die Wirktypen.

Name	Typ
AT130	I
Bay41-4109	II
CpAM_1	II
CpAM_2	(Typ II vermutet)
CpAM_3	(Typ I vermutet)

4.1.11 Software

Name	Hersteller
Fiji	NIH, USA
Prism	GraphPad Inc., USA
LightCycler 96 Software	Roche Diagnostics, USA
LightCycler480 Software	Roche Diagnostics, USA
BioFormats Plugin	The Open Microscopy Environment
InkScape	The Inkscape Team

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

Arbeiten mit humanen Zelllinien wurden den Richtlinien für steriles Arbeiten folgend in Laminarstrombänken der Firma BDK durchgeführt. Die Zellen wurden in HeraCell Inkubatoren der Firma Thermo Fisher Scientific bei 37 °C und 5% CO₂ gehalten. Die verwendeten Medien und Zusätze wurden von Thermo Fisher Scientific bezogen. Zellkulturplastikware war von TPP Techno Plastic Products AG

4.2.2 Antiviraler Assay

Mit dem Hepatitis B Virus (HBV) infizierbare HepG2-NTCP k7 Zellen oder transgene HepG2H1.3 bzw. HepG2.2.15 Zellen wurden in 24-well Platten ausgesät und bis zur Konfluenz (geschlossene Zellschicht) bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchte in Kultur gehalten.

HepG2-NTCP k7 Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz für zwei Tage mit 2,5% DMSO im Zellkulturmedium vordifferenziert, bevor sie über Nacht (18 h) mit dem Hepatitis B Virus infiziert wurden. In Experimenten, in denen cccDNA analysiert wurde, wurde eine multiplicity of infection (MOI) von min. 500 Genomequivalenten (geq)/Zielzelle verwendet, um eine ausreichende Menge der cccDNA Moleküle gegenüber den rcDNA Molekülen sicher zu stellen. Um die Infektion zu begünstigen, wurde dem Medium hierfür 5% Polyethylenglykol 8000 (PEG) zugesetzt sowie für die Dauer der Inokulation das Mediumvolumen pro Well halbiert.

Das Virus wurde von J. Wettengel hochrein produziert und zur Verfügung gestellt.

Nach der Infektion wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und dann für sechs Tage ohne Behandlung in Kultur gehalten, um die Infektion zu konsolidieren. Das Medium wurde alle drei Tage auf den Zellen gewechselt. Ob die Infektion erfolgreich war und wie aktiv die Virusproduktion war, wurde durch Messen des HBe-Antigens im Zellkulturüberstand (Diagnosekit Enzygnost® HBe monoclonal) bestimmt.

Die für HBV transgenen Zelllinien HepG2H1.3 und HepG2.2.15 wurden nach Erreichen der Konfluenz lediglich für zwei Tage mit 2,5% DMSO im Medium differenziert.

Nach der Differenzierung bzw. Infektion konnten die Zellen in antiviralen Experimenten verwendet werden. Dabei wurde ebenfalls alle drei Tage das Medium mit der Behandlung erneuert.

Nach Ablauf des Behandlungszeitraumes wurde der Überstand gesammelt und bei -20 °C bis zur Analyse gelagert. Die Zellen wurden mit entsprechenden Lysepuffern für die DNA, RNA oder Proteinpräparation vorbereitet und bei -20 °C, bei geplanter RNA-Präparation bei -80 °C gelagert.

4.2.3 Bestimmung der Zellviabilität

Zur Bestimmung der Zellviabilität und Toxizität der Behandlung wurde bei einigen Experimenten nach Ablauf der Behandlung und vor der Zellyse das „Cell Titer Blue“ Assay (Promega) durchgeführt. Hierbei wird eine Farbstofflösung mit Zellkulturmedium 1:5 gemischt und zügig auf alle Zellen gegeben. Eine Negativkontrolle (etwa 0,5 ml) wird im Mischgefäß zurückbehalten. Der Redoxfarbstoff Resazurin wird von lebenden Zellen zum fluoreszierenden Resorufin reduziert. In den Wells, in denen Zellen durch die Behandlung getötet werden, wird weniger Farbstoff umgewandelt und das Signal ist bei der Messung niedriger. Gemessen wird bei einer Anregungswellenlänge von 530-570 nm und Emissionswellenlänge von 580-620 nm. Die Messungen wurden auf einem Tecan Infinite F200 Plate Reader durchgeführt.

4.2.4 DNA Extraktion

Die DNA Extraktionen wurden mit dem NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey Nagel) durchgeführt.

4.2.5 RNA Extraktion

Experimente, bei denen RNA extrahiert und analysiert werden sollte, wurden in 6-well Platter durchgeführt, um eine ausreichende RNA Menge für die spätere RT-qPCR zu erhalten.

Die RNA Extraktionen wurden mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) durchgeführt.

4.2.6 Proteinextraktion

Proteinextraktionen aus Zellkulturüberstand wurden unmittelbar vor Auftrag auf das Gel (SDS-PAGE oder natives Agarosegel) durch Mischen mit dem Ladepuffer hergestellt. Bei SDS-PAGEs wurde die Probe davor zusätzlich für zehn Minuten auf 99 °C erwärmt und danach im Eisbad abgekühlt.

Proteine aus Zellen wurden durch Zugabe von SDS-Lysepuffer oder nativem Lysepuffer oder durch Zugabe von M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent (Pierce) präpariert. Es wurde der Protease Inhibitor Complete (Roche) verwendet. Der Lysepuffer bzw. M-PER wurden direkt auf die Zellen in der Zellkulturplatte oder -schale gegeben. Bei 24-well Platten wurden dabei 100 µl Lysepuffer verwendet, bei 12-well Platten 200 µl und bei 6-well Platten 500 µl. Das Lysat wurde danach bei 14000 g für 10 Minuten zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der klare Überstand wurde bis zur weiteren Analyse bei 4 °C gelagert.

4.2.7 Native Agarose-Gelelektrophorese

Proteinpräparationen, wie oben beschrieben (ohne Natriumlaurylsulfat (SDS)), werden bei der nativen Agarosegel Elektrophorese nach Größe, hydrodynamischem Radius und Form getrennt. Die Proteinlösung wurde mit dem 6x Ladepuffer (50% Glycerin, 0,1% Bromthymolblau) 1:6 gemischt. Die Lösung wurde dann in eine Tasche eines 1,2%igen Agarosegels, welches mit Triborat/EDTA Puffer (TBE-Puffer) angesetzt wurde, geladen und bei 50 V eine Stunde laufen gelassen.

Das Gel wurde dann auf einer sauberen und wasserfesten Unterlage oder Schale auf sechs mit 10x SSC-Puffer (1,5 M NaCl, 150 mM Natriumcitrat, pH 7) getränkte Löschpapiere in Größe des Gels gelegt (Blasen austreichen). Auf das Gel wurde eine Schablone aus wasserundurchlässigem Material (Overheadfolie o.Ä.) gelegt, die den Bereich, aus dem die Zielkomplexe übertragen werden sollten, ausspart. Auf die Schablone wurde eine aktivierte PVDF-Membran gelegt, die etwas größer als die Aussparung in der Schablone war.

Auf die Membran wurden drei Lagen in 10x SSC getränktes Löschpapier gelegt und darauf ein ca. 10 cm dicker Stoß trockene Papierhandtücher. Obenauf wurde ein schweres, planes Objekt gelegt (ggf. Glasplatte mit Gewicht) und der ganze Aufbau mit Hilfe einer Libelle vertikal ausgerichtet.

Dieser Aufbau wurde über Nacht stehen gelassen. (Abbildung 4.1)

Die Membran wurde dann aus dem Aufbau entfernt und in TBS-T (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5% Tween, pH 7,4) für 10 min. gewaschen.

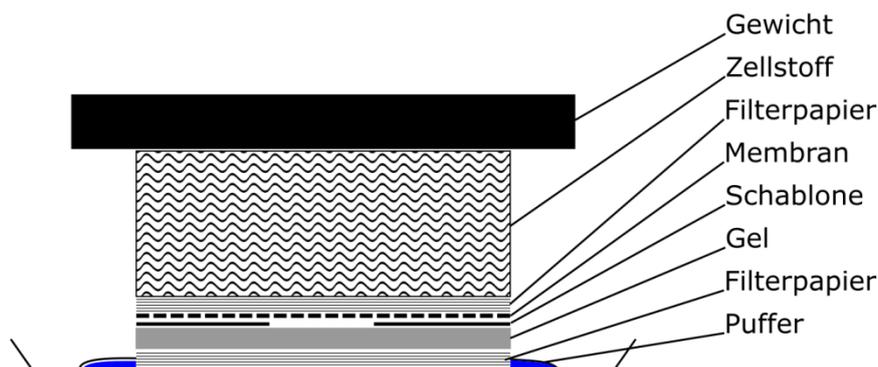


Abbildung 4.1 Skizze des Aufbaus für den Kapillartransfer des nativen Blots.

Der Aufbau steht in einer Schale, die als Reservoir für den Laufpuffer dient. Die Komponenten werden von unten nach oben aufgebaut wobei jeweils auf die Vermeidung von Luftblasen geachtet werden muss.

4.2.8 Retrovirale Transduktion

Die Methode wurde modifiziert nach Wisskirchen et al. (K. Wisskirchen et al., 2017). In der Veröffentlichung beschreibt Wisskirchen die Identifikation und Klonierung von HBV spezifischen T-Zellrezeptoren (TCR).

TCRs erkennen spezifisch Komplexe aus variablen Peptiden auf den MHC Klasse I und Klasse II Molekülen auf der Oberfläche von Zellen. Die verwendeten TCRs erkennen das Peptid von Aminosäure 18 bis Aminosäure 27 des Hepatitis B Virus Capsidproteins (C18-27). Die verwendeten TCRs haben unterschiedliche Affinitäten und Effektstärken, die von Wisskirchen et al. charakterisiert wurden.

Es wurden die TCRs 5E, 7D und FLP14 verwendet (TCR_{C18-27-5E}, TCR_{C18-27-7D}, TCR_{C18-27-FLP14}).

Die Plasmide mit den spezifischen TCR-Sequenzen wurden von M. Ostertag in die Retrovirus Verpackungszelllinie 293GP-R30 stabil transfiziert. Überstände dieser Zellen wurden 24 und 48 Stunden nach Erreichen der Konfluenz gesammelt und steril filtriert (0,45 µm).

Non-tissue Zellkulturplatten (Thermo), wurden mit 5 µg/ml anti-CD3 und 0,05 µg/ml anti-CD28 Antikörper beschichtet (37°C, 2 h), danach mit 2% BSA, 30 min. geblockt und mit PBS gewaschen. Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMCs) wurden in T-Zellmedium (TCM) mit 180 U/ml Interleukin-2 (IL-2) auf diesen Platten vordifferenziert.

Der gefilterte, Retroviren enthaltende Zellkulturüberstand wurde bei 2000 xg, 32 °C für 2 h auf non-tissue Zellkulturplatten zentrifugiert, die mit 20 µg/ml RetroNectin (Takara) beschichtet waren. Der Überstand wurde entfernt und die PBMCs wurden bei 1000 xg, 10 min ebenfalls auf die Platten zentrifugiert (Spinokulation). Nach 24 Stunden wurde die Transduktion wiederholt.

Um die Transduktionsrate und den Anteil an CD4+ und CD8+ T-Zellen zu bestimmen, wurden die PBMCs nach der Transduktion durchflusszytometrisch analysiert.

4.2.9 T-Zell Kokulturassays

Für HBV transgene Zelllinien HepG2.2.15 oder HepG2H1.3 wurden in speziellen 96-well ePlatten (ACEA Biosciences Inc.) ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz für drei Tage mit antiviralen Substanzen behandelt. Dabei wurde dem Medium 2% DMSO zugesetzt, um die Teilung der Zellen zu verlangsamen.

Die nach dem oben beschriebenen Protokoll transduzierten und analysierten T-Zellen wurden in definierten Effektor/ Zielzell Verhältnissen (E:T) auf die behandelten Zellen gegeben und mit Hilfe des xCELLigence Gerätes (ACEA Biosciences Inc.) wurde der zytotoxische Effekt der T-Zellen auf die HBV-positiven Zellen verfolgt.

Das xCELLigence Gerät analysiert die Impedanz (Wechselstromwiderstand) zwischen Elektroden im Boden der Wells der ePlatte. Dabei steigt die Impedanz abhängig von der durch Zellen bedeckten Fläche an und sinkt wieder ab, wenn die Fläche wieder frei wird (Zellen sterben und lösen sich ab bzw. auf).

4.2.10 Analyse der angeborenen Immunantwort

In HepaRG Zellen sind die Signalwege des angeborenen Immunsystems besser erhalten als in HepG2 Zellen und den darauf basierenden Zelllinien HepG2.2.15, HepG2H1.3 und HepG2-NTCP k7. Deswegen wurden Experimente zur angeborenen Immunantwort in HepaRG Zellen durchgeführt.

HepaRG Zellen wurde in 6-well Platten ausgesät und differenziert. Die Zellen wurden mit einer MOI von 100 HBV-Virionen pro Zelle infiziert und für weitere sechs Tage in Kultur gehalten.

Dann wurden die Zellen für weitere sechs Tage mit antiviralen Substanzen behandelt.

Am Ende der Behandlungsperiode wurde der Überstand gesammelt und die Zellen wurden zügig mit PBS gewaschen. Dann wurden 500 µl Lysepuffer des RNeasy Kits von Qiagen auf die Zellen gegeben und die RNA nach Protokoll isoliert. Die RNA wurde dann bei -80 °C gelagert.

Die RNA Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt und mit DEPC-Wasser auf gleiche Konzentrationen eingestellt. Um die enthaltene mRNA in cDNA umzuschreiben (reverse Polymerase Kettenreaktion, RT-PCR), wurde das SuperScript III Kit von Invitrogen verwendet.

Die Reaktionslösung wurde nach der RT-PCR 1:5 mit H₂O verdünnt und in der quantitativen PCR (qPCR) eingesetzt.

Um die Induktion der angeborenen Immunantwort zu bestimmen, wurden Markergene verschiedener Signaltransduktionswege mit Hilfe spezifischer Primer quantifiziert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Marker der Signaltransduktionswege des angeborenen Immunsystems

Zielgen	Signalweg
A20 / TNFAIP3	NFκB induziert, negativer Regulator für NFκB
IL-1β	NFκB induziert, Signalmolekül
IL-6	NFκB induziert, Signalmolekül
2'5'-OAS	STAT induziert, verdaut virale RNA
IL-8	STAT induziert, Signalmolekül

4.2.11 qPCR

Zur Analyse von genomischer DNA und anderen DNA Präparationen wurde das SYBR-Green I System (Roche) verwendet. Hierbei wird der SYBR Green I Mastermix verwendet, der bereits alle Enzyme und benötigten Reagenzien (dNTPs, Mg²⁺) enthält. Dieser Puffer konstituiert 50% des Reaktionsvolumens. Es wurde ein Mastermix bestehend aus 5 µl SYBR Green I Master und jeweils 0,5 µl der vorwärts und rückwärts Primer pro Reaktionsansatz vorbereitet. Die Primer wurden als 20 mM Lösung vorbereitet, was in einer Konzentration von 1 mM in der Reaktionslösung resultierte. Es wurden 6 µl des Mastermix in die verwendeten Wells vorgelegt. Für die qPCR wurden 96-well Platten (Fa. 4titude) sowohl für den Lightcycler 480 als auch den Lightcycler 96 (beide Roche) eingesetzt.

Es wurden 1 bis 4 µl der Probenlösung in der Reaktion eingesetzt. Wurden weniger als 4 µl eingesetzt, wurde beim Ansetzen des Mastermix das Volumen durch H₂O kompensiert.

Die Platte wurde dann mit einer selbstklebenden, lichtdurchlässigen Folie verschlossen und zentrifugiert.

Die Platte wurde dann in den Lightcycler eingebracht und das qPCR Programm gestartet.

Es wurden sowohl absolute als auch relative Quantifizierungen durchgeführt. Bei absoluter Quantifizierung wurde ein HBV-Plasmidstandard verwendet. Bei relativen Quantifizierungen in genomischer DNA wurde PrP, in cDNA wurde GAPDH als Referenzgen verwendet. Bei absoluten Quantifizierungen wurde eine Verdünnungsreihe eines, das HBV Genom tragenden Plasmids verwendet.

4.2.12 RT-PCR

Um von messenger RNA (mRNA) zu kodierender DNA (coding DNA, cDNA) zu gelangen, muss die RNA revers in DNA transkribiert werden. Dies wurde mit dem Invitrogen SuperScript III Kit durchgeführt. Dazu wurden 5 µl des RT Reaction-Mix und 1 µl des RT Enzyme Mix vorgelegt und dann 4 µl einer Probe darauf gegeben. Die Reaktion wurde 10 Minuten bei 25 °C inkubiert, dann 30 Minuten bei 50 °C, 5 Minuten bei 80 °C und dann auf Eis gekühlt. Danach wurden 0,5 µl RNaseH hinzugegeben, um RNA Reste zu verdauen.

Die fertige Lösung wurde 1:10 in qPCR-Reaktionen eingesetzt.

4.2.13 Western Blot

Proteinlösungen oder Zelllysate wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamid Gel nach Größe getrennt. Das Gel wurde dann auf eine aktivierte Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran gelegt und die Proteine mittels Elektrotransfer übertragen. Die Membran wurde dann 1 h in 5%

Magermilchpulver in TBS-T (20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1% Tween 20) geblockt. Der Primärantikörper wurde in Blockingpuffer gelöst und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Danach wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und der Peroxidase gelabelte Sekundärantikörper in Blockingpuffer 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde nun wiederum mit TBS-T gewaschen. Nach Zugabe von Chemolumineszenzlösung (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare GmbH) auf die Membran wurde das Signal in einem Chemocam Imager (INTAS) detektiert.

4.2.14 DIG-Hybridisierung und Detektion

Die Proben wurden über Kapillartransfer auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit ddH₂O gewaschen und auf ein trockenes Filterpapier gelegt. Die DNA wird durch UV-Bestrahlung (2,56 kJ/m²) an die Membran gebunden. Die Membran wird dann 2 h bei 65 °C und Rotation in 5 ml Prähybridisierungspuffer inkubiert.

5 µl der DIG-Sonde (hergestellt von T. Asen) wurden mit 100 µl Heringsperma-DNA gemischt, für 3 Min. bei 95 °C erhitzt und danach auf Eis abgekühlt.

Die Prähybridisierungslösung auf der Membran wurde durch 5 ml frische Prähybridisierungs-lösung ersetzt und die DIG-Sonden/Heringsperma-DNA-Lösung dazu gegeben. Die Membran wurde in dieser Lösung über Nacht bei 65 °C und Rotation hybridisiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran mit 20 ml 2x SSC mit 0,1% SDS 15 Min und danach mit 0,5x SSC, 0,1% SDS für 15 Min. gewaschen.

Danach erfolgte die Detektion dem Protokoll des DIG Luminescent Detection Kit (Roche).

4.2.15 Immunfluoreszenz Mikroskopie

In eine 24-well Platte wurden runde 10 mm Abdeckgläser gelegt und mit einer 0,02% Collagenlösung, 10 min. bei 37 °C collagenisiert. Die Gläser wurden zweimal mit sterilem H₂O gewaschen. Auf diese Gläser wurden Zellen mit einer Dichte von 90% ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz wurde die Behandlung begonnen.

Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehydlösung (PFA) 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 0,5% Saponin in PBS permeabilisiert. Danach wurden unspezifische Bindestellen mit 0,1% Saponin, 10% Ziegen Serum in PBS (Blocking-Puffer) bei 4 °C über Nacht geblockt.

Die Primärantikörper wurden in entsprechenden Verdünnungen in Blocking Puffer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Präparate wurden danach dreimal mit 0,1% Saponin in PBS gewaschen. Danach wurden die Sekundärantikörper 1:1000 in 0,1% Saponin, 2% Ziegen Serum in PBS für 2 h bei

Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Präparate drei Mal mit 0,1% Saponin in PBS gewaschen, dann ein Mal mit PBS.

Es wurde ein Tropfen DAPI Fluoromount-G (SouthernBiotech) auf einen Objektträger gegeben und das Abdeckglas mit den Zellen nach unten daraufgelegt. Mit klarem Nagellack wurde das Abdeckglas ringsum verschlossen.

Derart angefertigte Präparate wurden in einem Fluoview FV10i (Olympus GmbH) oder einem Ultraview ERS (PerkinElmer) analysiert.

4.2.16 Bildanalyse

Die aufgenommenen Fluoreszenzbilder wurden über das BioFormats Plugin (I. G. Goldberg et al., 2005; M. Linkert et al., 2010) in Fiji (J. Schindelin et al., 2012) geladen und die Helligkeit und der Kontrast in den einzelnen Kanäle angepasst. Die Bildausschnitte wurden dann ausgewählt und ein Maßstabsbalken eingefügt. Die Abbildungen wurden in Inkscape angefertigt.

4.2.17 Durchflusszytometrie

Um die Oberflächenproteine von Zellen zu färben, wurden sie in eine 96-well V-Bodenplatte übertragen und bei 1000 g, 4 °C für 5 Min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde ausgeklopft. Das Zellpellet wurde in 180 µl FACS-Puffer resuspendiert und diese Waschung zweimal wiederholt. Dann wurden die Zellen in 50 µl FACS-Puffer mit Antikörpern resuspendiert und die Zellen 30 Min. im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden 2 Mal gewaschen und final in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Unmittelbar vor der Analyse wurden 10 µl Propidiumiodid hinzugegeben, um tote Zellen zu markieren. Die Zellen wurden in einem BD FACSCanto II analysiert.

4.2.18 Proteaseinhibition

HepG2-NTCP k7 Zellen wurden mit HBV infiziert und sechs Tage nach der Infektion mit CAMs (AT130, Bay41-4109, CpAM_1 je 5 µM) behandelt. Nach vier Tagen Behandlung wurden die Zellen, aufgrund der hohen Toxizität von Proteaseinhibitoren für 2 Stunden mit den für Cysteinproteasen spezifischen Proteaseinhibitoren E-64 und AcLeu bei jeweils 10 µM inkubiert. Während des gesamten Experiments wurde die CAM- und die Inhibitor-Behandlung weitergeführt.

E-64 (L-trans-Epoxy succinyl-leucylamide-(4-guanido)-butane) ist ein irreversibler Inhibitor von Cysteinproteasen wie Papain, Calpain, Cathepsin B, L und H. Es wirkt über die Bildung eines Thioethers mit dem Thiol des Cysteins im aktiven Zentrum. AcLeu (N-acetyl-L-leucyl-N-[(1S)-1-

formylpentyl]-L-leucinamide) ist ein membrangängiger Peptid-Aldehyd-Inhibitor von Calpain I, Calpain II, Cathepsin L und anderen neutralen Cysteinproteasen. Im Anschluss folgte ein Pulse-Chase-Experiment.

4.2.19 Isotopenmarkierung und Analyse (Pulse-Chase Experiment)

Mit HBV infizierte oder HBV transgene Zellen wurden nach der antiviralen Behandlung zweimal mit PBS gewaschen und das Zellkulturmedium wurde für 45 Min. durch Depletionsmedium (ohne Cystein und Methionin) ersetzt, um intrazelluläre Reserven der Aminosäuren aufzubrechen. Danach wurden die Zellen mit ³⁵S-Methionin und ³⁵S-Cystein haltigem Depletionsmedium (0,1 µCi/µl) in 40% des regulären Mediumvolumens für 20 Min. inkubiert (Pulsperiode). Nach der Pulsperiode wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in Folgemedium (Chase-Medium) inkubiert. Das Folgemedium bestand aus Depletionsmedium mit 1 mM Cystein und 1 mM Methionin sowie 10% FCS. Die Zellen wurden dann zu den im Experiment angegebenen Zeitpunkten lysiert. Dem geklärten Lysat wurde ein Anti-HBcore Antikörper zugegeben (1 µl pro Probe) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde mit einem magnetischen Pull-Down der Antikörper-Antigenkomplex aus dem Lysat isoliert. Das Eluat aus dem Pull-Down wurde in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel getrocknet. Das getrocknete Gel wurde über Nacht mit einem BAS-TR2025 Phosphoscreen (GE) aufgenommen und danach in einem Phosphoscaner CR 35 Bio (Raytest) ausgelesen.

4.2.20 „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

Um die Konzentration von viralen und anderen Proteinen in Zellkulturüberständen oder Zelllysaten zu bestimmen, wurde die Methode des Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) angewendet. Hierbei handelt es sich um eine Sandwich-Antikörper-Methode, bei der ein Zielprotein von einem adsorbierten und einem löslichen Antikörper gebunden wird. Mit Hilfe eines Detektionsantikörpers, an den eine Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase (HRP)) gebunden ist, wird dann ein chromogenes Substrat umgesetzt und so das Zielprotein quantifiziert. (Abbildung 4.2) Die Analyse von Hepatitis B e-Antigen (HBeAg) wurde mit dem Enzygnost® HBe monoclonal (Siemens) auf einem BEP III System (Siemens) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Bestimmung von IL-2 wurde mit dem Human IL-2 ELISA MAX™ Standard (biologend) nach Herstellerprotokoll auf Nunc MaxiSorp™ ELISA Platten (Thermo Fisher) durchgeführt. Es wurde die TMB stabilized chromogen (Thermo Fisher) als Substrat verwendet und mit 1 M H₂SO₄ gestoppt. Die Platten wurden im Infinite F200 Plattenlesegerät (Tecan) bei 650 nm ausgelesen.

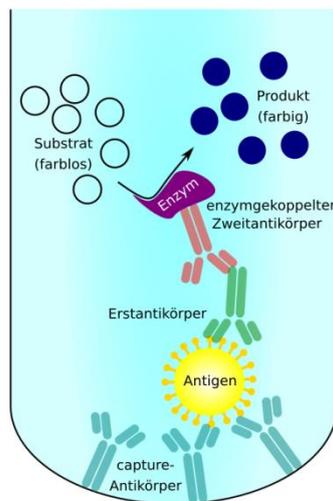


Abbildung 4.2 Funktionsweise eines ELISAs, Skizze

(Modifiziert von Jiver - Eigenes Werk, CC-BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=59221075>)

4.2.21 Statistische Analyse

Die erhobenen Daten wurden keiner statistischen Analyse unterzogen, da die Stichprobenmengen in allen durchgeführten Experimenten zu klein waren, um eine statistische Aussagekraft zu haben. Es wurden zur besseren Darstellung in Einzelfällen der Mittelwert oder Durchschnittswert +/- der Bandbreite dargestellt.

Datenanalysen (IC50, Halbwertszeit etc.) wurden mit GraphPad Prism durchgeführt.

4.2.22 Densitometrie

Densitometrische Analysen wurden mit Fiji (J. Schindelin et al., 2012) durchgeführt.

Abbildungen

Abbildung 1.1: Systematik der Familie der Hepadnaviren.	15
Abbildung 1.2: Übersichtskarte der globalen HBV-Infektionsraten.	16
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Virions (Dane Partikel) und der nicht infektiösen membranösen HBs-Partikel.	17
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des HBV Virions.	19
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des HBV Genoms in der rcDNA Form.	22
Abbildung 1.6: Replikationszyklus des Hepatitis B Virus.	25
Abbildung 1.7: Der MHC Klasse I Peptidladekomplex (PLC) in einer schematischen Darstellung.	32
Abbildung 1.8: Schematische Struktur des T-Zellrezeptorkomplexes.	34
Abbildung 1.9: Das Ubiquitin-Proteasom-System in einer Übersicht.	36
Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der chaperonvermittelten Autophagie.	38
Abbildung 1.11: Elektronenmikroskopische Aufnahme von HBc, mit AT130 behandelt.	39
Abbildung 1.12: Reaktionsschema des Kapsidassembly mit CAMs.	40
Abbildung 1.13: Elektronenmikroskopische Aufnahme von HBc, mit Bay41-4109 behandelt.	41
Abbildung 2.1: Zellviabilität HBV exprimierender Zellen bei CAM-Behandlung.	45
Abbildung 2.2: IC50 Werte der CpAMs in HepG2.2.15 Zellen.	46
Abbildung 2.3: IC50 Werte der CpAMs in HepG2H1.3 Zellen.	47
Abbildung 2.4 IC50 Werte der CpAMs in HBV-infizierten HepG2-NTCP k7 Zellen.	47
Abbildung 2.5: Intrazelluläre pgRNA nach CAM und NRTI Behandlung.	48
Abbildung 2.6: Natives Gel von Zelllysaten.	49
Abbildung 2.7: Immunfluoreszenzaufnahmen von HepG2H1.3 Zellen.	51
Abbildung 2.8: Darstellung eines isolierten Zellkerns mit Tiefenprojektion.	52
Abbildung 2.9: Immunfluoreszenzaufnahmen von HepaRG-NTCP Zellen.	53
Abbildung 2.10: Immunfluoreszenzaufnahmen von HepG2-NTCP k7 Zellen.	54
Abbildung 2.11: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Effekte von Bay41-4109 auf die intrazelluläre Lokalisation von HBc.	55
Abbildung 2.12: Nukleäre Kolokalisation von PML-Nuclear Bodies und HBc bei CAM-Behandlung.	56
Abbildung 2.13: Ko-Kulturexperiment mit HepG2.2.15 Zellen und transduzierten T-Zellen die den TCR _{C18-27} -7D trugen.	59
Abbildung 2.14: Differenzdarstellung der Graphen aus Abbildung 2.13.	60
Abbildung 2.15: Ko-Kulturexperiment mit HepG2.2.15 Zellen und transduzierten T-Zellen die den TCR _{C18-27} -5E trugen.	61

Abbildung 2.16: Detailanalyse des Ko-Kulturrexperiment mit HepG2.2.15 Zellen und transduzierten T-Zellen die den TCR _{C18-27} -5E trugen.....	62
Abbildung 2.17: T-Zell-Aktivierungsexperiment mit TCR _{C18-27} transduzierten T-Zellen auf HepG2.2.15 Zellen mit CAM behandlung.....	64
Abbildung 2.18: Experiment zu Bestimmung des HBc Abbauweges.....	66
Abbildung 2.19: Stressinduktion bei CAM-Behandlung von infizierten Zellen.....	67
Abbildung 2.20: Induktion der angeborenen Immunantwort in HBV infizierten HepaRG Zellen.	69
Abbildung 4.1 Skizze des Aufbaus für den Kapillartransfer des nativen Blots.....	105
Abbildung 4.2 Funktionsweise eines ELISAs, Skizze.....	112

Literaturverzeichnis

- Andersson TB, Kanebratt KP, Kenna JG. 2012. The HepaRG cell line: a unique in vitro tool for understanding drug metabolism and toxicology in human. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 8:909-20.
- Andre C, Guillemin MC, Zhu J, Koken MH, Quignon F, Herve L, Chelbi-Alix MK, Dhumeaux D, Wang ZY, Degos L, Chen Z, de The H. 1996. The PML and PML/RARalpha domains: from autoimmunity to molecular oncology and from retinoic acid to arsenic. *Exp Cell Res* 229:253-60.
- Antunovic J, Lemieux N, Cromlish JA. 1993. The 17 kDa HBx protein encoded by hepatitis B virus interacts with the activation domains of Oct-1, and functions as a coactivator in the activation and repression of a human U6 promoter. *Cell Mol Biol Res* 39:463-82.
- Arzumanyan A, Friedman T, Ng IO, Clayton MM, Lian Z, Feitelson MA. 2011. Does the hepatitis B antigen HBx promote the appearance of liver cancer stem cells? *Cancer Res* 71:3701-8.
- Bartenschlager R, Schaller H. 1992. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J* 11:3413-20.
- Bassani-Sternberg M, Pletscher-Frankild S, Jensen LJ, Mann M. 2015. Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. *Mol Cell Proteomics* 14:658-73.
- Beasley RP. 1988. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 61:1942-56.
- Benhenda S, Ducroux A, Riviere L, Sobhian B, Ward MD, Dion S, Hantz O, Protzer U, Michel ML, Benkirane M, Semmes OJ, Buendia MA, Neuveut C. 2013. Methyltransferase PRMT1 is a binding partner of HBx and a negative regulator of hepatitis B virus transcription. *J Virol* 87:4360-71.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. 2006. *Biochemistry*, 6th ed. W. H. Freeman and Company, New York, NY, USA.
- Berke JM, Dehertogh P, Vergauwen K, Van Damme E, Mostmans W, Vandyck K, Pauwels F. 2017. Capsid Assembly Modulators Have a Dual Mechanism of Action in Primary Human Hepatocytes Infected with Hepatitis B Virus. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
- Bernardi R, Pandolfi PP. 2007. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:1006-16.
- Berscheminski J, Groitl P, Dobner T, Wimmer P, Schreiner S. 2013. The Adenoviral Oncogene E1A-13S Interacts with a Specific Isoform of the Tumor Suppressor PML To Enhance Viral Transcription. *Journal of Virology* 87:965-977.
- Bertoletti A, Rivino L. 2014. Hepatitis B: future curative strategies. *Curr Opin Infect Dis* 27:528-34.
- Blees A, Janulienė D, Hofmann T, Koller N, Schmidt C, Trowitzsch S, Moeller A, Tampe R. 2017. Structure of the human MHC-I peptide-loading complex. *Nature* doi:10.1038/nature24627.
- Block TM, Guo H, Guo JT. 2007. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clin Liver Dis* 11:685-706, vii.
- Blumberg BS, Melartin L, Guint RA, Werner B. 1966. Family studies of a human serum isoantigen system (Australia antigen). *Am J Hum Genet* 18:594-608.
- Blumberg BS, Sutnick AI, London WT. 1969. Australia antigen and hepatitis. *JAMA* 207:1895-6.
- Bock CT, Schwinn S, Locarnini S, Fyfe J, Manns MP, Trautwein C, Zentgraf H. 2001. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J Mol Biol* 307:183-96.
- Bock CT, Schwinn S, Schroder CH, Velhagen I, Zentgraf H. 1996. Localization of hepatitis B virus core protein and viral DNA at the nuclear membrane. *Virus Genes* 12:53-63.
- Boni C, Fusicaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, Laccabue D, Zerbini A, Cavalli A, Missale G, Bertoletti A, Ferrari C. 2007. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol* 81:4215-25.

- Bottcher B, Wynne SA, Crowther RA. 1997. Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature* 386:88-91.
- Bourne C, Lee S, Venkataiah B, Lee A, Korba B, Finn MG, Zlotnick A. 2008. Small-molecule effectors of hepatitis B virus capsid assembly give insight into virus life cycle. *J Virol* 82:10262-70.
- Bourne CR, Finn MG, Zlotnick A. 2006. Global structural changes in hepatitis B virus capsids induced by the assembly effector HAP1. *J Virol* 80:11055-61.
- Braun K, Frank M, Pipkorn R, Reed J, Spring H, Debus J, Didinger B, von der Lieth CW, Wiessler M, Waldeck W. 2008. HIV-1 capsid assembly inhibitor (CAI) peptide: structural preferences and delivery into human embryonic lung cells and lymphocytes. *Int J Med Sci* 5:230-9.
- Brezillon N, Brunelle MN, Massinet H, Giang E, Lamant C, DaSilva L, Berissi S, Belghiti J, Hannoun L, Puerstinger G, Wimmer E, Neyts J, Hantz O, Soussan P, Morosan S, Kremsdorf D. 2011. Antiviral activity of Bay 41-4109 on hepatitis B virus in humanized Alb-uPA/SCID mice. *PLoS One* 6:e25096.
- Broering R, Lu M, Schlaak JF. 2011. Role of Toll-like receptors in liver health and disease. *Clin Sci (Lond)* 121:415-26.
- Busca A, Kumar A. 2014. Innate immune responses in hepatitis B virus (HBV) infection. *Virol J* 11:22.
- Caspar DL, Klug A. 1962. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 27:1-24.
- Cattaneo R, Will H, Schaller H. 1984. Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *EMBO J* 3:2191-6.
- Chelbi-Alix MK, de The H. 1999. Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* 18:935-41.
- Chelbi-Alix MK, Pelicano L, Quignon F, Koken MH, Venturini L, Stadler M, Pavlovic J, Degos L, de The H. 1995. Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. *Leukemia* 9:2027-33.
- Chong CK, Cheng CYS, Tsoi SYJ, Huang FY, Liu F, Seto WK, Lai CL, Yuen MF, Wong DK. 2017. Role of hepatitis B core protein in HBV transcription and recruitment of histone acetyltransferases to cccDNA minichromosome. *Antiviral Res* 144:1-7.
- Chu CM, Liaw YF. 1987. Intrahepatic distribution of hepatitis B surface and core antigens in chronic hepatitis B virus infection. Hepatocyte with cytoplasmic/membranous hepatitis B core antigen as a possible target for immune hepatocytolysis. *Gastroenterology* 92:220-5.
- Chu CM, Yeh CT, Sheen IS, Liaw YF. 1995. Subcellular localization of hepatitis B core antigen in relation to hepatocyte regeneration in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 109:1926-32.
- Chung YL. 2013. Defective DNA damage response and repair in liver cells expressing hepatitis B virus surface antigen. *FASEB J* 27:2316-27.
- Chung YL, Tsai TY. 2009. Promyelocytic leukemia nuclear bodies link the DNA damage repair pathway with hepatitis B virus replication: implications for hepatitis B virus exacerbation during chemotherapy and radiotherapy. *Mol Cancer Res* 7:1672-85.
- Chung YL, Wu ML. 2013. Promyelocytic leukaemia protein links DNA damage response and repair to hepatitis B virus-related hepatocarcinogenesis. *J Pathol* 230:377-87.
- Crowther RA, Kiselev NA, Bottcher B, Berriman JA, Borisova GP, Ose V, Pumpens P. 1994. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 77:943-50.
- Cuervo AM, Wong E. 2014. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res* 24:92-104.
- Dane DS, Cameron CH, Briggs M. 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1:695-8.
- Dargel C, Bassani-Sternberg M, Hasreiter J, Zani F, Bockmann JH, Thiele F, Bohne F, Wisskirchen K, Wilde S, Sprinzl MF, Schendel DJ, Krackhardt AM, Uckert W, Wohlleber D, Schiemann M, Stemmer K, Heikenwalder M, Busch DH, Richter G, Mann M, Protzer U. 2015. T Cells Engineered to Express a T-Cell Receptor Specific for Glypican-3 to Recognize and Kill Hepatoma Cells In Vitro and in Mice. *Gastroenterology* 149:1042-52.

- Decorsiere A, Mueller H, van Breugel PC, Abdul F, Gerossier L, Beran RK, Livingston CM, Niu C, Fletcher SP, Hantz O, Strubin M. 2016. Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature* 531:386-9.
- Delaney WE, Edwards R, Colledge D, Shaw T, Furman P, Painter G, Locarnini S. 2002. Phenylpropenamide Derivatives AT-61 and AT-130 Inhibit Replication of Wild-Type and Lamivudine-Resistant Strains of Hepatitis B Virus In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:3057-3060.
- Delius H, Gough NM, Cameron CH, Murray K. 1983. Structure of the hepatitis B virus genome. *J Virol* 47:337-43.
- Deres K, Schroder CH, Paessens A, Goldmann S, Hacker HJ, Weber O, Kramer T, Niewohner U, Pleiss U, Stoltefuss J, Graef E, Koletzki D, Masantschek RN, Reimann A, Jaeger R, Gross R, Beckermann B, Schlemmer KH, Haebich D, Rubsamen-Waigmann H. 2003. Inhibition of hepatitis B virus replication by drug-induced depletion of nucleocapsids. *Science* 299:893-6.
- Deroubaix A, Osseman Q, Cassany A, Begu D, Ragues J, Kassab S, Laine S, Kann M. 2014. Expression of viral polymerase and phosphorylation of core protein determine core and capsid localization of the human hepatitis B virus. *J Gen Virol* doi:10.1099/vir.0.064816-0.
- Desmond CP, Bartholomeusz A, Gaudieri S, Reville PA, Lewin SR. 2008. A systematic review of T-cell epitopes in hepatitis B virus: identification, genotypic variation and relevance to antiviral therapeutics. *Antivir Ther* 13:161-75.
- Doucas V, Ishov AM, Romo A, Juguilon H, Weitzman MD, Evans RM, Maul GG. 1996. Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev* 10:196-207.
- Droemann D, Goldmann T, Branscheid D, Clark R, Dalhoff K, Zabel P, Vollmer E. 2003. Toll-like receptor 2 is expressed by alveolar epithelial cells type II and macrophages in the human lung. *Histochem Cell Biol* 119:103-8.
- Dunn C, Peppas D, Khanna P, Nebbia G, Jones M, Brendish N, Lascar RM, Brown D, Gilson RJ, Tedder RJ, Dusheiko GM, Jacobs M, Klenerman P, Maini MK. 2009. Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 137:1289-300.
- Dupinay T, Gheit T, Roques P, Cova L, Chevallier-Queyron P, Tasahsu SI, Le Grand R, Simon F, Cordier G, Wakrim L, Benjelloun S, Trepo C, Chemin I. 2013. Discovery of naturally occurring transmissible chronic hepatitis B virus infection among *Macaca fascicularis* from Mauritius Island. *Hepatology* 58:1610-20.
- Everett RD, Chelbi-Alix MK. 2007. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* 89:819-30.
- Faure-Dupuy S, Lucifora J, Durantel D. 2017. Interplay between the Hepatitis B Virus and Innate Immunity: From an Understanding to the Development of Therapeutic Concepts. *Viruses* 9.
- Ferrari C. 2015. HBV and the immune response. *Liver Int* 35 Suppl 1:121-8.
- Ganem D, Prince AM. 2004. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 350:1118-29.
- Garcia ML, Byfield R, Robek MD. 2009. Hepatitis B virus replication and release are independent of core lysine ubiquitination. *J Virol* 83:4923-33.
- Gaudreault N, Jones C. 2011. Regulation of promyelocytic leukemia (PML) protein levels and cell morphology by bovine herpesvirus 1 infected cell protein 0 (bICP0) and mutant bICP0 proteins that do not localize to the nucleus. *Virus Res* 156:17-24.
- Ghani K, Wang X, de Campos-Lima PO, Olszewska M, Kamen A, Riviere I, Caruso M. 2009. Efficient human hematopoietic cell transduction using RD114- and GALV-pseudotyped retroviral vectors produced in suspension and serum-free media. *Hum Gene Ther* 20:966-74.
- Glick D, Barth S, Macleod KF. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 221:3-12.
- Goldberg IG, Allan C, Burel JM, Creager D, Falconi A, Hochheiser H, Johnston J, Mellen J, Sorger PK, Swedlow JR. 2005. The Open Microscopy Environment (OME) Data Model and XML file: open tools for informatics and quantitative analysis in biological imaging. *Genome Biol* 6:R47.
- Gong DY, Chen EQ, Huang FJ, Leng XH, Cheng X, Tang H. 2013. Role and functional domain of hepatitis B virus X protein in regulating HBV transcription and replication in vitro and in vivo. *Viruses* 5:1261-71.

- Gongora C, David G, Pintard L, Tissot C, Hua TD, Dejean A, Mechti N. 1997. Molecular cloning of a new interferon-induced PML nuclear body-associated protein. *J Biol Chem* 272:19457-63.
- Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C. 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15655-60.
- Guo H, Jiang D, Ma D, Chang J, Dougherty AM, Cuconati A, Block TM, Guo JT. 2009. Activation of pattern recognition receptor-mediated innate immunity inhibits the replication of hepatitis B virus in human hepatocyte-derived cells. *J Virol* 83:847-58.
- Guo P. 2013. Suppression of interferon-mediated antiviral immunity by hepatitis B virus: an overview of research progress. *Scand J Immunol* 78:230-7.
- Guo YH, Li YN, Zhao JR, Zhang J, Yan Z. 2011. HBc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state. *Epigenetics* 6:720-6.
- Heger-Stevic J, Zimmermann P, Lecoq L, Böttcher B, Nassal M. 2018. Hepatitis B virus core protein phosphorylation: Identification of the SRPK1 target sites and impact of their occupancy on RNA binding and capsid structure. *PLOS Pathogens* 14:e1007488.
- Huang HC, Chen CC, Chang WC, Tao MH, Huang C. 2012. Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Virol* 86:9443-53.
- Innaimo SF, Seifer M, Bisacchi GS, Standring DN, Zahler R, Colonno RJ. 1997. Identification of BMS-200475 as a potent and selective inhibitor of hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother* 41:1444-8.
- Inohara, Chamillard, McDonald C, Nunez G. 2005. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 74:355-83.
- Inoue J, Krueger EW, Chen J, Cao H, Ninomiya M, McNiven MA. 2015. HBV secretion is regulated through the activation of endocytic and autophagic compartments mediated by Rab7 stimulation. *J Cell Sci* 128:1696-706.
- Inoue N, Matsushita M, Fukui Y, Yamada S, Tsuda M, Higashi C, Kaneko K, Hasegawa H, Yamaguchi T. 2012. Identification of a varicella-zoster virus replication inhibitor that blocks capsid assembly by interacting with the floor domain of the major capsid protein. *J Virol* 86:12198-207.
- Jasmine Bullard A, Cunningham FE, Volpp BD, Lowy E, Beste LA, Heron BB, Geraci M, Hammond JM, LaPlant K, Stave EA, Turner MJ, O'Leary MC, Kelley MJ, Hunt CM. 2018. Preventing Hepatitis B Reactivation During Anti-CD20 Antibody Treatment in the Veterans Health Administration. *Hepatol Commun* 2:1136-1146.
- Jindal S, Malkovsky M. 1994. Stress responses to viral infection. *Trends Microbiol* 2:89-91.
- Junker-Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller H. 1990. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J* 9:3389-96.
- Kakumu S, Arai M, Yoshioka K, Tsutsumi Y, Inoue M. 1989. Distribution of HBcAg in hepatitis B detected by immunoperoxidase staining with three different preparations of anti-HBc antibodies. *J Clin Pathol* 42:284-8.
- Kann M, Bischof A, Gerlich WH. 1997. In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. *J Virol* 71:1310-6.
- 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* 68:7993-8000.
- Kann M, Schmitz A, Rabe B. 2007. Intracellular transport of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 13:39-47.
- Kann M, Sodeik B, Vlachou A, Gerlich WH, Helenius A. 1999. Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 145:45-55.
- Katen SP, Tan Z, Chirapu SR, Finn MG, Zlotnick A. 2013. Assembly-directed antivirals differentially bind quasiequivalent pockets to modify hepatitis B virus capsid tertiary and quaternary structure. *Structure* 21:1406-16.
- Keskinen P, Nyqvist M, Sareneva T, Pirhonen J, Melen K, Julkunen I. 1999. Impaired antiviral response in human hepatoma cells. *Virology* 263:364-75.

- Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. 1991. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 351:317-20.
- Ko C, Bester R, Zhou X, Xu Z, Blossey C, Sacherl J, Vondran FWR, Gao L, Protzer U. 2019. A New Role for Capsid Assembly Modulators To Target Mature Hepatitis B Virus Capsids and Prevent Virus Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 64.
- Ko C, Michler T, Protzer U. 2017. Novel viral and host targets to cure hepatitis B. *Curr Opin Virol* 24:38-45.
- Kock J, Rosler C, Zhang JJ, Blum HE, Nassal M, Thoma C. 2010. Generation of covalently closed circular DNA of hepatitis B viruses via intracellular recycling is regulated in a virus specific manner. *PLoS Pathog* 6:e1001082.
- Komiya Y, Katayama K, Yugi H, Mizui M, Matsukura H, Tomoguri T, Miyakawa Y, Tabuchi A, Tanaka J, Yoshizawa H. 2008. Minimum infectious dose of hepatitis B virus in chimpanzees and difference in the dynamics of viremia between genotype A and genotype C. *Transfusion* 48:286-94.
- Ladner SK, Otto MJ, Barker CS, Zaifert K, Wang GH, Guo JT, Seeger C, King RW. 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* 41:1715-20.
- Lallemand-Breitenbach V, de The H. 2010. PML nuclear bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000661.
- Lambert C, Doring T, Prange R. 2007. Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J Virol* 81:9050-60.
- Langley DR, Walsh AW, Baldick CJ, Eggers BJ, Rose RE, Levine SM, Kapur AJ, Colonno RJ, Tenney DJ. 2007. Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir. *J Virol* 81:3992-4001.
- Lee AS. 2005. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 35:373-81.
- Lee JM, Ahn SH. 2011. Quantification of HBsAg: basic virology for clinical practice. *World J Gastroenterol* 17:283-9.
- Lee S, Kim W, Ko C, Ryu WS. 2016. Hepatitis B virus X protein enhances Myc stability by inhibiting SCF(Skp2) ubiquitin E3 ligase-mediated Myc ubiquitination and contributes to oncogenesis. *Oncogene* 35:1857-67.
- Levine B, Kroemer G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132:27-42.
- Lewellyn EB, Loeb DD. 2011. The Arginine Clusters of the Carboxy-Terminal Domain of the Core Protein of Hepatitis B Virus Make Pleiotropic Contributions to Genome Replication. *Journal of Virology* 85:1298-1309.
- Li HC, Huang EY, Su PY, Wu SY, Yang CC, Lin YS, Chang WC, Shih C. 2010. Nuclear export and import of human hepatitis B virus capsid protein and particles. *PLoS Pathog* 6:e1001162.
- Lim SG. 2008. Heplisav™: a new hepatitis B vaccine.
- Linkert M, Rueden CT, Allan C, Burel JM, Moore W, Patterson A, Loranger B, Moore J, Neves C, Macdonald D, Tarkowska A, Sticco C, Hill E, Rossner M, Eliceiri KW, Swedlow JR. 2010. Metadata matters: access to image data in the real world. *J Cell Biol* 189:777-82.
- Liu HY, Zhang XY. 2015. Innate immune recognition of hepatitis B virus. *World J Hepatol* 7:2319-22.
- Liu YJ, Zhang J, Lane PJ, Chan EY, MacLennan IC. 1991. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol* 21:2951-62.
- Luangsay S, Gruffaz M, Isorce N, Testoni B, Michelet M, Faure-Dupuy S, Maadadi S, Ait-Goughoulte M, Parent R, Rivoire M, Javanbakht H, Lucifora J, Durantel D, Zoulim F. 2015. Early inhibition of hepatocyte innate responses by hepatitis B virus. *J Hepatol* 63:1314-22.
- Luciani JJ, Depetris D, Usson Y, Metzler-Guillemain C, Mignon-Ravix C, Mitchell MJ, Megarbane A, Sarda P, Sirma H, Moncla A, Feunteun J, Mattei MG. 2006. PML nuclear bodies are highly organised DNA-protein structures with a function in heterochromatin remodelling at the G2 phase. *Journal of Cell Science* 119:2518-2531.
- Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, Belloni L, Strubin M, Levrero M, Zoulim F, Hantz O, Protzer U. 2011. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol* 55:996-1003.

- Lucifora J, Durantel D, Testoni B, Hantz O, Levrero M, Zoulim F. 2010. Control of hepatitis B virus replication by innate response of HepaRG cells. *Hepatology* 51:63-72.
- Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Zhang K, Stadler D, Cheng X, Sprinzl MF, Koppensteiner H, Makowska Z, Volz T, Remouchamps C, Chou WM, Thasler WE, Huser N, Durantel D, Liang TJ, Munk C, Heim MH, Browning JL, Dejardin E, Dandri M, Schindler M, Heikenwalder M, Protzer U. 2014. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science* 343:1221-8.
- Mabit H, Knaust A, Breiner KM, Schaller H. 2003. Nuclear localization of the duck hepatitis B virus capsid protein: detection and functional implications of distinct subnuclear bodies in a compartment associated with RNA synthesis and maturation. *J Virol* 77:2157-64.
- Macovei A, Radulescu C, Lazar C, Petrescu S, Durantel D, Dwek RA, Zitzmann N, Nichita NB. 2010. Hepatitis B virus requires intact caveolin-1 function for productive infection in HepaRG cells. *J Virol* 84:243-53.
- Mao R, Nie H, Cai D, Zhang J, Liu H, Yan R, Cuconati A, Block TM, Guo JT, Guo H. 2013. Inhibition of hepatitis B virus replication by the host zinc finger antiviral protein. *PLoS Pathog* 9:e1003494.
- Marcellin P. 2009. Hepatitis B and hepatitis C in 2009. *Liver Int* 29 Suppl 1:1-8.
- McKee TA, Disney GH, Everett RD, Preston CM. 1990. Control of expression of the varicella-zoster virus major immediate early gene. *J Gen Virol* 71 (Pt 4):897-906.
- McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, Heyward WL, Bender TR, Francis DP, Maynard JE. 1985. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J Infect Dis* 151:599-603.
- McMahon BJ, Holck P, Bulkow L, Snowball M. 2001. Serologic and clinical outcomes of 1536 Alaska Natives chronically infected with hepatitis B virus. *Ann Intern Med* 135:759-68.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-7.
- Melegari M, Wolf SK, Schneider RJ. 2005. Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. *J Virol* 79:9810-20.
- Miller RH, Kaneko S, Chung CT, Girones R, Purcell RH. 1989. Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 9:322-7.
- Minor MM, Slagle BL. 2014. Hepatitis B virus HBx protein interactions with the ubiquitin proteasome system. *Viruses* 6:4683-702.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451:1069-75.
- Moller A, Schmitz ML. 2003. Viruses as hijackers of PML nuclear bodies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 51:295-300.
- Mosley B, Dower SK, Gillis S, Cosman D. 1987. Determination of the minimum polypeptide lengths of the functionally active sites of human interleukins 1 alpha and 1 beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:4572-6.
- Moss B, Rosenblum EN, Katz E, Grimley PM. 1969. Rifampicin: a specific inhibitor of vaccinia virus assembly. *Nature* 224:1280-4.
- Murphy K, Weaver C. 2017. *Janeway's Immunobiology*, 9th ed. Garland Sciences, New York, NY, USA.
- Nakhaei P, Hiscott J, Lin R. 2010. STING-ing the Antiviral Pathway. 2:110-112.
- Neurath AR, Kent SB, Strick N, Taylor P, Stevens CE. 1985. Hepatitis B virus contains pre-S gene-encoded domains. *Nature* 315:154-6.
- Nguyen DH, Ludgate L, Hu J. 2008. Hepatitis B virus-cell interactions and pathogenesis. *J Cell Physiol* 216:289-94.
- Niu C, Livingston CM, Li L, Beran RK, Daffis S, Ramakrishnan D, Burdette D, Peiser L, Salas E, Ramos H, Yu M, Cheng G, Strubin M, Delaney WI, Fletcher SP. 2017. The Smc5/6 Complex Restricts HBV when Localized to ND10 without Inducing an Innate Immune Response and Is Counteracted by the HBV X Protein Shortly after Infection. *PLoS One* 12:e0169648.

- Norris CA, He M, Kang LI, Ding MQ, Radder JE, Haynes MM, Yang Y, Paranjpe S, Bowen WC, Orr A, Michalopoulos GK, Stolz DB, Mars WM. 2014. Synthesis of IL-6 by hepatocytes is a normal response to common hepatic stimuli. *PLoS One* 9:e96053.
- Ozeki T, Mizuno S, Sanefuzi H, Tanaka N, Fujiwara H, Masuda H, Funakoshi K. 1987. Localization of hepatitis B core antigens in chronic active hepatitis using immunoperoxidase and chromotrope aniline blue staining. *Br J Exp Pathol* 68:605-12.
- Packianathan C, Katen SP, Dann CE, 3rd, Zlotnick A. 2010. Conformational changes in the hepatitis B virus core protein are consistent with a role for allostery in virus assembly. *J Virol* 84:1607-15.
- Pan XB, Han JC, Wei L, Peng DD, Gao Y. 2008. [Subcellular distribution and translocation of hepatitis B virus core protein in HepG2.2.15 cells]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 16:29-32.
- Pandey S, Kawai T, Akira S. 2014. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a016246.
- Parent R, Beretta L. 2008. Translational control plays a prominent role in the hepatocytic differentiation of HepaRG liver progenitor cells. *Genome Biol* 9:R19.
- Pei RJ, Chen XW, Lu MJ. 2014. Control of hepatitis B virus replication by interferons and Toll-like receptor signaling pathways. *World J Gastroenterol* 20:11618-11629.
- Perlman DH, Berg EA, O'Connor P B, Costello CE, Hu J. 2005. Reverse transcription-associated dephosphorylation of hepadnavirus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9020-5.
- Perni RB, Conway SC, Ladner SK, Zaifert K, Otto MJ, King RW. 2000. Phenylpropenamide derivatives as inhibitors of hepatitis B virus replication. *Bioorg Med Chem Lett* 10:2687-90.
- Piehler J, Thomas C, Garcia KC, Schreiber G. 2012. Structural and dynamic determinants of type I interferon receptor assembly and their functional interpretation. *Immunol Rev* 250:317-34.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-8.
- Porterfield JZ, Dhasan MS, Loeb DD, Nassal M, Stray SJ, Zlotnick A. 2010. Full-Length Hepatitis B Virus Core Protein Packages Viral and Heterologous RNA with Similarly High Levels of Cooperativity. *Journal of Virology* 84:7174-7184.
- Prange R. 2012. Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. *Med Microbiol Immunol* 201:449-61.
- Protzer U, Seyfried S, Quasdorff M, Sass G, Svorcova M, Webb D, Bohne F, Hosel M, Schirmacher P, Tiegs G. 2007. Antiviral activity and hepatoprotection by heme oxygenase-1 in hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 133:1156-65.
- Qian G, Jin F, Chang L, Yang Y, Peng H, Duan C. 2012. NIRF, a novel ubiquitin ligase, interacts with hepatitis B virus core protein and promotes its degradation. *Biotechnol Lett* 34:29-36.
- Qiu Z, Lin X, Zhang W, Zhou M, Guo L, Kocer B, Wu G, Zhang Z, Liu H, Shi H, Kou B, Hu T, Hu Y, Huang M, Yan SF, Xu Z, Zhou Z, Qin N, Wang YF, Ren S, Qiu H, Zhang Y, Zhang Y, Wu X, Sun K, Zhong S, Xie J, Ottaviani G, Zhou Y, Zhu L, Tian X, Shi L, Shen F, Mao Y, Zhou X, Gao L, Young JAT, Wu JZ, Yang G, Mayweg AV, Shen HC, Tang G, Zhu W. 2017. Discovery and Pre-Clinical Characterization of Third-Generation 4-H Heteroaryldihydropyrimidine (HAP) Analogues as Hepatitis B Virus (HBV) Capsid Inhibitors. *J Med Chem* 60:3352-3371.
- Regad T, Chelbi-Alix MK. 2001. Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene* 20:7274-86.
- Roseman AM, Berriman JA, Wynne SA, Butler PJ, Crowther RA. 2005. A structural model for maturation of the hepatitis B virus core. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15821-6.
- Rost M, Mann S, Lambert C, Doring T, Thome N, Prange R. 2006. Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation. *J Biol Chem* 281:29297-308.

- Sadler AJ, Williams BR. 2008. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8:559-68.
- Salminen WF, Jr., Voellmy R, Roberts SM. 1996. Induction of hsp 70 in HepG2 cells in response to hepatotoxicants. *Toxicol Appl Pharmacol* 141:117-23.
- Samuel CE. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14:778-809, table of contents.
- Sansonno DE, Fiore G, Bufano G, Manghisi OG. 1988. Cytoplasmic localization of hepatitis B core antigen in hepatitis B virus infected livers. *J Immunol Methods* 109:245-52.
- Schadler S, Hildt E. 2009. HBV life cycle: entry and morphogenesis. *Viruses* 1:185-209.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676-82.
- Schodel F, Peterson D, Zheng J, Jones JE, Hughes JL, Milich DR. 1993. Structure of hepatitis B virus core and e-antigen. A single precore amino acid prevents nucleocapsid assembly. *J Biol Chem* 268:1332-7.
- Schoenborn JR, Wilson CB. 2007. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 96:41-101.
- Schwarz KB. 1996. Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic Biol Med* 21:641-9.
- Seeger C, Mason WS. 2000. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:51-68.
- Sells MA, Chen ML, Acs G. 1987. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:1005-9.
- Seo HW, Seo JP, Jung G. 2018. Heat shock protein 70 and heat shock protein 90 synergistically increase hepatitis B viral capsid assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 503:2892-2898.
- Severi T, Ying C, Vermeesch JR, Cassiman D, Cnops L, Verslype C, Fevery J, Arckens L, Neyts J, van Pelt JF. 2006. Hepatitis B virus replication causes oxidative stress in HepAD38 liver cells. *Mol Cell Biochem* 290:79-85.
- Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP. 2006. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev* 28:112-25.
- Sly DL, London WT, Purcell RH. 1979. Illness in a chimpanzee inoculated with hepatitis B virus. *J Am Vet Med Assoc* 175:987-8.
- Sompayrac L. 2008. *How the Immune System Works* 3rd Ed. Blackwell Publishing, Malden, MA, USA.
- Sticht J, Humbert M, Findlow S, Bodem J, Muller B, Dietrich U, Werner J, Krausslich HG. 2005. A peptide inhibitor of HIV-1 assembly in vitro. *Nat Struct Mol Biol* 12:671-7.
- Stinski MF, Meier JL. 2007. Immediate-early viral gene regulation and function. *In* Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K (ed), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, Cambridge.
- Stölting J, Stoltefuss J, Goldmann S, Krämer T, Schlemmer KH, Niewöhner U, Paessens A, Graef E, Lottmann S, Deres K. 2000. Dihydropyrimidines and their use in the treatment of hepatitis b. Google Patents.
- Stray SJ, Bourne CR, Punna S, Lewis WG, Finn MG, Zlotnick A. 2005. A heteroaryldihydropyrimidine activates and can misdirect hepatitis B virus capsid assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8138-8143.
- Stray SJ, Zlotnick A. 2006. BAY 41-4109 has multiple effects on Hepatitis B virus capsid assembly. *J Mol Recognit* 19:542-8.
- Summers J, Mason WS. 1982. Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29:403-15.
- 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* 75:4533-7.

- Tan TL, Feng Z, Lu YW, Chan V, Chen WN. 2006. Adhesion contact kinetics of HepG2 cells during Hepatitis B virus replication: Involvement of SH3-binding motif in HBX. *Biochim Biophys Acta* 1762:755-66.
- Tan Z, Pionek K, Unchwaniwala N, Maguire ML, Loeb DD, Zlotnick A. 2015. The interface between hepatitis B virus capsid proteins affects self-assembly, pregenomic RNA packaging, and reverse transcription. *J Virol* 89:3275-84.
- Tanaka K. 2009. The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85:12-36.
- Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. 2012. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* 249:158-75.
- Tenney DJ, Levine SM, Rose RE, Walsh AW, Weinheimer SP, Discotto L, Plym M, Pokornowski K, Yu CF, Angus P, Ayres A, Bartholomeusz A, Sievert W, Thompson G, Warner N, Locarnini S, Colonna RJ. 2004. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3498-507.
- Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, Pokornowski KA, Eggers BJ, Fang J, Wichroski MJ, Xu D, Yang J, Wilber RB, Colonna RJ. 2009. Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology* 49:1503-14.
- Ternois F, Sticht J, Duquerroy S, Krausslich HG, Rey FA. 2005. The HIV-1 capsid protein C-terminal domain in complex with a virus assembly inhibitor. *Nat Struct Mol Biol* 12:678-82.
- Terrault NA, Bzowej NH, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, Murad MH, American Association for the Study of Liver D. 2016. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology* 63:261-83.
- Tu J, Li JJ, Shan ZJ, Zhai HL. 2017. Exploring the binding mechanism of Heteroaryldihydropyrimidines and Hepatitis B Virus capsid combined 3D-QSAR and molecular dynamics. *Antiviral Res* 137:151-164.
- Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szgyarto CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Ponten F. 2015. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347:1260419.
- Venkatakrishnan B, Katen SP, Francis S, Chirapu S, Finn MG, Zlotnick A. 2016. Hepatitis B Virus Capsids Have Diverse Structural Responses to Small-Molecule Ligands Bound to the Heteroaryldihydropyrimidine Pocket. *J Virol* 90:3994-4004.
- Verrier ER, Colpitts CC, Schuster C, Zeisel MB, Baumert TF. 2016. Cell Culture Models for the Investigation of Hepatitis B and D Virus Infection. *Viruses* 8.
- Weber O, Schlemmer KH, Hartmann E, Hagelschuer I, Paessens A, Graef E, Deres K, Goldmann S, Niewoehner U, Stoltefuss J, Haebich D, Ruebsamen-Waigmann H, Wohlfeil S. 2002. Inhibition of human hepatitis B virus (HBV) by a novel non-nucleosidic compound in a transgenic mouse model. *Antiviral Res* 54:69-78.
- WHO. 2017. GLOBAL HEPATITIS REPORT, 2017. World Health Organization, Geneva.
- 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* 101:6669-74.
- Wingfield PT, Stahl SJ, Williams RW, Steven AC. 1995. Hepatitis core antigen produced in *Escherichia coli*: subunit composition, conformational analysis, and in vitro capsid assembly. *Biochemistry* 34:4919-32.
- Wisskirchen K, Metzger K, Schreiber S, Asen T, Weigand L, Dargel C, Witter K, Kieback E, Sprinzl MF, Uckert W, Schiemann M, Busch DH, Krackhardt AM, Protzer U. 2017. Isolation and functional characterization of hepatitis B virus-specific T-cell receptors as new tools for experimental and clinical use. *PLoS One* 12:e0182936.
- Wittkop L, Schwarz A, Cassany A, Grun-Bernhard S, Delaleau M, Rabe B, Cazenave C, Gerlich W, Glebe D, Kann M. 2010. Inhibition of protein kinase C phosphorylation of hepatitis B virus capsids inhibits virion formation and causes intracellular capsid accumulation. *Cell Microbiol* 12:962-75.
- Wynne SA, Crowther RA, Leslie AG. 1999. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol Cell* 3:771-80.
- Xiong Y, Eickbush TH. 1990. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J* 9:3353-62.

- Yamada G, Nakane PK. 1977. Hepatitis B core and surface antigens in liver tissue. Light and electron microscopic localization by the peroxidase-labeled antibody method. *Lab Invest* 36:649-59.
- Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 1:e00049.
- Yang F, Yan S, He Y, Wang F, Song S, Guo Y, Zhou Q, Wang Y, Lin Z, Yang Y, Zhang W, Sun S. 2008. Expression of hepatitis B virus proteins in transgenic mice alters lipid metabolism and induces oxidative stress in the liver. *J Hepatol* 48:12-9.
- Yang Y, Ma Y, Zhen L, Chen Y, Ma W, Murakami S. 1999. HBV X protein (HBX) interacts with general transcription factor TFIIB both in vitro and in vivo. *Chin Med Sci J* 14:152-7.
- Ye B, Liu X, Li X, Kong H, Tian L, Chen Y. 2015. T-cell exhaustion in chronic hepatitis B infection: current knowledge and clinical significance. *Cell Death Dis* 6:e1694.
- Yeh CT, Wong SW, Fung YK, Ou JH. 1993. Cell cycle regulation of nuclear localization of hepatitis B virus core protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6459-63.
- Young LS, Arrand JR, Murray PG. 2007. EBV gene expression and regulation. *In* Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K (ed), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, Cambridge.
- Yu X, Jin L, Jih J, Shih C, Zhou ZH. 2013. 3.5A cryoEM structure of hepatitis B virus core assembled from full-length core protein. *PLoS One* 8:e69729.
- Zhang Z, Protzer U, Hu Z, Jacob J, Liang TJ. 2004. Inhibition of cellular proteasome activities enhances hepatitis B virus replication in an HBX-dependent manner. *J Virol* 78:4566-72.
- Zhao Q, Hu Z, Cheng J, Wu S, Luo Y, Chang J, Hu J, Guo JT. 2018. Hepatitis B Virus Core Protein Dephosphorylation Occurs during Pregenomic RNA Encapsidation. *J Virol* 92.
- Zhou Z, Hu T, Zhou X, Wildum S, Garcia-Alcalde F, Xu Z, Wu D, Mao Y, Tian X, Zhou Y, Shen F, Zhang Z, Tang G, Najera I, Yang G, Shen HC, Young JA, Qin N. 2017. Heteroaryldihydropyrimidine (HAP) and Sulfamoylbenzamide (SBA) Inhibit Hepatitis B Virus Replication by Different Molecular Mechanisms. *Sci Rep* 7:42374.
- Zimmermann K, Eells R, Heinrich F, Rintoul S, Josey B, Shekhar P, Losche M, Stern LJ. 2017. The cytosolic domain of T-cell receptor zeta associates with membranes in a dynamic equilibrium and deeply penetrates the bilayer. *J Biol Chem* 292:17746-17759.
- Zlotnick A, Ceres P, Singh S, Johnson JM. 2002. A small molecule inhibits and misdirects assembly of hepatitis B virus capsids. *J Virol* 76:4848-54.
- Zlotnick A, Palmer I, Kaufman JD, Stahl SJ, Steven AC, Wingfield PT. 1999. Separation and crystallization of T = 3 and T = 4 icosahedral complexes of the hepatitis B virus core protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55:717-20.
- Zlotnick A, Venkatakrisnan B, Tan Z, Lewellyn E, Turner W, Francis S. 2015. Core protein: A pleiotropic keystone in the HBV lifecycle. *Antiviral Res* 121:82-93.

Danksagung

Zuerst muss ich Frau Prof. Dr. Ulrike Protzer dafür danken, dass sie mich diese spannende und hochaktuelle Arbeit in ihrem Labor hat durchführen lassen. Sie gab Unterstützung und Rat, wenn nötig und hatte für dringende Themen immer ein offenes Ohr.

Ich danke meiner Zweitbetreuerin Frau Prof. Dr. Sevil Weinkauff, die zu den Thesis Committee Meetings stets konstruktive Kritik beisteuerte und mich auch in schwierigen Momenten motivierte.

Furthermore, I would like to thank Chunkyu Ko, who is a good friend and an amazing scientist. Basically, the only one who knew what I was talking about, since we were the only two doing research on the same topic. He always gave constructive advice when asked and was extremely supportive throughout the whole project.

Auch möchte ich Dr. Knud Esser danken, ohne den ich diese Arbeit wohl nicht begonnen hätte und der für die ersten Jahre mein Labormentor war.

Ganz spezieller Dank geht an Theresa Asen, die gute Seele des Labors, die alles kann und alles in irgendeinem ihrer Laborbücher stehen hat und die vor allem (fast) alles besorgen kann, was man so für neue, ausgefallene Experimente braucht.

Weiterhin möchte ich einigen großartigen Laborkollegen für die Gesellschaft im Labor und generell tolle Atmosphäre danken. Erwähnt werden sollen hier explizit Oliver Quitt, Lisa Wolff, Wen-Min Chou, Dr. Daniela Stadler, Sebastian Altstetter, Philipp Hagen, Romina Bester, Andreas Oswald, Stoyan Velkov, Florian Wilsch, Martin Kächele, Julia Sacherl, Dr. Katrin Singethan, Dr. Maarten van de Klundert, Dr. Frank Thiele und Dr. Stefanie Prosser.

Besonderer Dank geht an Doris Pelz, die gute Seele des Instituts im Sekretariat, die immer bescheid wusste und (fast) alles regeln konnte.

Großer Dank geht an Raza und Marinka, die unser Laborleben so reibungsfrei gestalteten.

Ein wichtiger Dank geht an meine Eltern, die mich überhaupt erst darauf brachten, das tolle Fach Biochemie zu studieren und meine Brüder Richard und Georg, denen ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung zu jeder Zeit sehr dankbar bin.

Zuletzt das Wichtigste, ein Riesendankeschön geht an meine Frau Paulina, die mich antreibt und liebt und die mich begleitet. Die mich vor allem in den letzten Jahren dieser Dissertation ausgehalten hat.

Veröffentlichungsliste

Ko C, ..., **Blossey C**,... Manuskript in Vorbereitung.

Ko C, Bester R, Zhou X, Xu Z, **Blossey C**, Sacherl J, Vondran FWR, Gao L, Protzer U. 2019. A New Role for Capsid Assembly Modulators To Target Mature Hepatitis B Virus Capsids and Prevent Virus Infection. **Antimicrob Agents Chemother** 64.

Xia Y, Cheng X, **Blossey CK**, Wisskirchen K, Esser K, Protzer U. 2017. Secreted Interferon-Inducible Factors Restrict Hepatitis B and C Virus Entry In Vitro. **J Immunol Res** 2017:4828936.

