

**Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Relevanz des autophagosomalen Kompartiments für die
Morphogenese des Hepatitis-B-Virus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Melanie Janet Hassemer, geb. Ester
Tierärztin
aus Hattingen

Berlin 2017
Journal-Nr.: 3995

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Ralf Einspanier
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Eberhard Hildt
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Benedikt Kaufer

Deskriptoren mice, animal models, liver cells, hepatitis b virus, autophagy (MeSH), golgi apparatus, DNA, RNA, SDS-PAGE, ELISA, polymerase chain reaction, scanning electron microscopy

Tag der Promotion: 23.11.2017

Meinen Lieben

Man merkt nie,
was schon getan wurde,
man sieht immer nur,
was noch zu tun bleibt.

Marie Curie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Pathogenese	2
1.1.3	Klinik	3
1.1.4	Diagnose	4
1.1.5	Therapie	6
1.1.6	Prävention	7
1.2	Hepatitis-B-Virus	8
1.2.1	Geschichtlicher Hintergrund	8
1.2.2	Klassifizierung	9
1.2.3	Morphologie	11
1.2.4	Genomstruktur	13
1.2.5	Oberflächenproteine	14
1.2.5.1	SHBs	15
1.2.5.2	MHBs	15
1.2.5.3	LHBs	15
1.2.6	Lebenszyklus	16
1.3	Intrazellulärer Vesikeltransport	18
1.4	ESCRT-System	19
1.4.1	ESCRT und HBV	20
1.5	ERGIC	21
1.5.1	ERGIC und HBV	22
1.6	Autophagie	22
1.6.1	LC3	24
1.6.2	p62	25
1.6.3	Autophagie und HBV	26
2	Ziel der Arbeit	28
3	Material	29
3.1	Zellen, Tiere, Gewebeprobe	29
3.1.1	Prokaryotische Zellen	29

3.1.2	Eukaryotische Zellen	29
3.1.3	Mäuse	29
3.2	Plasmide	30
3.3	Oligonukleotide	30
3.4	Antikörper	30
3.5	Größenstandards	32
3.6	Enzyme	32
3.7	Reagenzien für die Zellkultur	32
3.8	Inhibitoren	33
3.9	Chemikalien	33
3.10	Kits	34
3.11	Geräte	34
3.11.1	Elektrophorese	34
3.11.2	Mikroskopie	35
3.11.3	Bildgebung	35
3.11.4	<i>Real-Time</i> -PCR	35
3.11.5	Zentrifugen	35
3.11.6	Sonstiges	35
3.12	Verbrauchsmaterialien	36
3.13	Puffer, Lösungen und Medien	37
3.14	Software	39
4	Methoden	40
4.1	Zellbiologie	40
4.1.1	Prokaryotische Zellkultur	40
4.1.2	Eukaryotische Zellkultur	40
4.1.2.1	Kultivieren und Passagieren	40
4.1.2.2	Zellzählung	40
4.1.3	Transfektion von HuH7.5-Zellen	41
4.1.4	Autophagieinhibition	41
4.1.5	MTT-Test	42
4.1.6	Ernte und Lyse eukaryotischer Zellen	42
4.1.6.1	Proteinlysate für Western-Blot-Analysen	42
4.2	Molekularbiologische Methoden	43
4.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	43
4.2.2	Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen	43
4.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA	43
4.2.4	RNA-Isolierung	44
4.2.5	cDNA-Synthese	45
4.2.6	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR	45

4.2.7	Northern Blot	46
4.3	Proteinbiochemische Methoden	47
4.3.1	Proteinquantifizierung mittels Bradford-Assay	47
4.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
4.3.3	Western-Blot-Analyse	48
4.4	Immunologische Methoden	49
4.4.1	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay</i> (ELISA)	49
4.4.2	Indirekte Immunfluoreszenz	50
4.5	Mikroskopie	50
4.5.1	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	50
4.6	Charakterisierung HBV-transgener Mäuse	51
4.6.1	Identifizierung HBV-transgener Mäuse	51
4.6.2	Entnahme der Leber	51
4.6.3	Präparation von Leberlysaten	51
4.6.4	Histologie	51
4.6.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	52
4.6.4.2	Indirekte Immunfluoreszenz an Leberpräparaten	52
4.7	Statistik	52
5	Ergebnisse	53
5.1	Beurteilung des zytotoxischen Potenzials von NH ₄ Cl und BFLA-1	53
5.2	Unveränderte Mengen HBsAg nach Inhibition der Autophagie	54
5.3	Deutliche Steigerung der HBeAg-Mengen nach Behandlung mit BFLA-1	56
5.4	Verminderte Sekretion von HBV-Genomen nach Inhibition der Autophagie	57
5.5	Zunahme der intrazellulären LHBS-Mengen nach Autophagieinhibition	58
5.6	Keine Erhöhung der intrazellulären HBV-Transkripte	63
5.7	Veränderte Mengen an viralen Transkripten nach Autophagieinhibition	64
5.8	Veränderte LHBSAg-Verteilung in Autophagie-inhibierten stabil HBV-positiven Zellen	66
5.9	Western-Blot-Analysen mit Mäuseleberlysaten	69
5.10	Unveränderte Morphologie in HBV-transgenem Lebergewebe	69
5.11	Gesteigerte Expression von p62 und LC3 in HBV-transgenen Mäuselebern	70
6	Diskussion	73
7	Zusammenfassung	84
8	Summary	85
9	Abkürzungsverzeichnis	86
10	Literaturverzeichnis	89

11 Danksagung	106
12 Selbstständigkeitserklärung	107

1 Einleitung

Der Begriff der Hepatitis umfasst im Allgemeinen entzündliche Veränderungen der Leber. Die Ursachen dieser Entzündung sind infektiöser, toxischer, mechanischer, stoffwechselbedingter sowie immunologischer Natur. Mit hunderten Millionen Infizierten nehmen viral bedingte Hepatitiden hierbei die bedeutendste Rolle ein [Falke and Gerken, 2005, Robert Koch-Institut, 2014]. Klassische Vertreter sind die fünf wichtigsten Hepatitisviren A, B, C, D und E [Lazarus et al., 2013]. Eine elementare Gemeinsamkeit dieser Viren ist ihr hepatischer Tropismus, weitere Organsysteme können lediglich sekundär geschädigt werden [Falke and Gerken, 2005]. Die fünf Hepatitisviren rufen Krankheitsbilder hervor, die sich in Epidemiologie, Krankheitsverlauf, möglicher Prävention und Therapie signifikant unterscheiden. Hepatitis-A- und -E-Viren werden auf fäkal-oralem Weg übertragen, entsprechende Infektionen verlaufen in der Regel selbstlimitierend [World Health Organization, 2012, Zeuzem, 2001]. Im Gegensatz dazu stehen Infektionen mit parenteral übertragbaren Hepatitis-B-, -C- und -D-Viren. Neben einer akuten Verlaufsform können diese Viren durch intrazelluläre Persistenz eine chronische Virushepatitis hervorrufen, zu deren möglichen Spätfolgen die Leberzirrhose und das hepatozelluläre Karzinom (*Hepatocellular Carcinoma*, HCC) zählen [Wölk, 2012].

1.1 Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus

1.1.1 Epidemiologie

Nach Angaben der *World Health Organization* (WHO) haben weltweit mehr als zwei Milliarden Menschen eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) durchgemacht, hiervon sind 240 Millionen chronisch infiziert. [Robert Koch-Institut, 2014, Gerlich, 2015, Goldstein and Fiore, 2001, Ma et al., 2014]. Pro Jahr sterben etwa 600.000–800.000 Menschen an den Folgen einer HBV-Infektion [Goldstein et al., 2005]. Eine horizontale Übertragung erfolgt perkutan oder mukosal über infizierte Körperflüssigkeiten wie Blut, Sexualekrete, Speichel oder Muttermilch [Abdel-Hady and Kelly, 2013, Ma et al., 2014]. Vertikal kann es prä-, peri- und postnatal zur Infektion kommen. Die vorherrschende Übertragungsrouten steht in engem Zusammenhang mit dem Anteil der chronisch Erkrankten in der Bevölkerung, abhängig von der geografischen Lokalisation. Die höchste Prävalenz des HBV-Oberflächenproteins (Hepatitis-B-Virus-*surface*-Antigen, HBsAg) – als Marker einer chronischen Infektion – beträgt $\geq 8\%$ und ist beispielsweise in Subsahara-Afrika und Ostasien lokalisiert. In den betroffenen Gebieten sind 70–98 % der Bewohner serologisch nachweisbar mit HBV in Kontakt getreten. Das Virus wird hier größtenteils während der Geburt oder in früher Kindheit übertragen [World Health

Organization, 2014, 2009, Kew, 2010, Abdel-Hady and Kelly, 2013]. Mittlere Prävalenzen mit 2–5 % chronisch Infizierten werden für Regionen wie den Mittleren Osten angegeben. In niedrig endemischen Gebieten wie Westeuropa und Nordamerika sind Prävalenzen von weniger als 2 % zu finden [World Health Organization, 2014, Kew, 2010]. Hier überwiegen horizontale Übertragungen auf sexuellem Wege oder über Injektionen mit kontaminierten Nadeln bzw. Spritzen [World Health Organization, 2014, 2009, Abdel-Hady and Kelly, 2013, Kew, 2010]. Einen Überblick über die globale Verteilung des HBsAg gibt die Abbildung 1.1.

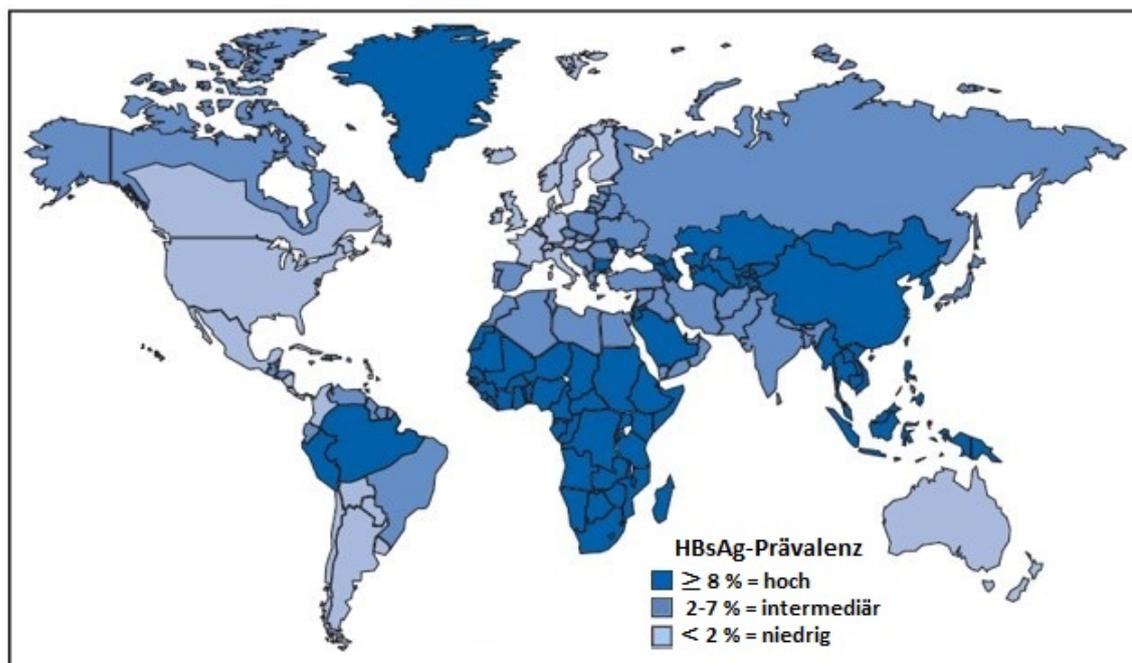


Abb. 1.1: Weltweite geografische Verteilung der chronischen HBV-Infektion anhand der HBsAg-Prävalenz im Serum Infizierter: Während in hoch endemischen Gebieten mindestens 8 % der Bevölkerung chronisch mit HBV infiziert sind, findet man in Regionen mit mittlerer Prävalenz in 2–7 % der Bewohner entsprechende Antigene. Niedrig endemische Gebiete besitzen eine Prävalenz von weniger als 2 %. Abbildung modifiziert nach [Weinbaum et al., 2008].

1.1.2 Pathogenese

Die inflammatorischen Effekte der Hepatitis-B-Infektion beruhen weitestgehend auf einer fehlgeleiteten Reaktion des Immunsystems, dem Virus selbst werden keine direkten zytopathischen Eigenschaften zugesprochen [Busch and Thimme, 2015]. Erst die Zerstörung infizierter, mit viralen Antigenen auf der Zelloberfläche markierter, Hepatozyten durch das zelluläre adaptive Immunsystem bedingt die entsprechende Klinik [Chisari and Ferrari, 1995]. Das Ausmaß der Pathogenität steht in engem Zusammenhang mit dem vorliegenden Genotyp, die Genotypen C, D und F sind stärker pathogen [Gerlich, 2013].

Das Virus entzieht sich in der frühen Infektionsphase dem angeborenen Immunsystem und repliziert unbemerkt. Eine zu schwach ausgeprägte Typ-I-Interferon-Antwort oder auch erhöhte Mengen an immunsuppressiv wirkendem Interleukin-10 werden als Ursache diskutiert [Busch and Thimme, 2015,

Dandri and Locarnini, 2012]. Im akuten Verlauf erkennt das Immunsystem nach mehreren Wochen bis Monaten das eingedrungene Virus [Gerlich, 2013]. Eine ausgeprägte zelluläre Immunantwort mit starker antiviraler Antwort der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, einer T-Helfer-Zell-Typ 1-basierten Zytokinproduktion sowie einer gegen das HBsAg gerichteten Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten wird initiiert. Bei ausreichender Koordination der zellulären und humoralen Immunantwort kann das Virus eliminiert werden [Koh et al., 2015]. Da mit dem Unterbrechen der viralen Replikation auch die meisten der infizierten Hepatozyten zerstört werden, ergibt sich die klinische Symptomatik einer akuten Hepatitis [Meisel et al., 2009]. In der späten Phase einer akuten Infektion kommt es zum Auftreten neutralisierender Antikörper, welche in der Regel einen Schutz vor Neuinfektion bieten.

Bei chronischen Verläufen vergehen Jahre bis Jahrzehnte, bis eine effektive Immunantwort eingeleitet wird [Gerlich, 2013]. Die adaptive Immunantwort ist deutlich geschwächt und befindet sich in einem Stadium relativen Kollapses [Koh et al., 2015]. Die T-Zellantwort erfolgt deutlich abgeschwächt und kann keine effektive Replikationshemmung des Virus bewirken [Timm and Walker, 2015, Lammert et al., 2000]. Mit dem Aufkommen einer Immunreaktion ergibt sich für *escape*-Mutanten ein Selektionsvorteil, da sie vom Immunsystem nicht erkannt werden. Diese Mutanten weisen häufig eine verstärkte HBcAg-Expression und DNA-Replikation auf. Im Falle einer ausreichend starken Immunreaktion wird die Replikation viraler DNA weitgehend unterdrückt. Kommt es hingegen zu zytotoxischen Immunreaktionen ohne Eindämmung der ausgeprägten viralen DNA-Replikation, erfolgt durch den fortwährenden Entzündungsreiz eine zunehmende Fibrosierung und Zirrhoseausbildung [Gerlich, 2013]. Auch wenn das Virus kein direkt transformierendes Onkogen besitzt, kann es durch chromosomale Insertion der HBV-DNA, andauernden Entzündungsreiz sowie fortschreitende Fibrose und Zirrhose zur Entwicklung eines HCC kommen [Kwak and Kim, 2014].

Im Falle einer okkulten HBV-Infektion kommt es nach akutem oder chronischem Geschehen zu einer unvollständigen Viruseliminierung, ein Teil der Genome persistiert intrahepatisch. Die Persistenz wird möglicherweise durch Mutationen in der X- oder S-Region des HBV-Genoms vermittelt. Aufgrund einer starken Immunreaktion des Wirts kommt es weitestgehend zur Unterdrückung der HBV-Replikation [Kwak and Kim, 2014] und einem vorübergehenden Ausbleiben der Pathogenität. Jedoch kann es bei Immunsuppression zu einer Reaktivierung des Virus mit Ausprägung einer schwerwiegenden akuten oder chronischen Hepatitis kommen [Gerlich, 2013].

1.1.3 Klinik

Eine HBV-Infektion kann verschiedene Verlaufsformen annehmen, entscheidend sind Alter und Immunlage zum Zeitpunkt der Infektion. Je früher eine Infektion erfolgt, desto größer ist das Risiko eines chronischen Verlaufs. So erkranken ca. 90 % der infizierten Kinder chronisch an HBV [Kew, 2010, Robert Koch-Institut, 2014], während Infektionen im Erwachsenenalter zu etwa 65 % subklinisch, 25 % akut und 10 % chronisch verlaufen. Bei immunsupprimierten Adulten steigt der Anteil der chronischen Verläufe auf 30–90 % an [Jochum and Gerken, 2011, Cornberg et al., 2011].

Die akute Infektion verläuft – nach einer Inkubationszeit von ca. 75 Tagen – zumeist asymptomatisch trotz hoher Virustiter von bis zu 10^{10} Virionen/ml Serum und einer Infektionsrate von 75–100 % aller

Hepatozyten [Lammert et al., 2000, Busch and Thimme, 2015]. Bei 35 % aller Infizierten kommt es zu einer deutlichen Ausprägung der akuten Hepatitis [Winckler, 2011, Jochum and Gerken, 2011]. An die Inkubationszeit schließt sich eine mehrtägige Prodromalphase an, welche sich in einem allgemeinen Krankheitsgefühl und Appetitlosigkeit äußert. In der nachfolgenden, drei bis sechs Wochen währenden, ikterischen Phase leiden die Erkrankten unter Gelbsucht, extremer Müdigkeit, Übelkeit, Erbrechen und abdominalem Schmerz [Jochum and Gerken, 2011, Busch and Thimme, 2015]. In 1 % aller Fälle entwickelt sich eine durch massive Leberzellnekrosen gekennzeichnete fulminante Hepatitis, welche in einem Leberversagen münden kann [Lammert et al., 2000, Jochum and Gerken, 2011]. Das vollständige Ausheilen einer akuten Hepatitis in der Rekonvaleszenzphase wird in 90 % der Fälle verzeichnet [World Health Organization, 2014]. Bleibt die Infektion auch nach sechs Monaten bestehen, liegt ein chronisches Geschehen vor [World Health Organization, 2014].

Bei chronischer Ausprägung im Kindesalter kommt es vermehrt zu asymptomatischen Verläufen bei normalem Wachstum und physiologischer körperlicher Entwicklung [Abdel-Hady and Kelly, 2013]. Entsprechend Infizierte werden als *healthy carrier* bezeichnet. Durch das weitgehende Fehlen einer Immunantwort zeigen sie keine Anzeichen einer Leberzellschädigung, wenngleich dauerhaft die Fähigkeit zur HBV-Replikation besteht. Es kann jederzeit spontan, insbesondere jedoch unter Immunsuppression, zur Entwicklung einer klinisch sichtbaren Hepatitis kommen [Cornberg et al., 2011]. Unabhängig von möglichen klinischen Symptomen tragen die betroffenen Personen ein dauerhaft erhöhtes HCC-Risiko. Zu den Symptomen einer klinisch ausgeprägten, chronischen HBV-Erkrankung zählen allgemeines Unwohlsein, Oberbauchdruck, Gliederschmerzen, Müdigkeit und kognitive Störungen [Lammert et al., 2000, Jochum and Gerken, 2011]. Wesentlich dramatischer sind die Folgen von Zirrhose und HCC, welche sich dem chronischen Verlauf anschließen können. Zunächst reversibel, kommt es zu regenerativen und fibrotischen Prozessen, einem vermehrten Ersatz nekrotischen Leberparenchyms durch Bindegewebe [Cornberg et al., 2011, Hammerstingl et al., 2001, Bläker et al., 2001]. Als Endstadium des fibrotischen Umbaus entwickelt sich in 20 % aller chronisch Infizierten das irreversible Bild einer Leberzirrhose mit Verlust der physiologischen Leberstruktur bei stark eingeschränkter Leberfunktion [Bläker et al., 2001, Busch and Thimme, 2015]. Chronische HBV-Patienten mit einer Leberzirrhose weisen im Vergleich zu Gesunden ein 100-fach erhöhtes Risiko auf, ein HCC auszubilden [Busch and Thimme, 2015].

1.1.4 Diagnose

Zu Beginn einer akuten HBV-Infektion lässt sich als erster Marker die virale DNA detektieren, wenige Wochen später schließen sich HBs- und HBeAg an. Die Höhe des HBeAg korreliert für gewöhnlich positiv mit Virusreplikation und Infektiösität des Patienten [Guo et al., 2013]. Dieses Antigen ist der erste virologische Marker, welcher nach wenigen Wochen wieder unter die Nachweisgrenze fällt [Jochum and Gerken, 2011]. HBV-DNA und HBsAg zeigen eine Persistenz während der klinischen Phase und sind bis zur Genesung nachweisbar [Jochum and Gerken, 2011]. Eine Sonderstellung nehmen sogenannte okkulte Infektionen ein, die durch Abwesenheit des HBsAg und geringst-positive, zum Teil nicht detektierbare, HBV-DNA-Mengen charakterisiert sind [Dény and Zoulim, 2010]. Chronische

Infektionen unterscheiden sich von akuten Prozessen durch niedrigere Mengen an viraler DNA und HBsAg, da eine partielle Immunabwehr zum Tragen kommt und die Virussyntese reduziert ist. Ist die Immunabwehr deutlich stärker ausgeprägt, so kann sich der *healthy carrier*-Status entwickeln. Dieser ist gekennzeichnet durch einen positiven HBsAg-Nachweis bei messbaren Antikörpern gegenüber HBc- und HBeAg. Die virale DNA ist in der Regel nachweisbar, zum Teil fällt sie im Laufe der Zeit unter die Nachweisgrenze [Gerlich, 2013, WHO].

Der erste – noch vor der klinischen Symptomatik – messbare Antikörper ist das Anti-HBc, ein gegen das Core-Protein gerichteter Antikörper, welcher einen generellen HBV-Kontakt anzeigt. Seine Bestimmung lässt keine Unterscheidung zwischen akuter, chronischer, okkult oder überstandener Infektion zu [Gerlich, 2013]. Eine gewisse Aussagekraft bezüglich des Infektionsstatus birgt die Methode, seine Immunglobulinklasse zu bestimmen. Zunächst herrscht der HBc-Antikörper des IgM-Typs vor (Anti-HBc-IgM), er wird in der Regel nach einigen Wochen bis Monaten von Antikörpern des IgG-Typs (Anti-HBc-IgG) abgelöst [Jilg, 2000]. Mit dem Verschwinden des HBeAg tritt der Antikörper Anti-HBe in Erscheinung. Diese Entwicklung stellt ein prognostisch günstiges Zeichen dar, da meist eine gering ausgeprägte bis ausbleibende Virämie zugrunde liegt [Liaw, 2009]. Bei dem Vorliegen gewisser Prä-Core-Mutanten ist diese Regel außer Kraft gesetzt und es kommt trotz messbarer HBe-Antikörper zu einer starken Virusreplikation [Jochum and Gerken, 2011, Jilg, 2000]. Gegen das HBsAg gerichtete Antikörper erscheinen normalerweise mit dem Ausheilen einer Hepatitis-B-Erkrankung bei Erregerelimination und lösen das HBsAg ab. Dieser Antikörpertiter wird bestimmt, um die Immunlage eines Patienten nach HBV-Infektion oder eines gesunden Individuums nach Vakzinierung zu ermitteln [Jilg, 2000].

Die Bestimmung diverser Leberenzyme wie der Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) ermöglicht bereits wenige Wochen nach Infektion eine Beurteilung der entzündlichen Aktivität der Leber [Liang, 2009, Dény and Zoulim, 2010]. Eine intensivere Bestimmung ebendieser Aktivität erfolgt bei chronisch Infizierten durch eine Leberbiopsie (*Grading*). Gleichzeitig kann das Ausmaß des fibrotischen und zirrhotischen Umbaus bestimmt werden (*Staging*) [Jochum and Gerken, 2011, Dény and Zoulim, 2010]. Die nachfolgende Tabelle 1.1 und Abbildung 1.2 fassen die wichtigsten Parameter der HBV-Diagnostik zusammen.

Tab. 1.1: Diagnostische Markerkonstellationen einer HBV-Infektion: Betrachtet werden virologische und immunologische Parameter in Abhängigkeit vom Infektionsstatus. Zur Bestimmung der Leberentzündung wird die Aktivität des Enzyms Alanin-Aminotransferase (ALT) bestimmt. Die Abbildung wurde modifiziert nach [Jochum and Gerken, 2011, Dény and Zoulim, 2010].

HBV	HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc	Anti-HBc IgM	HBeAg	Anti-HBe	HBV-DNA	ALT
akut	+	-	+	+	+	-	+	↑↑↑
ausgeheilt	-	+	+	-	-	+	-	normal
chronisch	+	-	+	- (+)	+	-	+	normal/↑
<i>healthy carrier</i>	+	-	+	-	-	+	- (+)	normal/(↑)
HBeAg-negativ	+	-	+	- (+)	-	- (+)	+	↑ (↑)
okkult	-	+	+	-?	-?	-?	(+)	normal?
geimpft	-	+	-	-	-	-	-	normal

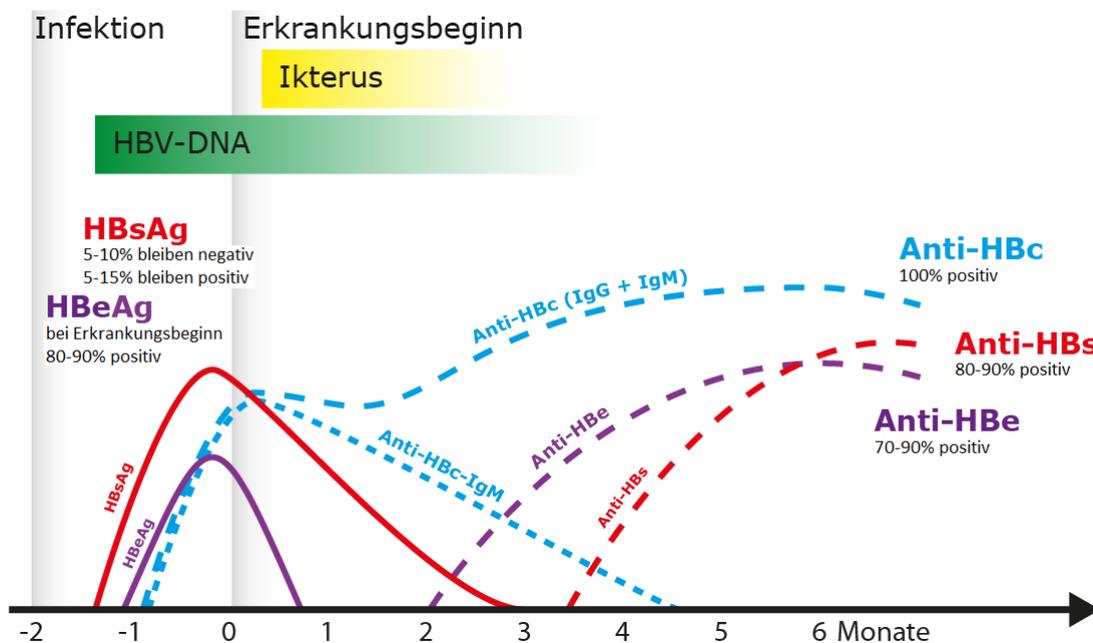


Abb. 1.2: Zeitliches Auftreten serologischer Marker der akuten HBV-Infektion: Zu erkennen sind verschiedene virologische sowie immunologische Marker, welche in charakteristischer Reihenfolge im Serum auftreten und Auskunft über Infektionsstatus und Immunlage des Infizierten geben, modifiziert nach [Tugendheim, 2014].

1.1.5 Therapie

Akute Erkrankungen werden lediglich bei schwerem oder fulminantem Verlauf medikamentös behandelt [Lammert et al., 2000]. Beim Vorliegen einer chronischen Infektion erfolgt die Wahl des geeigneten Therapeutikums in Abhängigkeit von der Höhe der viralen Replikation sowie des jeweiligen Fibrose-, Zirrhose- und Entzündungsstatus [Cornberg and Manns, 2011, Deutsche Leberstiftung, 2011].

Eingesetzt werden rekombinante α -Interferone, welche als Zytokine antivirale und zytotoxische Wirkungen entfalten. Sie hemmen indirekt die Synthese viraler Proteine, degradieren die virale RNA und potenzieren die zelluläre Immunantwort [Lammert et al., 2000]. Pegylierte Interferone sind den konventionellen Interferonen aufgrund der reduzierten Applikationshäufigkeit bei vergleichbaren Ansprechraten vorzuziehen. Faktoren wie niedriger Virämietiter, erhöhte Transaminasewerte, weibliches Geschlecht, junges Alter sowie das Vorliegen bestimmter Genotypen (Genotyp A und B) steigern die Chancen auf einen Therapieerfolg [Cornberg et al., 2011, Gerlich, 2013]. Kontraindikationen für den Interferoneinsatz sind das Vorliegen von Schwangerschaft oder Stillzeit sowie fortgeschrittener oder dekompensierter Leberzirrhose.

Nukleosid- bzw. Nukleotidanaloga vermindern durch Hemmung der HBV-Polymerase die virale Replikation. Ein Nachteil dieser Medikamente besteht in der meist dauerhaft nötigen Verabreichung bei unterschiedlich hohem Risiko der Resistenzausbildung. Die Substanzen lassen sich einteilen in Mittel mit niedriger (Lamivudin, Telbivudin, Adefovir) und erhöhter Resistenzbarriere (Entecavir oder Tenofovir). Der Erfolg einer Behandlung wird unabhängig vom Genotyp verzeichnet, positiv auf die Ansprechrate wirken sich erhöhte Transaminasewerte, niedrige Ausgangsviruslast sowie junges

Alter des Patienten aus. Selbst bei erfolgreichem Ansprechen auf die Behandlung muss die Medikamentenverabreichung häufig dauerhaft erfolgen [Cornberg et al., 2011].

Unter Einsatz der gängigen Therapeutika wird selten ein dauerhafter HBsAg-Verlust oder eine anhaltende HBeAg-Serokonversion verzeichnet, da die Medikamente keine Elimination der cccDNA bewirken. Die häufig lebenslang notwendige Therapie geht mit einem fortbestehenden Risiko der Resistenzausbildung einher. Es besteht daher der Bedarf an neuartigen Behandlungsmethoden, die in einer vollständigen Ausheilung resultieren [Barnes, 2015]. Eine Übersicht über die gängigen Medikamente, welche in der Therapie chronischer HBV-Infektionen Verwendung finden, ist in Tabelle 1.2 aufgeführt.

Tab. 1.2: Therapiemöglichkeiten der chronischen HBV-Erkrankung: Für die Behandlung der chronischen HBV-Infektion zugelassene Medikamente und ihre Dosierung, modifiziert nach [Cornberg et al., 2011].

Substanz	Dosierung
α-Interferone	
Pegyliertes Interferon α -2a (Pegasys [®])	180 μ g 1x/Woche für 48 Wochen
Interferon α -2a (Roferon [®])	2,5–5 Mio. IU pro m ² Körperoberfl. 3x/Woche für 4–6 Monate
Interferon α -2b (Intron A [®])	5–10 Mio. IU 3x/Woche für 4–6 Monate
Nukleosid-Analoga	
Lamivudin (Zeffix [®])	100 mg 1x/Tag
Entecavir (Baraclude [®])	0,5 mg 1x/Tag
Telbivudin (Sebivo [®])	600 mg 1x/Tag
Nukleotid-Analoga	
Adefovir dipivoxil (Hepsera [®])	10 mg 1x/Tag
Tenofovir dipivoxil (Viread [®])	245 mg 1x/Tag

1.1.6 Prävention

Eine globale, möglichst flächendeckende Immunisierung gilt laut WHO als effektivste aller präventiven Maßnahmen [World Health Organization, 2012, 2014]. Erste Versuche, einen Impfstoff gegen das HBV zu finden, werden auf das Jahr 1971 datiert, als das Serum infizierter HBV-Patienten nach Verdünnung und Erhitzung Versuchspersonen injiziert wurde. Die Schutzwirkung basierte auf der Bildung von Antikörpern gegen das im Serum enthaltene Oberflächenprotein HBsAg [Gerlich, 2013]. Die Impfstoffe aus jener Zeit werden als solche der ersten Generation, sogenannte Plasmaimpfstoffe, bezeichnet. Um die Sicherheit der Impfstoffe zu erhöhen, wurden seit den 1980er Jahren mithilfe gentechnischer Methoden rekombinante Impfstoffe der zweiten Generation hergestellt, welche zurzeit weltweit zum Einsatz kommen [Shouval et al., 2015, Leroux-Roels, 2015]. Im Einzelnen wird das für das SHBs kodierende Gen mit entsprechenden Steuerelementen in das Plasmid einer Hefezelle eingefügt, wo es zur Bildung von HBsAg in Form sphärischer Partikel kommt. Als Adjuvans werden Aluminiumhydroxid oder -phosphat zugesetzt. Eine Impfung führt zur Bildung von Antikörpern gegen SHBs und verhindert bei Kontakt mit Viruspartikeln eine Infektion durch Neutralisierung. Der Impfstoff schützt vor allen acht existierenden Genotypen [Jilg, 2011, World Health Organization,

2009]. Das klassische Impfschema beruht auf der Verabreichung von drei bis vier Impfdosen bei einem Beginn der Grundimmunisierung innerhalb der ersten 24 h nach der Geburt [World Health Organization, 2009, Williams et al., 2003]. Mehr als 95 % der Säuglinge und Kinder sowie mehr als 90 % der Erwachsenen reagieren mit der Bildung schützender Antikörpertiter [Leroux-Roels, 2015]. Bei gesunden, immunkompetenten Erwachsenen mit vollständiger Grundimmunisierung besteht der Impfschutz für mindestens 15 bis 20 Jahre [Poorolajal et al., 2010, Williams et al., 2003, European Consensus Group on Hepatitis B Immunity, 2000]. *Booster*-Impfungen werden nicht grundsätzlich empfohlen, da selbst bei reduzierten bzw. nicht-detektierbaren Antikörpertitern auch Jahre nach erfolgter Grundimmunisierung ein ausreichender Schutz beobachtet werden kann [World Health Organization, 2009, 2010, FitzSimons et al., 2005, Banatvala and Damme, 2003]. Es ist mittlerweile zur Entwicklung von Impfstoffen der dritten Generation gekommen. Diese werden in Säugetierzellen produziert und enthalten ein bis zwei zusätzliche Oberflächenproteine (MHBs und/oder LHBs). Die neuartigen Impfstoffe sind stärker immunogen und zeigen eine schneller eintretende und höher ausfallende Schutzwirkung mit erhöhten Antikörpertitern im Vergleich zu Impfstoffen der zweiten Generation. Aufgrund hoher Produktionskosten werden diese Mittel bisher nicht standardmäßig, jedoch in speziellen Risikogruppen wie Patienten mit Nierenversagen oder Organtransplantaten, eingesetzt [Shouval et al., 2015, Gerlich, 2015].

1.2 Hepatitis-B-Virus

1.2.1 Geschichtlicher Hintergrund

Auch wenn es bereits in der Antike zu seuchenartigem Auftreten von Gelbsucht kam, wurde der infektiöse Charakter der Erkrankung erst im Jahr 1885 von Lürmann aufgedeckt [Schaefer et al., 2008]. Im Rahmen einer Pocken-Vakzinierung mittels humaner Lymphe erkrankten in Bremen viele der Geimpften an einer Ikterusepidemie – vermutlich zurückzuführen auf eine HBV-Kontamination des Impfstoffs. In den 30er und 40er Jahren des 20. Jahrhunderts mehrten sich Hinweise auf eine Übertragung der ansteckenden Gelbsucht durch humanes Serum im Rahmen von Vakzinierungen und Transfusionen [MacCallum and Bauer, 1944]. Im Jahr 1963 entdeckte Blumberg im Serum eines australischen Ureinwohners ein Antigen, welches vermehrt in vielfach transfundierten Patienten zu finden war. Dieses Antigen wurde folglich als Australien-Antigen (Au-Ag) bezeichnet. Antikörper gegen das Au-Ag wurden gesteigert in vielfach transfundierten Hämophiliepatienten gemessen. 1966 stellte Blumberg die Hypothese auf, dass das Au-Ag in Verbindung mit einer viralen Hepatitis steht und per Transfusion übertragen werden kann. Diese Entdeckung wurde in anderen Forschungsarbeiten bestätigt [Blumberg, 1976]. Es entstand der Konsens, das Au-Ag als Marker akuter und chronischer HBV-Erkrankungen heranzuziehen [Gerlich, 2013]. In Elektronenmikroskopie-Analysen von Blutproben Au-Ag-positiver Hepatitis-Patienten entdeckte David S. Dane 1970 eine 42 nm große Struktur, welche aufgrund ihrer komplexen Struktur mit äußerer Hülle und innerem Nukleokapsid für das komplette Virus gehalten wurde. Die mengenmäßig überwiegenden 22 nm Durchmesser großen sphärischen sowie länglichen Partikel wurden als nicht-infektiöse Nebenprodukte bezeichnet [Dane et al., 1970].

Bereits 1971 mehrten sich Hinweise, dass das Virion, der sogenannte Dane-Partikel, durch die 42 nm große Struktur dargestellt wird und von einer äußeren Hülle aus Au-Ag umgeben ist. Es wurden Antikörper gegen das innenliegende Nukleokapsid detektiert, welche eine überstandene Infektion überdauerten [Almeida et al., 1971]. Die Antikörper gegen das Nukleokapsid (*nucleocapsid*, NC) wurden als Anti-HBc bezeichnet und das Au-Ag wurde als Oberflächenprotein identifiziert und in HBsAg umbenannt [Gerlich, 2013]. Im Jahr 1973 schließlich gelang W. Robinson der Nachweis der viralen Polymerase im NC. Nur ein Jahr später konnte derselbe Forscher die HBV-DNA als kleine, zirkuläre Struktur im Kapsidinneren ausmachen [Robinson et al., 1974, Robinson and Greenman, 1974]. Die ersten Klonierungen und Sequenzierungen des HBV gelangen 1978, im Jahr 1982 wurde das erste erfolgreiche Tierexperiment durchgeführt [Gerlich, 2013].

1.2.2 Klassifizierung

HBV wird zu der Familie der *Hepadnaviridae* (Hepatitis-DNA-Viren) gezählt [Modrow et al., 2010]. Vertreter dieser Virusfamilie weisen neben einer äußeren Virushülle ein ikosaedrisches Nukleokapsid und eine partiell doppelsträngige DNA auf. Sie können persistierende Infektionen hervorrufen und sind durch eine hohe Speziespezifität und Lebertropismus gekennzeichnet. Eine Aufteilung der Hepadnaviren wird in zwei Gattungen, Orthohepadnaviren und Avihepadnaviren, vorgenommen. Avihepadnaviren infizieren ausschließlich Vögel. Geläufige Vertreter sind das *Duck* Hepatitis-B-Virus (DHBV) und das *Heron* Hepatitis-B-Virus (HHBV) [de Carvalho Dominguez Souza, Breno Frederico et al., 2014]. Eine ausführliche Auflistung der verschiedenen Avihepadnaviren und ihrer Wirte findet sich in der nachfolgenden Tabelle 1.3.

Tab. 1.3: **Avihepadnaviren und ihre Wirte**, nach [Schaefer, 2007].

Avihepadnaviren	
Virus	Wirt
<i>Duck</i> -Hepatitis-B-Virus (DHBV)	Pekingente <i>Anas domestica</i>
<i>Grey Teal</i> -Hepatitis-B-Virus (GTHBV)	Weißkehlente <i>Anas gibberfrons gracilis</i>
<i>Heron</i> -Hepatitis-B-Virus (HHBV)	Graureiher <i>Adrea cinerea</i>
<i>Maned Duck</i> -Hepatitis-B-Virus (MDHBV)	Mähngans <i>Chenonetta jubata</i>
<i>Ross Goose</i> -Hepatitis-B-Virus (RGHBV)	Zwergschneegans <i>Anser rossii</i>
<i>Snow Goose</i> -Hepatitis-B-Virus (SGHBV)	Schneegans <i>Anser caerulescens</i>
<i>Stork</i> -Hepatitis-B-Virus (STHBV)	Weißstorch <i>Ciconia ciconia</i>
<i>Crane</i> -Hepatitis-B-Virus (CHBV)	Jungfernkranich <i>Anthropoides virgo</i> Kronenkranich <i>Balearica regulorum</i>

Orthohepadnaviren verursachen akute und chronische Hepatitiden in Säugetieren. Ihre Nukleotidsequenzen zeigen Übereinstimmungen von 55–70 % [Kidd-Ljunggren et al., 2002]. Bekanntester Vertreter dieser Gattung ist das humane Hepatitis-B-Virus, welches in bestimmten Varianten auch Menschenaffen infizieren kann. Weitere Vertreter sind unter anderem das *Woodchuck*-Hepatitis-Virus (WHV), das *Ground Squirrel*-Hepatitis-Virus (GSHV) und das *Woolly Monkey*-Hepatitis-B-Virus (WMHBV) [de Carvalho Dominguez Souza, Breno Frederico et al., 2014, Gerlich, 2013, Schaefer et al., 2008]. Erst vor wenigen Jahren wurden diverse Hepatitis-B-Viren in verschiedenen Fledermausarten entdeckt [Drexler et al., 2013, He et al., 2013]. Die einzelnen Orthohepadnaviren und ihre entsprechenden Wirte sind in Tabelle 1.4 aufgelistet.

Tab. 1.4: Orthohepadnaviren und ihre Wirte, nach [Schaefer, 2007].

Orthohepadnaviren	
Virus	Wirt
Hepatitis-B-Virus (HBV)	Mensch <i>Homo sapien sapiens</i>
<i>Chimpanzee</i> -Hepatitis-B-Virus (ChHBV)	Schimpanse <i>Pan troglodytes</i>
Gibbon-Hepatitis-B-Virus (GiHBV)	Weißhandgibbon <i>Hylobates lar</i>
Orang-Utan-Hepatitis-B-Virus (OHBV)	Orang-Utan <i>Pongo pygmaeus pygmaeus</i>
Gorilla-Hepatitis-B-Virus (GoHBV)	Gorilla <i>Gorilla gorilla</i>
<i>Woolly Monkey</i> -Hepatitis-B-Virus (WMHBV)	Wollaffe <i>Lagothrix lagotricha</i>
<i>Woodchuck</i> -Hepatitis Virus (WHV)	Waldmurmeltier <i>Marmota monax</i>
<i>Ground Squirrel</i> -Hepatitis Virus (GSHV)	Erdhörnchen <i>Spermophilus beecheyi</i>
<i>Arctic Squirrel</i> -Hepatitis Virus	Arktisches Erdhörnchen <i>Spermophilus parryi kennicotti</i>
<i>Long Fingered Bat</i> -Hepatitis-B-Virus (LBHBV)	Langflügel-Fledermaus <i>Miniopterus fuliginosus</i>
<i>Tent making Bat</i> -Hepatitis-B-Virus (TBHBV)	Zeltbauende Fledermaus <i>Uroderma bilobatum</i>
<i>Horseshoe Bat</i> -Hepatitis-B-Virus (HBHBV)	Hufeisennasen-Fledermaus <i>Rhinolophus alcyone</i>
<i>Roundleaf Bat</i> -Hepatitis-B-Virus (RBHBV)	Rundblattnasen-Fledermaus <i>Hipposideros cf. ruber</i>

Aufgrund der Gemeinsamkeiten der *Hepadnaviridae* in Morphologie, Genom- und Proteinstruktur stammen viele Erkenntnisse bezüglich der viralen Transkription, Replikation, Pathogenese sowie viral induzierter Hepatokarzinogenese aus Tiermodellen des WHV und DHBV, welche sich auf das HBV übertragen lassen. Bestimmte Besonderheiten der HBV-Infektionen werden zudem an transgenen Mäusen, welche einen Teil oder das gesamte HBV-Genom exprimieren, untersucht [Wei et al., 2010]. Eine Anzüchtbarkeit des HBV in der Zellkultur ist aufgrund seiner engen Adaptation an

differenzierte Hepatozyten relativ begrenzt. Experimentell infizierbar sind primäre humane Hepatozyten (PHHs) sowie jene des nordischen Spitzhörnchens (*Tupaia belangeri*; PTHs) [Schaefer et al., 2008, Gerlich, 2013]. Darüber hinaus kann eine Infektion der humanen Hepatomzelllinie HepaRG durch Rückdifferenzierung ermöglicht werden [Gripon et al., 2002].

Anhand einer Differenz in der Nukleotidanzahl im Gesamtgenom von mehr als 8 % findet eine Unterscheidung in acht verschiedene HBV-Genotypen (A–H) statt. Innerhalb dieser Genotypen lässt sich anhand einer divergierenden totalen Nukleotidsequenz von mehr als 4 % eine weitere Unterteilung in Subgenotypen vornehmen [Kew, 2010, Gerlich, 2013, Consensus Report, 2004]. Die (Sub-)Genotypen sind mit bestimmten geografischen Regionen assoziiert, weisen eine unterschiedlich hohe Pathogenität auf und sprechen different auf die diversen Therapieformen an [Abdel-Hady and Kelly, 2013]. Die Genotypen sind in Tabelle 1.5 aufgeführt.

Tab. 1.5: Globale geografische Verteilung der HBV-Genotypen, modifiziert nach [Kew, 2010, Gerlich, 2013].

Genotypen	Geografische Verteilung
A	Nordwesteuropa, Nordamerika, Afrika
B	Asien
C	Asien
D	weltweit; v. a. mediterraner Raum
E	(West-)Afrika
F	Südamerika
G	Frankreich, USA
H	Zentralamerika

Eine weitere Unterteilung der HBV-Stämme erfolgt anhand einer serologischen Analyse des HBsAg in neun serologische Serotypen: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq-, adrq+, auch hier ergibt sich ein bestimmtes geografisches Muster [Busch and Thimme, 2015, Kidd-Ljunggren et al., 2002, Locarnini, 2004].

1.2.3 Morphologie

Die sphärischen HBV-Virionen weisen einen Durchmesser von 42 nm auf und werden als Dane-Partikel bezeichnet [Gerlich, 2013, Busch and Thimme, 2015]. Die lipidhaltige Virushülle beinhaltet die drei verschiedenen Formen des HBsAg. Namentlich sind diese das *large*, *middle* und *small hepatitis B surface antigen* (LHBs, MHBs, SHBs) [Schaefer et al., 2008]. Die Virushülle umgibt das im Durchmesser 34 nm große ikosaedrische Nukleokapsid, zusammengesetzt aus 240 Einheiten des Core-Proteins (HBc). Im Inneren des Nukleokapsids befindet sich das virale Genom, kovalent an die virale Polymerase gebunden [Schädler and Hildt, 2009]. Der Aufbau des Dane-Partikels ist in Abbildung 1.3 dargestellt.

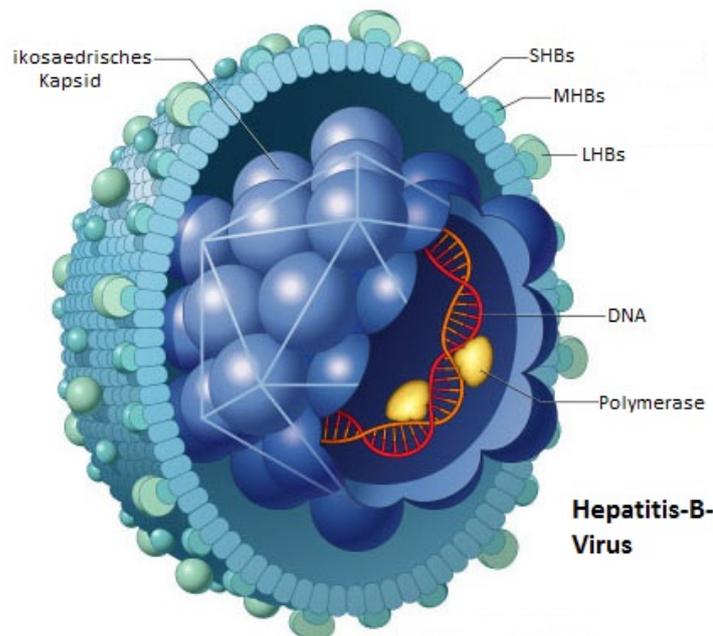


Abb. 1.3: Dreidimensionale Darstellung des Dane-Partikels: Die partiell doppelsträngige virale DNA ist von einem ikosaedrisch geformten Kapsid umgeben. Als äußere Hülle fungiert eine Lipiddoppelmembran, in welche die verschiedenen Oberflächenproteine eingefügt sind, modifiziert nach [Perkins, 2002].

Im Serum HBV-positiver Patienten sind neben Dane-Partikeln in 1.000–10.000-fachem Überschuss sogenannte subvirale Partikel (SVP) zu finden [Xie et al., 2010]. SVP sind ausschließlich aus HBsAg aufgebaut – da keine virale DNA eingebaut ist, sind diese Partikel nicht infektiös [Busch and Thimme, 2015]. Neben den sphärischen SVP mit einem Durchmesser von ca. 25 nm sind auch filamentöse SVP mit ähnlichem Durchmesser und variabler Länge detektierbar [Liang, 2009, Gerlich, 2013]. Auch wenn in der Virushülle alle drei Oberflächenproteine vertreten sind, so überwiegt mengenmäßig das SHBs. MHBs und LHBs sind in etwa in gleichen Anteilen vertreten und machen rund 30 % der Hüllproteine des Virions aus [Seeger and Mason, 2000]. Auch in den SVP überwiegt das SHBs. In den Sphären liegt zusätzlich ein geringer Anteil an MHBs und ein kaum detektierbarer LHBs-Gehalt vor. Im Gegensatz dazu weisen Filamente einen höheren LHBs-Anteil auf [Xie et al., 2010, Siegler and Bruss, 2013]. Die genaue Funktion der stark immunogen wirkenden SVP im Lebenszyklus des HBV ist noch nicht abschließend aufgeklärt [Sato et al., 2000]. Eine Theorie besagt, dass sie durch das Abfangen neutralisierender Antikörper das Immunsystem ablenken, um somit die infektiösen Viruspartikel zu schützen [Patient et al., 2009b]. Eine weitere besteht in der Annahme, dass die SVP den Infektionsprozess unterstützen und die Replikation und Genexpression verstärken [Schädler and Hildt, 2009, Bruns et al., 1998]. Der Aufbau der SVP ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

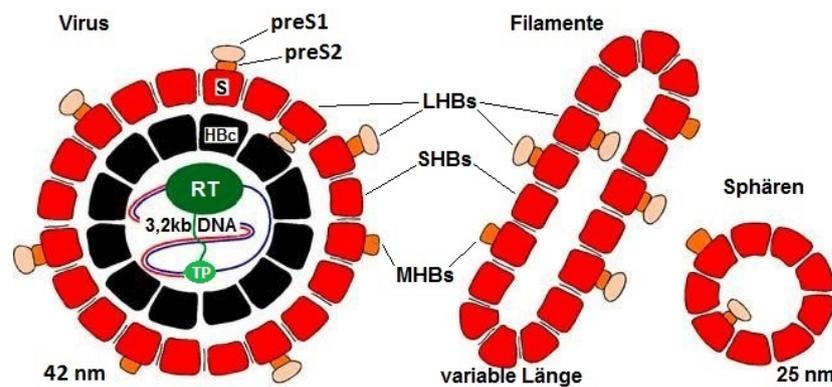


Abb. 1.4: Aufbau von Virion und SVP: Linksseitig ist ein detaillierter Aufbau des Virions zu erkennen. Die äußere Hülle ist aus SHBs, MHBs und LHBs aufgebaut. Das innenliegende Kapsid, aus HBc bestehend, umschließt die virale DNA und die kovalent gebundene virale Polymerase. Die mittlere und rechte Struktur zeigen Filamente und Sphären, welche aus HBsAg zusammengesetzt sind. Abbildung modifiziert nach [Gerlich, 2013].

1.2.4 Genomstruktur

Das 3,2 kb umfassende HBV-Genom liegt partiell doppelsträngig vor. Der kodierende Minusstrang beinhaltet die gesamte Genomsequenz, der nicht-kodierende, komplementäre Plusstrang beinhaltet 1.700 bis 2.800 Basen bei fester Position des 5'- und variablem 3'-Ende. An das 5'-Ende des Minusstrangs ist das terminale Protein (TP, auch Primase genannt) kovalent gebunden. Das 3'-Ende des Positivstrangs weist eine nicht-kovalente Bindung zur reversen Transkriptase (RT) auf. Die zirkuläre Struktur des HBV-Genoms ergibt sich durch Hybridisierung zwischen komplementären Regionen am 5'-Ende beider Stränge [Winckler, 2011, Wei et al., 2010]. Das kompakte HBV-Genom weist vier sich teilweise überlappende, offene Leserahmen (*open reading frames*, ORFs) auf, die für sieben strukturelle und nicht-strukturelle Proteine kodieren. Der S-Leserahmen kodiert, je nach Startkodon, für alle drei Formen der Oberflächenproteine, SHBs, MHBs und LHBs. Der C-Leserahmen beinhaltet zwei Startcodons und kodiert für das Core-Protein sowie das nicht-strukturelle Prä-Core-Protein [Busch and Thimme, 2015]. Aus dem Prä-Core-Protein entsteht durch Prozessierung am ER das HBeAg, welches in den Blutkreislauf sezerniert wird. Es ist weder für die Replikation, die Virusformation noch die Infektiosität essentiell und besitzt vermutlich immunmodulatorische Funktion [Liang, 2009, Bruss, 2004]. Es gibt divergierende Angaben darüber, ob das „e“ in der Bezeichnung HBeAg für *early* oder *enigmatisch* steht [Gerlich, 2013]. Der P-Leserahmen kodiert für die virale Polymerase, welche funktionell in drei Domänen (terminales Protein, reverse Transkriptase und Ribonuklease H) aufgeteilt werden kann. Das terminale Protein ist in die Enkapsidation involviert und initiiert als *Primer*-Protein die Synthese des Minusstrangs. Die DNA- und RNA-abhängige reverse Transkriptase katalysiert die Genomsynthese und die Ribonuklease H degradiert die prägenomische RNA (pgRNA) und unterstützt die Replikation [Modrow et al., 2010]. Der X-Leserahmen codiert für das regulatorische X-Protein (HBx), welches in die Aktivierung der Transkription, die DNA-Reparatur und die Hemmung der Proteindegradation involviert ist. Auch wenn die genaue Funktion des Proteins im viralen Lebenszyklus noch ungeklärt ist, so scheint es für eine erfolgreiche Infektion unerlässlich zu

sein und beeinflusst möglicherweise die HBV-assoziierte Onkogenese [Liang, 2009].

Da lediglich ein einzelnes, gemeinsames Polyadenylierungssignal für die mRNAs zur Verfügung steht, weisen die vier unterschiedlich langen Transkripte durch eigene Promotoren bedingt heterogene 5'-Startpunkte bei identischem 3'-Ende auf [Bruss, 2004]. Die Transkription der 3,5 kb mRNA kann an drei verschiedenen Initiationsstellen starten. Je nach Startpunkt dient die mRNA als Matrize für die pgRNA oder als Vorlage für HBc, virale Polymerase oder HBeAg. Die zweite mRNA-Klasse weist eine Länge von 2,4 kb auf und steht für die Bildung des Oberflächenproteins LHBs. Mengenfähig am häufigsten wird die 2,1 kb große mRNA transkribiert, welche je nach Startpunkt zur Bildung von MHBs oder SHBs führt [Modrow et al., 2010]. Die mit 0,7 kb kleinste mRNA dient der Synthese des HBx [Locarnini, 2004].

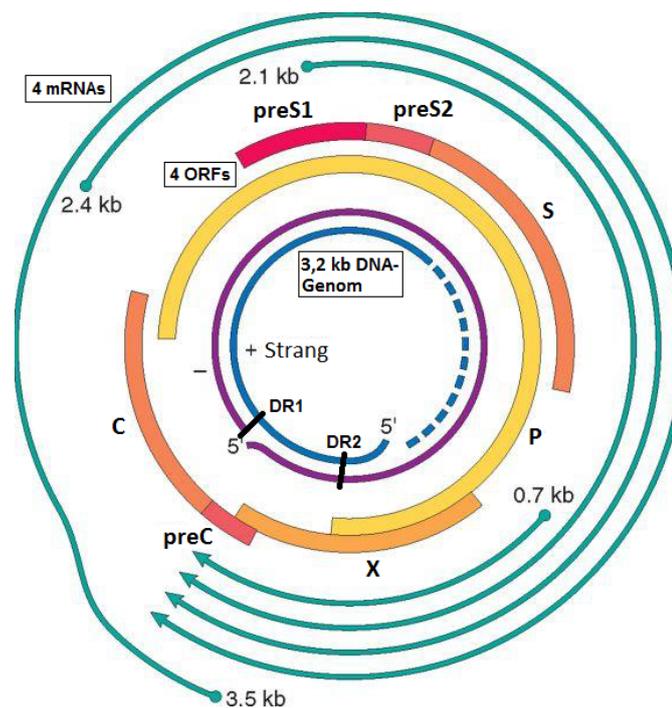


Abb. 1.5: Aufbau des HBV-Genoms: Das 3,2 bp große, partiell doppelsträngige HBV-Genom weist neben einem unvollständigen Positivstrang (blau dargestellt) einen vollständigen, kodierenden Negativstrang (violett). Anhand der vier ORFs (preS1-/preS2-/S-ORF, preC-/C-ORF, P-ORF, X-ORF; in Gelb/Orange/Hellrot/Rot dargestellt) werden vier verschiedene mRNAs (3,5 kb/pgRNA, 2,4 kb, 2,1 kb und 0,7 kb) transkribiert. Die mRNAs (türkis) kodieren für strukturelle (LHBs, MHBs, SHBs, HBc) und nicht-strukturelle (HBeAg, Polymerase, HBx) Virusproteine. Abbildung modifiziert nach [Robbins et al., 2010].

1.2.5 Oberflächenproteine

Die drei verschiedenen Oberflächenproteine werden von dem S-ORF unter Berücksichtigung dreier verschiedener Startcodons codiert und anhand der 2,1 kb und 2,4 kb mRNA translatiert [Locarnini, 2004]. Sie divergieren sowohl in ihrem N-terminalen Ende als auch in ihrer Membrantopologie, den synthetisierten Mengenverhältnissen und ihrer Funktion für das Virus [Schädler and Hildt, 2009]. Sie werden an der rauhen ER-Membran synthetisiert, in dieser verankert, können co- und post-translational ihre Topologie ändern und aggregieren über Protein-Protein-Interaktion durch Ausbildung

von Disulfidbrücken miteinander [Blanchet and Sureau, 2006]. Ihre divergierende Topologie und komplexe Struktur unterscheidet sich stark von dem meist simplen Aufbau der Oberflächenproteine anderer Viren [Sato et al., 2000].

1.2.5.1 SHBs

Das kleine Oberflächenprotein SHBs weist eine Länge von 226 AS auf und besitzt in unglykosyliertem Zustand ein Molekulargewicht von 24 kDa, in glykosylierter Form erreicht es 27 kDa. Das Protein beinhaltet ausschließlich die S-Domäne des preS1-/preS2-/S-Leserahmens [Persing et al., 1986]. Der Aufbau des SHBs ist durch mehrere Transmembranregionen (*transmembrane regions*, TM1, TM2, vermutlich auch TM3/4) charakterisiert. Eine N-terminale Schleife ragt ins Zytoplasma, während eine C-terminale Schleife und der N-Terminus im ER-Lumen liegen. Dort kann während der Reifung von Virus und SVP eine N-Glykosylierung des Proteins erfolgen. Nach der Virusknospung sind diese Domänen auf der Virusoberfläche exponiert [Schädler and Hildt, 2009, Bruss, 2007]. SHBs wird mengenmäßig deutlich häufiger als die anderen Oberflächenproteine synthetisiert und besitzt als Besonderheit unter Zuhilfenahme wirtseigener Lipide die Fähigkeit zum *self assembly* [Prange et al., 1991]. Primär führt diese Fähigkeit zur Sekretion von SVP. Einzig in Gegenwart von LHBs in den Oberflächenprotein-Aggregaten kann es durch Rekrutierung von Nukleokapsiden auch zur Knospung von Virionen kommen. Somit werden weitaus mehr SVP als infektiöse Viren sezerniert [Blanchet and Sureau, 2006, Sato et al., 2000]. SHBs übernimmt in immunologischer Hinsicht eine wichtige Rolle, indem es zur Bildung neutralisierender Antikörper beiträgt. Daher wird es als Antigen in gängigen HBV-Impfstoffen eingesetzt [Heermann et al., 1984, Siegler and Bruss, 2013, Xie et al., 2010].

1.2.5.2 MHBs

Das mittlere Oberflächenprotein MHBs fasst 281 AS und ist im Vergleich zum SHBs um 55 AS am N-Terminus verlängert. Durch Verwendung eines alternativen Startcodons wird neben der S- auch die preS2-Domäne translatiert [Persing et al., 1986, Bruss, 2007]. Grundsätzlich stimmt die Membrantopologie des MHBs mit jener des SHBs überein. Die N-terminale Verlängerung ragt in das ER-Lumen [Eble et al., 1990, Bruss and Thomssen, 1994]. MHBs kann in unglykosylierter (30 kDa), monoglykosylierter (33 kDa) sowie biglykosylierter (36 kDa) Form vorliegen [Schädler and Hildt, 2009]. Seine Funktion ist noch nicht abschließend aufgeklärt. Die preS-2-Region ist jedoch weder für die Infektiosität noch für die Morphogenese essentiell [Seeger and Mason, 2000, Lepère-Douard et al., 2009, Patient et al., 2009a].

1.2.5.3 LHBs

Das große Oberflächenprotein liegt – in Abhängigkeit vom vorliegenden Genotyp – um weitere 108 bis 119 AS N-terminal verlängert vor. Es umfasst mit der S-, preS- und preS2-Domäne den vollständigen preS1-/preS2-/S-Leserahmen und ist durch eine N-terminale Myristylierung membranständig verankert

[Xie et al., 2010]. Das Molekulargewicht divergiert zwischen 39 kDa in unglykosyliertem Zustand und 42 kDa nach Glykosylierung [Persing et al., 1986]. Die preS1-Domäne wird auf der zytosolischen Seite ausgebildet. Bei der Hälfte der LHBs-Proteine erfolgt posttranslational eine Translokation, sodass die N-terminale preS1-Domäne im Anschluss im ER-Lumen vorliegt. Es besteht damit eine duale Membrantopologie [Bruss, 1997]. Im reifen Virion vermittelt der ehemals im ER-Lumen befindliche Teil der preS1-/preS2-Domäne die Interaktion der Virushülle mit dem Nukleokapsid. Hingegen ermöglicht der auf der Oberfläche reifer Virionen nach außen gerichtete Anteil der preS1-Domäne den Kontakt zwischen Virus und Wirtszelle, um durch Bindung an NTCP (*sodium-taurocholate co-transporting polypeptide*) den Start der HBV-Infektion zu ermöglichen [Schädler and Hildt, 2009, Locarnini, 2004, Yan et al., 2012]. Im Gegensatz zu SHBs ist das LHBs nicht zum *self assembly* befähigt. Bei Koexpression mit SHBs sorgt LHBs dosisabhängig für eine Inhibition der Partikelfreisetzung und einer Ansammlung der Filamente im ER-Lumen [Persing et al., 1986, Bruss, 2007]. Die Bedeutung der Sekretionshemmung filamentöser SVP für den viralen Lebenszyklus konnte noch nicht abschließend aufgeklärt werden [Roingeard and Sureau, 1998, Bruss, 2007]. Ähnlich wie SHBs wirkt auch LHBs stark immunogen [Heermann et al., 1984].

1.2.6 Lebenszyklus

Zu Beginn des Infektionsprozesses bindet HBV unspezifisch an Heparinsulfat-Proteoglykane der Zellmembran [Schulze et al., 2007, Leistner et al., 2008]. Im Anschluss erfolgt die Bindung des Dane-Partikels über die preS1-Domäne des LHBs an NTCP als spezifischen Rezeptor [Yan et al., 2012], eine Beteiligung des α -Taxilin konnte darüber hinaus festgestellt werden [Hoffmann et al., 2013]. Der sich anschließende Aufnahmeprozess des Virus in die Zelle ist noch nicht detailliert aufgeklärt, er erfolgt jedoch in Form einer rezeptorvermittelten Endozytose [Offensperger et al., 1991, Stoeckl et al., 2006]. Nach dem Aufnahmeprozess in die Wirtszelle gelangt das Virus in das endosomale Kompartiment. Durch den dort vorherrschenden niedrigen pH-Wert kommt es zur Freilegung eines Translokationsmotivs (TLM), welches zum Verschmelzen des viralen Partikels mit der endosomalen Membran führt und somit das Nukleokapsid in das Zytoplasma freisetzt. [Marsh and Helenius, 2006]. Das Nukleokapsid gelangt über einen gerichteten Transportmechanismus – vermutlich unter Beteiligung von Mikrotubuli und Aktinfilamenten – zum Zellkern der Wirtszelle [Döhner and Sodeik, 2005, Rabe et al., 2006, Huang et al., 2000]. Infolge einer Phosphorylierung kommt es zur Exposition von Kernlokalisationssequenzen (*nuclear localisation sequences*, NLS) an der Kapsidoberfläche und zum Binden des Kapsids an die Kernporen. Dies führt zu einem Zerfall des Nukleokapsids. Die virale DNA wird anschließend mithilfe der NLS der TP-Domäne der viralen Polymerase [Lupberger et al., 2013] aktiv über die Kernporen in den Zellkern freigesetzt [Lupberger et al., 2013, Eckhardt et al., 1991, Rabe et al., 2003]. Im Inneren des Zellkerns wird nun der unvollständige DNA-Strang mithilfe der zellulären Polymerase vervollständigt. In Folge dieses Prozesses werden das RNA-Oligonukleotid am Positivstrang ebenso wie die Polymerase und das TP-Protein am Negativstrang entfernt und die verbliebene Lücke wird geschlossen. Somit wird die ehemals lineare *relaxed circular DNA* (rcDNA) in eine kovalent geschlossene, zirkuläre *supercoiled* Doppelstrang-DNA (*covalently closed circular DNA*,

cccDNA) umgewandelt. Im Zellkern dient nun die cccDNA als Matrize für die Transkription der verschiedenen viralen mRNAs durch die zelluläre Polymerase II [Seeger and Mason, 2000, Schädler and Hildt, 2009]. So entsteht unter Zuhilfenahme des zellulären Translationsapparates im Zytoplasma die pgRNA von 3,5 kb Länge. Diese dient der Translation der viralen Polymerase, des Core-Proteins und des Prä-Core-Proteins, welches nach Prozessierung im ER als lösliches HBsAg ins Blut sezerniert wird. Darüber hinaus dient die pgRNA auch als Vorlage für die reverse Transkription des viralen (-)-Strangs. Neben der pgRNA werden auch drei subgenomische mRNAs transkribiert, welche in die drei Oberflächenproteine (2,4 und 2,1 kb RNA) und das HBx-Protein (0,7 kb RNA) übersetzt werden. Die Virusreplikation erfolgt unter Einsatz der pgRNA im Zytoplasma der Wirtszelle. Hierbei lagert sich die virale Polymerase über das Enkapsidationssignal ϵ der pgRNA an das 3,5 kb *template* an und bildet einen Komplex. Durch die erfolgte Bindung werden Core-Protein-Dimere rekrutiert, welche sich durch *self assembly* zum Viruskapsid formieren. Im Inneren des Kapsids wird, ebenfalls durch ϵ -Polymerase-Interaktion, die reverse Transkriptase initiiert [Schädler and Hildt, 2009]. Die pgRNA dient zunächst als Matrize für den (-)-Strang, anschließend wird der (+)-Strang synthetisiert und es kommt zur Ausbildung der partiell doppelsträngigen DNA [Gerelsaikhon et al., 1996]. Das reife, dephosphorylierte Nukleokapsid kann nun über einen noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus unter Einbindung von MVBs zu einem *post-ER, pre-Golgi compartment* (post-ER-prä-Golgi-Kompartiment) gelangen. Dort werden die Nukleokapside von den Oberflächenproteinen umhüllt, woraufhin die so entstandenen Virionen sezerniert werden können. Im Anschluss an die Freisetzung können die Dane-Partikel Nachbarzellen infizieren [Bruss, 2004]. Ein Teil der reifen Nukleokapside wird jedoch nicht umhüllt, sondern wandert zurück zum Zellkern, entlässt erneut die rcRNA und vergrößert damit den amplifizierbaren Genpool [Rabe et al., 2003].

Die exakte Morphogenese der SVP ist noch nicht aufgeklärt [Siegler and Bruss, 2013], ihre Entstehung hängt jedoch unter anderem von den verfügbaren viralen Proteinen und ihren Mengenverhältnissen ab. So formen sich die unterschiedlichen SVP in Abwesenheit von Nukleokapsiden. Bereits das alleinige Vorhandensein von SHBs ist ausreichend, um sphärische SVP zu bilden [Patient et al., 2009a]. Liegt darüber hinaus MHBs – oder auch zusätzlich geringe Mengen an LHBs – vor, so kommt es weiterhin zur Formung von Sphären [Roingard and Sureau, 1998], welche in das *ER-Golgi intermediate compartment* (ERGIC) knospen und schließlich über den sekretorischen Weg die Zelle verlassen [Hoffmann et al., 2013, Bruss, 2007]. In Anwesenheit großer Mengen an LHBs kommt es jedoch zur Synthese der Filamente, deren Sekretion ineffizienter erfolgt [Roingard and Sureau, 1998, Hoffmann et al., 2013]. Sie können entsprechend der Virionen die Zelle über MVBs verlassen [Jiang et al., 2015]. Die nachfolgende Abbildung 1.6 zeigt eine schematische Übersicht des HBV-Lebenszykluses. Die divergierenden Exportrouten der einzelnen (sub-)viralen Partikel werden darüber hinaus in Abbildung 1.8 ersichtlich.

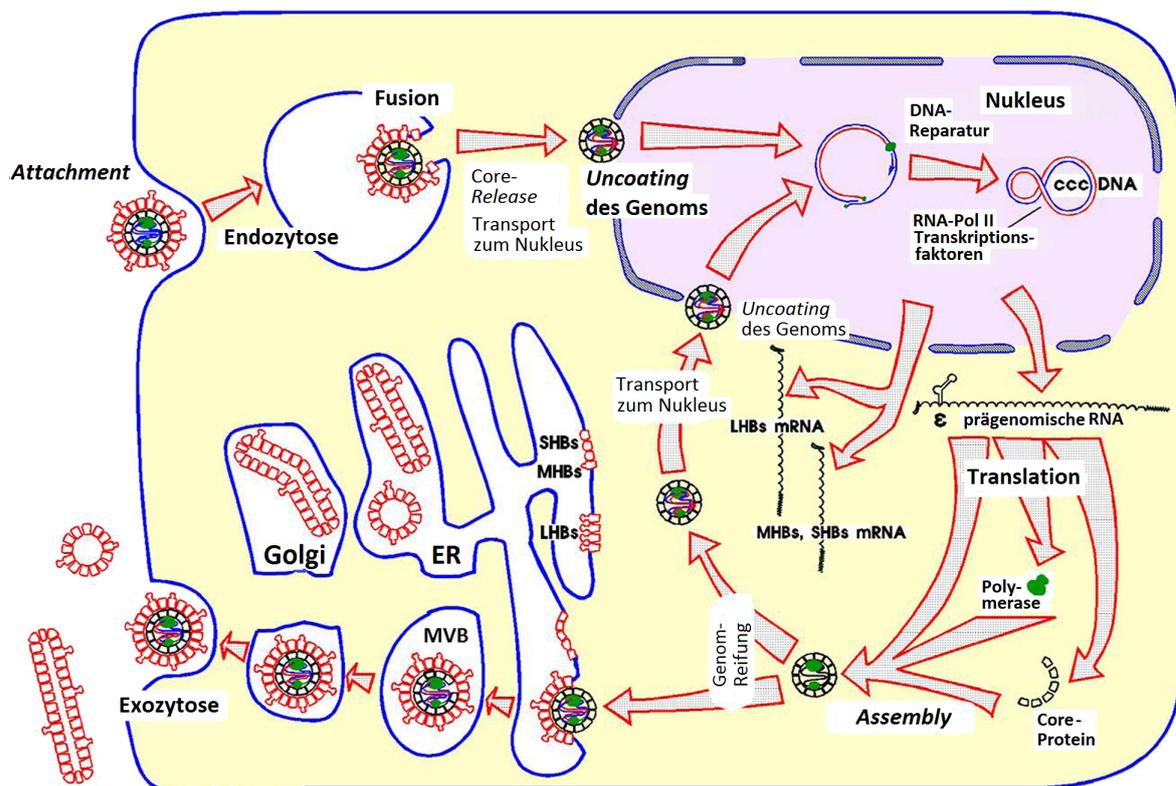


Abb. 1.6: Morphogenese des HBV: Das Virus wird mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose in die Zelle aufgenommen. Das freigesetzte NC wird zum Zellkern transportiert, die DNA wird freigegeben. Im Zellkern erfolgt die Transkription des viralen Genoms, im Zytoplasma werden die mRNAs in ihre entsprechenden viralen Proteine translatiert. Um den Komplex aus pgRNA und Polymerase wird das Kapsid geformt, in dessen Inneren die Transkription zur rcDNA erfolgt. Gereifte NCs werden zurück zum Zellkern transportiert oder nach Umhüllung mit HBsAg aus der Zelle entlassen. Auch die SVP werden nach *self assembly* aus der Zelle transportiert, ihr Export ist in 1.8 dargestellt. Abbildung modifiziert nach [Gerlich, 2013].

1.3 Intrazellulärer Vesikeltransport

Innerhalb eukaryotischer Zellen ermöglicht ein komplexes und stark reguliertes Transportsystem die Abgabe intrazellulärer Inhalte (z. B. Hormone, Neurotransmitter) nach außen sowie die Aufnahme extrazellulär gelagerter Substanzen in die Zelle. Im ersten Fall fusioniert die Membran eines sekretorischen Vesikels mit der Plasmamembran und sein Inhalt wird an den extrazellulären Raum abgegeben, es liegt die sogenannte Exozytose vor. Gegenteilig spricht man von Endozytose, wenn durch Abschnürung eines Vesikels von der Plasmamembran extrazellulärer Inhalt in die Zelle aufgenommen wird. Der Transport verläuft über verschiedene Stadien. Zu Beginn steht die Ausstülpung (*budding*) und Loslösung eines Vesikels von seiner Donormembran, es folgt der Transport zu seiner Zielmembran, das Andocken am Zielort und endet in der Vesikelfusion mit der Zielmembran [Rothman, 1994, 1996].

1.4 ESCRT-System

Die in die Endozytose involvierten Vesikel werden als Endosomen bezeichnet. Sie werden in frühe, in der Zellperipherie befindliche, sowie späte, in Zellkernnähe lokalisierte, Endosomen unterteilt. Um die Proteinaufnahme in Endosomen zu ermöglichen, werden die Peptide mittels Ubiquitinierung markiert [Hicke and Dunn, 2003]. Über das ESCRT-System (*endosomal sorting complex required for transport*) erfolgt anschließend die Sortierung und Aufnahme der Proteine in intraluminale Vesikel (*intraluminal vesicles, ILVs*) [Hurley and Hanson, 2010, Huotari and Helenius, 2011]. Zunächst kommt die *ubiquitin binding* ESCRT-Maschinerie, bestehend aus ESCRT-0, ESCRT-I und ESCRT-II, zum Einsatz. Diese drei Komplexe bilden in festgelegter Reihenfolge Bindungen zum ubiquitinierten Cargo sowie untereinander aus. Darüber hinaus vermitteln sie den Kontakt zu der *late acting* ESCRT-Maschinerie, dem ESCRT-III und der VPS4 [Hanson et al., 2009]. ESCRT-III leitet die Invagination der endosomalen Membran und die Abschnürung eines ILV ein [Hurley and Hanson, 2010]. Die VPS4 ist eine AAA⁺-ATPase, liefert die benötigte Energie für die ILV-Bildung und löst letztlich die ESCRT-Maschinerie wieder von der endosomalen Membran [Hanson et al., 2009].

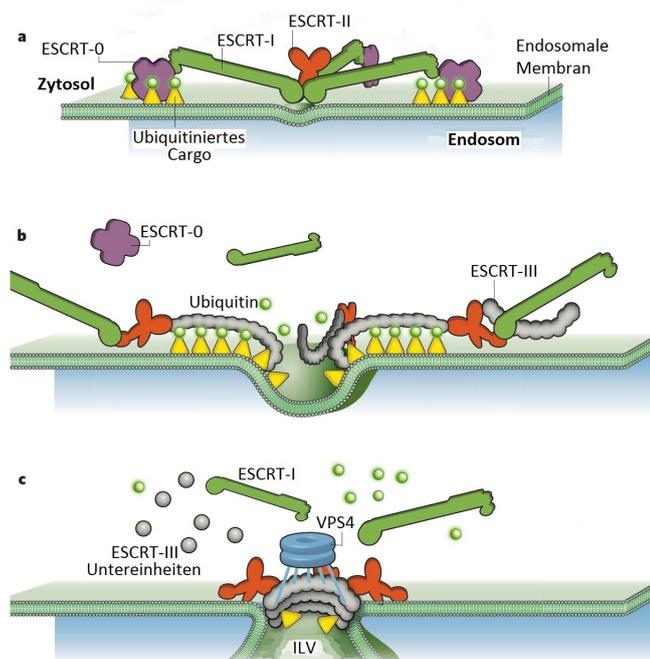


Abb. 1.7: Wirkung des ESCRT-Systems: a) Cargo-Sortierung: Anhand verschiedener Domänen binden die Komplexe ESCRT-0 bis -II ubiquitinierte Ladung. b) Membraninvagination: Der ESCRT-III-Komplex bewirkt eine Invagination der endosomalen Membran, Ubiquitin und die übrigen ESCRT-Komplexe werden gelöst. c) Membranabschnürung: Die Membran wird zu einem intraluminalen Vesikel abgeschnürt. VPS4 liefert die nötige Energie und beeinflusst die Loslösung und das Recycling des ESCRT-III-Komplexes. Abbildung modifiziert nach [Raiborg and Stenmark, 2009].

Liegt in gereiften, späten Endosomen eine große Anzahl an ILVs vor, so werden diese Endosomen auch als multivesikuläre Körper (*multivesicular bodies, MVBs*) bezeichnet [Clague and Urbé, 2008]. Die entstandenen MVBs können nun mit Lysosomen oder – unter gewissen Umständen – mit der

Plasmamembran fusionieren, um den Inhalt der nun als Exosomen bezeichneten Vesikel an den extrazellulären Raum abzugeben [Clague and Urbé, 2008, Fader et al., 2008]. So ist das ESCRT-System an der Ausschleusung mancher Viren beteiligt [Morita et al., 2007]. Diverse behüllte Viren haben einen Mechanismus entwickelt, manipulierend in den Ubiquitinierungsprozess einzugreifen, um die Virusknospung von der Plasmamembran in den extrazellulären Raum zu ermöglichen [Hicke and Dunn, 2003, Raiborg et al., 2003]. Eine weitere Beteiligung des ESCRT-Systems besteht in der Autophagie [Filimonenko et al., 2007, Rusten and Stenmark, 2009, Hurley and Hanson, 2010].

1.4.1 ESCRT und HBV

Die Umhüllung des reifen HBV-Nukleokapsids mit seinen Oberflächenproteinen und der Schritt der Virusfreisetzung ist noch nicht in Gänze aufgeklärt, jedoch sind mittlerweile einige Details bekannt geworden. Mittels Ubiquitinierung viraler Komponenten und entsprechender Adapterproteine gibt es eine Verbindung zum endosomalen Kompartiment und der ESCRT-Maschinerie. So sind zwei zelluläre endosomale Proteine im späten Stadium des *virus assembly* beteiligt [Lambert et al., 2007]. $\gamma 2$ -Adaptin ist ein *endosomal sorting and trafficking adapter* [Rost et al., 2006]. Als Ubiquitin-Rezeptor stellt es die Interaktion zwischen den viralen Hüllproteinen und dem Nukleokapsid her und ist vermutlich einer der Schlüsselfaktoren in der Virusknospung an den MVBs. In Studien resultierte eine Reduktion von $\gamma 2$ -Adaptin mittels siRNA-Einsatz in einer Blockade des HBV-*assembly* und der Virionfreisetzung, sie hatte jedoch keinen Einfluss auf die Freisetzung der SVP [Lambert et al., 2007]. Eine vollständige Depletion von $\gamma 2$ -Adaptin resultierte in der Bildung stark vergrößerter, defekter MVBs [Rost et al., 2008]. Darüber hinaus konnte eine direkte Kollokalisierung von $\gamma 2$ -Adaptin mit LHBs und HBc bewiesen werden [Rost et al., 2006]. Eine weitere Verknüpfung der HBV-Knospung mit der ESCRT-Maschinerie und den MVBs wird über die zelluläre, endosomale Ubiquitin-Ligase Nedd4 vermittelt [Bardens et al., 2011]. Diese Ligase unterstützt die Sortierung ubiquitiniertes Proteine und deren Aufnahme in MVBs [Lambert et al., 2007]. Studien mit Überexpression einer inaktiven Nedd4-Mutante offenbarten eine deutliche Minderung der Virusfreisetzung [Rost et al., 2006]. In Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte eine Kollokalisierung von $\gamma 2$ -Adaptin mit Nedd4 nachgewiesen werden. Es wird daher vermutet, dass die zwei Adapterproteine über Ubiquitin und wechselseitige Ubiquitinierung miteinander interagieren und möglicherweise erst ihr Zusammenspiel ein erfolgreiches *virus assembly* ermöglicht [Rost et al., 2008]. Eine Studie mit ESCRT-III- und VPS4-Mutanten bestätigte eine Beteiligung des ESCRT-Systems in der HBV-Morphogenese. Die Zusammenlagerung der viralen Partikel wurde blockiert und das Core-Protein in stark vergrößerten endosomalen Strukturen sequestriert. Daher blieben alle sich anschließenden Schritte des *virus assembly* aus. All diese Studien zeigen, dass HBV ähnlich behüllter RNA-Viren MVB-abhängig die ESCRT-Maschinerie nutzt, um seine Oberflächenproteine zu rekrutieren, seine Morphogenese zu vollenden und die Zelle gegebenenfalls zu verlassen [Lambert et al., 2007]. Ein zusätzlicher essentieller Faktor für den Virusexport ist das zelluläre Protein α -Taxilin. Dieses stellt den Bindungspartner des LHBs dar und kann zusätzlich mit dem ESCRT-I-Komplex interagieren. Somit agiert α -Taxilin als Adapter zwischen dem ESCRT-System und HBV selbst. Eine Übersicht über das Zusammenspiel

zwischen dem endosomalen Kompartiment und der ESCRT-Maschinerie während des *virus assembly* ist in Abbildung 1.8 zu erkennen.

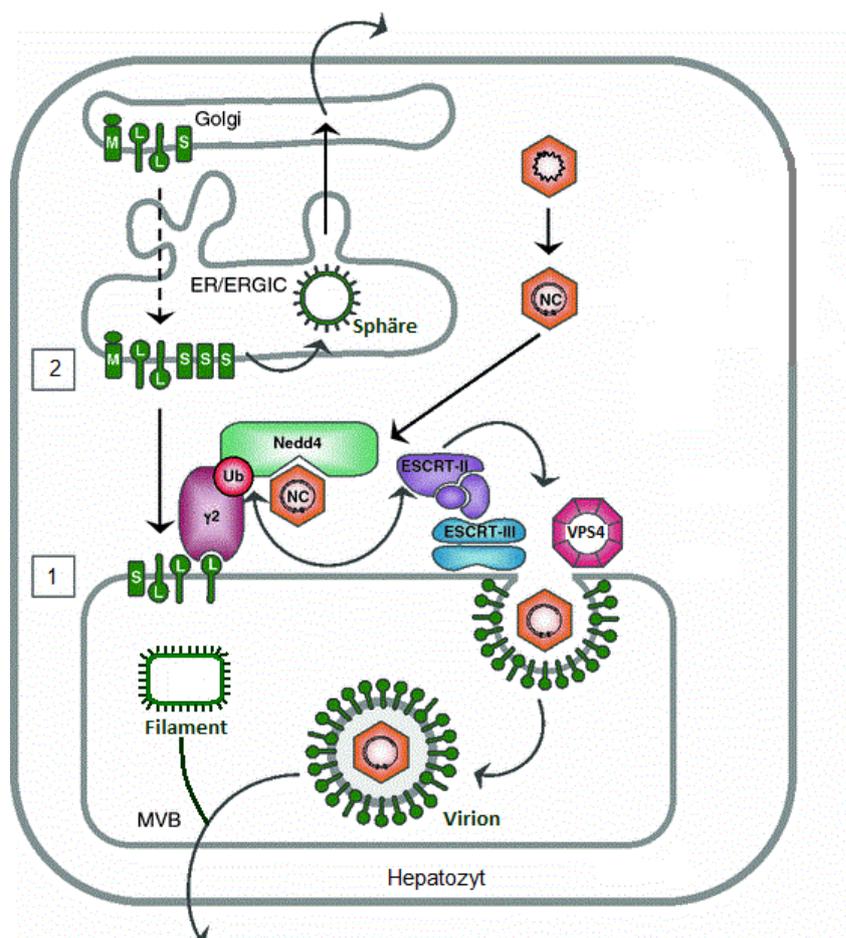


Abb. 1.8: Umhüllung der Virionen und Bildung der SVP: (1) *Virus assembly*: $\gamma 2$ -Adaptin ($\gamma 2$) vermittelt die Interaktion zwischen HBsAg und dem NC. Nedd4 sortiert die ubiquitinierten viralen Proteine und unterstützt deren Aufnahme in MVBs. Die Virusknospung an den MVBs geschieht ESCRT-abhängig unter Energiebereitstellung durch VPS4; α -Taxilin (i. d. Abbildung nicht aufgeführt) fungiert als Adapter zwischen dem LHBs der Virushülle und dem ESCRT-I-Komplex. (2) Die im ER durch *self assembly* gebildeten sphärischen SVP gelangen zum ERGIC und verlassen die Zelle unter Einbindung des Golgi-Apparates. Abbildung modifiziert nach [Prange, 2012].

1.5 ERGIC

Der Proteintransport vom ER zum Golgi-Apparat erfolgt in eukaryotischen Zellen über das komplexe tubulovesikuläre Membransystem des ERGIC. Es wird vermutet, dass Cargo-Proteine über einen vesikulären Schritt vom ER zum Golgi-Apparat vermittelt und wiederum mittels vesikulären Transports in den Golgi-Apparat überführt werden. Die Funktion des ERGIC besteht nicht nur in dem Sortieren der erhaltenen Proteine, sondern auch in deren entsprechendem antero- sowie retrograden Transport zwischen den Kompartimenten. Darüber hinaus wird vermutet, dass ein Falten sowie eine Qualitätskontrolle neu synthetisierter Proteine vorgenommen wird [Appenzeller-Herzog and Hauri, 2006, Hurtley and Helenius, 1989].

1.5.1 ERGIC und HBV

Auch wenn die Morphogenese der SVP noch nicht vollständig aufgeklärt ist, so ist bekannt, dass sie mit der Zusammenlagerung des SHBs zu Dimeren – vermutlich durch Disulfidbrücken stabilisiert – beginnt [Patient et al., 2009b]. Im ER-Lumen folgt ein eigenvermitteltes *self assembly* des SHBs, zunächst in Form länglicher, teils verzweigter Filamente. Im Anschluss werden die vorläufigen Filamente nach ihrer Faltung in kristallähnliche Strukturen verpackt und in Vesikeln aus dem ER zum ERGIC befördert. Im Lumen des ERGIC angelangt, werden die aus SHBs bestehenden Filamente entpackt, entfaltet und vermutlich in sphärische, sezernierbare SVP konvertiert [Patient et al., 2007]. Die sphärischen SVP verlassen die Zelle mittels Exozytose über den konstitutiven sekretorischen Weg, siehe auch Abbildung 1.8 [Patient et al., 2009b, Patzer et al., 1986, Lodish et al., 2000]. Auch die Filamente scheinen im Inneren des ER-Lumens gebildet zu werden, sie werden jedoch nicht in Transportvesikel verpackt; entsprechend wird ein Transport zum ERGIC ineffizient vollzogen. Eine Sekretion der Filamente ist grundsätzlich möglich, erfolgt jedoch weniger effizient als jener der Sphären, vermutlich auf ihrem erhöhten LHBs-Anteil beruhend [Patient et al., 2007]. Sie verlassen die Zelle entsprechend der Virionen über MVBs [Jiang et al., 2015].

Hinsichtlich der Sekretion der SVP zeigen HBV-gtG-positive Zellen eine Besonderheit in Form einer stark verminderten Sekretion vornehmlich filamentöser SVP bei unbeeinträchtiger Virusfreisetzung – eine weitere Bestätigung der unterschiedlichen Sekretionsmuster von Virus und SVP. Die Menge der produzierten SVP ähnelt jener der übrigen Genotypen, die Morphologie ist jedoch divergierend. So weisen die Filamente in HBV-gtG-positiven Zellen eine Zunahme in Größe und Durchmesser auf, zurückzuführen auf eine extreme Neigung der PreS1-/PreS2-Domäne, Aggregate zu bilden. Das ER besitzt im Sinne einer Qualitätskontrolle die Fähigkeit, unüblich aggregierte Proteine zurückzuhalten und deren Sekretion zum Golgi-Apparat zu blockieren [Hurtley and Helenius, 1989]. Somit könnte die Genotyp G-spezifische Aggregatbildung ursächlich für die Akkumulation der Filamente im ER sein [Patient et al., 2007].

1.6 Autophagie

Die Autophagie stellt einen streng regulierten intrazellulären katabolen Prozess zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase dar [Sir et al., 2010a, Mizushima et al., 2008]. Grundsätzlich wird die Autophagie in drei Formen unterteilt: Chaperon-vermittelte sowie Mikro- und Makroautophagie. In der Chaperon-vermittelten Autophagie werden lösliche zytoplasmatische Proteine Chaperon-abhängig entfaltet und in Lysosomen transloziert. Mikroautophagie ist gekennzeichnet durch inwärtige Invagination der lysosomalen Membran mit Einschluss einer geringen Zytoplasmamenge in das Lysosom [Mizushima et al., 2010]. Während der Makroautophagie – im Folgenden nur noch als „Autophagie“ bezeichnet – werden Autophagosomen gebildet, in deren Inneres akkumulierte oder defekte Proteine sowie beschädigte Zellorganellen aufgenommen werden [Sir et al., 2010a]. Nach Reifung werden die Autophagosomen dem lysosomalen Apparat zugeführt, es bilden sich Autolysosomen und ihr Inhalt wird degradiert und recycelt [Levine and Kroemer, 2008]. Eine weitere Fusionsmöglichkeit

besteht in der Vereinigung der Autophagosomen mit Endosomen oder MVBs zu Amphisomen vor der letztlichen Vereinigung mit Lysosomen [Orsi et al., 2010]. Eine effiziente Autophagie ist auf funktionelle MVBs angewiesen [Fader and Colombo, 2009]. Der Mechanismus der „Selbstverdauung“ [Mizushima et al., 2008] wird bei multiplen zellulären Stresssignalen initiiert. Wichtigster Stimulus ist Nährstoffmangel, welcher über die Ausschüttung von ROS (*reactive oxygen species*, reaktive Sauerstoffspezies) die Autophagie initiiert [Filomeni et al., 2015, Scherz-Shouval and Elazar, 2011]. Weitere physiologische Stressstimuli sind Hypoxie, Energiemangel, ER-Stress und hohe Temperatur. Außerdem können hormonelle oder pharmakologische Stimuli sowie Signale der angeborenen Immunantwort zur Autophagieinduktion führen [Mizushima et al., 2010, Yang et al., 2015]. Neben Wahrung der Homöostase stellt die Autophagie auch einen wichtigen Abwehrmechanismus dar. So können intrazelluläre Pathogene (Viren, Bakterien, Protozoen) eine Induktion der Autophagie verursachen und einen selektiven, zielgerichteten autophagosomalen Transport der Pathogene (Xenophagie) zu den Lysosomen hervorrufen [Levine et al., 2011, Mizushima et al., 2008]. Darüber hinaus interagiert das autophagosomale Kompartiment mit dem angeborenen und erworbenen Immunsystem. Einige Pathogene haben Strategien entwickelt, sich den protektiven autophagosomalen Mechanismen zu entziehen. So inhibiert beispielsweise das Herpes-simplex-Virus 1 (HSV 1) die Formation autophagosomaler Strukturen, um die direkte Degradation ihrer viralen Komponenten per Xenophagie zu unterbinden [Dreux and Chisari, 2014, Mizushima et al., 2008, Sir and Ou, 2010]. Andere Viren nutzen gar das autophagosomale Kompartiment für ihre Zwecke. So induziert das Hepatitis-C-Virus (HCV) die Autophagie, während das Poliovirus die Bewegung der Autophagosomen entlang der Mikrotubuli unterdrückt, beide Mechanismen resultieren in einer Replikationssteigerung [Dreux and Chisari, 2014]. Das Parvovirus wiederum bewirkt durch gesteigerte Autophagie eine gehemmte Apoptose infizierter Zellen. [Dreux and Chisari, 2014].

Auf den Autophagieprozess nehmen verschiedene zelluläre Komponenten Einfluss. Eine herausragende Rolle übernimmt die Proteinkinase *mammalian target of rapamycin* (mTOR), welche in Abhängigkeit von Nährstoffversorgung, Wachstumsfaktoren und Stressstimuli sowohl Zellwachstum als auch zellulären Selbstverdau reguliert [Jung et al., 2010]. Eine weitere Regulation der Autophagieprozesse geschieht durch verschiedene *autophagy related genes* (Atg)-Proteinkomplexe. Zu diesen Komplexen zählen der *Atg1/unc-51-like-kinase* (ULK)-Komplex, der Beclin1/Klasse III-Phosphatidylinositol-3-Kinase (Klasse III-PI3K) -Komplex, zwei *ubiquitin-like protein* (UBL) -Konjugationskomplexe (Atg12 und Atg8/LC3) sowie die Lysosom-assoziierte Membranproteinfamilie (LAMP1, LAMP2, Rab7) [Kroemer et al., 2010]. Bei Nährstoffmangel oder gleichwertigen Signalen wird die Autophagie durch Inaktivierung von mTOR initiiert. So kommt es durch eine Translokation des ULK1/2-Komplexes aus dem Zytoplasma [Mizushima, 2010] in das ER zu einer Rekrutierung des PI3K-Komplexes und der Abspaltung von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) [Axe et al., 2008, Matsunaga et al., 2010, Levine et al., 2011]. Diese Vorgänge führen zur Nukleation, der Ausbildung einer Isolationsmembran (IM) bzw. Phagophore. Das abgespaltene PI3P kann wiederum weitere Effektoren aktivieren, welche gemeinsam eine Elongation der IM bewirken [Levine et al., 2011]. Es bildet sich eine ER-assoziierte Ω -ähnliche Struktur (Omegasom) [Axe et al., 2008]. Unter Beteiligung der zwei UBL-Komplexe kommt es zur weiteren Ausdehnung der Isolationsmembran bis hin zur vollständigen Abschnürung

eines Vesikels mit Doppelmembrancharakter, dem Autophagosom. Die Größe des abgeschnürten Vesikels beträgt ca. 0,5–1 μm [Levine et al., 2011]. Durch Fusion der äußeren Membran des reifen Autophagosoms mit einem Lysosom entsteht unter Einwirkung des *lysosomal transmembrane protein* LAMP-2 das Autolysosom [Levine and Kroemer, 2008], in welchem der Abbau eingeschlossener Zellorganellen und Proteinaggregate zusammen mit der inneren autophagosomalen Membran durch lysosomale Enzyme vorgenommen wird. Hierbei gewonnene Aminosäuren können recycelt oder zur Energiegewinnung genutzt werden [Mizushima et al., 2010].

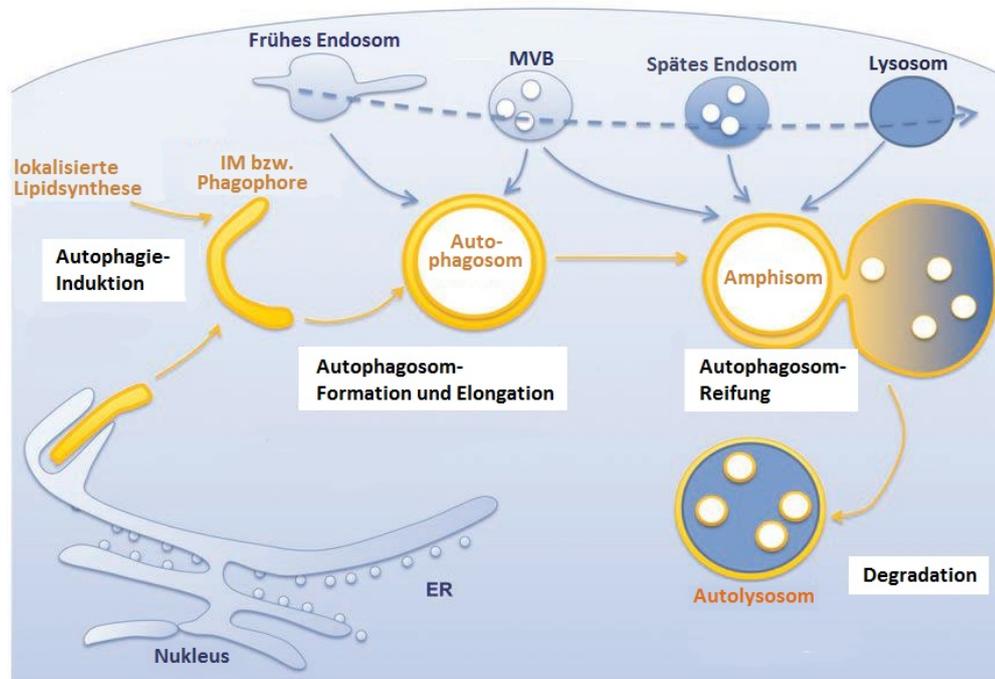


Abb. 1.9: Autophagosomale Reifung: Während der Autophagieinduktion wird eine IM gebildet, aus welcher nach Elongation das Autophagosom entsteht. Es können diverse vesikuläre Strukturen wie frühe bzw. späte Endosomen und MVBs mit dem Autophagosom zum Amphisom verschmelzen. Dieses verschmilzt letztlich mit einem Lysosom zum Autolysosom; der vesikuläre Inhalt unterliegt der Degradation. Abbildung modifiziert nach [Dreux and Chisari, 2014].

1.6.1 LC3

Das *microtubule-associated protein 1 light chain 3* (LC3) wird während der Elongation der IM durch Atg4 am C-Terminus prozessiert und liegt nun zyttoplasmatisch als LC3-I (18 kDa [MBL]) vor. Durch die anschließende Konjugation mit Phosphatidylethanolamin (PE) entsteht LC3-II (LC3-PE, 16 kDa [MBL]), welches sich sowohl an der äußeren als auch inneren Membran des Autophagosoms befindet. Nach der Fusion von Autophagosom mit Lysosom wird das auf der Membranaußenseite anzutreffende LC3-II durch Atg4 abgespalten.

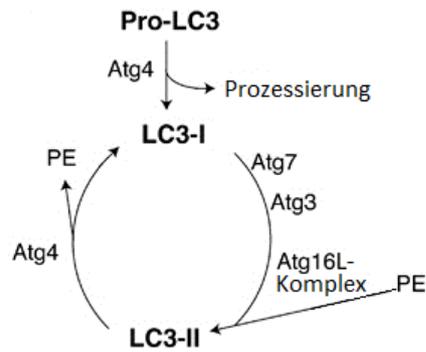


Abb. 1.10: Verschiedene LC3-Formen: Das Protein LC3 liegt nach Prozessierung durch Atg4 zytoplasmatisch als LC3-I vor. Unter Einfluss weiterer Atg findet eine Konjugation mit PE statt und es entsteht LC3-II, welches nun an der inneren sowie äußeren Autophagosommembran lokalisiert ist. Abbildung modifiziert nach [Noda et al., 2009].

Das innenseitig befindliche LC3-II wird anschließend durch lysosomale Enzyme abgebaut, somit ist der in Autolysosomen befindliche LC3-Anteil sehr klein [Mizushima et al., 2010, Tanida et al., 2014]. LC3 ist ein weit eingesetzter Marker zur Detektion von Autophagosomen und der Messung der autophagosomalen Aktivität [Kuma et al., 2014, Mizushima and Yoshimori, 2014]. Neben einem veränderten Gehalt der verschiedenen LC3-Formen wird bei Zunahme autophagosomaler Aktivität auch eine Umverteilung des LC3 beobachtet. So liegt das LC3 nicht mehr diffus sondern konzentriert punktförmig im Zytoplasma vor – die Rekrutierung des Proteins in autophagische Vesikel demonstrierend [Dreux and Chisari, 2014].

1.6.2 p62

Das Adapterprotein p62 nimmt eine entscheidende Rolle in diversen zellulären Funktionen und Signalkaskaden ein, so auch in der Autophagie [Moscat and Diaz-Meco, 2009, Komatsu and Ichimura, 2010]. Zum einen kann p62 über eine C-terminale Ubiquitin-assoziierte (UBA) -Domäne mit ubiquitinierten Proteinen interagieren. Zum anderen kann es durch eine LC3-interagierende Region (LIR) in das Autophagosom aufgenommen werden [Pankiv et al., 2007]. Somit leitet p62 ubiquitinierte Proteine in Interaktion mit LC3 zum Autophagosom, um deren Abbau zu ermöglichen [Zheng et al., 2009], siehe auch Abbildung 1.11.

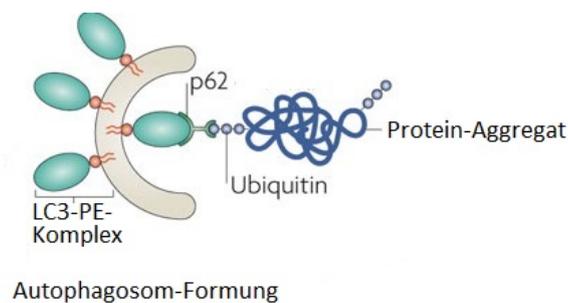


Abb. 1.11: Zusammenspiel von p62 und LC3: Während der Autophagosomenbildung interagiert p62 sowohl mit ubiquitiniertem Cargo als auch mit LC3. So kommt es zur Aufnahme des Cargo in das Autophagosom. Als Marker befindet sich LC3-II sowohl auf der äußeren als auch inneren Vesikelmembran, p62 ist lediglich im Inneren des Autophagosoms anzutreffen. Abbildung modifiziert nach [Tyedmers et al., 2010].

Im Laufe der Autophagie wird p62 im Autolysosom abgebaut, eine Inhibition der Autophagie resultiert folglich in einer p62-Akkumulation [Rusten and Stenmark, 2010, Klionsky et al., 2014b, Komatsu and Ichimura, 2010]. Daher wird p62 als verlässlicher Marker zur Bestimmung der Autophagosomenanzahl genutzt [Larsen et al., 2014].

1.6.3 Autophagie und HBV

Diverse Studien in der Zellkultur, im Lebergewebe transgener Mäuse als auch in Hepatozyten HBV-positiver Patienten haben gezeigt, dass HBV die Autophagie induziert [Tian et al., 2011]. Hierbei kommt es jedoch nicht zu einer verstärkten autophagosomalen Degradation; es tritt also trotz einer erhöhten Anzahl autophagosomaler Vakuolen kein verstärkter Abbau zellulärer Proteine auf [Sir et al., 2010b, Li et al., 2011a]. Der genaue Mechanismus der HBV-medierten Autophagieinduktion konnte bislang nicht aufgedeckt werden. Es besteht die Theorie, dass der für die Autophagie essentielle positive Verstärker Klasse3-PI3K durch das regulatorische HBx-Protein beeinflusst wird [Sir et al., 2010a]. Sowohl in Zellkultursystemen, denen per Mutation das HBx-Protein fehlte, als auch in transgenen Mäusen mit X-null HBV-Genom konnte ein Ausbleiben der Autophagieinduktion beobachtet werden [Sir et al., 2010a]. Weitere Studien konnten zeigen, dass die Autophagieinduktion – vermutlich HBx-abhängig – durch verstärkte Beclin1-Expression erfolgt. So hatte der Einsatz entsprechender Beclin1-siRNA eine Blockade der Autophagieinduktion zur Folge [Tang et al., 2009, Dreux and Chisari, 2014]. Die Ergebnisse der Induktion über Klasse3-PI3K bzw. Beclin1 schließen sich nicht aus, da beide Faktoren zum gemeinsamen Beclin1-/Klasse3-PI3K-Proteinkomplex der Atg zählen und für die Autophagieaktivierung essentiell sind [Kroemer et al., 2010, O Farrell et al., 2013].

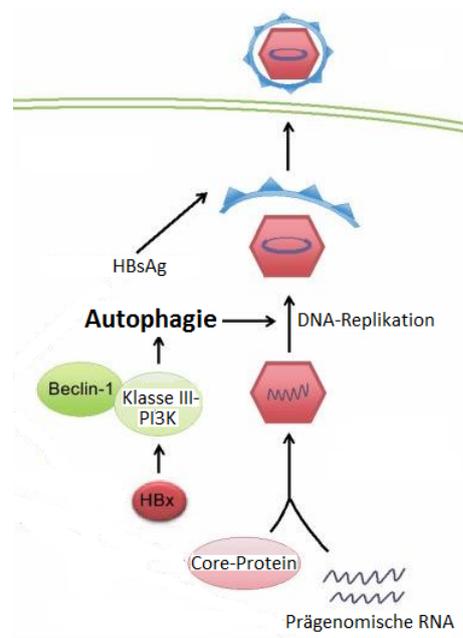


Abb. 1.12: Einfluss der Autophagie auf die DNA-Replikation: Positive Verstärkung der HBV-Replikation durch Klasse III-PI3K-Komplex-abhängige Autophagieinduktion. Abbildung modifiziert nach [Alavian et al., 2011].

Die frühe Autophagie [Sir and Ou, 2010] ist für eine effiziente HBV-Replikation essentiell [Yang et al., 2015] und steigert sie darüber hinaus [Sir and Ou, 2010, Sir et al., 2010b]. Dies zeigten Studien mit 3-Methyladenin (3-MA), einem Inhibitor der Klasse3-PI3K, sowie Studien mit siRNA, welche die Expression von VPS34, einer katalytischen Untereinheit der Klasse3-PI3K, unterdrückte. Ein dritter Versuchsaufbau beinhaltete die unterdrückte Expression von Atg7, einem für die Formation der Autophagosomen kritisches Enzym, per siRNA. In allen drei Fällen wurde die DNA-Replikation drastisch gemindert.

Die Replikation des Virus findet nicht in den Autophagosomen statt. Somit ist bislang unklar, auf welche Weise die Induktion der Autophagie zur Replikation der viralen DNA beitragen kann [Yang et al., 2015]. Eine Vermutung besteht darin, dass die induzierte Autophagie über eine Beeinflussung der HBc-Dephosphorylierung auf die virale Replikation einwirke. Eine weitere Theorie besagt, dass die Autophagie für die Reifung der Core-Partikel benötigt werde, welche für die HBV-Replikation essentiell ist [Sir et al., 2010b]. Eine weitere Studie an Zellkultursystemen legt die Vermutung nahe, dass die Autophagie die HBV-Replikation im Schritt der Umhüllung positiv beeinflusse [Li et al., 2011b]. Die Erforschung der Relevanz des autophagosomalen Kompartiments für die HBV-Morphogenese soll nähere Erkenntnisse bezüglich der Pathogenese erzielen. So besteht die Theorie, dass eine persistierende Aktivierung der Autophagie in chronischen Infektionen einen Einfluss auf die HBV-Pathogenese haben könne [Sir et al., 2010b]. Darüber hinaus könnte ein detailliertes Wissen über die Bedeutung des autophagosomalen Apparates für HBV einen neuen therapeutischen Ansatz für HBV-infizierte Patienten bieten [Tian et al., 2011, Sir and Ou, 2010].

2 Ziel der Arbeit

Das HBV bildet neben infektiösen viralen Partikeln sogenannte SVP (Sphären und Filamente), welche einzig aus den Oberflächenproteinen SHBs, MHBs und LHBs bestehen. [Schädler and Hildt, 2009]. Es wird vermutet, dass sezernierte SVP neutralisierende Antikörper abfangen und den Infektionsprozess positiv beeinflussen [Bruns et al., 1998]. Virionen werden ESCRT-abhängig über MVBs und Sphären „klassisch“ über das ER-Golgi-System ausgeschleust. Erst kürzlich konnte festgestellt werden, dass Filamente – einen erhöhten Anteil an LHBs besitzend – analog zu Virionen die Zelle über MVBs verlassen können [Jiang et al., 2015].

Das HBV induziert autophagosomale Prozesse in der infizierten Zelle [Tian et al., 2011]. Die Autophagie ist essentiell für die Virusreplikation, wenngleich die Replikation selbst nicht in den Autophagosomen stattfindet [Yang et al., 2015] und ihre genaue Bedeutung für den viralen Lebenszyklus noch nicht abschließend aufgeklärt werden konnte. Da bereits diverse Wechselwirkungen des HBV mit zellulären vesikulären Strukturen und intrazellulären Transportwegen bekannt sind, soll im Rahmen dieser Dissertation die Bedeutung der Autophagie für den Lebenszyklus und den Export der Virionen und SVP näher untersucht werden. Hierfür werden die Autophagie-spezifischen Prozesse mit Hilfe verschiedener Substanzen in einer stabil HBV-exprimierenden Zelllinie und entsprechenden Kontrollzellen unterbunden. Zudem werden spezielle Untersuchungen im transient HBV-positiven Zellkultursystem wiederholt.

In vitro wird der Effekt der Autophagieinhibition auf die HBV-Expression analysiert, indem sowohl die intra- als auch extrazelluläre Viruslast quantitativ bestimmt wird, ebenso wird ein möglicher Einfluss auf mRNA-Ebene untersucht. Auf Proteinebene wird die Wirkung auf die extrazelluläre Menge aller Oberflächenproteine sowie der Effekt auf die intrazellulären LHBs-Mengen beurteilt. Um einen möglichen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung sichtbar zu machen, wird die LHBs-Lokalisation in der Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Abschließend werden *in vivo* die intrazellulären Mengen autophagiespezifischer Proteine in Leberzelllysaten sowie ihre subzelluläre Verteilung in immunfluoreszenzmarkierten Gewebeschnitten HBV-positiver Mäuse im Vergleich mit jenen des Wildtyps bestimmt.

Eine Beeinflussung der Exportrouten von Virionen bzw. SVP per Autophagieinhibition könnte eine bedeutende Rolle in der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze darstellen, da die Infektiosität des HBV bei Sekretionsblockade der (sub-)viralen Partikel sehr wahrscheinlich maßgeblich herabgesetzt wäre. Ebenso könnte, nach Identifizierung der für die HBV-Replikation essentiellen Strukturen, eine pharmakologische Beeinflussung der hepatozellulären autophagosomalen Prozesse eine therapeutische Möglichkeit darstellen, welche auch im Hinblick auf das fortwährend hohe globale HBV-Infektionsrisiko von gesteigerter Bedeutung wäre.

3 Material

3.1 Zellen, Tiere, Gewebeprouben

3.1.1 Prokaryotische Zellen

Stamm	Beschreibung	Hersteller
E. coli TOP10	<i>Escherichia coli</i> K12-Stamm, Einsatz in molekularer Subklonierung und Plasmidexpression; Rekombinase A- und Endonuklease A-defizient; Streptomycin-resistent	Life Technologies, Darmstadt

3.1.2 Eukaryotische Zellen

Zelllinie	Beschreibung
HuH7.5	Humane Hepatoblastom-Zelllinie, von HuH7-Zelllinie abstammend [Blight et al., 2002]
HepG2	Humane Hepatoblastom-Zelllinie [Knowles et al., 1980]
HepAD38	Humane Hepatoblastom-Zelllinie, von HepG2-Zelllinie abstammend; 1,2-faches HBV-Genom beinhaltend, pgRNA tet-reguliert [Ladner et al., 1997]

3.1.3 Mäuse

Die transgenen Mäuse mit integriertem 1,3-fachen HBV-Genom entstammten dem Inzuchtstamm C57BL/6. Die als Kontrollgruppe verwendeten Wildtyp-Mäuse zählten zum Inzuchtstamm C57BL/6 [Guidotti et al., 1995, 1996]. Alle verwendeten Mäuse stammten aus der Zentralen Tierhaltung des Paul-Ehrlich-Institutes in Langen. Die Tierversuchsanzeige trug das Aktenzeichen F107/13.

3.2 Plasmide

Plasmid	Eigenschaft	Herkunft
pCEP-Puro-gtA-1.5	1,5-faches HBV-Genom, Genotyp A, Puromycin-Resistenz; Expressionsvektor	Prof. Dr. Glebe, Universität Gießen
pCEP-Puro-gtG-1.5	1,5-faches HBV-Genom, Genotyp G, Puromycin-Resistenz; Expressionsvektor	Prof. Dr. Glebe, Universität Gießen
pEGFP-N1	eGFP-Expressionsvektor	Clontech Laboratories, Heidelberg
pUC18	Kontrollvektor	Life Technologies, Darmstadt

3.3 Oligonukleotide

Alle aufgezählten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers.net GmbH in Ulm synthetisiert. Hierfür wurden die GAPDH- und HBV-spezifischen *Primer* von der Arbeitsgruppe Hildt, Abteilung 2/0, Paul-Ehrlich-Institut, so entworfen, dass alle PCRs unter identischen Bedingungen bei einer *Annealing*-Temperatur von 56 °C genutzt werden konnten.

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Amplikongröße
#42	GAPDH_fwd	gac ccc ttc att gac ctc aac	434 bp
#43	GAPDH_rev	tgg act gtg gtc atg agt cc	
#405	HBV_3.5kb_fwd	ctc caa gct gtg cct tgg g	251 bp
#406	HBV_3.5kb_rev	ccc acc cag gta gct aga g	
	<i>Random Hexamer Primer</i> 0,2 µg/µl (Fermentas, St. Leon-Rot)		

3.4 Antikörper

Die aufgelisteten Primär- und Sekundärantikörper wurden im Falle der Western-Blot (WB) -Analysen wahlweise in 10 % Milchpulver oder 1x Roti-Block verdünnt. Im Bereich der Immunfluoreszenz (IF) wurde eine Verdünnung der Antikörper in 1 % BSA in PBS vorgenommen. Die jeweiligen Verdünnungsfaktoren können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Antikörper	Spezies/ Klonalität	Verdünnung (WB/IF)	Hersteller
Primäre Antikörper			
Anti-β-Aktin	Maus, monoklonal	1:10.000/-	Sigma-Aldrich, Seelze

Antikörper	Spezies/ Klonalität	Verdünnung (WB/IF)	Hersteller
Anti-Hexokinase	Kaninchen, polyklonal	1:250/-	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-Lamin	Kaninchen, polyklonal	1:300/-	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-LC3	Kaninchen, polyklonal	1:1.000/1:100	MBL International, Woburn, USA
Anti-LHBsAg (MA18/7)	Maus, monoklonal	1:600/1:100	Prof. Dr. Glebe, Universität Gießen [Heermann et al., 1984]
Anti-p62	Meerschweinchen, polyklonal	1:1.000/1:200	Progen Biotechnik, Heidelberg
Anti-SHBsAg (HB1)	Maus, monoklonal	1:200/1:100	PD D. Glebe, Universität Gießen
Anti-SHBsAg	Ziege, polyklonal	-/1:100	Abcam, Cambridge, GB
Sekundäre Antikörper			
Anti-Kaninchen IgG-AlexaFluor633	Ziege, polyklonal	-/1:1.000	Life Technologies, Darmstadt
Anti-Kaninchen IgG-Cy3	Esel, polyklonal	-/1:400	Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK
Anti-Kaninchen IgG-HRP	Esel, polyklonal	1:2.000/-	GE Healthcare, Freiburg
Anti-Kaninchen IRDye® 680RD	Esel, polyklonal	1:10.000/-	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Anti-Kaninchen IRDye® 800CW	Esel, polyklonal	1:10.000/-	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Anti-Maus IgG-AlexaFluor488	Esel, polyklonal	-/1:1.000	Life Technologies, Darmstadt
Anti-Maus IgG-HRP	Esel, polyklonal	1:2.000/-	GE Healthcare, Freiburg
Anti-Maus IRDye® 680RD	Esel, polyklonal	1:10.000/-	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Anti-Maus IRDye® 800CW	Esel, polyklonal	1:10.000/-	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Anti-Meerschweinchen IgG-Cy3	Esel, polyklonal	-/1:400	Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK
Anti-Ziege IgG-Alexa Fluor488	Esel, polyklonal	-/1:1.000	Life Technologies, Darmstadt
Anti-Ziege IgG-Alexa Fluor633	Esel, polyklonal	-/1:1.000	Life Technologies, Darmstadt
DAPI (0.1 mg/ml Stock in PBS)		-/1:300	Sigma-Aldrich, Seelze

HRP = *Horseradish Peroxidase* (Meerrettich Peroxidase), CY3 = Cyanin 3

3.5 Größenstandards

Proteinstandards	Hersteller
PageRuler TM Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler TM Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Standards	Hersteller
Gene Ruler TM 1kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

3.6 Enzyme

Enzyme	Hersteller
Klenow-Fragment (DNA-Polymerase-I-Fragment)	Bioline, Randolph, USA
RevertAid TM H Minus Reverse Transcriptase	Fisher Scientific Schwerte
RQ1-DNase I	Promega, Mannheim

3.7 Reagenzien für die Zellkultur

Reagenz	Hersteller
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> ; 4,5 g/l Glukose, ohne L-Glutamin)	BioWhittaker [®] Lonza, Basel, Schweiz
DPBS (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> ; ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Medienküche PEI
FCS (<i>Fetal Calf Serum</i>)	Biochrom, Berlin
H ₂ O ₂	Carl-Roth [®] , Karlsruhe
Hydrokortison (100 mg in PBS)	Sigma-Aldrich, Seelze
Insulin (50 mg in ddH ₂ O)	Sigma-Aldrich, Seelze
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Opti-MEM I	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin

3.8 Inhibitoren

Inhibitor	Inhibition von	Hersteller
Lysosomale Inhibitoren		
Bafilomycin-1 (BFLA-1)	vakuolare H ⁺ -ATPase	Sigma-Aldrich, Seelze
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl), pH 7,4, in Natriumphosphatpuffer	Inhibition der Ansäuerung des Endosoms/Lysosoms	Roth, Karlsruhe
Proteaseinhibitoren		
Leupeptin	Serin-, Cysteinproteasen (4 µM)	Sigma-Aldrich, Seelze
Pepstatin	Saure Proteasen (1 µM)	Sigma-Aldrich, Seelze
PMSF	Serinproteasen (1 mM)	Carl-Roth, Karlsruhe

3.9 Chemikalien

Ein Großteil der verwendeten Chemikalien wurden von Carl-Roth, Karlsruhe, oder Sigma-Aldrich, Seelze, bezogen. Im Folgenden sind hiervon ausgenommene Substanzen aufgelistet:

GenAgarose LE	Genaxxon, Ulm
Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Butanol	VWR International
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Genaxxon, Ulm
dNTP Mix	NEB, Frankfurt am Main
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Formaldehyd 37 %	J. T. Baker, München
peqGOLD TriFast TM	PeqLab, Erlangen
Polyethylenimin (PEI), linear	Polysciences, Warrington, USA
RevertAid TM H Minus RT-Reaktionspuffer (5x)	Fisher Scientific, Schwerte
RQ1-DNase-Stopplösung	Promega, Mannheim
RQ1-RNase-freier DNase-Reaktionspuffer (10x)	Promega, Mannheim
Tween-20	Genaxxon BioScience, Ulm

3.10 Kits

Kit	Hersteller
ELISA-Kits	
Enzygnost HBsAg 6.0 ELISA	Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn
Enzygnost HBeAg 6.0 monoclonal ELISA	Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn
Light Cycler	
Maxima TM SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	Fisher Scientific, Schwerte
Northern Blot	
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Plasmidpräparation	
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Western Blot	
Quick Western Kit - IRDye [®] 680RD	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Zellviabilität	
TACS [®] MTT Cell Proliferation Assay	Trevigen, Helgerman Ct. Gaithersburg, USA

3.11 Geräte

3.11.1 Elektrophorese

Horizontales Elektrophorese-System	GE Healthcare, Freiburg
Hoefer Elektrophorese Power Supply-EPS301	GE Healthcare, Freiburg
Mighty small Multiple Gel Caster SE200 Series	GE Healthcare, Freiburg
Mighty Small II Laufkammer	GE Healthcare, Freiburg
Schleicher und Schuell's Turboblotter	Schleicher & Schuell, Dassel
Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
TE77 ECL-Semi-Dry Transfer Unit	GE Healthcare, Freiburg

3.11.2 Mikroskopie

Axiophot Fluoreszenz Mikroskop	Zeiss, Jena
Axiovert 40C	Zeiss, Jena
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 META)	Zeiss, Jena
Leica, Leitz DM RBE	Leica, Wetzlar

3.11.3 Bildgebung

AGFA Curix60 film developer	Agfa Healthcare, Köln
Hypercassette TM	GE Healthcare, Freiburg
Hyperfilm ECL Chemiluminescence	GE Healthcare, Freiburg
INTAS-Imaging system (Geldokumentation)	Intas, Göttingen
Odyssey [®] Imaging System	LI-COR, Lincoln, USA

3.11.4 Real-Time-PCR

LightCycler [®] 1.5 Instrument	Roche, Mannheim
LightCycler [®] 480 System	Roche, Mannheim

3.11.5 Zentrifugen

Heraeus Cryofuge 8500	Heraeus, Osterode
Heraeus Fresco17 Centrifuge	Thermo Scientific, Schwerte
Heraeus Multifuge 15-R	Heraeus, Osterode

3.11.6 Sonstiges

Analysewaage M-Power	Sartorius, Göttingen
Captair [®]	Erlab®, Köln
Dako Pen	Dako, Dänemark
Dounce-Homogenisator	B. Braun, Melsungen
DU [®] 730 Life Science UV/VIS Spectrophotometer	Beckman Coulter®, Krefeld
Heraeus BBD 6220 (Inkubationsschrank)	Heraeus®, Osterode
HLB 2448 BS	Thermo, Schwerte
Innova [®] 44 (Schüttelinkubator)	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe
Photometer Ultrospec 1100 pro	GE Healthcare

Photometer Ultrospec 3000	GE Healthcare, Freiburg
Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Präzisionswaage M-Power	Sartorius, Göttingen
RCT basic	IKA®, Staufen
SevenEasy TM pH (pH-Meter)	Mettler-Toledo, Gießen
Sonoplus HD 2200	Bandelin, Berlin
SterilGard® III Advance (Sterilwerkbank)	The Baker Company, Sanford, USA
Stuart® Roller mixer SRT6	Bibby Scientific, Staffordshire UK
Stuart® Roller mixer SRT9	Bibby Scientific, UK
Tecan Infinite M1000	Tecan, Schweiz
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Überkopffroller VWR Tube Rotator	VWR International
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasseraufbereiter Milli-Q A10	Millipore, Schwalbach
Wasserbad TW12	Julabo, Seelbach
Z1 TM Coulter Counter® (Zellzähler)	Beckman Coulter®, Krefeld

3.12 Verbrauchsmaterialien

Amersham Hyperfilm TM ECL	GE Healthcare, Freiburg
Biosphere® Pipettenspitzen 0,5-20 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Biosphere® Pipettenspitzen 2-100 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Biosphere® Pipettenspitzen 1250 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Cellstar® 6-Loch-Zellkulturplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® 12-Loch-Zellkulturplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® 96-Loch-Zellkulturplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® Zellkulturflasche T175	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® Messpipette 5 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® Messpipette 10 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® Messpipette 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckgläser, rund, Ø 18 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Deckgläser 24 mm x 50 mm	Menzel, Braunschweig
epT.I.P.S.® Pipettenspitzen 0,5-20 µl	Eppendorf, Hamburg
epT.I.P.S.® Pipettenspitzen 2-200 µl	Eppendorf, Hamburg
epT.I.P.S.® Pipettenspitzen 50-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
FrameStar® 96 PCR Platte für LC 480	GeneON, Ludwigshafen

Hybond-N-Membran	GE Healthcare, Freiburg
Immobilon [®] -P Transfer Membrane	Merck Millipore, Schwalbach
Immobilon TM Western HRP-Substrat	Merck Millipore, Schwalbach
LightCycler Kapillaren (Polycarbonat)	Genaxxon, Biberach
Luminata TM Forte Western HRP Substrat	Merck Millipore, Schwalbach
Objektträger SuperFrost [®]	Carl Roth®, Karlsruhe
Parafilm [®]	Pechiney Plastik Packing, Menasha, USA
Phase Lock Gel Heavy TM , 2 ml	5 Prime, Hilden
Roti [®] -Fluoro PVDF Membran	Carl Roth, Karlsruhe
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
SuperSignal [®] West Pico	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Whatman [®] Filterpapier 3mm	VWR International, Darmstadt
Zellschaber S	TPP, Trasadingen, Schweiz

3.13 Puffer, Lösungen und Medien

Die aufgeführten Puffer und Lösungen wurden mit doppelt deionisiertem Wasser (ddH₂O) aus der MilliQ-Anlage (Firma Millipore) angesetzt. Hiervon abweichendes Prozedere ist vermerkt.

Puffer	
Agarose-Ladepuffer 6x	6x TAE-Puffer 30 % Glycerol (w/v) 0,1 mg/ml Bromphenolblau
Anoden-Puffer I	20 % Ethanol (v/v) 300 mM TRIS (Trisaminomethan)
Anoden-Puffer II	20 % Ethanol (v/v) 25 mM TRIS (Trisaminomethan)
Kathoden-Puffer	20 % Ethanol (v/v) 40 mM 6-Aminocapronsäure
LB-Medium	1 % Trypton (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) 1 % Natriumchlorid (w/v) pH 7,0
Mowiol	10 % Mowiol (w/v) 25 % Glycerol (w/v) 2.5 % DABCO 100 mM TRIS/HCl, pH 8,5

PBS	8,0 g NaCl 0,2 g Kaliumchlorid 1,44 g Na ₂ HPO ₄ 0,24 g KH ₂ PO ₄ pH 7,4 ad 1 l ddH ₂ O
Ponceau S-Lösung	100 ml dH ₂ O 30 ml Eisessig 0,33 g Ponceau S ad 300 ml ddH ₂ O
RIPA-Puffer	50 mM TRIS-HCl, pH 7.2 150 mM NaCl 0,1 % SDS (w/v) 1 % Na-Desoxycholat (w/v) 1 % TritonX-100
SDS-Ladepuffer (4x)	4 % SDS (w/v) 125 mM TRIS-HCl, pH 6,8 10 % Glycerol (v/v) 10 % β-Mercaptoethanol (v/v) 0,02 % Bromphenolblau (w/v)
SDS-Laufpuffer (10x)	0,25 M TRIS 2 M Glycin 1 % SDS (w/v) pH 8,3
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M TRIS 0,4 % SDS (w/v) pH 6,7
TAE-Puffer (50x)	2 M TRIS 1 M Natriumacetat 50 mM EDTA pH 8,0
TBST (10x)	200 mM TRIS-HCl 1,5 M NaCl 0,5 % Tween-20 pH 7,4

Trenngelpuffer (4x)	1,5 M TRIS-HCl 0,4 % SDS (w/v) pH 8,8
Lösungen	
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml
Ethidiumbromid-Stammlösung	1 g Ethidiumbromid ad 100 ml ddH ₂ O
Kanamycin-Stammlösung	25 mg/ml
Medien	
Medium für HuH7.5/HepG2	500 ml DMEM 10 % FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung 2 mM L-Glutamin
Medium für HepAD38	500 ml DMEM 10 % FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung 2 mM L-Glutamin 25 µg Hydrokortison 5 µg Insulin

3.14 Software

Programm	Herausgeber
AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss AG, Jena
GraphPad Prism Version 5.04	GraphPad, USA
Image Studio TM Lite	LI-COR, Lincoln, USA
INTAS GDS	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen
LightCycler [®] Software Version 3.5	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler [®] 480 Software 1.5	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LSM Image Browser	Carl Zeiss AG, Jena
Odyssey Infrared Imaging System 2.1	LI-COR, Lincoln, USA
Photoshop CS6	Adobe, San Jose, USA
Tecan i-control 1.8	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
ZEN 2009/2012	Carl Zeiss AG, Jena

4 Methoden

4.1 Zellbiologie

4.1.1 Prokaryotische Zellkultur

Für Plasmidpräparationen kamen in der vorliegenden Arbeit Zellen des E. coli-Stamms TOP10 zur Herstellung von Flüssigkulturen zum Einsatz. Hierfür wurden Bakterienstämme aus den entsprechenden *glycerol stocks* in LB-Medium angeimpft, zur plasmidkodierten Resistenzselektion wurden dem Kulturmedium je nach Plasmid 100 µg/ml des Antibiotikums Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin zugesetzt. Im Anschluss wurde die Kultur unter aeroben Bedingungen für 16 h bei 37 °C und 200 rpm in einem Inkubationsschüttler inkubiert. Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden 500 µl der Kultur mit 500 µl 100 % Glycerin versetzt und bei -80 °C eingefroren.

4.1.2 Eukaryotische Zellkultur

4.1.2.1 Kultivieren und Passagieren

Die humanen Hepatoblastom-Zelllinien HepAD38, HepG2 und HuH7.5 kamen in dieser Arbeit zum Einsatz. Eine Inkubation der Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Zellinkubator stellten die Rahmenbedingungen dar. Im Falle der Zelllinien HuH7.5 und HepG2 setzte sich das Medium wie folgt zusammen: DMEM mit 4,5 g/l Glukose, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 0,1 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Für die Zelllinie HepAD38 wurde das zuvor beschriebene Komplettmedium mit 5 µg/ml Insulin und 25 µg/ml Hydrokortison ergänzt.

Ein Passagieren der Zellen wurde in der Regel zwei bis drei Mal pro Woche vorgenommen – sobald die adhärent wachsenden Zellen eine Konfluenz von ca. 70 % aufwiesen. Nach Abnahme des verbrauchten Kulturmediums wurde zunächst mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA für 2–5 min bei 37 °C inkubiert, was ein Ablösen der Zellen zur Folge hatte. Durch Zugabe von 10 ml Medium wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden sorgfältig resuspendiert. Die Zellen wurden nun in geeigneter Verdünnung – je nach Zelllinie im Verhältnis von 1:3 bis 1:12 – neu ausgesät.

4.1.2.2 Zellzählung

Vor einem Auslegen der Zellen wurde mit Hilfe des *Z1TM Coulter Counter[®] Cell and Particle Counter* oder einer Neubauer-Kammer eine Zählung vorgenommen.

4.1.3 Transfektion von HuH7.5-Zellen

Die Zelllinie HuH7.5 wurde mit den Plasmiden des gtA und gtG sowie dem Kontrollvektor pUC18 transfiziert. Die Zellen wurden 24 h vor Transfektion in einer Anzahl von $1-2 \times 10^5$ Zellen/Loch in 2 ml Medienvolumen in 6-Loch-Platten ausgelegt. Die Transfektion wurde mit linearem Polyethylenimin (PEI) in einer Konzentration von 1 mg/ml [Ehrhardt et al., 2006] vorgenommen. Hierbei machte das Volumen des Transfektionsansatzes 1/10 des Mediumvolumens aus und das Verhältnis von zu transfizierender DNA zur Menge an eingesetztem PEI betrug 1:6.

Im Speziellen wurde die DNA im erforderlichen PBS-Volumen (1/10 des Mediumvolumens) verdünnt und für 10 s durch Vortexen gemischt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des PEI und ein erneutes Vortexen, dieses Mal für 60 s. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur wurde das Transfektionsgemisch erneut für wenige Sekunden durch Vortexen gemischt und im Anschluss tropfenweise zum Medium gegeben. Durch das Schwenken der Zellkulturplatte erfolgte eine Verteilung des Transfektionsgemisches. Es erfolgte eine Inkubation im Brutschrank, bis nach 16 h ein Mediumwechsel vorgenommen wurde. Insgesamt 48 h nach erfolgter Transfektion wurde entweder eine Ernte der Zellen oder eine Fixation (siehe 4.4.2) ebensolcher durchgeführt.

4.1.4 Autophagieinhibition

Um die Bedeutung der Autophagie für den Lebenszyklus des HBV genauer analysieren zu können, wurde ebendiese durch Zugabe zweier Chemikalien moduliert. Zum Einsatz kamen phosphatgepuffertes Ammoniumchlorid (NH_4Cl) sowie Bafilomycin-1 (BFLA-1). NH_4Cl , welches in einer Konzentration von 50 mM (1 M Stammlösung) zum Einsatz kam, inhibierte die Fusion von Autophagosom und Lysosom durch eine Anhebung des intrazellulären pH-Wertes. Die Wirkung lysosomaler Enzyme wurde blockiert. Die Pufferung des NH_4Cl in Phosphat bei einem pH-Wert von 7,2 sorgte für einen stabilen pH-Wert des Zellkulturmediums [Tanaka et al., 1986]. BFLA-1 wies eine Konzentration von 50 nM auf (10 μM Stammlösung) und verhinderte durch spezifische Hemmung der vakuolären H^+ -ATPase (V-ATPase) [Yamamoto et al., 1998] eine Reifung autophagosomaler Vakuolen. Da eine Ansäuerung von Endosomen und Lysosomen ausblieb, konnten vesikuläre Strukturen wie Autophagosomen und Lysosomen nicht miteinander verschmelzen [Klionsky et al., 2014a]. Die Zelllinien HepAD38 und HepG2 wurden, je nach Zelldichte, 36–48 h nach dem Aussäen für insgesamt 24 h mit einer der zwei Substanzen versetzt. Hierbei wurde nach 8 bzw. 16 h ein Mediumwechsel mit erneuter Zugabe des entsprechenden Inhibitors vorgenommen. Im Falle der Zelllinie HuH7.5 wurde die Inhibition 24 h nach erfolgter Transfektion gestartet. Auch hier wurde für insgesamt 24 h inhibiert, wobei das Medium in diesem Zeitraum einmal unter erneuter Zugabe des Inhibitors getauscht wurde. Als Negativkontrolle wurden in den 6- bzw. 12-Loch-Zellkulturplatten zusätzlich Zellen mitgeführt, an welchen zwar in den entsprechenden Zeiträumen ein Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte, die jedoch mit keiner der beiden Substanzen behandelt wurden. Nach Beendigung des Versuchs wurde der zelluläre Überstand abpipetiert, für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert und in diversen ELISAs sowie in der qRT-PCR näher analysiert (siehe 4.4.1 und 4.2.6).

4.1.5 MTT-Test

Um herauszufinden, ob eine Behandlung der diversen Zelllinien mit NH_4Cl bzw. BFLA-1 einen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Zellen hat, wurde ein MTT-Test durchgeführt. Dieser von Mosmann eingeführte Zellviabilitätstest beruht auf einer Reduktion des gelben, wasserlöslichen Tetrazoliumsalses 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid (MTT) in wasserunlösliches, blau-violettes Formazan [Denizot and Lang, 1986, Barltrop et al., 1991]. Die reduktive Spaltung des Tetrazoliumringes kann nur in Anwesenheit mitochondrialer Dehydrogenasen – und somit nur in lebenden Zellen – erfolgen. Die im Anschluss messbare Menge des Formazans verhält sich direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Der Test stellt eine hoch präzise, quantitative, kolorimetrische Methode zur Bestimmung von Zytotoxizität und Zellproliferation dar [Mosmann, 1983, Ferrari et al., 1990, Gerlier and Thomasset, 1986].

Im Detail wurden HepAD38-Zellen in einer Zellzahl von 4×10^4 Zellen/ml und HepG2-Zellen in einer Zellzahl von 3×10^4 Zellen/ml, jeweils in Duplikaten, in einer 96-Loch-Platte in normalem Wachstumsmedium ausgesät. Der erste Schritt des MTT-Tests erfolgte 24 h nach dem Aussäen der Zellen. Es wurden 100 μl frischen, phenolrotfreien Mediums (OptiMEM) – um eine Absorptionsbeeinflussung während der späteren Messung zu verhindern [Denizot and Lang, 1986] – sowie 10 μl der 12 mM-MTT-Stocklösung pro Loch auf die Zellen getropft, welche anschließend für 4 h bei 37 °C inkubiert wurden. Im zweiten Schritt wurden 100 μl einer 0,01 M SDS-HCl-Lösung zugegeben und durch gründliches Mischen verteilt. Erneut erfolgte eine Inkubation für 4 h bei 37 °C. Letztlich wurde, nach gründlichem Resuspendieren zur Auflösung der dunkelblauen Kristalle, die Absorption bei 570 nm am Tecan Reader gemessen. Die einzelnen Schritte entsprachen den Empfehlungen des Herstellers [Trevigen, 2009].

4.1.6 Ernte und Lyse eukaryotischer Zellen

4.1.6.1 Proteinlysate für Western-Blot-Analysen

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurde zunächst das Medium aus den 6-Loch-Platten entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zum Ablösen der Zellen wurden pro Loch 200 μl RIPA-Puffer (siehe 3.13) unter Zusatz von Proteaseinhibitoren (siehe 3.8) verwendet. Nach 15 min Inkubationszeit wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers abgelöst, resuspendiert und in ein 1,5 ml fassendes Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde zweimal für je 10 s sonifiziert und später für 10 min bei 13.300 rpm und 4 °C zentifugiert. Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde nun ein Bradford-Assay (siehe 4.3.1) durchgeführt.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Da die Agarose-Gelelektrophorese eine Auftrennung von DNA- und RNA-Molekülen entlang ihrer jeweiligen Größe zulässt, wurde diese Methode zur Qualitätsbestimmung gewonnener Nukleinsäuren eingesetzt. Hierfür wurde 1–2 % (w/v) Agarose in kochendem TAE-Puffer aufgelöst. Zur späteren Detektion der Nukleinsäure-Moleküle wurde der flüssigen Agarose nach einer gewissen Abkühlphase 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Anschließend wurde die Agarosemischung zum Aushärten in einen Plastikschlitten mit eingehängtem Kamm gegossen. In der Zwischenzeit wurden 1–10 µl der zu analysierenden RNA- bzw. DNA-Proben mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt, das übrige Volumen wurde mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Der Schlitten mitsamt ausgehärtetem Agarosegel wurde in eine horizontale Gelelektrophoresekammer überführt und die vorbereiteten DNA- bzw. RNA-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Um eine spätere Bestimmung der Fragmentgröße zu ermöglichen, wurde in einer freien Tasche ein entsprechender Größenstandard mitgeführt (siehe 3.5). Die Nukleinsäuremoleküle wurden nun elektrophoretisch aufgetrennt. Da der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid die Eigenschaft besitzt, sich unspezifisch in DNA bzw. RNA einzulagern, konnten die Nukleinsäurefragmente abschließend mit Hilfe eines UV-Transilluminators (Wellenlänge 254/365 nm) im Gel visualisiert werden [Sharp et al., 1973]. Eine Dokumentation wurde letztlich über das INTAS-Imaging-System vorgenommen.

4.2.2 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Mithilfe des Ultraspec 1100 pro von GE Healthcare wurde anhand der vorhandenen aromatischen Gruppen eine photometrische Messung der Nukleinsäurekonzentration vorgenommen. Hierbei wurde die Extinktion bei der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm (E_{260}) bestimmt. Eine Extinktion von 1,0 weist auf eine Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger RNA hin. Zur Charakterisierung des Reinheitsgehalts der Nukleinsäuren wurde zusätzlich die Extinktion bei der Wellenlänge $\lambda = 280$ nm (E_{280}) gemessen. Reine DNA-Proben weisen einen Wert von 2,8 auf, reine RNA-Proben zeigen einen Wert von 2,0. Sind die Nukleinsäuren durch Proteine oder Phenole verunreinigt, ergeben sich niedrigere Werte. Zur weiteren Bestimmung möglicher Kontaminationen kann die Bestimmung der Wellenlänge $\lambda = 230$ nm (E_{230}) dienen. So ergibt sich bei dem Verhältnis von E_{260}/E_{230} ein Wert $\geq 2,0$ bei reinen Proben. Liegen niedrigere Werte vor, so weist dies wiederum auf eine mögliche Verunreinigung mit Kohlenhydraten, Peptiden, Phenolen oder aromatischen Verbindungen hin.

4.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Entsprechend der Angaben des Herstellers kam das Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen zum Einsatz, um eine Isolation von Plasmid-DNA vorzunehmen. Das Verfahren beruht auf einer alkalischen Lyse

der Bakterien, wobei die vorhandenen Proteine denaturiert und durch Zentrifugation aus der Lösung entfernt werden. Im Anschluss wird die sich im Überstand befindliche Plasmid-DNA über eine Anionenaustauschsäule aus dem Lysat gefiltert, gereinigt und in Wasser eluiert [Birnboim and Doly, 1979]. Für die beschriebenen Schritte wurden 300 ml einer Übernachtskultur benötigt, welche zuvor für 20 min bei 5000 rpm und 4 °C in einer Heraeus Sepatech Cyrofuge 8500 zentrifugiert wurde. Zur Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA wurde die spezifische Absorption (siehe 4.2.2) gemessen. Zur genaueren Qualitätseinschätzung wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 4.2.1) durchgeführt. Eine Lagerung der so überprüften DNA erfolgte bei -20 °C.

4.2.4 RNA-Isolierung

Zur Gewinnung zellulärer RNA wurde die Substanz PeqGOLD TriFastTM von PEQLAB Biotechnologies verwendet. Die Methode basiert auf einer Ein-Schritt-Flüssigphasenseparation [Chomczynski and Sacchi, 1987]. So wurden 5×10^5 Zellen/Loch der Zelllinie HepAD38 sowie 3×10^5 Zellen/Loch der Zelllinie HepG2 in 6-Loch-Platten ausgelegt. Die Zellen wurden wie beschrieben (siehe 4.1.4) für 24 h behandelt, eine Kontrollgruppe wurde unbehandelt mitgeführt. Im Anschluss wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und jedes Loch der 6-Loch-Platte mit 500 µl Trizol überschichtet. In den folgenden 15 min, bei einer Lagerung der Platten auf Eis, fand eine Auflösung der zellulären Bestandteile statt, während das Trizol die Integrität der RNA bewahrte. Nachfolgend wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers von ihrem Untergrund gelöst und der Inhalt jeweils zweier Löcher einer Zellkulturplatte wurde in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß vereinigt. Nach einer Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde zum Entfernen der Zelltrümmer ein Zentrifugationsschritt bei $12.000 \times g$ und 4 °C für 5 min vorgenommen. Der in ein neues Reaktionsgefäß überführte Überstand wurde mit 200 µl Chloroform versetzt, für 15 s durch Vortexen gemischt und für 2–3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Überstand in PhaseLocksTM gefüllt und bei $12.000 \times g$ und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die die RNA enthaltende obere Phase, mit 500 µl Isopropanol vermischt, wurde für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend für 30 min bei $12.000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Das somit gewonnene Pellet wurde zweimal mit 75%-igem Ethanol in DEPC-ddH₂O gewaschen und für je 10 min bei $12.000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Letztlich wurde das Pellet getrocknet und je nach Größe in 15–40 µl DEPC-ddH₂O resuspendiert. Zur Konzentrations- und Qualitätsbestimmung schlossen sich nach erfolgter RNA-Isolierung eine photometrische Messung (siehe 4.2.2) und eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 4.2.1) an. Anhand der Gelelektrophorese wurde die Integrität der extrahierten RNA bestätigt, indem die einzelnen ribosomalen Untereinheiten (28 S-, 18 S-, 5 S-rRNA-Banden) überprüft wurden. Nach dieser Qualitätsüberprüfung wurden die entsprechenden Proben für weiterführende Experimente verwendet.

4.2.5 cDNA-Synthese

Gewonnene zelluläre RNA (siehe 4.2.4) wurde einem DNase-Verdau unterzogen, um mögliche DNA-Kontaminationen zu eliminieren. Der folgende Ansatz wurde pipettiert und anschließend für 60 min bei 37 °C inkubiert.

RNA	5 µg
RQ1-DNase-Reaktionspuffer (10x)	1 µl
RQ1-DNase	1 µl
DEPC-ddH ₂ O	ad 10 µl

Im Folgenden wurde der Ansatz um je 1 µl RQ1 DNase Stop Solution ergänzt und die DNase durch 15-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Nun folgte eine Zugabe von je 1 µl Random Hexamer Primer und eine weitere Inkubation für 15 min bei 65 °C, um ein Anlagern der Primer zu gewährleisten. Weitere Pipettierschritte schlossen sich zum Start der Reverse-Transkriptase-Reaktion wie folgt an:

Reverse Transkriptase Puffer (5x)	4 µl
dNTP-Mix (10 mM)	2 µl
RevertAid TM H Minus Reverse Transkriptase	1 µl
DEPC-ddH ₂ O	1 µl

Einer 10-minütigen Inkubationsphase bei Raumtemperatur schloss sich eine 60-minütige Inkubation bei 42 °C an. Ein Stopp der Reaktion wurde durch eine Erhitzung des Ansatzes auf 72 °C für 10 min gewährleistet, worauf sich eine Abkühlphase auf Eis anschloss. Sämtliche beschriebenen Inkubationen erfolgten im Thermomixer bei 450 rpm. Eine Analyse der gewonnenen cDNA erfolgte in Form einer PCR-Amplifikation (siehe 4.2.6).

4.2.6 Quantitative *Real-Time*-PCR

Eine Quantifizierung von DNA-Sequenzen kann durch das Einlagern eines DNA-bindenden, fluoreszierenden Farbstoffes während der Bildung doppelsträngiger DNA ermöglicht werden. Dieses Prinzip kommt bei der quantitativen *Real-Time-Polymerase Chain Reaction* (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, qRT-PCR) zum Einsatz. Die Fluoreszenz steigt hierbei proportional zur Menge an amplifizierter DNA, die Zunahme der Fluoreszenz wird nach jedem qRT-PCR-Zyklus gemessen. Um eine Aussage über die Quantität der DNA treffen zu können, wird die gemessene Fluoreszenzintensität mit jener definierter Standardverdünnungen verglichen.

Zum Einsatz kamen das Light Cycler[®] 1.5-System und das Light Cycler[®] 480-System von Roche. Im Speziellen wurde die hergestellte cDNA oder der gewonnene zelluläre Überstand der HepAD38- sowie HepG2-Zellen mit nukleasefreiem ddH₂O im Verhältnis 1:10 verdünnt und wie folgt im MaximaTM SYBR Green qPCR-Kit von Fermentas eingesetzt:

Maxima TM SYBR Green qPCR-Master Mix (2x)	5 µl
Primer <i>forward</i> (10 µM)	0,25 µl
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	0,25 µl
cDNA Template (1:10)	3 µl
ddH ₂ O (<i>ultrapure</i>)	ad 10 µl

Eine Normalisierung jeder Probe auf GAPDH wurde vorgenommen. Die nachfolgenden Schritte wurden im qRT-PCR-Programm durchlaufen:

Programm	Temperatur (°C)	Haltedauer (s)	Temperatur- anstieg/-abfall (°C/s)	Datener- fassung	Wiederho- lungen
Denaturierung	95	600	20	keine	1
PCR-Zyklen	95	15	20	keine	45
	56	30	20	keine	
	72	30	5	nach jedem Zyklus	
Schmelzen	95	60	20	keine	1
	60	30	20	keine	
	95	0	0,1	kontinuierlich	
Kühlen	40	30	20	keine	

4.2.7 Northern Blot

Ein Northern Blot ermöglicht die Analyse einer RNA-Probe, indem spezifische RNA-Moleküle detektiert werden können. Das Grundprinzip beruht auf einer Separierung der RNA-Moleküle entlang ihrer Größe durch eine Gelelektrophorese und einem anschließenden Transfer der RNA vom Gel auf eine Blotting-Membran. Die Membran wird schließlich mit einer speziell designten, radioaktiv markierten DNA-Sonde behandelt, welche sich mit komplementären Sequenzen an spezifische RNA-Fragmente auf der Membran legen kann. Die hier eingesetzte Sonde wurde zuvor mittels Restriktion aus einem entsprechend klonierten gentechnisch veränderten pUC-Plasmid (Vorarbeiten der AG Hildt) gewonnen. Sie basierte auf einem Bereich der HBx-DNA des Genotyps D, Serotyp ayw, und umfasste 465 bp. Eine Detektion der spezifischen RNA-Moleküle schloss sich an den Hybridisierungsprozess an.

Im Detail wurden 5–10 µg einer RNA-Probe über ein 1,5%-formaldehydhaltiges 1,2%iges Agarosegel entlang ihrer Größe aufgetrennt. Die Übertragung der RNA-Fragmente erfolgte mithilfe des Kapillarblot-Systems Turboblotter von Schleicher und Schuell auf eine Hybond-N-Membran (Amersham). Die radioaktive Markierung der DNA-Sonden wurde mit [$\alpha^{32}P$]dCTP (3000 Ci/mmol) unter Verwendung eines Klenow-Fragments (5 U/µl) (Bioline) vorgenommen. Es kamen hierfür 30–80 ng DNA zum

Einsatz, welche für 5 min bei 95°C hitzedenaturiert und anschließend auf Eis inkubiert wurden. Der nachfolgende Ansatz zeigt die Bestandteile zur radioaktiven Markierung im Detail:

HBx-spezifische DNA-Sonde, hitzedenaturiert	30–80 ng
Klenow-Fragment-Puffer (10x)	5 µl
dATP/dTTP/dGTP (0,5 mM)	2 µl
Random Primer (500 ng/µl)	1 µl
Klenow-Fragment	1 µl
Radiomarkiertes [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP	5 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Nach einer Inkubation des Ansatzes für 1 h bei 37 °C wurden die radioaktiv markierten Sonden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt. Entsprechend der Herstellerangaben erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei 65 °C mit Roti[®]-Hybri-Quick (Roth). Am nächsten Tag schlossen sich mehrere Waschschriffe der Membran an, 10 min mit erhitztem Waschpuffer I und zweimal für jeweils 10 min mit erhitztem Waschpuffer II bei 65 °C. Nach dem Einschweißen der Membran wurde sie bei -80 °C auf einem Röntgenfilm (Amersham) exponiert; die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte im AGFA Curix60 film developer. Der Röntgenfilm wurde eingescannt und anschließend mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ densitometrisch quantifiziert. Hierbei wurden die Intensitäten der einzelnen Northern-Blot-Banden in Relation zu der Intensität der Standard-Bande (HepAD38 unbehandelt, Intensität = 1) gesetzt.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Proteinquantifizierung mittels Bradford-Assay

Der Bradford-Assay ermöglicht eine photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen auf Basis einer Absorptionsänderung des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250. Durch die Ausbildung von Bindungen zwischen dem Farbstoff und kationischen sowie unpolaren Seitenketten von Proteinen in saurer Umgebung verschiebt sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffs von $\lambda = 465$ nm (rot) nach $\lambda = 595$ nm (blau) [Bradford, 1976].

Nachdem die Proteinlysate im Verhältnis 1:200 mit der Bradford-Reagenz gemischt und in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert wurden, erfolgte nach einer fünfminütigen Inkubationszeit in Dunkelheit bei Raumtemperatur die Analyse am Tecan Reader Infinite M1000 durch Messung der Absorption bei $\lambda = 595$ nm. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde zeitgleich eine Protein-Standardreihe (0,5–10 µg/µl BSA) analysiert.

4.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyamid-Gelelektrophorese nach Laemmli ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen anhand ihrer molekularen Größe [LAEMMLI, 1970]. Es wurden zunächst 100 µg

der zu untersuchenden Proteinlysate mit dem Detergenz 4x SDS-Probenpuffer (*Sodium Dodecyl Sulfate*, Natriumdodecylsulfat) versetzt und zur Denaturierung für 20 min bei 95 °C erhitzt. Im Anschluss wurden die Proben in die Taschen eines SDS-Gels aufgetragen, welches in eine vertikale Gelelektrophoresekammer eingespannt war. Ein solches Gel besteht aus einem oberen Sammelgel zur Konzentrierung der Proteine und einem Trenngel, in welchem die mit SDS beladenen, reduzierten und denaturierten Proteine der Größe nach aufgetrennt werden. Die Zusammensetzung der Gele ist nachfolgend aufgelistet, wobei die Konzentration des Trenngels in Abhängigkeit des Molekulargewichtes der Proteine ausgewählt wurde.

Sammelgel	4 %	Trenngel	8 %	10 %	12 %	14 %
Rotiphorese 40 (29:1)	6 ml	Rotiphorese 40 (29:1)	16 ml	20 ml	24 ml	30 ml
Sammelgelpuffer (4x)	15 ml	Trenngelpuffer (4x)	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml
H ₂ O	39 ml	H ₂ O	44 ml	40 ml	36 ml	32 ml
TEMED	40 µl	TEMED	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl
APS	SSP	APS	800 µl	800 µl	800 µl	800 µl

Die Geschwindigkeit, mit der ein Protein durch das Gel wandert, korreliert mit seiner jeweiligen Molekülgröße. Dies bedeutet, dass ein kleines Protein schneller wandert und somit eine weitere Strecke im Gel zurücklegt als ein Protein mit höherem Molekulargewicht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 V, solange die Proteine sich im Sammelgel befanden bzw. bei 120 V, sobald sie das Trenngel erreicht hatten.

4.3.3 Western-Blot-Analyse

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer molekularen Größe in der SDS-PAGE (siehe 4.3.2) wurden die Proteine aus dem SDS-Gel mithilfe eines gerichteten Stromflusses auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Proteine blieben aufgrund starker hydrophober Wechselwirkungen an der Membran haften. Der Blotting-Prozess erfolgte im *semi-dry* Verfahren [Kyhse-Andersen, 1984] unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems für 1 h bei 1,3 mA/cm² [Towbin and Gordon, 1984]. Gearbeitet wurde mit in verschiedenen Puffersystemen getränkten Whatman-Filterpapieren und einer in Methanol aktivierten PVDF-Membran nach dem in Abbildung 4.1 demonstrierten Schema.



Abb. 4.1: Aufbau eines Western Blots: Direkt auf der Anode werden vier in Anodenpuffer I getränkte Whatman-Papiere angeordnet. Es folgen zwei in Anodenpuffer II getränkte Whatman-Papiere. Nun folgen die in Methanol aktivierte PVDF-Membran, das SDS-Gel sowie sechs in Kathodenpuffer getränkte Whatman-Papiere. Die Kathode schließt den Western Blot ab [Eisenreich, 2009].

Nach dem Transfer der Proteine wurden durch Inkubation in 1x Roti[®]-Block bzw. in 10 % Milchpulver in TBST für 1 h unspezifische Antikörperbindungsstellen abgesättigt. Die nachfolgend zum Einsatz gekommenen Antikörperverdünnungen wurden entsprechend in 1x Roti[®]-Block oder 10 % Milchpulver in TBST angesetzt. Eine Inkubation mit dem primären Antikörper, welcher an das zu detektierende Protein bindet, erfolgte für 90–120 min bei Raumtemperatur. Zum Entfernen unspezifisch gebundener Antikörper schloss sich eine Waschphase mit TBST für 30–45 min an, wobei das TBST alle 5–10 min gewechselt wurde. Es schloss sich eine 90 min währende Inkubation mit einem gegen den Primäantikörper gerichteten Fluorophor- oder Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper bei Raumtemperatur an. Im Anschluss wiederholte sich der Waschvorgang zu gleichen Bedingungen. Eine Detektion der Antikörperbindungen wurde mit dem Odyssey System von Licor oder mit dem ECL-System unter Verwendung von Röntgenfilmen (Amersham) an einem automatischen Filmentwickler vorgenommen. Die Röntgenfilme wurden per Scanner digitalisiert, bei Verwendung des Odyssey Systems lagen direkt digitale Daten vor. Die anschließende quantitative Auswertung der WB-Analysen erfolgte mithilfe des Programms ImageJ. Hierfür wurden die Intensitäten der einzelnen WB-Banden bestimmt und in Relation zu der Intensität der Standard-Bande (HepAD38 unbehandelt, Intensität = 1) gesetzt.

4.4 Immunologische Methoden

4.4.1 Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay (ELISA)

Der Begriff *Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay* beschreibt ein immunologisches Verfahren zum spezifischen Protein- bzw. Proteinfragmentnachweis im zellulären Überstand. In dieser Arbeit kamen ELISA nach dem sogenannten *Sandwich*-Verfahren zum Einsatz. Das zu bestimmende Protein aus der Probe hat hierbei an einen auf einer Mikrotiterplatte gekoppelten, spezifischen Antikörper gebunden. Nach einem zwischengeschalteten Waschschritt zur Entfernung unspezifisch gebundener Antigene hat ein zweiter, nun Peroxidase-konjugierter, monoklonaler Antikörper an ein weiteres Epitop des zu untersuchenden Proteins gebunden. Die Anwesenheit eines farbstoffhaltenden Konjugates

bewirkte nach Substratzugabe über eine Peroxidase-Reaktion einen Farbumschlag von blau zu gelb. Die Intensität der Farbreaktion war hierbei proportional zur Menge des gebundenen Proteins und konnte photometrisch am Tecan Reader Infinite M1000 bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm ausgewertet werden. Die zum Einsatz gekommenen ELISA dienten dem Nachweis von HBs- und HBe-Antigenen und wurden entsprechend der Angaben des Herstellers Siemens Healthcare durchgeführt. Zur vergleichenden Darstellung der Ergebnisse wurde der Quotient aus den Rohwerten (*Relative Light Units*) und dem *Cut-Off* (Mittelwert der drei Negativkontrollen + 0,05) gebildet und als Signal-zu-cut-off (*s/co*) präsentiert.

4.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Zur Beurteilung der intrazellulären Proteinverteilung wurde eine Markierung permeabilisierter Zellen mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern vorgenommen, ihre Signale wurden detektiert. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zelllinien HepAD38 und HepG2 wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen in mit Deckgläschen (18 mm Durchmesser) ausgelegten 12-Loch-Platten ausgelegt. Nach entsprechender Inhibition (siehe 4.1.4) für 24 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und für 20 min mit 4 % Formaldehyd in PBS fixiert. Zum Entfernen von Rückständen wurde dreifach mit PBS gewaschen, anschließend wurden die Zellen mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 in PBS für 10 min permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte eine Inkubation mit 1 % (w/v) BSA in PBS für 1 h, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit einem in 10 % BSA in TBST verdünnten primären Antikörper für 1 h lichtgeschützt in einer feuchten Kammer. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS zum Entfernen überschüssiger Antikörperreste wurde für 1 h die Inkubation mit einem sekundären Antikörper vorgenommen, welcher zuvor in 10 % BSA in TBST verdünnt wurde. Zusätzlich zum sekundären Antikörper wurde dem Ansatz die Substanz 4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ zugesetzt, um die Zellkerne darstellen zu können. Nach dem Einbetten der Deckgläschen in Mowiol auf Objektträgern wurde eine Auswertung der Präparate an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510, Zeiss) vorgenommen (siehe 4.5.1).

4.5 Mikroskopie

4.5.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Zur Analyse Fluoreszenz-markierter Proteine hinsichtlich ihrer Menge und Verteilung in der Zelle wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510, Zeiss) eingesetzt. Dieses Mikroskop zeichnet sich dadurch aus, dass es nur emittiertes Licht einer Ebene detektiert. Licht aus anderen Ebenen wird durch eine konfokal zur Fokusebene angeordnete Lochblende herausgefiltert, wodurch sich ein deutlich exakteres und schärferes Bild der intrazellulären Verhältnissen ergibt. In den zu untersuchenden Präparaten wurden die fluoreszenzmarkierten Proteine mit Licht spezifischer Wellenlänge angeregt.

Das Präparat wurde sequentiell abgerastert, die im *Photomultiplier* detektierten Lichtemissionen wurden auf einen angeschlossenen Computer übertragen und mit der LSM Image Browser Software ausgewertet. Durch das Zusammenfügen mehrerer gescannter Ebenen ergab sich letztlich ein präzises, dreidimensionales Bild des Zellinneren [Claxton et al., 2006].

4.6 Charakterisierung HBV-transgener Mäuse

4.6.1 Identifizierung HBV-transgener Mäuse

Zur eindeutigen Unterscheidung HBV-transgener und nicht-transgener Mäuse wurde den Tieren im Alter von 4–6 Wochen Blut aus der *Vena caudalis mediana* entnommen. Eine zusätzliche Blutentnahme zur weiteren Serumanalyse erfolgte bei den getöteten Mäusen durch Herzpunktion. Das Vollblut wurde zur Gerinnungshemmung mit 50 µl EDTA (0,5 M Stammlösung) versetzt, für 10 min bei 1.500 rpm zentrifugiert und als Serum bei -20 °C aufbewahrt. So konnte das gewonnene Serum in einem HBsAg-ELISA näher analysiert werden (siehe 4.4.1). Darüber hinaus wurde den Mäusen die Schwanzspitze abgesetzt, um das Transgen mit HBV-spezifischen Primern in einer qRT-PCR nachzuweisen (siehe 4.2.6).

4.6.2 Entnahme der Leber

Nach dem Töten der Mäuse durch zervikale Dislokation während einer CO₂-Narkose wurde die Bauchhöhle mit einem Schnitt in der Linea alba eröffnet und die Leber entnommen. Zur Herstellung von Paraffinschnitten wurde ein Teil des Lebergewebes in 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert und bei 4 °C gelagert. Das Lebergewebe, welches zur Gewinnung von Proteinlysaten verwendet werden sollte, wurde auf einem vorgekühlten Metallblock schockgefroren, zerkleinert und bei -80 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

4.6.3 Präparation von Leberlysaten

Das schockgefrorene, zerkleinerte Lebergewebe wurde mit 1 ml RIPA-Puffer versetzt und mithilfe eines Dounce-Homogenisators (Braun, Melsungen) lysiert. Nach dem Sonifizieren der Proben und einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 13.300 rpm konnte die Proteinkonzentration im Bradford-Assay (siehe 4.3.1) ermittelt werden. Eine anschließende Verwendung der Leberlysate fand in der SDS-PAGE Gelelektrophorese sowie der WB-Analyse statt (siehe 4.3.2 und 4.3.3).

4.6.4 Histologie

Native Paraffinpräparate der Mäuselebern wurden freundlicherweise von Frau M. Wingerter unter der Leitung des Herrn Dr. Plesker aus der Abteilung 4/ZT des Paul-Ehrlich-Institutes in Langen hergestellt.

4.6.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

An einem Teil der Leberpräparate wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer von Frau M. Wingerter aus der Abteilung 4/ZT des Paul-Ehrlich-Institutes in Langen vorgenommen.

4.6.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz an Leberpräparaten

Um einen Überblick über die intrazellulären Proteinverteilungen und -mengen im Mausmodell zu erlangen, wurden auf Objektträgern befindliche, in Paraffin eingebettete, murine Leberpräparate mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Zu Beginn wurden die Leberschnitte durch aufeinanderfolgendes Inkubieren in Färbeküvetten für 15 min in Xylol, für 10 min in 99 % Ethanol und für weitere 10 min in 75 % Ethanol deparaffiniert. Im Anschluss wurde für weitere 5 min in ddH₂O gewaschen. Die Inkubation für 30 min in 3,7 % Wasserstoffperoxid in Methanol diente der Reduktion der Autofluoreszenz der Leberzellen. Unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden anschließend durch Inkubation für 1 h in 10 % BSA in 1 × TBST abgesättigt. Eine Umrandung der Leberschnitte wurde mit einem *Dako Pen* (Dako, Glostrup, Dänemark) vorgenommen, worauf sich eine einstündige Inkubation mit – je nach Präparatgröße – 50 bis 100 µl primären Antikörpers in einer feuchten Kammer anschloss. Nach einem dreifachen Waschprozess mit 1 × TBST erfolgte eine einstündige Inkubation der Leberproben mit fluoreszenzgekoppeltem sekundären Antikörper, ergänzt durch eine Zugabe des Farbstoffs DAPI in einer Konzentration von 1 µg/µl zur Kenntlichmachung der Zellkerne. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 1 × TBST wurden die Objektträger über eine Schicht Mowiol mit Deckgläschen versehen. Eine Analyse der nun indirekt immungefärbten Leberschnitte erfolgte am cLSM (siehe 4.5.1).

4.7 Statistik

Die gemessenen Ergebnisse wurden, soweit nicht anders vermerkt, als Mittelwerte (\pm SD; *standard deviation*) dargestellt. Signifikanzen zwischen den einzelnen Messergebnissen wurden mithilfe des Analyse-Programms GraphPad Prism unter Verwendung geeigneter Testmethoden (*two-way ANOVA*) ermittelt. Eine Darstellung der statistischen Signifikanz wurde in den Abbildungen anhand der p-Werte vorgenommen: **** $\equiv p \leq 0,0001$; *** $\equiv 0,0001 < p \leq 0,001$; ** $\equiv 0,001 < p \leq 0,01$; * $\equiv 0,01 < p \leq 0,05$; n.s. (nicht signifikant) $\equiv p > 0,05$. Eine statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte bei einer Experimentanzahl ≥ 3 und wurde in die entsprechenden Abbildungen integriert.

5 Ergebnisse

5.1 Beurteilung des zytotoxischen Potenzials von NH_4Cl und BFLA-1

Um die Bedeutung des autophagosomalen Kompartiments für den Lebenszyklus des HBV genauer analysieren zu können, wurden die intrazellulären Autophagie-spezifischen Prozesse über einen Zeitraum von 24 Stunden blockiert. Zur Klärung, ob die im Anschluss beobachteten intra- und extrazellulären Effekte tatsächlich auf die vorgenommene Modulation der Autophagie – und nicht auf mögliche zytotoxische Effekte der zum Einsatz gekommenen Substanzen – zurückzuführen sind, wurde ein Zellviabilitätstest durchgeführt (siehe 4.1.5). Hierfür wurden HBV-stabile HepAD38-Zellen sowie HBV-negative HepG2-Zellen zweimal innerhalb von 24 h mit 50 mM NH_4Cl bzw. 50 nM BFLA-1 behandelt. Unbehandelte Zellen beider Zelllinien dienten der Kontrolle. Die Absorptionswerte der unbehandelten Kontrollzellen dienten als Referenz und wurden mit 1 gleichgesetzt, die Messwerte der behandelten Zellen wurden hierauf standardisiert. Die Mittelwerte der Absorption sind inklusive ihrer Standardabweichung aufgeführt. Der Test wurde zweimalig durchgeführt ($n = 2$).

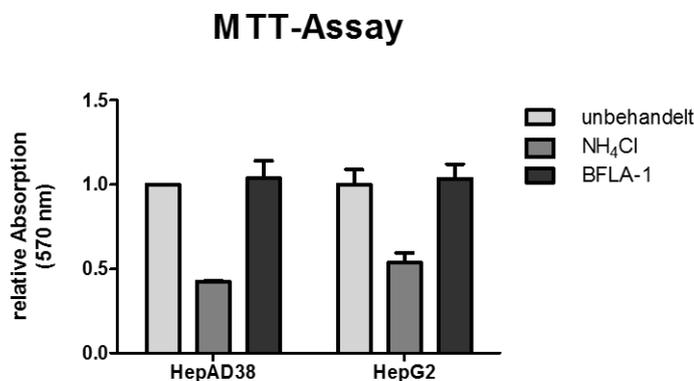


Abb. 5.1: MTT-Zellviabilitätstest unter Einfluss verschiedener Autophagie-Inhibitoren. Zur Inhibition der Autophagie wurden die Zellen in einem Zeitraum von 24 Stunden zweimal mit 50 mM NH_4Cl oder 50 nM BFLA-1 behandelt. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen. Im Anschluss wurden die Zellen zunächst mit MTT-Lösung, danach mit SDS-HCl-Lösung inkubiert, bevor die Absorption der jeweiligen Ansätze bei 570 nm bestimmt wurde. Die Absorptionswerte der unbehandelten Zellen beider Zelllinien dienten als Referenz (jeweils = 1 gesetzt). Dargestellt sind die referenznormierten Absorptionswerte unter Berücksichtigung der Standardabweichung. Der Test wurde zweimalig durchgeführt ($n = 2$).

Wie in Abbildung 5.1 ersichtlich, zeigen die mit NH_4Cl versetzten Zellen eine deutliche Reduktion der gemessenen Fluoreszenz. Diese Beobachtung spricht für einen nicht unerheblichen zytotoxischen

Effekt der NH_4Cl -Inkubation. Im Gegensatz dazu sind die Absorptionswerte der mit BFLA-1 behandelten Zellen vergleichbar mit jenen der unbehandelten Kontrollzellen; dies deutet auf einen ähnlich hohen Anteil an lebenden Zellen hin. Das sich andeutende divergierende zytotoxische Potenzial der verschiedenen Inhibitoren in dem durchgeführten Behandlungsprotokoll muss in der Auswertung der nachfolgenden Untersuchungsmethoden berücksichtigt werden und wurde hierfür in den nachfolgenden Abbildungen in den jeweiligen Legenden ergänzt.

5.2 Unveränderte Mengen HBsAg nach Inhibition der Autophagie

Um zu klären, ob die Inhibition der Autophagie in einer Mengenänderung der freigesetzten (sub-)viralen Partikel resultiert, wurden mehrere HBsAg-ELISA (siehe 4.4.1) durchgeführt. Die ausgelegten HBV-stabilen HepAD38-Zellen und die der Kontrolle dienenden HBV-negativen HepG2-Zellen wurden hierfür zweimal in einem Zeitraum von 24 h mit 50 mM NH_4Cl bzw. 50 nM BFLA-1 versetzt. Im Anschluss wurde zur Analyse der Freisetzung viraler und subviraler Partikel ein HBsAg-ELISA mit dem fünffach in PBS verdünnten zellulären Überstand durchgeführt. Insgesamt wurden sechs voneinander unabhängige Experimente durchgeführt ($n = 6$), deren Mittelwerte auf den Proteingehalt der Zellysate der entsprechenden Proben bezogen und grafisch dargestellt wurden. Die Standardabweichung wurde berücksichtigt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte der unbehandelten HepAD38-Kontrollzellen auf 1 normiert.

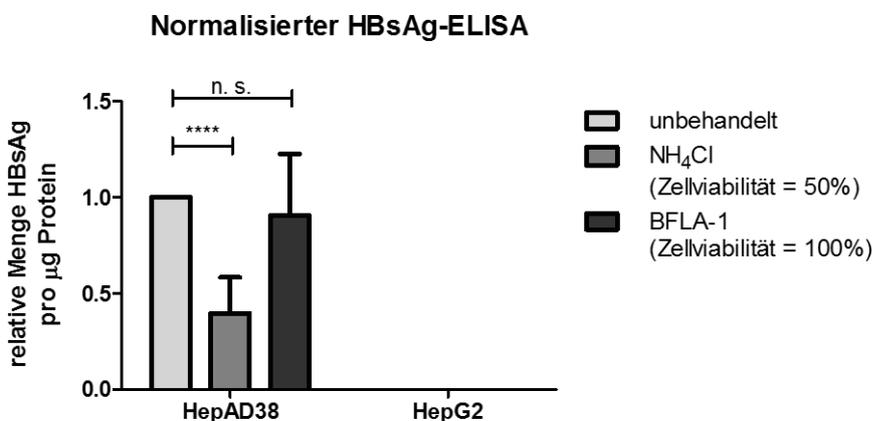


Abb. 5.2: Unveränderte HBsAg-Mengen nach Autophagieinhibition im stabilen HBV-positiven Zellsystem. Es wurden Zellen der stabil HBV-exprimierenden Zelllinie HepAD38 sowie der HBV-negativen Zelllinie HepG2 zweifach in einem Zeitraum von 24 h mit 50 mM NH_4Cl bzw. 50 nM BFLA-1 behandelt. Die zellulären Überstände wurden im HBsAg-ELISA eingesetzt. Die Ergebnisse der unbehandelten HepAD38-Kontrollzellen dienten den behandelten Zellen als Referenz und wurden auf 1 normiert. Die Grafik beinhaltet die Mittelwerte sechs voneinander unabhängiger Experimente ($n = 6$) inklusive Standardabweichung.

Wie in Abbildung 5.2 zu erkennen ist, zeigen die mit NH_4Cl versetzten Zellen eine signifikante Reduktion der HBsAg-Mengen um ca. 50 %. Berücksichtigt man die Ergebnisse des Zellviabilitätstests (siehe 5.1) – um 50 % reduzierte HBsAg-Mengen bei einer ebenso um 50 % reduzierten Zellviabilität – so ist eine Relativierung der Ergebnisse wahrscheinlich. Somit sind bei der Inkubation mit NH_4Cl

keine deutlichen Änderungen der HBsAg-Mengen zu erwarten. Im Falle der mit BFLA-1 behandelten Zellen zeigt sich keine signifikante Modulation der HBsAg-Mengen im Überstand der HBV-positiven HepAD38-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, weder unter Bezugnahme auf die Proteinkonzentration noch auf den MTT-Assay. Die beschriebenen Beobachtungen lassen darauf schließen, dass das Sekretionsmuster des HBsAg durch beide Inhibitionsprotokolle im Wesentlichen unbeeinflusst bleibt. Die der Kontrolle dienenden HBV-negativen HepG2-Zellen zeigen – wie zu erwarten – kein messbares HBsAg-Signal.

Zur Verifizierung der beobachteten Effekte wurden die Analysen in einem unabhängigen, transienten Transfektionssystem wiederholt. Hierzu wurden HBV-gtA- bzw. -gtG-positive HuH7.5 Zellen untersucht (siehe 4.1.3). Als Negativkontrolle dienten mit dem Leervektor pUC18-transfizierte Zellen. Der im Anschluss an die 24 h andauernde Behandlung gewonnene zelluläre Überstand wurde im HBsAg-ELISA eingesetzt. Insgesamt wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt ($n = 3$), deren Ergebnisse als Mittelwerte unter Berücksichtigung der Standardabweichung grafisch dargestellt wurden. Die unbehandelten Kontrollzellen des Genotyps A wurden in der Abbildung auf 1 normiert.

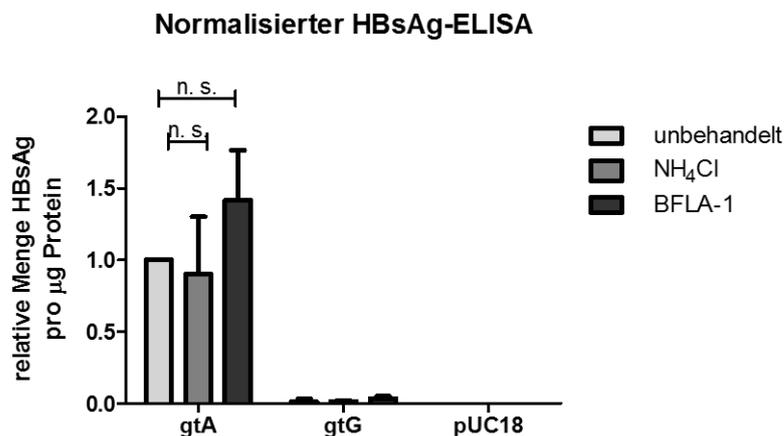


Abb. 5.3: Keine signifikante Veränderung der HBsAg-Freisetzung nach Autophagie-Inhibition im transienten Zellsystem. Es wurden HuH7.5-Zellen mit dem HBV-Genom transfiziert (gtA bzw. gtG), Kontrollzellen beinhalteten den Leervektor pUC18. Es wurde zweimal in einem Zeitraum von 24 h mit 50 mM NH₄Cl bzw. 50 nM BFLA-1 inkubiert. Im Anschluss wurde der zelluläre Überstand im HBsAg-ELISA analysiert. Als Referenz dienten die Werte der unbehandelten gtA-positiven Zellen, welche auf 1 normiert wurden. Die Ergebnisse sind auf den Proteingehalt der entsprechenden Proben bezogen. Die Grafik beinhaltet die Mittelwerte dreier voneinander unabhängiger Experimente ($n = 3$) inklusive Standardabweichung.

Wie in Abbildung 5.3 erkennbar, sind auch in den transient HBV-transfizierten HuH7.5-Zellen im Falle des Genotyps A nach Inhibition der Autophagie keine signifikanten Änderungen der HBsAg-Mengen im Überstand detektierbar. In den Proben des Genotyps G sind – wie zu erwarten – keine nennenswerten HBsAg-Mengen nachweisbar. Dies ist darauf zurückzuführen, dass HBV-Genotyp-G-replizierende Zellen per se keine SVP sezernieren, wenn auch deren Synthese unbeeinträchtigt ist [Peiffer et al., 2015]. Auch in diesem Fall zeigen die negativen Kontrollzellen – mit dem Leervektor pUC18 transfiziert – kein messbares HBsAg-Signal.

5.3 Deutliche Steigerung der HBeAg-Mengen nach Behandlung mit BFLA-1

Um zu untersuchen, ob die Inhibition der endosomalen Funktion in einer verminderten Freisetzung des Prä-Core-Proteins in stabil HBV-exprimierenden Zellen resultiert, wurden HBeAg-ELISA-Messungen durchgeführt. HBV-positive HepAD38- und als Kontrolle dienende HBV-negative HepG2-Zellen wurden innerhalb eines Zeitraums von 24 h zweimal mit 50 mM NH_4Cl bzw. 50 nM BFLA-1 behandelt. Die unverdünnten Zellkultur-Überstände von vier voneinander unabhängigen Versuchen ($n = 4$) wurden in einem HBeAg-ELISA eingesetzt (siehe 4.4.1). Die Mittelwerte der Ergebnisse wurden auf den Proteingehalt der einzelnen Proben bezogen und grafisch dargestellt. Die Ergebnisse der unbehandelten HepAD38-Kontrollzellen wurden hierbei auf 1 normiert. Im Falle der NH_4Cl -Inhibition ist die Standardabweichung angegeben. Eine Angabe definitiver Werte der mit BFLA-1 behandelten Zellen war nicht möglich, da in diesem Fall das Detektionslimit des Assays überschritten wurde, die Absorptionswerte lagen außerhalb des messbaren Bereichs. Die fehlenden definitiven Endwerte schließen eine Angabe der Standardabweichung sowie eine statistische Auswertung für die Werte der mit BFLA-1 inkubierten Zellen aus.

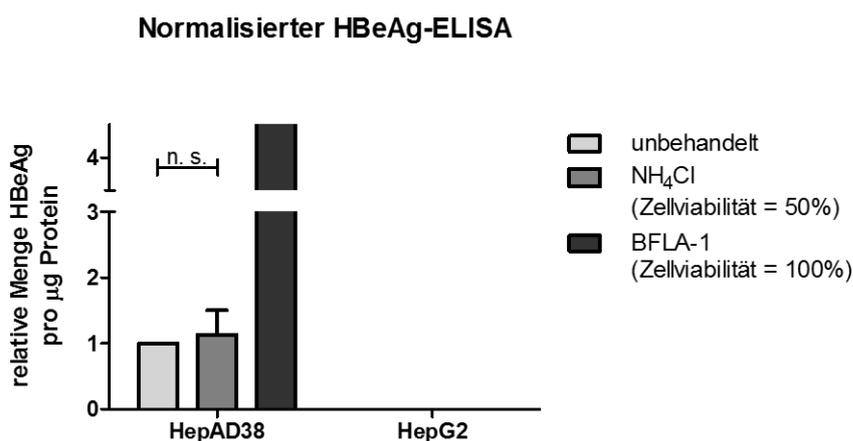


Abb. 5.4: Gesteigerte Freisetzung des HBeAg nach Autophagie-Inhibition im stabilen HBV-positiven Zellsystem. Nach zweimaliger Inhibition der stabil HBV-exprimierenden Zelllinie HepAD38 sowie der HBV-negativen Zelllinie HepG2 für 24 h mit 50 mM NH_4Cl bzw. 50 nM BFLA-1 wurden die Überstände in einem HBeAg-ELISA eingesetzt. Als Referenz für die übrigen Ergebnisse diente der Wert der unbehandelten HepAD38-Zellen, welcher auf 1 normiert wurde. Die Ergebnisse wurden auf den Proteingehalt der entsprechenden Proben bezogen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte vierer voneinander unabhängiger Experimente ($n = 4$). Im Falle der NH_4Cl -Behandlung ist die Standardabweichung und statistische Auswertung, auf der Höhe des p-Wertes beruhend, in die Abbildung integriert. Die Werte der mit BFLA-1 inhibierten Zellen überschreiten das Absorptionsmaximum, weshalb die Angabe der Standardabweichung und des p-Wertes entfällt.

Eine Inhibition mit NH_4Cl führt zu keiner signifikanten Änderung der freigesetzten HBeAg-Mengen – unter Berücksichtigung der Ergebnisse des MTT-Tests ist jedoch von einer Steigerung auszugehen. Die Inhibition mit BFLA-1 resultiert in einer sehr deutlichen Steigerung des HBeAg-Levels im zellulären

Überstand im Vergleich zu den unbehandelten HepAD38-Zellen. Wie zu erwarten, ist kein HBsAg-spezifisches Signal in den HBV-negativen HepG2-Kontrollzellen zu messen.

5.4 Verminderte Sekretion von HBV-Genomen nach Inhibition der Autophagie

Zur Feststellung, ob die beschriebenen Inhibitionsprotokolle zu einer Modulation der Freisetzung viraler Partikel führen, wurden nach zweifacher Inhibition mit wahlweise 50 mM NH_4Cl bzw. 50 nM BFLA-1 innerhalb eines Zeitraums von 24 h die zellulären Überstände von HBV-positiven HepAD38- sowie HBV-negativen HepG2-Zellen gesammelt und durch Zentrifugation pelletiert. Die Proben wurden anschließend mithilfe HBV-spezifischer Primer, welche eine 251 bp lange Sequenz der Prä-Core-/Core-Region detektieren, in der qPCR vermessen (siehe auch 4.2.6). Standardisiert wurden die Ergebnisse auf die Werte der unbehandelten HepAD38-Zellen, welche auf 1 normiert wurden. Die Mittelwerte dreier voneinander unabhängiger Experimente ($n = 3$) wurden unter Berücksichtigung des spezifischen Proteingehalts der entsprechenden Zelllysate sowie der Standardabweichung grafisch dargestellt.

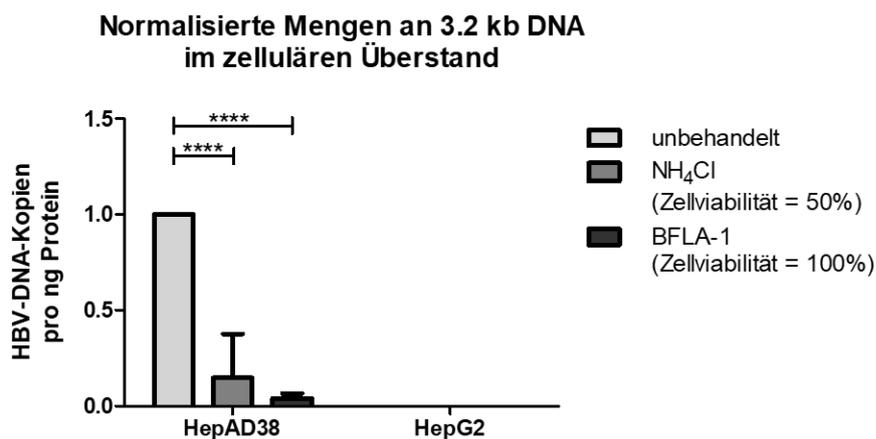


Abb. 5.5: Verringerte Anzahl der HBV-Genome nach autophagosomaler Inhibition. Stabil HBV-positive HepAD38- sowie -negative HepG2-Zellen wurden für 24 h mit 50 mM NH_4Cl bzw. 50 nM BFLA-1 behandelt. Die zellulären Überstände wurden in einer qPCR unter Verwendung HBV-spezifischer Primer analysiert. Die Grafik beinhaltet die Mittelwerte dreier voneinander unabhängiger Experimente ($n = 3$) unter Berücksichtigung der Standardabweichung. Die Ergebnisse der unbehandelten HepAD38-Kontrollzellen dienten hierbei als Referenz und wurden mit 1 gleichgesetzt. In der Abbildung wurde eine Normierung auf den Proteingehalt der zellulären Lysate vorgenommen.

Die Abbildung 5.5 lässt erkennen, dass der NH_4Cl -Einsatz eine starke Reduktion der sezernierten Genome im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen bewirkt. Unter Berücksichtigung der reduzierten Zellviabilität (siehe 5.1) ist dennoch, wenn auch weniger ausgeprägt, eine Sekretionshemmung der HBV-Genome zu erwarten. Der BFLA-1-Einsatz führt zu einer signifikanten Reduktion der im Überstand befindlichen sezernierten Genome um mehr als 90 % im Vergleich zu den unbehandelten

Kontrollzellen – bei unbeeinträchtiger Zellviabilität. Die negativen Kontrollzellen zeigen, wie zu erwarten, keinerlei messbare Mengen an HBV-spezifischen Genomen.

5.5 Zunahme der intrazellulären LHBs-Mengen nach Autophagieinhibition

Um zu untersuchen, ob eine Blockade des endosomalen Signalwegs auf intrazellulärer Ebene zu einer Modulation der LHBs-Mengen führt, wurden stabil HBV-positive HepAD38-Zellen und HBV-negative HepG2-Zellen zweifach innerhalb eines Zeitraums von 24 h mit 50 mM NH_4Cl bzw. 50 nM BFLA-1 behandelt. Entsprechende unbehandelte Kontrollen wurden mitgeführt. Die Analyse der Zelllysate erfolgte mittels Western Blot (siehe 4.3.2 und 4.3.3). Mit MA18/7 kam ein LHBs-spezifischer Antikörper zum Einsatz, anti-p62 und anti-LC3 wurden zur Bestimmung der autophagosomalen Prozesse verwendet. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin detektiert. Bei Verwendung des Antikörpers MA18/7 werden bei Einsatz von Zelllysaten stets zwei zusätzliche unspezifische Banden detektiert, welche in der nachfolgenden Abbildung gekennzeichnet sind (unspez. = unspezifisch). Die Abbildung 5.6 zeigt einen exemplarischen Western Blot aus insgesamt fünf Experimenten ($n = 5$).

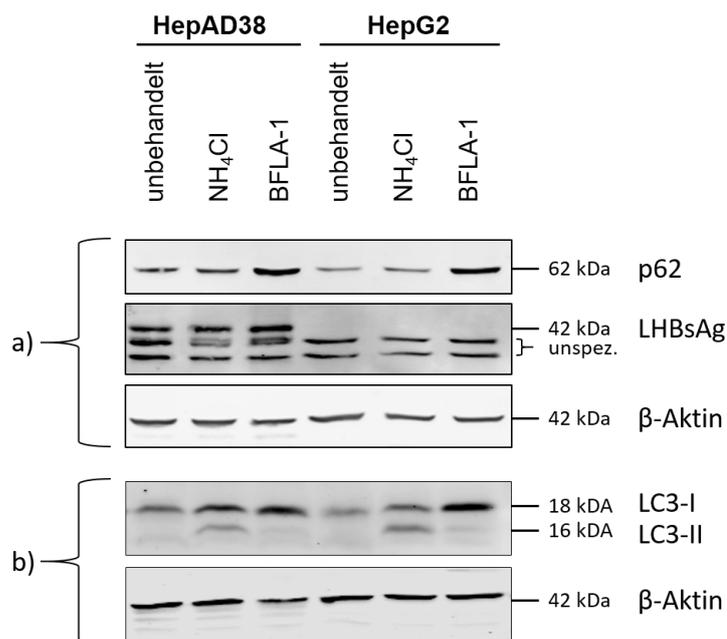


Abb. 5.6: WB-Signale stabil HBV-positiver sowie -negativer Zellen. HBV-positive HepAD38-Zellen sowie HBV-negative HepG2-Zellen wurden zweifach innerhalb 24 h entsprechend inkubiert; unbehandelte Zellen der jeweiligen Zelllinien dienten als Kontrolle. Die anschließend gewonnenen zellulären Lysate wurden mittels WB analysiert. Es kamen LHBs-, LC3- sowie p62-spezifische Antikörper zum Einsatz, zur Bestimmung der Gesamtprotein-Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. Es wurden geeignete fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper verwendet, um eine Detektion am Licor-/Odyssey-System zu ermöglichen. Die zwei zusätzlichen, entsprechend gekennzeichneten, unspezifischen (unspez.) Banden spiegeln das typische Antikörperbindungsverhalten des MA18/7 bei Verwendung von zellulären Lysaten wider. Insgesamt wurden Proben von fünf voneinander unabhängigen Versuchen in WB-Analysen untersucht ($n = 5$). Abgebildet ist ein exemplarischer Western Blot für a) LHBs + p62 und b) LC3.

In der folgenden Abbildung 5.7 ist eine Quantifizierung des detektierten LHBs- und p62-Signals, jeweils bezogen auf die Ladekontrolle β -Aktin, zu sehen. Zusammengefasst wurden die Ergebnisse von fünf voneinander unabhängigen Experimenten inklusive Standardabweichung. Es wurde jeweils eine Normierung auf die Werte der unbehandelten HepAD38-Zellen durchgeführt, welche mit 1 gleichgesetzt wurden.

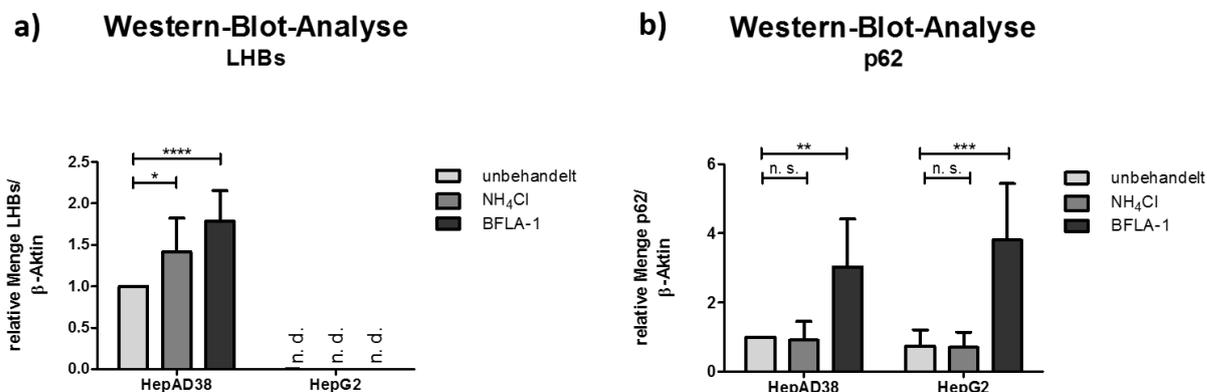


Abb. 5.7: Erhöhte LHBs-Signale in stabil HBV-exprimierenden Zellen bei Inhibition der Autophagie durch BFLA-1. Die Grafiken stellen die Quantifizierung der auf β -Aktin normierten Mittelwerte der a) LHBs- und b) p62-spezifischen WB-Signale dar. Sie beinhalten die Ergebnisse von fünf voneinander unabhängigen Experimenten ($n = 5$) unter Berücksichtigung der Standardabweichung. Die jeweiligen Ergebnisse der unbehandelten HepAD38-Kontrollzellen dienen als Referenz und wurden mit 1 gleichgesetzt, die restlichen Ergebnisse wurden hierauf bezogen.

Die Abbildung 5.7 a) zeigt, dass der Einsatz von NH₄Cl zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der LHBs-Mengen in den Lysaten der HepAD38-Zellen führt; die BFLA-1-Inkubation bewirkt eine deutlich ausgeprägtere Signalsteigerung. Die Abbildung 5.7 b) zeigt eine Zusammenfassung der p62-Signale. Die NH₄Cl-Inkubation führt zu keiner nennenswerten Änderung der entsprechenden Signale, hier ist erneut die reduzierte Zellviabilität zu berücksichtigen. Die Inkubation mit BFLA-1 bewirkt sowohl in den HepAD38- als auch HepG2-Zellen eine signifikante Steigerung des p62-Signals, die autophagiespezifischen Prozesse werden reproduzierbar inhibiert.

Die Abbildung 5.8 zeigt auf Basis der vorherigen Ergebnisse eine Gegenüberstellung der basalen p62-Signale in unbehandelten HepAD38- sowie HepG2-Zellen, bezogen auf das jeweilige β -Aktinsignal der Probe. Es können keine signifikanten Unterschiede in der basalen Verteilung der p62-Level in den verschiedenen unbehandelten Zelllinien festgestellt werden.

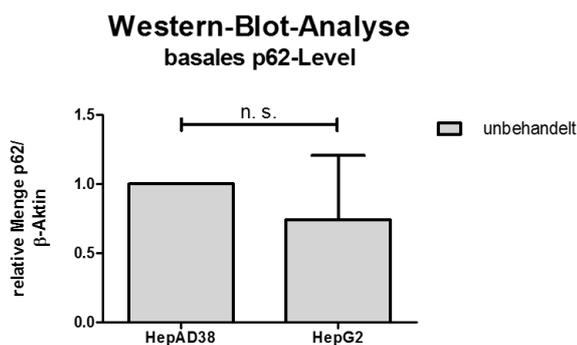


Abb. 5.8: Keine Beeinflussung der basalen p62-Signale durch Inhibition der Autophagie. Die Gegenüberstellung der basalen Mengen für p62 in unbehandelten HepAD38 und HepG2, standardisiert auf die entsprechenden β -Aktin-Werte, zeigt keine wesentlichen Unterschiede in der Signalstärke. Als Referenz wurden die Werte der unbehandelten HepAD38-Kontrollzellen verwendet, ihr Mittelwert wurde auf 1 normiert. In der Grafik sind die Mittelwerte von fünf voneinander unabhängigen Experimenten ($n = 5$) inklusive Standardabweichung aufgeführt.

Auch im Falle der WB-Signale des Proteins LC3 als zweiter Marker der Autophagosomen wurden die Ergebnisse von fünf voneinander unabhängigen WB-Analysen zusammengefasst ($n=5$). In der Abbildung 5.9 sind die Mittelwerte der LC3-II-Signale inklusive Standardabweichung dargestellt.

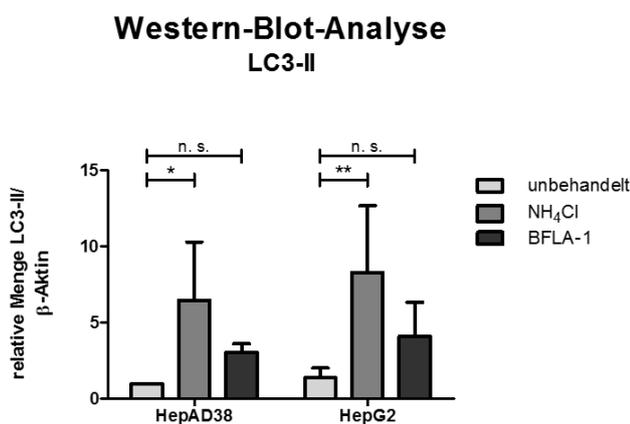


Abb. 5.9: Gering- bis mittelgradige Erhöhung von LC3-II. In den Grafiken werden die auf β -Aktin bezogenen Mittelwerte der LC3-II-spezifischen WB-Signale fünf voneinander unabhängiger Experimente ($n = 5$) zusammengefasst.

Die Behandlung mit NH₄Cl bewirkt sowohl in den HepAD38- als auch HepG2-Zellen eine signifikante Steigerung des LC3-II-Signals. In den mit BFLA-1-inkubierten Zellen kann man eine milde, wenn auch nicht signifikante, Zunahme des LC3-II-Signals beobachten.

Die Abbildung 5.10 zeigt eine Gegenüberstellung der basalen LC3-II-Signale in unbehandelten HepAD38- sowie HepG2-Zellen.

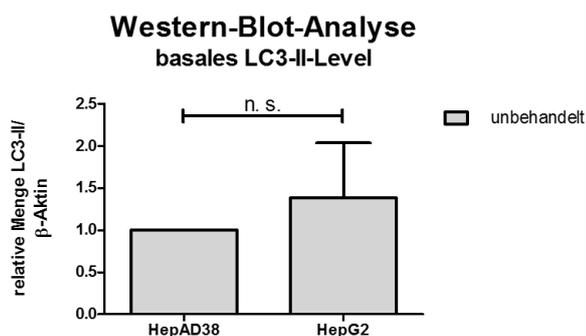


Abb. 5.10: Keine wesentlichen Änderungen der basalen LC3-II-Signale in HBV-positiven Zellen: Eine Gegenüberstellung der basalen LC3-II-Signale in unbehandelten HepAD38 sowie HepG2 zeigt keine signifikante Änderung der Intensitäten. In der Grafik sind die Mittelwerte von fünf voneinander unabhängigen Experimenten ($n = 5$), normiert auf β -Aktin, zusammengefasst.

In Übereinstimmung mit der Bestimmung der basalen p62-Mengen zeigt auch die Analyse der basalen LC3-II-Mengen keinen signifikanten Unterschied zwischen den HBV-positiven HepAD38- sowie den HBV-negativen HepG2-Zellen (siehe 5.10).

Zur Verifizierung der im stabil HBV-positiven Zellsystem beobachteten Ergebnisse wurden entsprechende Versuche mit HuH7.5-Zellen wiederholt. Hierfür wurden die Zellen 24 h nach dem Auslegen mit einem für HBV-gtA bzw. -gtG kodierenden Plasmid transfiziert. Kontrollzellen wurden mit dem Leervektor pUC18 transfiziert. Weitere 24 h später erfolgte eine Behandlung der Zellen für 24 h mit NH_4Cl bzw. BFLA-1. Im Anschluss wurden Zelllysate hergestellt, welche mittels Western Blot analysiert wurden. Insgesamt wurden zwei voneinander unabhängige Versuche analysiert ($n = 2$). Die Abbildung 5.11 zeigt einen exemplarischen WB.

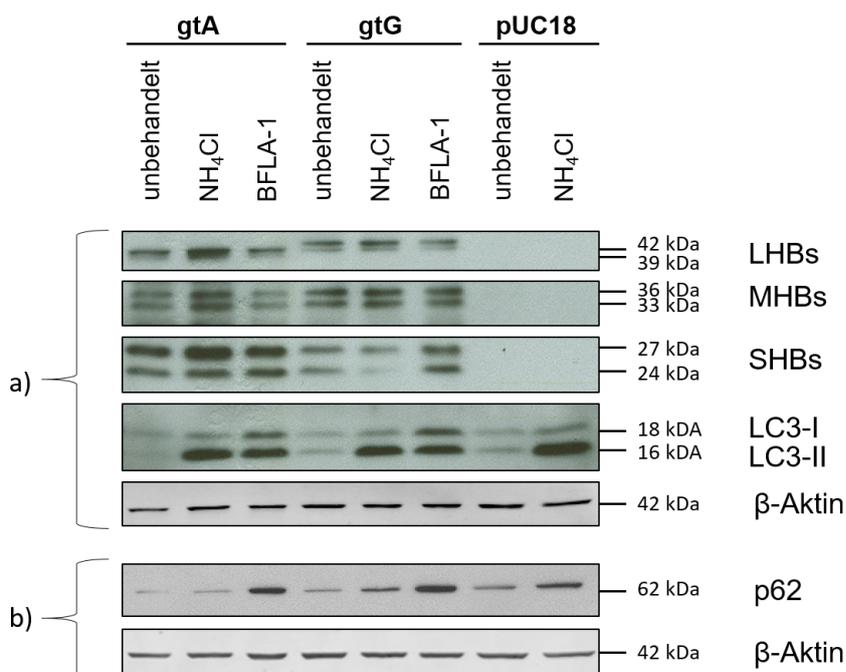


Abb. 5.11: Unterschiedlich starke Erhöhung HBV-spezifischer Hüllproteine in transient HBV-positiven Zellen nach Inhibition der Autophagie. Nach Transfektion von HuH7.5-Zellen mit einem Plasmid, kodierend für HBV-gtA oder -gtG bzw. dem Kontrollvektor pUC18, wurden die Zellen zweifach innerhalb von 24 h mit 50 mM NH₄Cl bzw. 50 nM BFLA-1 inkubiert. Ein Teil der Zellen blieb als Kontrollgruppe unbehandelt. Gewonnene Zelllysate wurden im WB mit einem HBV-spezifischen Antikörper analysiert, welcher eine Detektion aller drei HBV-Oberflächenproteine (inklusive ihrer unglykosylierten sowie glykosylierten Formen) erlaubt, zusätzlich wurden die LC3-spezifischen Signale bestimmt. Zur Detektion kam jeweils ein geeigneter ECL-spezifischer HRP-gekoppelter Sekundärantikörper zum Einsatz. Als weiterer autophagosomaler Marker wurde p62 und als Gesamtprotein-Ladekontrolle β-Aktin detektiert. Hierfür wurden jeweils entsprechende fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper verwendet, um eine Detektion am Licor-/Odyssey-System zu ermöglichen. Es lagen Proben von zwei voneinander unabhängigen Experimenten vor (n = 2). Abbildung a) zeigt die HBV-spezifischen Signale sowie jene von LC3-I und -II, Abbildung b) zeigt einen repräsentativen WB von p62-Signalen.

Zu erkennen sind die HBV-spezifischen Signale des Antikörpers HB1, welcher eine Unterscheidung der einzelnen Oberflächenproteine in ihre unglykosylierten als auch glykosylierten Formen (SHBsAg p24 + gp27, MHBsAg p30 + gp33 + gp36, LHBsAg p39 + gp42) zulässt. SHBs weist in beiden Genotypen höchste Intensitäten auf – eine Beobachtung, welche zu erwarten war, da SHBs den Hauptbestandteil sowohl der Dane-Partikel als auch der verschiedenen SVP ausmacht. MHBs folgt mit mittleren Intensitäten und LHBs zeigt die schwächsten Signale – entsprechend der Zusammensetzung der (sub-)viralen Partikel. Grundsätzlich sind die HBsAg-Signale in HBV-gtA-positiven Zellen prominenter, verglichen mit gtG. Die unglykosylierten sowie glykosylierten Banden zeigen in Zellen beider Genotypen eine vergleichbare Tendenz, wenn auch insbesondere in HBV-gtA-positive Zellen die glykosylierten SHBs- sowie LHBs-Banden ein deutlicheres Signal als die unglykosylierten Banden aufweisen. In beiden Genotypen resultiert die NH₄Cl-Inkubation in einer deutlicheren Intensitätszunahme als die BFLA-1-Inkubation, wenngleich die Effekte in den HBV-gtA-Zellen ausgeprägter sind. Lediglich das SHBs in HBV-gtG-positiven Zellen zeigt nach NH₄Cl-Inkubation eine Erniedrigung des Signals, dies kann jedoch auch auf ein ungenügend verteiltes Detektionssubstrat zurückzuführen sein. Wie

zu erwarten kann in den negativen Kontrollen, transfiziert mit dem Leervektor pUC18, keinerlei HBV-spezifisches Signal gemessen werden.

Neben der Bestimmung der HBV-spezifischen Signale kamen in der WB-Analyse die autophagiespezifischen Antikörper anti-p62 sowie anti-LC3 zum Einsatz. Als Ladekontrolle wurde der Antikörper β -Aktin verwendet. In den mit den Genotypen A und G sowie in den mit pUC18 transfizierten Kontrollzellen äußert sich die Inkubation mit NH_4Cl in einer mäßigen Zunahme des p62-Signals. Deutlicher macht sich die Behandlung mit BFLA-1 in massiv verstärkten p62-Signalstärken sichtbar. Beide Behandlungsprotokolle resultieren in einer deutlichen Zunahme der LC3-II-Signalintensitäten, wobei der Effekt nach NH_4Cl -Inkubation stärker ist, verglichen mit Zellen, die mit BFLA-1 behandelt wurden. Die deutlichen Intensitätssteigerungen, sei es von p62 als auch LC3, deuten auf eine erfolgreiche Autophagieinhibition hin.

Grundsätzlich zeigen die WB-Analysen für gtA und gtG eine (unterschiedlich stark ausgeprägte) Signalzunahme nach Inhibition der autophagosomalen Prozesse. Eine mathematische Signifikanz könnte jedoch erst nach Quantifizierung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten bestimmt werden.

5.6 Keine Erhöhung der intrazellulären HBV-Transkripte

Um einen Einfluss der Autophagiemechanismen auf die Bildung der intrazellulären HBV-Transkripte sichtbar zu machen, wurde nach 24-stündiger Inkubation der stabil HBV-exprimierenden HepAD38- und der HBV-negativen HepG2-Zellen mit 50 mM NH_4Cl bzw. 50 nM BFLA-1 die gesamtzelluläre RNA gewonnen. Diese wurde, nach dem Umschreiben in cDNA, in der qRT-PCR unter Verwendung HBV-spezifischer Primer zur Detektion der 3,5 kb mRNA (Primer #405, #406) analysiert. Es schloss sich ein weiterer qRT-PCR-Lauf mit GAPDH-Primern an, um die HBV-spezifischen Werte standardisieren zu können. In der nachfolgenden Grafik sind die entsprechenden normierten Mittelwerte von drei voneinander unabhängigen Experimenten aufgeführt ($n = 3$), die jeweilige Standardabweichung ist in die Abbildung integriert. Das Ergebnis der unbehandelten HepAD38-Zellen wurde mit 1 gleichgesetzt, die übrigen Ergebnisse wurden darauf normiert. In den HepG2-Zellen, welche der Negativkontrolle dienten, wurden - wie zu erwarten - keine messbaren HBV-spezifischen Signale detektiert, dies wurde in der Grafik entsprechend vermerkt (n. d. = nicht detektierbar).

Intrazelluläre HBV-Transkripte

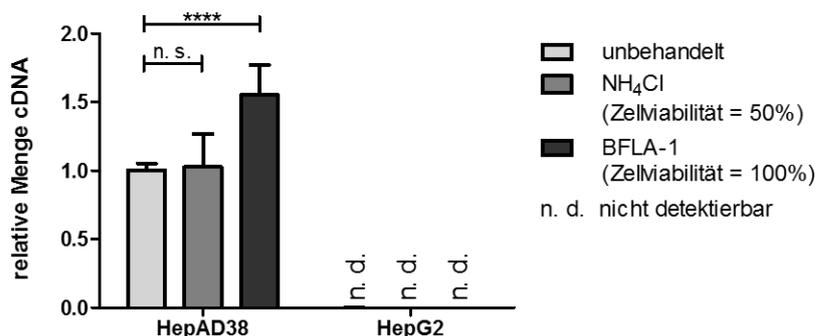


Abb. 5.12: Erhöhung der intrazellulären HBV-Transkripte in stabil HBV-positiven Zellen nach Autophagieinhibition. HBV-positive HepAD38- sowie HBV-negative HepG2-Zellen wurden für 24 h zweifach mit wahlweise 50 mM NH₄Cl bzw. 50 nM BFLA-1 inkubiert. Im Anschluss wurde die gesamtzelluläre RNA isoliert, welche folgend in cDNA umgeschrieben und unter Einsatz 3,5 kb HBV-mRNA-spezifischer Primer mittels qRT-PCR analysiert wurde. Die Grafik stellt die Anzahl HBV-spezifischer Transkripte dar, welche auf die Menge der GAPDH-spezifischen Transkripte normiert wurde. Es sind Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente (n = 3) unter Berücksichtigung der Standardabweichung aufgeführt (n. d. = nicht detektierbar).

Es ist ersichtlich, dass die Behandlung der Zellen mit NH₄Cl im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen zu keinerlei erwähnenswerten Veränderung in der Anzahl der HBV-Transkripte führt. Im Gegensatz dazu zeigt sich eine signifikante Zunahme der intrazellulären HBV-Transkripte in HepAD38-Zellen, welche mit BFLA-1 versetzt wurden.

5.7 Veränderte Mengen an viralen Transkripten nach Autophagieinhibition

Nach zweifacher Behandlung der stabil HBV-positiven HepAD38- sowie HepG2-Kontrollzellen mit 50 mM NH₄Cl bzw. 50 nM BFLA-1 für 24 h schloss sich eine Auswertung der gewonnenen zellulären RNA im Northern Blot an. Hierfür wurden zelluläre RNA-Proben eines Experiments (n = 1) eingesetzt, deren Signale mithilfe einer HBV-spezifischen, radioaktiv markierten Sonde sichtbar gemacht wurden.

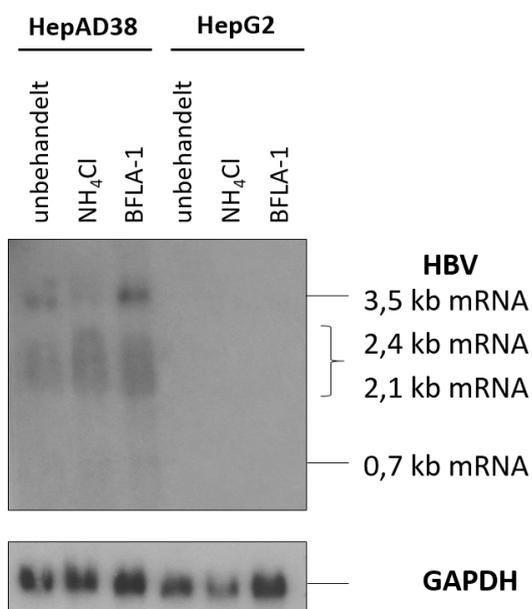


Abb. 5.13: Northern-Blot-Analyse HBV-positiver sowie -negativer Zellen. HBV-positive HepAD38-Zellen sowie -negative HepG2-Zellen wurden für 24 h mit 50 mM NH₄Cl bzw. 50 nM BFLA-1 versetzt, Kontrollgruppen beider Zelllinie wurden mitgeführt. Die isolierte zelluläre RNA wurde – nach Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließendem Blotten auf eine Nitrozellulosemembran – mit Hilfe einer radioaktiv-markierten HBV-spezifischen Sonde analysiert. So konnte die anteilmäßige Verteilung der vier verschiedenen mRNAs des HBV bestimmt werden. Zur Quantifizierung der Proben wurden zusätzlich GAPDH-Signale als Ladekontrolle detektiert. Zum Einsatz kamen Proben eines Experiments (n = 1).

Die Signale der diversen mRNAs wurden auf die GAPDH-spezifischen Signale der einzelnen Proben normiert. Hierbei wurden die Ergebnisse der unbehandelten HepAD38 mit 1 gleichgesetzt, die restlichen Ergebnisse wurden hierauf bezogen. In Abbildung 5.14 a) ist die Quantifizierung der 3,5 kb mRNA zu sehen. Da eine genaue Auftrennung der 2,4 kb sowie 2,1 kb mRNA nicht möglich war, wurden die Signale beider mRNA-Transkripte in Abbildung 5.14 b) zusammengefasst. Die Quantifizierung der kleinsten RNA mit 0,7 kb ist in Abbildung 5.14 c) ersichtlich.

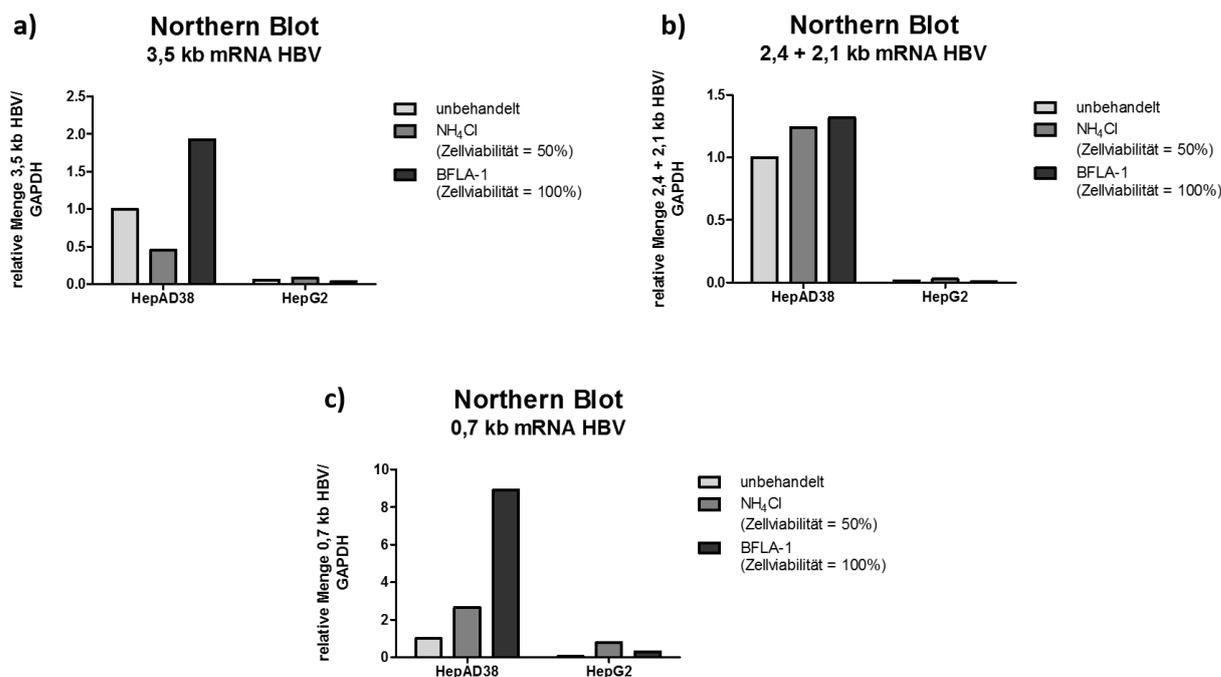


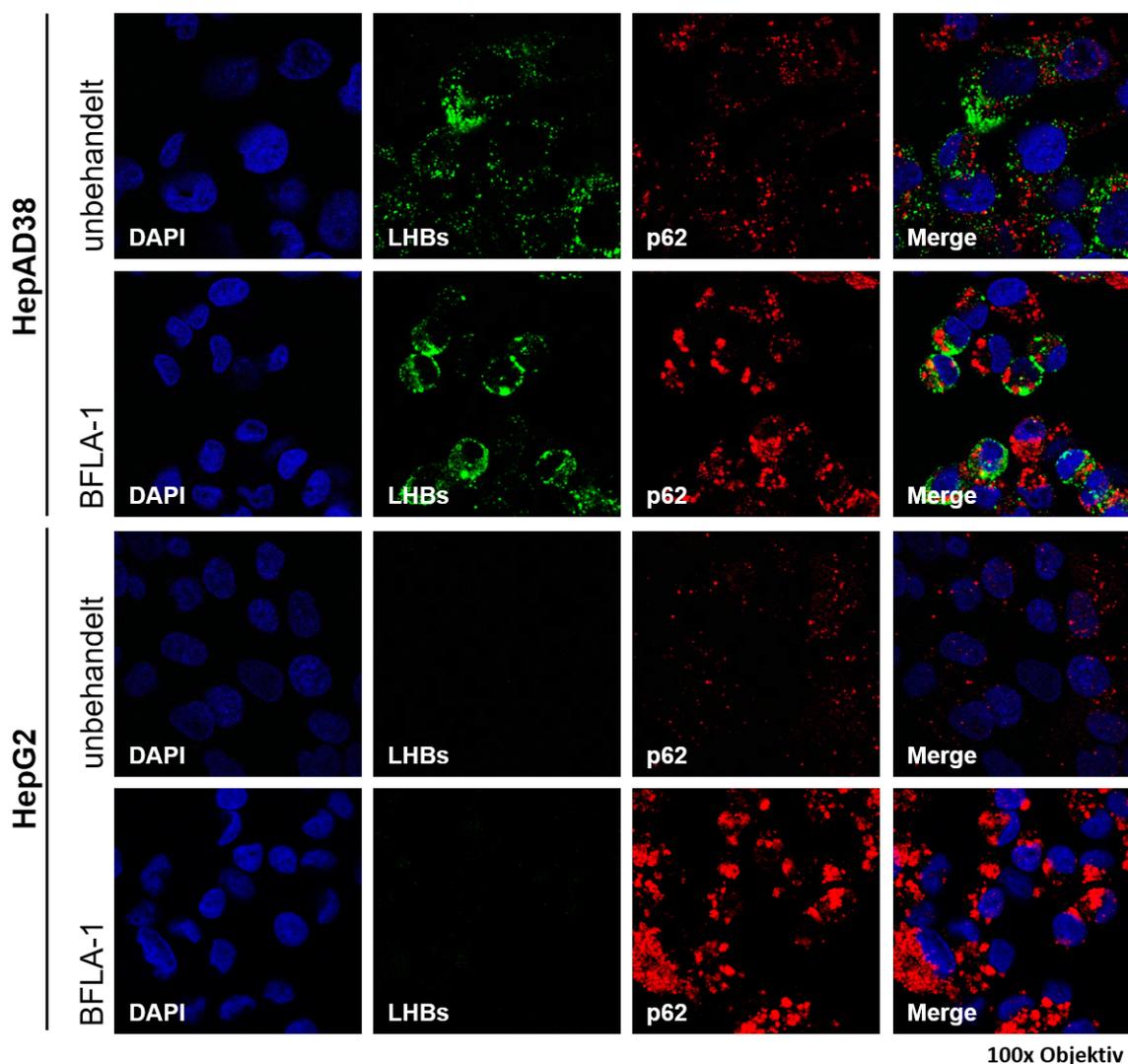
Abb. 5.14: Mengenänderung der HBV-Transkripte nach Autophagieinhibition. Zur Standardisierung wurden die verschiedenen HBV-spezifischen RNA-Signale auf die in den entsprechenden Proben gemessenen GAPDH-Signale bezogen. Grafik a) zeigt die normierten Ergebnisse der 3,5 kb mRNA, in Grafik b) ist die Quantifizierung der 2,4 kb sowie 2,1 kb RNA zusammengefasst und Grafik c) zeigt wiederum die Normierung der 0,7 kb RNA. Zu sehen ist die Auswertung eines Experiments (n = 1).

Die Gesamtheit der viralen Transkripte zeigt nach BFLA-1-Inkubation eine Erhöhung. So weist insbesondere die 3,5 kb mRNA, welche als pgRNA und Matritze für die Produktion von Core-Protein und Prä-Core-Protein dient, eine deutliche Steigerung auf. Die Summe der 2,4 und 2,1 kb mRNA, benötigt für die Transkription des HBsAg, ist geringgradig erhöht. Die 0,7 kb mRNA als Matritze des HBx wird um ein Vielfaches verstärkt gemessen. Im Gegensatz dazu wird ein deutlich geringerer Effekt nach NH₄Cl-Inkubation vermerkt. So wird neben einer Reduktion der 3,5 kb mRNA eine schwache Zunahme in der Signalstärke der 2,4 + 2,1 kb mRNAs gemessen. Die Quantifizierung der 0,7 kb mRNA macht eine leichte Steigerung sichtbar.

5.8 Veränderte LHBsAg-Verteilung in Autophagie-inhibierten stabil HBV-positiven Zellen

Um sowohl eine Aussage über die intrazellulären Proteinmengen als auch deren subzelluläre Verteilung treffen zu können, wurden Zellen auf Deckgläschen ausgelegt und nach der Behandlung mit 50 mM BFLA-1 fixiert. Eine Analyse von mit NH₄Cl inkubierten Zellen erfolgte nicht, da der toxische Effekt keine Auswertung erlaubte. Nach der Inkubation der Zellen mit LHBs- und p62-spezifischen Antikörpern sowie entsprechenden fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern erfolgte eine Auswertung der indirekten Färbung am cLSM. Das entsprechend markierte LHBsAg erscheint in der

Abbildung 5.15 in grüner Farbe, das in den autophagosomalen Strukturen befindliche p62 ist in Rot dargestellt, die Zellkerne erscheinen durch DAPI-Färbung in Blau.



100x Objektiv

Abb. 5.15: Veränderte intrazelluläre Lokalisation von LHBsAg in stabil HBV-positiven Zellen nach Inhibition der Autophagie. Zur Inhibition der Autophagie wurden HBV-positive HepAD38- sowie HBV-negative HepG2-Zellen für 24 h mit 50 nM BFLA-1 inkubiert, Kontrollzellen blieben unbehandelt. Nach der Inkubation der fixierten Zellen mit LHBs- sowie p62-spezifischen Antikörpern und Verwendung entsprechender Cy2- bzw. Cy3-gekoppelter sekundärer Antikörper erfolgte eine Auswertung am cLSM. Die Zellkerne erscheinen durch Markierung mit DAPI in Blau, LHBs in Grün und p62 in Rot. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen bei Verwendung eines 100x Objektivs.

Eine Analyse der IF-Aufnahmen zeigt, dass das p62-Signal in mit BFLA-1 behandelten Zellen deutlich erhöht ist. Die rotmarkierten Vakuolen nehmen in Folge der Autophagie-Inhibition deutlich an Zahl und Größe zu. Dieses Phänomen tritt in den HepG2-Zellen deutlicher in Erscheinung als in den HepAD38-Zellen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Blockade der autophagosomalen Prozesse erfolgreich eingetreten ist.

In den unbehandelten Kontrollzellen zeigt sich ein LHBs-spezifisches, punktuell zytosolisches Verteilungsmuster mit perinukleär gesteigerter Dichte. In den mit BFLA-1 inkubierten Zellen zeigt sich neben

einer Zunahme der Signalintensität eine veränderte, verstärkt perinukleär ausgeprägte Verteilung im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Die nachfolgenden IF-Aufnahmen zeigen nach dem gleichen Prinzip gefärbte zelluläre Präparate, in denen autophagosomale Strukturen mithilfe eines LC3-spezifischen Antikörpers und eines entsprechenden fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers markiert wurden. Die Detektionsmethodik des LHBs sowie der Zellkerne wurde beibehalten.

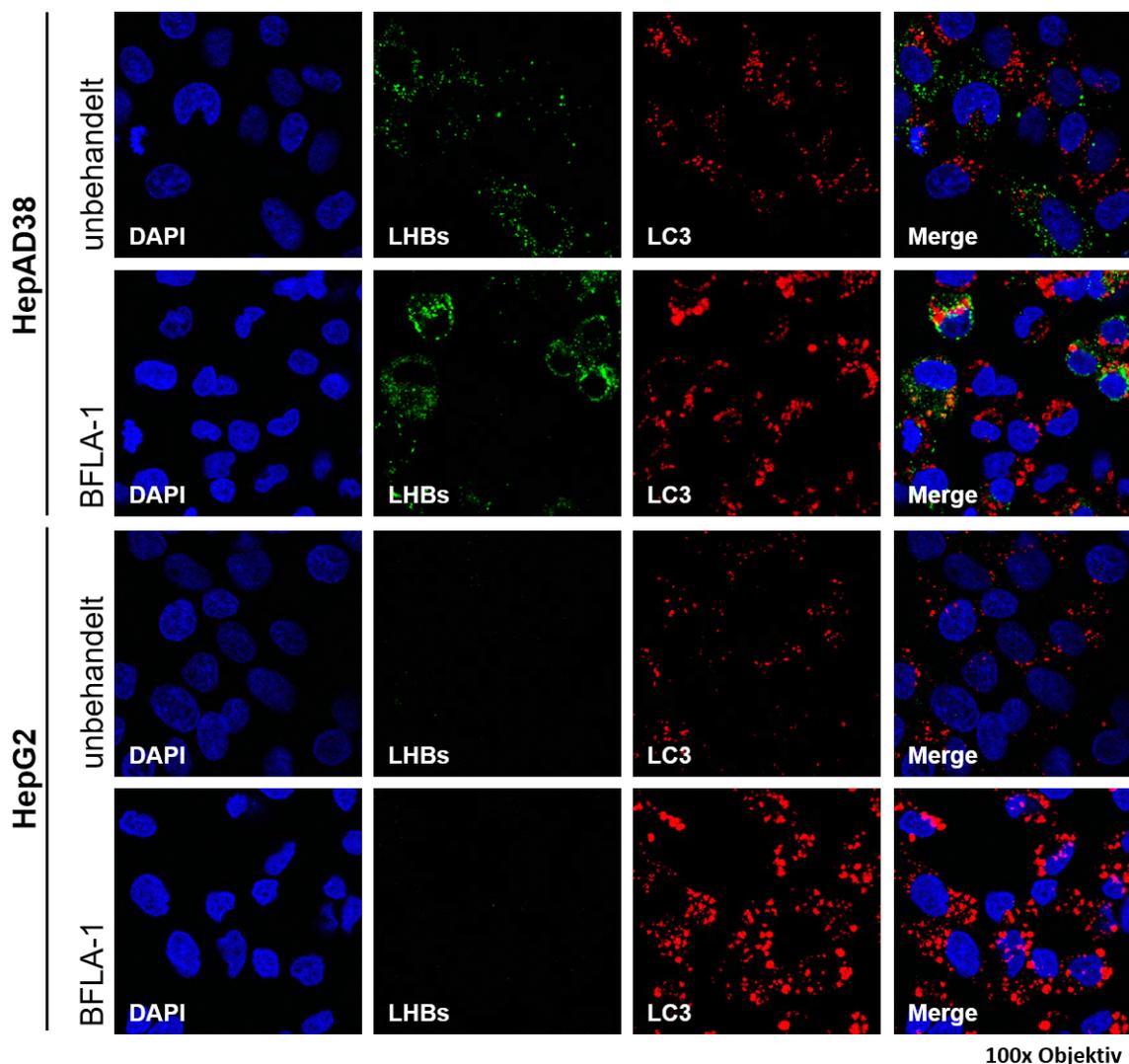


Abb. 5.16: Veränderte LHBsAg-Verteilung in deutlich Autophagie-inhibierten HBV-positiven Zellen. Auf Deckgläschen ausgelegte stabil HBV-positive Zellen (HepAD38) und -negative Kontrollzellen (HepG2) wurden für 24 h mit BFLA-1 inkubiert, entsprechende Kontrollgruppen wurden mitgeführt. Die Zellen wurden zunächst mit LHBs- bzw. LC3-spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern gefärbt. Die Detektion der Mengenverhältnisse und Verteilung der detektierbaren Proteine erfolgte am cLSM. Die Zellkerne erscheinen blau, LHBsAg grün und LC3 rot. 100x Objektiv.

Auch diese Färbungen zeigen deutlich gesteigerte LHBs-Signale in perinukleärer Akkumulation in den mit BFLA-1 inkubierten Zellen verglichen mit unbehandelten Zellen. Das LC3-spezifische Signal nimmt unter dem Einfluss von BFLA-1 deutlich zu, sichtbar in größeren und vermehrt vorkommenden vakuolären Strukturen.

5.9 Western-Blot-Analysen mit Mäuseleberlysaten

Zur Bestätigung der im stabilen sowie transienten Zellkultursystem gewonnenen Ergebnisse in der WB-Analyse wurden vier verschiedene Leber-Lysate von HBV-transgenen Mäusen mittels WB-Analyse untersucht ($n = 4$). Als Negativkontrolle dienten drei HBV-negative Wildtyp-Mäuse ($n = 3$). Die Signalstärke wurde jeweils auf die eingesetzte Proteinmenge (Ponceau-Färbung) bezogen. Das p62-Signal der ersten Probe wurde aus der Quantifizierung herausgenommen. In dieser Kontroll-Probe konnte aufgrund eines starken unspezifischen Hintergrunds kein p62-spezifisches Signal detektiert werden, jedoch ist (wie in den anderen Kontrollen) stets ein basales Niveau an autophagosomaler Aktivität zu erwarten. Die Höhe des unspezifischen Hintergrunds kann auch das schwache Signal der zweiten Probe erklären, diese Probe wurde dennoch in die Quantifizierung miteinbezogen.

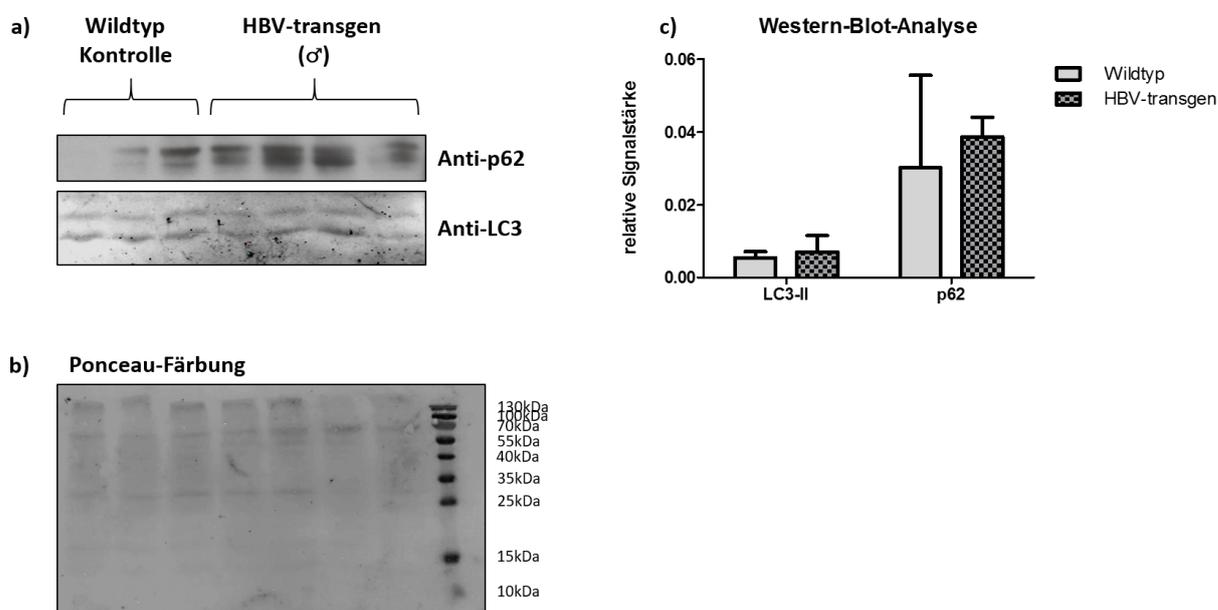


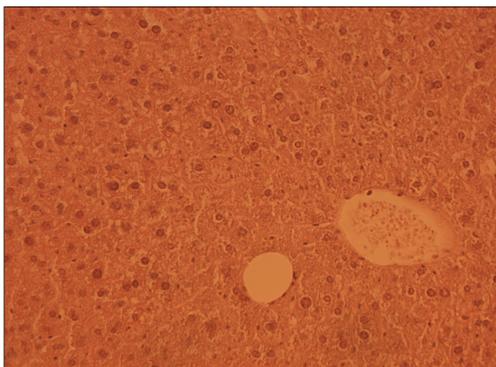
Abb. 5.17: WB-Analyse mit Lysaten aus Lebern HBV-transgener Mäuse. a) WB-Analyse: Es kamen p62- sowie LC3-spezifische Antikörper und fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper zur Detektion am Licor-/Odyssey-System zum Einsatz. b) Ponceau-Färbung der in a) verwendeten PVDF-Membran. c) Quantifizierung der Signale der WB-Analyse unter Berücksichtigung der Ponceau-Färbung. Es wurden die Mittelwerte dargestellt, die Standardabweichung wurde integriert. Zum Einsatz kamen Lysate von vier HBV-transgenen sowie von drei Wildtyp-Mäusen.

Die LC3-II-Intensitäten sind in Tieren des Wildtyps mit jenen der HBV-transgenen Mäuse vergleichbar, die Signale des detektierten p62 sind in HBV-transgenen Mäusen gegenüber den Kontroll-Tieren verstärkt.

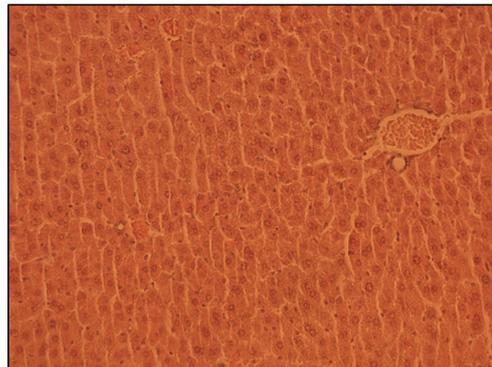
5.10 Unveränderte Morphologie in HBV-transgenem Lebergewebe

Um näher zu untersuchen, ob HBV-transgene Mäuse verglichen mit Kontrolltieren eine veränderte Lebermorphologie aufweisen, wurden Leberschnitte der verschiedenen Tiere mittels HE-Färbung untersucht.

a) Wildtyp (Kontrollmaus)



b) HBV-transgene Maus



10x Objektiv

Abb. 5.18: Histologische Situation in HBV-negativen und HBV-transgenen murinen Lebern. a) Lichtmikroskopische Aufnahme eines HE-gefärbten Leberschnitts einer Kontrollmaus (Wildtyp). b) Lichtmikroskopische Aufnahme eines HE-gefärbten Leberschnitts einer HBV-transgenen Maus. 10x Objektiv.

Wie in der beispielhaften Abbildung 5.18 ersichtlich, weisen sowohl die Aufnahmen der Leberpräparate der Kontrollmäuse (Wildtyp) als auch jene HBV-transgener Mäuse eine physiologische Läppchenstruktur mit schwach ausgeprägtem Bindegewebsanteil auf. Unter histologischem Gesichtspunkt betrachtet zeigen die Präparate HBV-transgener Tiere somit keine auffälligen Veränderungen der Lebermorphologie im Vergleich zu den entsprechenden Negativkontrollen. Mögliche Auffälligkeiten wie eine veränderte subzelluläre Proteinverteilung lassen sich somit nicht auf eine veränderte Morphologie zurückführen.

5.11 Gesteigerte Expression von p62 und LC3 in HBV-transgenen Mäuselebern

Um einen Zusammenhang zwischen der HBV-Expression mit der Menge autophagosomaler Strukturen sowie möglicher Parallelen zwischen den gewonnenen IF-Eindrücken in der Zellkultur (siehe 5.8) und *in vivo*-Vorgängen aufzudecken, wurden Leber-Paraffinschnitte von Kontrolltieren (Wildtyp) sowie HBV-transgenen Mäusen mit geeigneten Antikörpern indirekt gefärbt (siehe 4.6.4.2) und am cLSM ausgewertet. Durch Verwendung eines SHBs-spezifischen Antikörpers, in Verbindung mit einem Cy2-gekoppelten sekundären Antikörper, konnten die entsprechenden Proteine in grüner Farbe dargestellt werden. Als Marker autophagosomaler Strukturen wurden p62- sowie LC3-spezifische Antikörper in Kombination mit Cy3-gekoppelten sekundären Antikörpern verwendet (rote Fluoreszenz). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt, sichtbar in blauer Fluoreszenz. Die folgenden IF-Aufnahmen (Abbildung 5.19) zeigen zunächst die p62-spezifischen Strukturen.

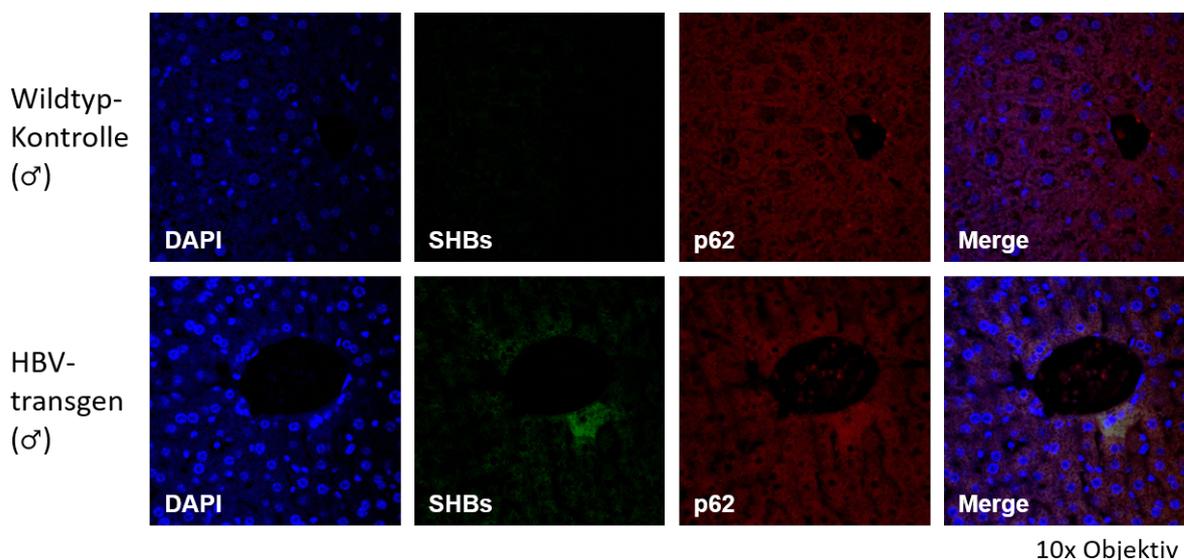


Abb. 5.19: Expression von p62 in HBV-transgenen Mäuselebern. Nach immunhistologischer Färbung der Leberschnitte von Kontrolltieren sowie HBV-transgenen Mäusen wurden die Proben am cLSM untersucht. Zur Darstellung HBV-positiver Zellen wurde ein HBs-spezifischer, zur Detektion autophagosomaler Strukturen ein p62-spezifischer Antikörper eingesetzt. Es kamen jeweils geeignete fluoreszenzmarkierte Sekundäntikörper zum Einsatz. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt, HBs erschien in grüner, p62 in roter Fluoreszenz. Die Abbildung zeigt eine beispielhafte subzelluläre Verteilung der entsprechenden Proteine. 10x Objektiv.

Die Analyse der IF-Aufnahmen zeigt, dass nur wenige Zellen im Zellverband ein starkes HBV-positives Signal aufweisen. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass das Virus in seiner Vermehrung auf den zellulären Apparat angewiesen ist. Somit ergibt sich in HBV-transgenen Zellen in Abhängigkeit von Zellzyklus und -zustand ein in der HBV-Expression divergierendes Muster. In den vermehrt HBV-exprimierenden Leberzellen der HBV-transgenen Mäuse zeigen sich zytoplasmatisch erhöhte p62-Mengen im Vergleich zu anderen Zellen. Die grundsätzlichen Mengen an p62 im Lebergewebe des Wildtyps sowie jenem HBV-transgener Mäuse unterscheiden sich jedoch nicht sonderlich in ihrer Signalstärke. Dies lässt sich mit den Ergebnissen der basalen p62-Mengen im WB in HBV-positiven HepAD38- sowie HBV-negativen HepG2-Zellen vereinbaren (siehe auch 5.8).

Im Folgenden (Abbildung 5.20) sind die entsprechenden IF-Aufnahmen mit LC3-spezifischen Signalen aufgeführt.

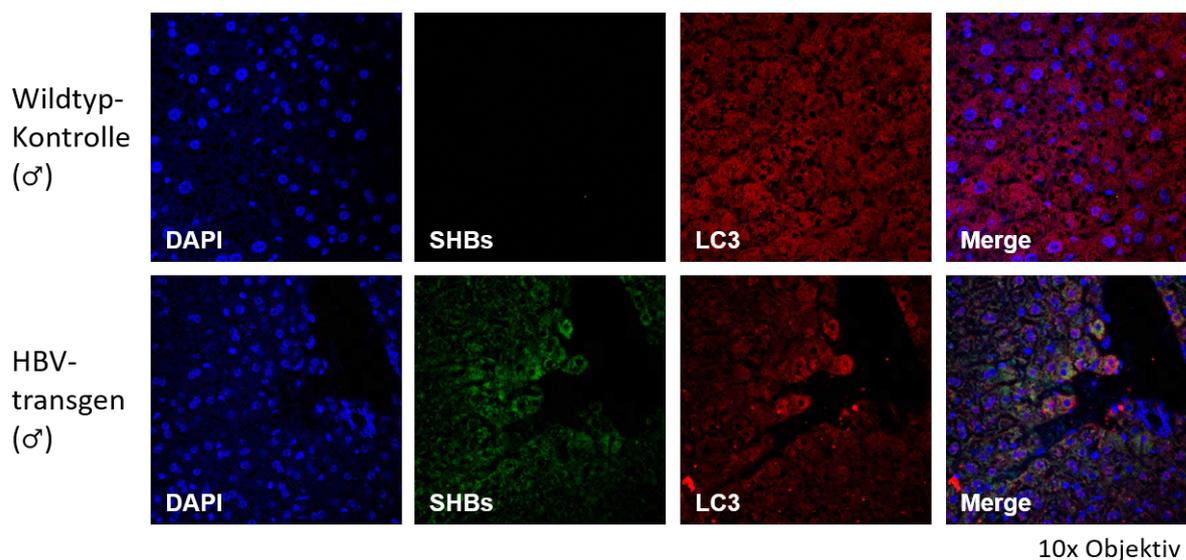


Abb. 5.20: Expression von LC3 in HBV-transgenen Mäuselebern. Das Lebergewebe HBV-transgener Mäuse sowie entsprechender Kontrolltiere wurde nach immunhistologischen Methoden gefärbt, die Leberschnitte wurden anschließend am cLSM untersucht. Es wurden HBs- und LC3-spezifische Antikörper verwendet, eine Inkubation mit geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern schloss sich an. Die Zellkerne wurden mit DAPI dargestellt (blaue Fluoreszenz), HBs erschien in Grün, LC3 in Rot. Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen der intrazellulären Verteilung. 10x Objektiv.

Es können erhöhte Mengen an LC3-spezifischen Signalen in vermehrt HBV-exprimierenden Zellen HBV-transgener Mäuse vermerkt werden. Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass die zytoplasmatischen Mengen an p62 und LC3 nicht per se in HBV-transgenem Gewebe erhöht sind, in vermehrt HBV-exprimierenden Zellen hingegen kommt es zu einer deutlichen Signalerhöhung.

6 Diskussion

Das Hepatitis-B-Virus ist ein partiell doppelsträngiges DNA-Virus, dessen Genom von einem Kapsid umfasst wird [Winckler, 2011]. Die äußere Virushülle beinhaltet die viralen Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs [Schaefer et al., 2008]. Neben viralen Partikeln werden in infizierten Zellen in großem Überschuss nicht-infektiöse SVP (v. a. Sphären, zu einem geringen Anteil Filamente) gebildet, welche lediglich HBsAg beinhalten [Patient et al., 2009b]. Während die Sphären einen geringen MHBs- sowie einen kaum nachweisbaren LHBs-Anteil aufweisen, besitzen die Filamente einen signifikant erhöhten LHBs-Anteil. [Liang, 2009, Prange, 2012]. Die Hülle vollständig assemblierter Virionen beinhaltet neben SHBs zusätzlich zu je ca. 15 % MHBs und LHBs. Sezernierte SVP sollen maßgeblich an der Infektiosität und Pathogenese des HBV beteiligt sein, indem sie immunmodulatorisch wirken und den Viruseintritt in benachbarte Hepatozyten erleichtern [Satoh et al., 2000, Patient et al., 2009a, Schädler and Hildt, 2009].

Bei Betrachtung der HBV-Morphogenese sind insbesondere die Exportmechanismen der verschiedenen (sub-)viralen Partikel von Interesse. Das Virus verlässt die Zelle ESCRT-abhängig über MVBs [Lambert et al., 2007], indem es die Ubiquitinierung seiner viralen Strukturen fördert und eine Verknüpfung zwischen endosomalem Kompartiment und ESCRT-Maschinerie herstellt [Lambert et al., 2007, Prange, 2012]. So kommt es durch Fusion von MVBs mit der Plasmamembran zur Ausschleusung der Virionen per Exozytose [Prange, 2012]. Die Morphogenese der SVP unterscheidet sich von jenen der Viren. Nach Zusammenlagerung des SHBs im Sinne einer *self assembly* erfolgt der Transport der entsprechenden Strukturen zum ERGIC, wo sich die Formung der Sphären anschließt [Patient et al., 2007, Prange, 2012]. Anschließend werden die Partikel über den konstitutiven sekretorischen Weg per Exozytose ausgeschleust [Patient et al., 2009a, Patzer et al., 1986, Lodish et al., 2000, Prange, 2012]. Auch die Filamente werden im ER geformt, sie werden jedoch nur wenig effektiv – vermutlich aufgrund ihres erhöhten LHBs-Gehalts – zum ERGIC transportiert. Eine anschließende Sekretion der Filamente ist möglich, erfolgt jedoch ineffizienter als jene der Sphären [Patient et al., 2007]. Erst kürzlich veröffentlichte Daten zeigen, dass die Filamente entsprechend der Virionen die Zelle über MVBs verlassen [Jiang et al., 2015].

Neben Beeinflussung des ESCRT-Systems und der MVBs [Lambert et al., 2007] gibt es weitere Verknüpfungspunkte des HBV mit Strukturen des zellulären Vesikeltransports, hier ist insbesondere das autophagosomale Kompartiment zu nennen. Die Autophagie ist ein essentieller lysosomaler Degradationsmechanismus, dem Abbau defekter Proteine und Zellorganellen dienend. Während ihrer Initiation wird ein Vesikel (Autophagosom) um zu degradierenden Cargo gebildet [Rubinsztein et al., 2012]. Das Autophagosom kann im Anschluss mit Endosomen, MVBs oder Lysosomen verschmelzen [Longatti and Tooze, 2009, Orsi et al., 2010]. Bei Fusion mit ebenjenen Strukturen wurde eine

Beteiligung der ESCRT-Komplexe beschrieben [Rubinsztein et al., 2012, Rusten and Stenmark, 2009, Hurley and Hanson, 2010], darüber hinaus bedarf eine effiziente Autophagie funktioneller MVBs [Fader and Colombo, 2009, Filimonenko et al., 2007]. Die Autophagie ist ein für die HBV-Morphogenese [Li et al., 2011b] und -Replikation essentieller Mechanismus [Yang et al., 2015]. Das Virus induziert die Autophagie, welche wiederum die HBV-Replikation steigert [Tian et al., 2011, Sir and Ou, 2010, Sir et al., 2010b]. Auch wenn die genaue Rolle der Autophagie im Lebenszyklus des HBV bislang nicht geklärt ist, so ist bekannt, dass die virale Replikation nicht innerhalb der autophagosomen Strukturen stattfindet. Eine der bestehenden Theorien besagt, dass die Autophagie über eine Phosphorylierung des HBcAg indirekt die im Kapsid stattfindende HBV-DNA-Replikation beeinflusst [Sir et al., 2010b]. Eine andere Vermutung besagt, dass die Autophagie für die vollständige Reifung der Core-Proteine – eine essentielle Voraussetzung für die Umhüllung des Nukleokapsids [Roseman et al., 2005, Gerelsaikhan et al., 1996] und die Sekretion neuer Virionen [Schädler and Hildt, 2009, Prange, 2012] – benötigt wird [Sir et al., 2010b]. Mit detaillierterem Wissen über die Bedeutung der autophagosomalen Strukturen für das HBV könnte sich ein neues therapeutisches Feld eröffnen, sei es über eine pharmakologisch bedingte Replikationshemmung oder den Exportstopp der (sub-)viralen Partikel.

In der vorliegenden Arbeit wurde die autophagosomale Aktivität *in vitro* unterbunden, um ihren Einfluss auf das Sekretionsverhalten des HBV zu untersuchen. Gearbeitet wurde vornehmlich mit stabil HBV-gtD-positiven Zellen. Zwischen den Genotypen herrschen zum Teil deutliche Unterschiede, insbesondere in der Schwere der Klinik sowie Chronizität [Sugiyama et al., 2007]. Um erste Eindrücke zu möglichen Genotypen-spezifischen Sekretionsmustern zu erhalten, wurden daher spezielle Untersuchungsschritte im transienten Transfektionssystem mit HBV-gtA- und -gtG-transfizierten Zellen ergänzt. Um die Autophagie zu inhibieren, kam NH_4Cl [Hart and Young, 1991] zum Einsatz. Über eine direkte Anhebung des pH-Wertes des Nährkulturmediums beeinflusst es den intrazellulären pH-Wert [Klionsky et al., 2014a]. So werden lysosomale Proteasen inaktiviert und ein Verschmelzen der Autophagosomen mit Lysosomen wird verhindert. Für NH_4Cl ist eine akute Toxizität nachgewiesen [Carl Roth GmbH + Co KG, 2015], es kommt zu Vakuolisierungen in Lysosomen und dem Golgi-Apparat [Yamamoto et al., 1998]. Zusätzlich wurde BFLA-1 eingesetzt, ein spezifischer Hemmer der vakuolären H^+ -ATPase [Oda et al., 1991]. Diese Protonenpumpe sorgt für die Aufrechterhaltung des sauren pH-Wertes innerhalb des vesikulären Apparates [Yamamoto et al., 1998] und spielt in der konstitutiven sowie regulierten Sekretion eine bedeutende Rolle [Gagliardi et al., 1998]. Eine Blockade der Protonenpumpe verändert den pH-Wert in den zellulären vesikulären Strukturen und beeinflusst den Transport zwischen den verschiedenen Organellen. BFLA-1 verhindert auf diese Weise eine Ansäuerung der Autophagosomen und Lysosomen und blockiert ihre Fusion zu Autophagolysosomen [Yoshimori et al., 1991, Yamamoto et al., 1998, Oda et al., 1991, Klionsky et al., 2014a]. Ein Vorteil des BFLA-1-Einsatzes liegt in kaum zu verzeichnenden Nebeneffekten [Yamamoto et al., 1998].

Ein durchgeführter MTT-Test zeigt eine deutliche Reduktion der Zellviabilität in den mit NH_4Cl inkubierten Zellen (um ca. 50 %; siehe 4.1.5). Die Dauer der Inkubation wurde – aufgrund der hohen Halbwertszeit der SVP in der Zelle und möglicher Prozessierungsvorgänge – mit 24 h beabsichtigt lange gewählt. Aufschluss über einen möglichen negativen Einfluss der Konzentrationshöhe oder

Inkubationsdauer könnten zusätzliche Titrationsversuche geben. Aufgrund gewisser zeitlicher und ökonomischer Begrenzungen, denen der experimentelle Teil dieser Arbeit unterlegen war, wurde von ausführlichen Titrationsversuchen abgesehen. Dies ist auch der Grund für die teilweise geringen Versuchsanzahlen der nachfolgenden Experimente. Mit BFLA-1 inkubierte Zellen zeigen eine unverändert hohe Zellviabilität. Zwar gefährden beide verwendete Substanzen die zelluläre Homöostase und wirken als zelluläre Stressoren [Yu et al., 2013], indem sie den Abbau fehlgefalteter Proteine und geschädigter Zellorganellen unterbinden. Die akute Toxizität des NH_4Cl hat jedoch einen wesentlich stärkeren Einfluss auf die Zellviabilität. Vermutlich führt sie über erhöhten ER-Stress und gesteigerte Synthese von Hitzeschockproteinen zu einer verstärkten Apoptoserate sowie einer Arretierung des Zellzyklus in den überlebenden Zellen [Efferth, 2007, Høyer-Hansen and Jäättelä, 2007]. Dies resultiert in einer verminderten Teilungsrate der überlebenden Zellen und einer reduzierten viralen Replikation. Bei der Auswertung der durchgeführten Experimente ist daher die reduzierte Zellviabilität der mit NH_4Cl inkubierten Zellen zu berücksichtigen.

Es wurden HBsAg-ELISA-Analysen durchgeführt, um den Gehalt der Oberflächenproteine im zellulären Überstand zu bestimmen (siehe 5.2). Eine Inkubation der stabil HBV-exprimierenden Zellen mit NH_4Cl resultiert in einer deutlichen Reduktion der HBsAg-Mengen um ca. 50 %. Unter Berücksichtigung der Zellviabilität ist jedoch von unverändert hohen extrazellulären HBsAg-Mengen auszugehen. Ebenso resultiert die BFLA-1-Inkubation in gleichbleibenden HBsAg-Mengen. Experimente im transienten Transfektionssystem bestätigen diese Ergebnisse in HBV-gtA-positiven Zellen (siehe 5.3), die HBsAg-Sekretion bleibt in beiden Inkubationsprotokollen unbeeinflusst. In den transfizierten HBV-gtG-positiven Zellen fällt ein minimal messbares HBsAg-Signal sowohl in den Autophagie-inhibierten als auch in den unbehandelten Kontrollzellen auf. Dies deckt sich mit veröffentlichten Daten zum deutlich abweichenden Sekretionsverhalten des gtG im Vergleich mit den übrigen HBV-Genotypen. Es wurde eine unbeeinträchtigte Virusfreisetzung bei stark reduzierter Sekretion der SVP aufgedeckt [Peiffer et al., 2015]. So ist es verständlich, dass die Inhibition der autophagosomalen Aktivität in HBV-gtG-positiven Zellen zu keiner messbaren Sekretionsänderung der – ohnehin kaum sezernierten – SVP führt. Die vorliegenden Ergebnisse betonen jedoch die bestehenden Unterschiede zwischen den einzelnen HBV-Genotypen. So wird ersichtlich, dass nicht nur Unterschiede im Sekretionsverhalten zwischen Dane-Partikeln, Sphären und Filamenten bestehen, sondern auch zusätzlich zwischen den unterschiedlichen Genotypen. Die im ELISA messbaren HBsAg-Mengen setzen sich sowohl aus SVP als auch den Hüllproteinen der Virionen zusammen, eine Unterscheidung erfolgt nicht. Da die SVP jedoch in einem Überschuss von 1:1.000 bis 1:10.000 sezerniert werden [Ganem and Prince, 2004, Chai et al., 2008], wird der Hauptanteil des gemessenen HBsAg von den SVP gestellt. Somit wird deutlich, dass die durchgeführte Autophagieinhibition keinen messbaren Einfluss auf die extrazellulär befindlichen HBsAg-Mengen hat, der ER-Golgi-Sekretionsweg bleibt somit unbeeinflusst. Schließlich könnten die Sphären – welche wiederum den Großteil der SVP ausmachen – bei einer Blockade dieser Exportroute die infizierte Zelle nicht verlassen und es wäre mit deutlich verringerten extrazellulären HBsAg-Mengen zu rechnen. Die unverändert hohe HBsAg-Sekretion zeigt somit, dass das autophagosomale Kompartiment eine untergeordnete Rolle im Export der SVP spielt.

Messungen des nichtpartikulär über den Golgi-Apparat sezernierten [Jochum and Gerken, 2011]

HBeAg (siehe 5.4) weisen infolge der NH_4Cl -Inkubation – unter Berücksichtigung der Zellviabilität – eine schwache Mengenerhöhung in den stabil HBV-exprimierenden Zellen auf. Der Einsatz von BFLA-1 mündet in einer deutlichen Mengenzunahme. Aufgrund der starken Absorptionssteigerung konnten keine definitiven Endwerte bestimmt werden – aus ökonomischen Gründen wurde von einer Wiederholung dieses ELISAs mit verdünnten Proben abgesehen, da die Tendenz der Ergebnisse eindeutig war. Die Höhe des HBeAg korreliert in der Regel positiv mit der Virusreplikation in HBV-Infizierten [Jochum and Gerken, 2011, Gerlich, 2013, Alagiozian-Angelova et al., 1998]. Dass die gemessenen HBeAg-Zunahmen nach der BFLA-1-Inkubation für eine gesteigerte virale Replikation sprechen, ist unwahrscheinlich, da bereits diverse veröffentlichte Daten den essentiellen Charakter einer funktionierenden Autophagie für die virale Replikation gezeigt haben [Yang et al., 2015, Sir and Ou, 2010, Sir et al., 2010b]. Vielmehr weisen die Ergebnisse darauf hin, dass es bei Inhibition der Autophagie zu einer gesteigerten Ansammlung viraler mRNA-Mengen kommt. Diese kann zum einen durch eine direkte virale Replikationshemmung zwecks veränderter HBcAg-Phosphorylierung im Kapsid [Sir et al., 2010b] zustande kommen. Zum anderen kann eine unvollständige Reifung der Core-Proteine, folglich eine ausbleibende Umhüllung des Nukleokapsid und ein Stopp der Umschreibung von RNA in DNA, ursächlich sein [Bruss, 2007, Schädler and Hildt, 2009]. Durch Translation der akkumulierten, nicht in virale DNA translatierte, pgRNA, kann vermehrt HBeAg gebildet und konstitutiv ausgeschleust werden. Die schwache HBeAg-Steigerung nach NH_4Cl -Inkubation kann auf einer mäßigen Beeinflussung der Replikation oder einer schwächeren Umschreibung der akkumulierten pgRNA in HBeAg beruhen, vermutlich durch die erhöhte Zelltoxizität bedingt.

Es schloss sich eine Bestimmung der extrazellulären DNA-Mengen an (siehe 5.5). Die im Überstand von stabil HBV-positiven Zellen nachweisbare virale DNA entstammt ausschließlich vollständig assemblierten Virionen und ist somit der Menge an extrazellulären Genom-Kopien gleichzusetzen. Zwar könnte ein Teil der gemessenen viralen DNA aus abgestorbenen Zellen stammen, da jedoch der zelluläre Überstand vor Vermessung in der qRT-PCR zentrifugiert wurde, ist dieser Anteil als vernachlässigbar gering anzusehen. Im Überstand der mit BFLA-1 inkubierten Zellen werden äußerst geringe Mengen an viralem Genom gemessen. Dies kann sowohl auf einer verminderten Bildungsrate, einer unterdrückten Sekretion oder einem verstärkten Abbau der Virionen basieren. Letzteres ist eher unwahrscheinlich, da ein Abbau der Virionen auf eine funktionierende Autophagie angewiesen ist. Da jedoch die frühen autophagosomalen Strukturen unbeeinflusst bleiben, kann dies als Ursache nicht völlig ausgeschlossen werden. Der hemmende Einfluss des BFLA-1 könnte darin bestehen, dass die Virusaufnahme in MVBs verhindert oder auch ein Verschmelzen der MVBs mit Lysosomen bzw. der Plasmamembran blockiert wird. Somit könnte das Virus im ESCRT-System „stecken“ bleiben und an der Ausschleusung gehindert werden. Es ist zudem möglich, dass eine Hemmung des autophagosomalen Kompartiments zu einer reduzierten Replikation und folglich verringerten sezernierbaren Virusmengen führt. Gleichbleibende extrazelluläre HBsAg-Mengen, in Verbindung mit dem marginalen extrazellulären Virusgehalt, weisen auf eine unbeeinflusste bis leicht gesteigerte Sekretion der SVP hin. Demnach sollte die Synthese der SVP ungehindert stattfinden und ihr Export sollte ebenso effektiv erfolgen wie im Zustand unbeeinflusster Autophagie. Dies konnte auch bereits durch die Arbeiten von Wanatabe et al. nachgewiesen werden, welche beschreiben, dass Viren und

SVP (Sphären) die Zelle auf unterschiedlichen Wegen verlassen [Watanabe et al., 2007]. Auch in den Proben der mit NH_4Cl inkubierten Zellen ist eine Reduktion der sezernierten Genome erkennbar, unter Berücksichtigung der Zellviabilität fällt die Reduktion der Genomanzahl jedoch schwächer aus. Es ist möglich, dass die Wirkung des NH_4Cl auf die Virussekretion milder ausfällt, da die Substanz vornehmlich auf den lysosomalen pH-Wert einwirkt. Übrige vesikuläre Strukturen – durch BFLA-1 direkt beeinflusst – werden primär nicht verändert. Auf Ebene der Virusreplikation können die beobachteten Ergebnisse für eine Replikationshemmung – bedingt durch den zelltoxischen Einfluss des NH_4Cl – sprechen, resultierend in einer verringerten Bildungsrate viraler Partikel und folglich verminderten Mengen sezernierbarer Dane-Partikel.

In WB-Analysen wurde der LHBs-Anteil in Zelllysaten bestimmt. Das NH_4Cl -Protokoll verursacht eine signifikante, das BFLA-1-Protokoll eine noch ausgeprägtere, intrazelluläre Steigerung (siehe 5.7). Erhöhte intrazelluläre LHBs-Mengen können sowohl Virionen als auch Filamenten zugehörig sein, sei es durch eine erhöhte Produktion oder auch blockierte Sekretion der Partikel. Neben HBV-spezifischen Proteinen wurden in den WB-Analysen auch Marker der autophagosomalen Aktivität bestimmt. Eine solche Bestimmung stellt eine Momentaufnahme innerhalb eines kontinuierlichen autophagosomal-lysosomalen Fließsystems dar, der tatsächliche autophagosomale Flux wird nicht bestimmt [Mizushima and Yoshimori, 2014]. Einer der gemessenen Marker ist das Protein p62, welches ubiquitinierten Cargo durch spezifische Bindung an LC3 zum Autophagosom leitet und dessen Degradation induziert [Zheng et al., 2009]. Normalerweise wird p62 im Verlauf der Autophagie abgebaut, eine Inhibition des autophagosomalen Kompartiments resultiert folglich in einer p62-Akkumulation [Klionsky et al., 2014b, Komatsu et al., 2010]. Diese kann in mit NH_4Cl inkubierten, stabil HBV-positiven Zellen jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden (siehe 5.7). Die ausbleibende Akkumulation könnte auf einer nicht ausreichend starken Inhibition der autophagosomalen Strukturen beruhen. Eine wahrscheinlichere Erklärung liegt in einer autophagieunabhängigen Änderung des p62-Expressionsniveaus [Mizushima and Yoshimori, 2014], schließlich nimmt der p62-Gehalt bei vermehrtem Zelluntergang ab. Unter Berücksichtigung des MTT-Tests ist daher von Letzterem auszugehen.

Mit LC3 wurde ein weiterer autophagosomaler Marker untersucht. Dieses Protein liegt zu Beginn der Autophagosomenbildung als zytosolisches LC3-I (18 kDa) vor. Später ist es in modifiziertem Zustand als sogenanntes LC3-II (16 kDa) membrangebunden auf und in Autophagosomen zu finden. Während der Autophagolysosomen-Reifung wird das äußere LC3-II abgespalten, das innere durch lysosomale Enzyme abgebaut [Tanida et al., 2014]. So zeigt sich zu Beginn einer Autophagieinhibition eine Abnahme des LC3-I-Gehalts, die LC3-II-Menge sinkt erst später [Mizushima and Yoshimori, 2014]. Da LC3-II durch externe Bedingungen weniger beeinflussbar ist als LC3-I und zudem durch LC3-spezifische Antikörper deutlich sensitiver gebunden wird, wird die Messung des LC3-II empfohlen [Tanida et al., 2014, Mizushima and Yoshimori, 2014, Klionsky et al., 2014a,b]. Die Messung einer erhöhten Autophagosomenzahl anhand des LC3-II-Signals kann eine erhöhte autophagosomale Aktivität bedeuten [Kuma et al., 2014, Klionsky et al., 2014b]. Jedoch steht eine Akkumulation der Autophagosomen nicht gleichbedeutend für eine vermehrte lysosomale Degradation [Mizushima and Yoshimori, 2014], da die Aktivität selbst und die Vollendung des Prozesses unbeobachtet bleiben [Klionsky et al., 2014b]. Daher kann das Ergebnis auch eine reduzierte Fusion zwischen Autophago-

somen und Lysosomen, also eine Hemmung der autophagosomalen Reifung, darstellen [Klionsky et al., 2014a]. In den WB-Analysen (siehe 5.9) zeigt sich in den mit NH_4Cl -inkubierten Zellen eine signifikante LC3-II-Steigerung, dies lässt sich mit der beabsichtigten autophagosomalen Blockade erklären. Schließlich wird ein Verschmelzen der Autophagosomen mit Lysosomen unterbunden, die gebildeten Autophagosomen werden somit am Abbau gehindert und bleiben bestehen. So führt das NH_4Cl -Behandlungsprotokoll trotz nicht signifikanter p62-Akkumulation zu einer nachweisbaren Autophagieinhibition. Weitere Resultate äußern sich in stark erhöhten p62- und mäßig gesteigerten LC3-II-Mengen nach der Inkubation mit BFLA-1 (siehe 5.7). Eine besonders verlässliche LC3-II-Messung sollte zu Beginn einer Autophagieinhibition erfolgen [Tanida et al., 2014], im vorliegenden Fall wurde jedoch über einen langen Zeitraum inhibiert. Es ist daher möglich, dass bereits ein gewisser lysosomaler LC3-II-Abbau eingetreten und deshalb lediglich eine geringe Steigerung zu vermerken ist. Die Kombination der p62- und LC3-II-Ergebnisse der WB-Analysen sprechen somit auch im Falle der BFLA-1-Inkubation für eine eingetretene Inhibition des autophagosomalen Kompartiments.

Ein Vergleich der basalen p62-Mengen in unbehandelten stabil HBV-positiven HepAD38-Zellen mit unbehandelten HBV-negativen HepG2-Zellen zeigt keinerlei nennenswerte Veränderung des Proteinsignals (siehe 5.8). Eigentlich wäre mit geringeren Mengen an p62 in HBV-positiven Zellen zu rechnen, da es aufgrund der Autophagieinduktion zu einem verstärkten Abbau kommen sollte. Ähnliches gilt für die basalen Mengen der LC3-II-Signale (siehe 5.10), auch hier wäre aufgrund der HBV-typischen Autophagieinduktion mit veränderten basalen Niveaus der Autophagiemarker in HBV-positiven Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen zu rechnen. Jedoch ist ein Vergleich der autophagosomalen Kapazität zwischen verschiedenen Zelllinien aufgrund divergierender Differenzierungsstadien schwierig, auch der Proteingehalt kann je nach Zelltyp stark fluktuieren [Mizushima and Yoshimori, 2014]. Die degradative Kapazität steht in engem Zusammenhang mit dem jeweiligen Zelltyp und wird u. a. vom Zellalter beeinflusst [Klionsky et al., 2014b]. Die sich ähnelnden basalen p62- und LC3-II-Mengen in den HBV-stabilen sowie HBV-negativen Zellen stellen daher nur einen gewissen Anhaltspunkt dar und lassen keinen Schluss auf vergleichbare Autophagieniveaus zu.

Die WB-Analysen wurden im transienten Transfektionsmodell wiederholt (siehe 5.11). Hierbei kam anstelle des LHBs-spezifischen ein Antikörper zum Einsatz, welcher die Detektion aller Oberflächenproteine samt ihrer unglykolysierten wie glykolysierten Formen ermöglicht. Bei beiden Genotypen zeigt sich nach NH_4Cl -Inkubation eine LHBs-Zunahme, auch SHBs und MHBs werden verstärkt detektiert. Einzig das SHBs-Signal der HBV-gtG-positiven Zellen zeigt eine abgeschwächte Intensität. Dies kann auf verringerte Proteinmengen oder aber eine ungenügende Verteilung des Detektionssubstrates zurückzuführen sein. Da alle übrigen Banden eine Signalverstärkung aufweisen und die β -Aktin-Kontrolle unauffällig ist, ist Letzteres wahrscheinlicher. Im Falle der BFLA-1-Inkubation sind im Vergleich zu den Kontrollzellen gesteigerte Mengen an SHBs detektierbar. Somit ergeben sich abweichende Ergebnisse im Vergleich mit den HBV-gtD-positiven Zellen, in welchen die BFLA-1-Inkubation stärkere Effekte auf den LHBs-Gehalt hervorruft als NH_4Cl . Möglicherweise wird das autophagosomale Kompartiment unterschiedlich stark von den einzelnen Genotypen beeinflusst. Darüber hinaus ist denkbar, dass die Ausstattung der V^+ -ATPasen in den verwendeten Zelllinien divergiert, weshalb der BFLA-1-Einfluss auf die autophagosomalen Prozesse unterschiedlich stark ausfallen kann. Es besteht zudem die

Möglichkeit, dass die Zelllinien unterschiedlich empfindlich auf eine NH_4Cl -Inkubation reagieren und das Ausmaß zelltoxischer Nebeneffekte divergiert. Um eine eindeutige Aussage diesbezüglich treffen zu können, wäre eine Wiederholung der WB-Analysen im transienten System in ausreichender Anzahl vonnöten. Abschließend ist zu vermerken, dass in den Zellysaten beider Genotypen eine deutliche Verstärkung sowohl des p62- als auch des LC3-II-Gehalts auftritt, gleichbedeutend mit dem Eintritt der beabsichtigten Autophagieinhibition.

Es schloss sich eine Analyse der für die Bildung neuer Virionen essentiellen intrazellulären HBV-spezifischen mRNAs an. Es ergeben sich im Falle der NH_4Cl -Inkubation keine messbaren Veränderungen (siehe 5.12), hingegen ist in den Proben der mit BFLA-1 inkubierten Zellen eine signifikante Zunahme zu messen. Dies deckt sich mit den bereits zuvor aufgeführten Ergebnissen. Schließlich sind in den mit BFLA-1 inkubierten Zellen deutlich verringerte Virusmengen im Überstand zu messen, somit muss auch intrazellulär vermehrt DNA zu finden sein. Möglicherweise kann allerdings die 3,5kb-mRNA nicht erfolgreich für die Bildung neuer Viren genutzt werden, da bei gehemmter Autophagie die Ausschleusung des Virus vermindert und so das Fließgleichgewicht zwischen Virus-Neubildung und -Export gestört ist. Die überschüssige 3,5 kb-mRNA könnte somit zur Produktion von HBeAg sowie HBcAg genutzt werden. Neben einer Hemmung des Virusexports beeinflusst die Autophagie durch eine HBcAg-Phosphorylierung die DNA-Replikation in assemblierten Kapsiden und wird zudem für die Reifung des HBcAg benötigt. Bei der Autophagie-Inhibition werden folglich – zusätzlich zur Behinderung der Virusekretion über MVBs – weniger erfolgreich vollständig assemblierte Virionen gebildet. Dass eine intrazelluläre Akkumulation von 3,5 kb mRNA nach NH_4Cl -Inkubation ausbleibt, kann auf der erhöhten toxischen Wirkung der Substanz und entsprechend veränderten intrazellulären Prozessen beruhen. Auch wenn ein direkter Einfluss der verminderten Zellviabilität auf die Anzahl der intrazellulären Virionen nicht gegeben sein sollte, da zur Messung der Transkripte die gleiche Menge zellulärer mRNA – umgewandelt in cDNA – eingesetzt wurde, kann ein indirekter Einfluss nicht ausgeschlossen werden.

Zur weiteren Untersuchung einer möglichen Beeinflussung der viralen Replikation durch die Autophagieinhibition wurde eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt (siehe 5.13 und 5.14). Die 3,5 kb mRNA dient als Matrize der pgRNA, anhand dieser mRNA wird die virale DNA transkribiert. Darüber hinaus kodiert sie – je nach Startpunkt – für das HBcAg, die virale Polymerase und das HBeAg [Modrow et al., 2010]. Die Erhöhung dieses Transkripts nach BFLA-1-Inkubation lässt sich durch die bereits aufgeführten hemmenden Einflüsse der Autophagie sowohl auf die Replikation als auch auf die Formung und Ausschleusung reifer Virionen erklären. So kann es ohne eine Steigerung der Replikation zu einer Anhäufung der 3,5 kb mRNA kommen, da eine Translation der mRNA in entsprechende virale Proteine und die anschließende Zusammenlagerung zu reifen Virionen ausbleibt. Theoretisch könnte die gesteigerte Menge an 3,5 kb mRNA auch auf einer Induktion der Replikation beruhen. Die in dieser Arbeit getätigten Ergebnisse liefern jedoch keinen Beweis für eine Replikationsinduktion unter Autophagieinhibition und auch die bisher publizierten Daten konnten einen solchen Effekt nicht nachweisen. Die nach NH_4Cl -Inkubation eingetretene Reduktion der 3,5 kb mRNA kann durch nachhaltige Schädigung des Zellhaushalts der überlebenden Zellen, möglicherweise in Kombination mit einem reduzierten Replikationsmaß, bedingt sein. Nicht völlig ausgeschlossen werden kann, dass ein

Teil der 3,5 kB RNA autophagosomal degradiert wurde, entweder direkt oder in Form von Kapsiden, in denen sich die 3,5 kB mRNA befindet. Schließlich blockiert NH_4Cl zwar die autophagosomale Reifung, die frühen Schritte der Autophagie werden jedoch nicht unterbunden.

Eine differenzierte Analyse der 2,4 kb und 2,1 kb mRNA-Mengen ist aufgrund zu dicht benachbarter Northern-Blot-Signale nicht möglich. Die gemeinsame Quantifizierung der mRNAs ergibt in beiden Behandlungsprotokollen eine leichte Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollzellen. Anhand der 2,4 kb mRNA wird LHBs, anhand der 2,1 kb mRNA werden MHBs sowie SHBs synthetisiert [Modrow et al., 2010]. Die Inhibition der autophagosomalen Prozesse verursacht somit keine deutliche Mengenänderung des HBsAg auf mRNA-Ebene. Die mRNA-Mengen korrelieren nicht zwingend mit der Menge an gebildetem Protein aufgrund unterschiedlich hoher Translationsniveaus, dennoch sind sie ein guter Hinweis auf möglicherweise veränderte Proteinmengen. Der in den WB-Analysen festgestellte erhöhte LHBs-Anteil ist daher vermutlich nicht auf eine deutlich erhöhte Bildung des LHBs zurückzuführen. Intrazellulär sind vermehrte Gehalte an LHBs und 3,5 kb-mRNA zu messen, die Mengen an HBsAg bleiben nahezu unverändert. Extrazellulär ist lediglich eine Beeinflussung der Viruslast messbar. Die Gesamtheit dieser Ergebnisse zeigt, dass bei inhibierter Autophagie die Virus-Sekretion beeinflusst wird, wohingegen die Sekretion der SVPs nicht messbar betroffen ist. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Filamente ebenso wie die Viren am Export gehindert werden, da sie den gleichen Sekretionsweg wie die Viren nutzen [Jiang et al., 2015]. Da jedoch der Anteil der Filamente an den SVP sehr gering ist, ist diesbezüglich kein messbarer Effekt auf Ebene des extrazellulär messbaren HBsAg zu erwarten. Die 0,7 kb mRNA steht für die Bildung des HBxAg [Locarnini, 2004], eines multifunktionell wirksamen, regulatorischen Proteins, welches einen positiven Einfluss auf die Autophagieinduktion ausübt [Sir and Ou, 2010]. Die HBx-abhängige Autophagieinduktion konnte *in vitro*, *in vivo* sowie in natürlicher Infektion nachgewiesen werden und basiert auf der Bindung des viralen Proteins an Klasse-III-PI3K – eines regulatorischen Enzyms, welches für die Initiation der Autophagie benötigt wird. Die Transkription des HBxAg ist in NH_4Cl -inkubierten Zellen geringfügig, in mit BFLA-1 inkubierten Zellen deutlich erhöht. Es ist denkbar, dass die Transkription des Proteins in Autophagie-inhibierten Zellen im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus erhöht wird, um in einer gesteigerten Bildung des Proteins zu resultieren. Die toxische Wirkung des NH_4Cl , die die zelluläre Homöostase beeinträchtigt, könnte diesen negativen Feedback-Mechanismus stören und zu lediglich schwach gesteigerten 0,7 kb mRNA-Mengen führen. Die Ergebnisse des vorliegenden Northern Blots dienen als erste Orientierung, zur Bestätigung wären weitere Versuchsdurchläufe vonnöten.

Zur Analyse der subzellulären Proteinverteilung wurden IF-Aufnahmen der mit BFLA-1 inkubierten Zellen angefertigt (siehe 5.15, 5.16). Es sind intrazellulär gesteigerte, umverteilte LHBs-Mengen erkennbar. So kann das Protein in Kontrollzellen punktuell zytosolisch und in geringem Maße perinukleär angereichert detektiert werden. Unter BFLA-1-Einfluss ergibt sich eine Akkumulation des LHBs-Signals und eine vermehrte Anreicherung im perinukleären Raum. Eine Erklärung liegt in der Anhäufung der am Export behinderten Virionen und Filamente, die denselben Exportweg über MVBs nutzen ([Jiang et al., 2015]. Die p62- und LC3-spezifischen Strukturen sind als punktförmige, diffus im Zytoplasma verteilte, Signale erkennbar. Dass selbst in unbehandelten Zellen autophagosomale Strukturen erkennbar sind, lässt sich durch die Tatsache begründen, dass ein gewisses Maß

autophagosomalen Fluxes dauerhaft besteht. Eine Inkubation der Zellen mit BFLA-1 äußert sich in deutlicher Signalzunahme beider Autophagiemarker, erkennbar in einer gesteigerten Größe und Anzahl der Granula. Hintergrund ist eine Akkumulation der autophagosomalen Strukturen, deren Fusion mit Lysosomen unterbunden wurde.

Die mit BFLA-1 erzielten Ergebnisse zeigen einen deutlichen Einfluss des autophagosomalen Kompartiments auf die HBV-Morphogenese in HBV-gtD-positiven Zellen auf Ebene des Virusexports. So führt die Autophagieinhibition über eine Hemmung des intrazellulären Vesikeltransports zu einer Reduktion der Virusfreisetzung, resultierend in einer intrazellulären Akkumulation an Virionen in den kernnahen Kompartimenten (ER/Golgi). Entsprechend zeigt sich auch eine intrazelluläre Zunahme und veränderte subzelluläre Verteilung des LHBs, beruhend auf den in kernnahen Kompartimenten zurückgehaltenen Viren und Filamenten. Das HBsAg wird in nahezu unbeeinflusstem Ausmaß synthetisiert und in Form von Sphären ungehindert ausgeschleust. So kommt es in Autophagie-inhibierten Zellen zu einer verminderten Sekretion an Viren und Filamenten, wohingegen die Sphären in Syntheseleistung wie Sekretion trotz Beeinflussung des intrazellulären Vesikeltransports unbeeinflusst bleiben. Der wesentlichen Unterschied in den mit NH_4Cl inkubierten Zellen liegt in einer schwächer ausgeprägten Form der Effekte, verglichen mit jenen der BFLA-1-inkubierten Zellen, was durch die vermehrt auftretenden apoptotischen Prozesse zu erklären ist.

Für einen ersten Eindruck der *in vivo*-Verhältnisse wurden Leberlysate und Leberschnitte der entsprechenden Mäuse untersucht. Die Mäuse kamen nicht in Kontakt mit Mitteln zur Autophagieinhibition. Somit entsprechen die Ergebnisse der WB-Analysen der Mäuse-Leberlysate im übertragenden Sinne den WB-Ergebnissen der unbehandelten HBV-positiven bzw. -negativen Kontrollzellen. Eine grundsätzliche therapeutische Beeinflussung der Autophagie kommt nicht in Frage, da eine Beeinflussung dieser Prozesse zu unkontrollierbaren Nebenwirkungen führen würde, da nicht nur Hepatozyten, sondern auch die übrigen Zellen des Körpers auf eine funktionierende Autophagie angewiesen sind [Rubinsztein et al., 2012]. Eine systemische Verabreichung von NH_4Cl wie BLFA-1 ist für die beabsichtigten Studien undenkbar, da beide Substanzen in dieser Darreichungsform toxisch auf den Organismus wirken [MP Biomedicals, 2005, Merck Millipore, 2014]. BFLA-1 inhibiert generalisiert V-ATPasen; da keine selektive Protonenpumpen-Subklasse in Lebergewebe angesprochen wird [Gagliardi et al., 1998], kann auch keine spezifizierte Wirkung der Autophagieinhibition in hepatischem Gewebe analysiert werden. Entsprechendes gilt für NH_4Cl und seine Beeinflussung des zellulären pH-Wertes [Rubinsztein et al., 2012].

Es wurden die endogenen Gehalte an p62 sowie LC3 in den murinen Lysaten gemessen (siehe 5.17). Die Ergebnisse transgener HBV-positiver Mäuse wurden jenen von Wildtyp-Mäusen gegenübergestellt. In WB-Analysen der Proben HBV-transgener Mäuse zeigen sich kaum veränderte Mengen an LC3-II im Vergleich zu HBV-negativen Wildtyp-Mäusen. Die Detektion des p62 war nicht in vergleichbarer Weise möglich. Dies erklärt den großen Fehlerbalken, wenn auch hier ähnliche Signalstärken bei HBV-transgenen sowie Kontrolltieren zu verzeichnen sind. Eine Wiederholung insbesondere des Immunoblottings der p62-Signale wäre für eindeutigere Aussagen vonnöten. Die Verhältnisse der Autophagiemarker *in vivo* weisen Parallelen zu jenen der Zellkultur auf (siehe 5.10). So zeigt bereits die Bestimmung der basalen LC3-II- und p62-Mengen in der Zellkultur in HBV-positiven wie -negativen

Zellen vergleichbare Mengen (siehe 5.8). Auch wenn die Bestimmung der autophagosomalen Strukturen somit ähnlich ausfällt, kann aufgrund dessen nicht – wie bereits zuvor erwähnt – auf eine vergleichbare Aktivität des autophagosomalen Abbaus geschlossen werden [Mizushima and Yoshimori, 2014]. Es weist lediglich darauf hin, dass die Anzahl der Autophagosomen vergleichbar ist [Klionsky et al., 2014b]. Weiterhin gilt auch hier, ebenso wie in der Zellkultur, dass eine Bestimmung der p62- wie LC3-Mengen lediglich Momentaufnahmen eines mobilen Prozesses sind [Klionsky et al., 2014a]. Zudem ist die HBV-Expression in den einzelnen Hepatozyten nicht zu jeder Zeit gleich hoch, auch dies erklärt Schwankungen in der Höhe der autophagosomalen Kapazität.

Die HE-gefärbten Ultradünnschnitte HBV-transgener Mäuse zeigen keinen Hinweis auf eine veränderte Morphologie im Vergleich zum Wildtyp. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die in der LSM-Analyse beobachteten Ergebnisse auf strukturelle Veränderungen zurückzuführen sind. In den immunhistologisch gefärbten Präparaten zeigt sich eine Erhöhung der LC3- sowie p62-Signale in stärker HBV-exprimierenden Zellen der HBV-transgenen Tiere. LC3 ist mit autophagosomalen Organellen assoziiert; die erhöhte Signalintensität beruht auf einer gesteigerten Menge und Größe an LC3-markierten Vakuolen. Das Protein p62 leitet ubiquitinierten Cargo zum autophagosomalen Kompartiment und ist mit LC3 assoziiert. Somit repräsentieren die gesteigerten LC3- und p62-Signale die HBV-bedingte Induktion der autophagosomalen Aktivität.

Um den Einfluss des autophagosomalen Kompartiments auf den HBV-Lebenszyklus und insbesondere die filamentöse Sekretion intensiver untersuchen zu können, wären detailliertere WB-Analysen zellulärer Überstände möglich, um den extrazellulären Gehalt des LHBs zu bestimmen. Zudem könnten elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden, um einen direkten Einfluss der Autophagie auf die Morphologie der sezernierten viralen und subviralen Partikel untersuchen zu können. Neben Begutachtung des Effekts der experimentellen Autophagieinduktion (z. B. mittels Rapamycin) auf die HBV-Morphogenese wäre eine weitere Untersuchung möglicher genotypenspezifischer Unterschiede hinsichtlich der Beeinflussung des autophagosomalen Kompartiments und der Sekretion der viralen und subviralen Partikel sinnvoll. Sehr interessant wäre darüber hinaus die Analyse der Autophagieinhibition *in vivo*. Bei Identifikation einer spezifischen hepatischen V-ATPase könnte diese mittels entsprechend inhibitorisch wirkendem Agens, z.B. einem chemisch modifizierten BFLA-1, angesprochen werden. So existieren bereits Studien, in denen angestrebt wurde, eine bestimmte Protonenpumpe in der Plasmamembran von Osteoklasten mithilfe eines chemisch modifizierten BFLA-1 oder eines anderen Inhibitors anzusprechen [Gagliardi et al., 1998]. Im vorliegenden Fall würde dies Versuchsreihen mit systemischer Verabreichung ermöglichen, da einzig das Lebergewebe von der Wirkung des Inhibitors beeinflusst würde und systemische Nebenwirkungen eingeschränkt oder aufgehoben würden. Dies könnte einen wichtigen Schritt in der Entwicklung eines neuartigen therapeutischen Ansatzes darstellen. Schließlich könnte bei exakter Identifizierung der für die virale Replikation oder auch für den Export der viralen Partikel essentiellen Strukturen im autophagosomalen Kompartiment spezifisch, mit möglichst niedrigem Nebenwirkungspotenzial, pharmakologisch in ebendiese Prozesse eingegriffen werden.

Das in dieser Arbeit eingesetzte experimentelle System mit stabil HBV-positiven Zellen ist insbesondere bezüglich der BFLA-1-Inkubation geeignet, da die Blockade der autophagosomalen Prozesse verlässlich reproduzierbar ist. Die Inkubation mit NH_4Cl resultiert zwar ebenso in einer reproduzier-

baren Autophagieinhibition – da jedoch die Zellviabilität bei Verwendung dieser Substanz reduziert wurde, ist der in diesem Rahmen erfolgte Einsatz des NH_4Cl nur indirekt als geeignet einzuschätzen. Der Literatur ist zu entnehmen, dass HBV die Autophagie in infizierten Zellen induziert. Diese Induktion ist essentiell für die virale Replikation, wenngleich sie nicht innerhalb der autophagosomalen Strukturen stattfindet. Die genaue Funktion der Autophagie für die HBV-Morphogenese konnte bislang noch nicht aufgedeckt werden. In der vorliegenden Arbeit ergeben sich unter Inhibition der autophagosomalen Prozesse *in vitro* keinerlei Änderungen in der HBsAg-Sekretion, somit können die SVPs (hauptsächlich Sphären) unter Autophagie-Inhibition die Zelle normal verlassen. Intrazellulär gesteigerte Mengen an 3,5 kb mRNA lassen auf eine beeinträchtigte Verpackung und Ausschleusung von Virionen schließen, bedingt durch die Hemmung der autophagosomalen Prozesse. Gesteigerte extrazelluläre Mengen an HBeAg bestätigen, dass die 3,5kb mRNA nunmehr vermehrt als Matrize zur Bildung dieses viralen Proteins genutzt wird, welches schließlich konstitutiv sekretiert wird. Die in der qRT-PCR gemessenen verringerten Mengen viraler DNA im Überstand sind gleichbedeutend mit einer reduzierten Virussekretion, folglich verbleiben die Virionen in der Zelle. Dies zeigt eindeutig, dass eine funktionierende Autophagie sowohl für die Ausschleusung als auch die erfolgreiche Bildung vollständig assemblierter Virionen essentiell ist. Die in den WB-Analysen sowie IF-Aufnahmen registrierten gesteigerten intrazellulären LHBs-Mengen sind auf die am Export gehinderten und folglich im ER-/Golgi-Bereich akkumulierten Viren und Filamente zurückzuführen. Diese Ergebnisse decken sich mit der bereits veröffentlichten Datenlage: während sowohl die Virionen als auch Filamente ESCRT-abhängig über MVBs ausgeschleust werden, werden die Sphären, zunächst am ERGIC in ihre endgültige Form verwandelt, über den konstitutiven Sekretionsweg via Golgi-Apparat exportiert. *In vivo* ergeben sich in den WB-Analysen der Maus-Leberlysate tendenziell ähnliche Mengen an Autophagiemarkern in den HBV-transgenen sowie Wildtyp-Proben – dies spricht für eine vergleichbare Menge an Autophagosomen in beiden Gruppen und deckt sich mit den *in vitro*-Ergebnissen. Während die HBV-transgenen Zellen in den HE-Aufnahmen keine morphologischen Auffälligkeiten aufweisen, zeigen die immunhistologischen Aufnahmen erhöhte LC3- und p62-Mengen in vermehrt HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Dies spricht für eine Erhöhung der basalen Autophagie in HBV-positiven Zellen – ebenfalls in Übereinstimmung mit den *in vitro*-Ergebnissen.

Die Gesamtheit der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse geben einen tieferen Einblick in die Bedeutung der Autophagie für die Morphogenese des Hepatitis-B-Virus. Es ist denkbar, dass neuartige Therapieansätze auf Basis der Beeinflussung autophagosomaler Prozesse eine Eindämmung der viralen Last in infizierten Patienten bewirken könnten. Womöglich könnten bei Hemmung der Autophagie sowohl Viren als auch Sphären am Export gehindert und die Infektiosität reduziert werden. Aufgrund der zum Teil geringen Experimentanzahl liegt jedoch eine gewisse statistische Unsicherheit vor; um definitive Aussagen bezüglich möglicher Therapieoptionen treffen zu können, wären weitere Validierungen vonnöten.

7 Zusammenfassung

Einfluss der Autophagie-Inhibition auf die Morphogenese des Hepatitis-B-Virus

Das Hepatitis-B-Virus ist ein partiell doppelsträngiges DNA-Virus, welches mittels Sekretion immunmodulatorisch wirkender SVP (Sphären und Filamente) seine Infektiosität steigern kann. Der Exportmechanismus der Virionen und Filamente erfolgt ESCRT-abhängig über MVBs, wohingegen Sphären konstitutiv via Golgi-Apparat ausgeschleust werden. Neben der vielfältigen Beeinflussung der vesikulären Transportwege spielt die Induktion der Autophagie eine essentielle Rolle für das HBV – seine virale Replikation wird hierdurch erst ermöglicht und darüber hinaus gesteigert, wenngleich die Replikation selbst nicht innerhalb der Autophagosomen stattfindet.

Um einen detaillierten Einblick in die Bedeutung der autophagosomalen Prozesse für die HBV-Morphogenese zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Autophagie *in vitro* in HBV-positiven Zellen inhibiert. Die Sphären als weitaus größter Bestandteil der SVP zeigen infolgedessen ein unbeeinflusstes Sekretionsverhalten. Hingegen wird neben der viralen Replikation auch die Umhüllung und Reifung der Virionen gestört, weswegen lediglich eine sehr geringe Menge an Viren die Zellen verlassen kann. Die aufgrund der Replikationshemmung nicht in virale DNA umgeschriebene 3,5 kb RNA dient letztlich der Bildung des nichtpartikulären HBeAg. Es zeigt sich somit ein direkter Einfluss des autophagosomalen Kompartiments sowohl auf die Bildung vollständig assemblierter Viren als auch auf die Ausschleusung ebenjener Partikel. Die zurückgehaltenen Viren akkumulieren zusammen mit den Filamenten im ER-Golgi-Bereich. Da eine Blockade der Autophagiemechanismen *in vivo* nicht zu realisieren ist, beschränkten sich die Untersuchungen auf Leberzellen HBV-transgener Mäuse mit intaktem autophagosomalen Kompartiment. Die Ergebnisse zeigen bestätigend gesteigerte autophagosomale Prozesse in verstärkt HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu nicht-HBV-exprimierenden Zellen, was einen Beweis für die HBV-induzierte Autophagiesteigerung darstellt.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass HBV in der Lage ist zelluläre Prozesse zu beeinflussen und zu nutzen. Die Ergebnisse könnten einen wesentlichen Beitrag zur Erforschung neuartiger Therapeutika darstellen; eine pharmakologische Beeinflussung der Autophagie könnte neben einer reduzierten Bildung neuer Viren und einer Exporthemmung der Viren und Filamente über eine verringerte extrazelluläre Viruslast eine verminderte Neuinfektion weiterer Zellen bewirken. Für eindeutige Aussagen wären jedoch weitere Versuchsreihen vonnöten.

8 Summary

The influence of the inhibition of autophagy on the morphogenesis of HBV

The hepatitis B virus is a partially double-stranded DNA virus which increases its infectivity by the secretion of non-infectious subviral particles (spheres and filaments). The export of virions and filaments occurs ESCRT-dependently via MVBs, whereas spheres are secreted via the constitutive pathway. Besides its pronounced influence on several vesicular transport pathways, HBV furthermore induces autophagy. The induction is essential for the viral replication, moreover, it enhances the replication – even though it does not happen inside the autophagosomes.

For gaining a detailed insight into the impact of the autophagosomal processes on the HBV morphogenesis, autophagy was inhibited *in vitro* in HBV-positive cells. The spheres, as by far the largest share of the SVPs, show an uninfluenced secretion pattern. In contrast, the viral replication, coating and maturation of virions is inhibited; therefore, only a small number of virions is able to exit the cells. The inhibition of replication leads to an accumulation of 3.5 kb RNA which leads to an enhanced production and secretion of HBeAg. Therefore, a direct influence of the autophagosomal compartment on the synthesis and export of completely assembled viruses can be observed. In fact, virus and filaments accumulate in the ER Golgi area. As there is no possibility of directly inhibiting autophagy *in vivo*, the experiments were limited to the analysis of liver cells of HBV-transgene mice with intact autophagosomal compartment. The results confirm induced autophagosomal levels in increased HBV-expressing cells in comparison to non-HBV-expressing cells, which is a proof for the HBV-induced enhancement of autophagy.

The results clarify to which extent HBV influences and utilizes cellular processes and represents an essential contribution to the investigation of novel therapeutical agents. A pharmacological inhibition of autophagy may result in a reduced synthesis of new viruses and an inhibited export of viruses and filaments. The reduced viral load may result in a significantly decreased infection rate of healthy hepatocytes. For distinct conclusions further experiments would be necessary.

9 Abkürzungsverzeichnis

Aus dem Periodensystem der Elemente bekannte Kürzel chemischer Elemente, SI- und davon abgeleitete Einheiten sowie im DUDEN zu findende, alltägliche Abkürzungen sind in diesem Verzeichnis nicht aufgeführt.

Abkürzung	Bedeutung/Übersetzung	Abkürzung	Bedeutung/Übersetzung
A	Absorption	DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane
Abb.	Abbildung	DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
ad	auf	dATP	Desoxyadenosintriphosphat
Ag	Antigen	dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ALT	Alanin-Aminotransferase	ddH₂O	doppelt-deionisiertes Wasser
Anti-	Antikörper	DEPC	Diethylpyrocarbonat
APS	Ammoniumperoxodisulfat	DHBV	<i>Duck</i> -Hepatitis-B-Virus
AS	Aminosäure	dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
AST	Aspartat-Aminotransferase	DL	Detektionslimit
ATG	<i>autophagy-related genes</i>	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ATPase	Adenosintriphosphatase	DMSO	Dimethylsulfoxid
Au-Ag	<i>Australia antigen</i>	DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
BFLA-1	Bafilomycin-1	DNAse	Desoxyribonuklease
Bp	Basenpaare	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin	DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
c	Konzentration	DR1/2	<i>direct repeat sequence 1/2</i>
C	Hepatitis-B-Virus C-Domäne	dTTP	Desoxythymidintriphosphat
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i>	E	Extinktion
cDNA	komplementäre DNA	ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
CHBV	<i>Crane</i> -Hepatitis-B-Virus	E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ChHBV	<i>Chimpanzee</i> -Hepatitis-B-Virus	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ci	Curie (Einheit der Radioaktivität)	eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
(c)LSM	<i>(confocal) laser scanning microscope</i>	ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Cy2	Cyanin 2	ER	endoplasmatisches Retikulum
Cy3	Cyanin 3	ERGIC	<i>ER-Golgi intermediate compartment</i>
d	Schichtdicke Küvette	ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
DA	Dalton	FCS	<i>fetal calf serum</i>

fwd	<i>foreward</i>	IM	Isolationsmembran
g	Gravitation	IR	Infrarot
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	IU	<i>international unit</i>
GiHBV	<i>Gibbon</i> -Hepatitis-B-Virus	kb	Kilobasen
GoHBV	Gorilla-Hepatitis-B-Virus	kDa	Kilodalton
g/l	Massenkonzentration (<i>gram/liter</i>)	LAMP	<i>lysosome-associated membrane protein 2</i>
gp	glykosyliert; Glykoprotein	LB	<i>lysogeny broth</i>
GSHBV	<i>Ground squirrel</i> -Hepatitis-B-Virus	LC3	<i>microtubule-associated protein light chain 3</i>
gtA	Genotyp A	LHBs	<i>large hepatitis B surface protein</i>
GTHBV	<i>Grey Teal</i> -Hepatitis-B-Virus	LIR	LC3-interagierende Region
gtG	Genotyp G	3-MA	3-Methyladenin
H⁺	Proton	M	molar
HBV	Hepatitis-B-Virus	MDHBV	<i>Maned Duck</i> -Hepatitis-B-Virus
HBc	Hepatitis-B-Core-Protein	MHBs	<i>middle hepatitis B surface protein</i>
HBcAg	Hepatitis-B-Core-Antigen	mRNA	<i>messenger RNA</i>
HBeAg	Hepatitis-B-e-Antigen	mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
HBsAg	Hepatitis-B- <i>surface</i> -Antigen	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
HBx	Hepatitis-B-x-Protein	MVB	<i>multivesicular body</i>
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i>	n	Anzahl der analysierten Experimente
HCl	Salzsäure	NaCl	Natriumchlorid
HCV	Humanes Hepatitis-C-Virus	NC	<i>Nukleocapsid</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin	Nedd4	<i>Neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated gene4</i>
Hep	Hepatomezelllinie	NH₄Cl	Ammoniumchlorid
HHBV	<i>Heron</i> -Hepatitis-B-Virus	NLS	<i>nuclear localisation sequence</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus	n. s.	nicht signifikant
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>	NTCP	<i>Na⁺-Taurochlorat co-transporting polypeptide</i>
HSV-1	Herpes-Simplex-Virus-1	OHBV	Orang-Utan-Hepatitis-B-Virus
HuH	Humane Hepatoblastom-Zelllinie	OptiMEM	optimiertes minimal essentielles Medium
IF	Immunfluoreszenz	ORF	<i>open reading frame</i>
IFN	Interferon	p	Protein
IgG	Immunglobulin G	P	Hepatitis-B-Virus P-Domäne
IgM	Immunglobulin M	p62	Adapterprotein p62
IL	<i>intraluminal vesicle</i>		

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	STHBV	<i>Stork</i> -Hepatitis-B-Virus
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>	SVP	subvirale Partikel
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	Tab.	Tabelle
PD	Privatdozent	TAE	Tris-Acetat-EDTA
PE	Phosphatidylethanolamin	TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween-20</i>
PEI	Polyethylenimin	TEMED	Tetramethylethylendiamin
pgRNA	prägenomische RNA	tet	Tetracyclin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydrogenium-Ionen-Aktivität	TLM	Translokationsmotiv
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase	TM	Transmembran-Domäne
PHHs	Primäre humane Hepatozyten	TNF	Tumornekrosefaktor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	TP	terminales Protein
preC	Prä-Core	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
preS1	Hepatitis-B-Virus Prä-S1-Domäne	U	<i>Unit</i> ; Enzymeinheit
preS2	Hepatitis-B-Virus Prä-S2-Domäne	Ub	Ubiquitin
PTHs	Primäre <i>Tupaia belangeri</i> - Hepatozyten	UBA	Ubiquitin-assoziiert
pUC18	spezieller Kontrollvektor	UBL	<i>ubiquitin-like protein</i>
Puro	Puromycin	ULK	<i>Unc-51-like kinases</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid	UV	Ultraviolett
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time-PCR</i>	V-ATPase	vakuoläre ATPase
Rab7	<i>Ras-related protein 7</i>	VPS34	Klasse III-PI3-Kinase
Ras	<i>rat sarcoma</i> (Proto-Onkogen)	VPS4	<i>vacuolar protein sorting-associated protein 4</i>
rcDNA	<i>relaxed circular DNA</i>	v/v	<i>volume/volume</i>
rev	<i>reverse</i>	WB	Western Blot
RGHBV	<i>Ross Goose</i> -Hepatitis-B-Virus	w/v	<i>weight/volume</i>
RIPA	<i>radio immunoprecipitation assay</i>	WHBV	<i>Woodchuck</i> -Hepatitis-B-Virus
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	WHO	<i>World Health Organization</i>
ROS	<i>reactive oxygene species</i>	WMHBV	<i>Woolly Monkey</i> -Hepatitis-B-Virus
rpm	<i>rounds per minute</i>	X	Hepatitis-B-Virus X-Domäne
RQ1	RNA <i>qualified 1</i>	ZT	Zentrale Tierhaltung
RT	reverse Transkriptase	$\alpha^{32}\text{P}$	radioaktives Isotop Phosphor
S	Hepatitis-B-Virus S-Domäne	ε	Extinktionskoeffizient
s/co	<i>signal through cut-off</i>	λ	<i>Lambda</i> , Wellenlänge
SD	<i>standard deviation</i>	Ω	Omeegasom
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>		
SHBsAg	<i>small hepatitis B surface protein</i>		
SHGHBV	<i>Snow Goose</i> -Hepatitis-B-Virus		
siRNA	<i>silencing RNA</i>		

10 Literaturverzeichnis

- M. Abdel-Hady and D. Kelly. Chronic hepatitis b in children and adolescents: epidemiology and management. *Pediatric Drugs*, 15(4):311–317, 2013. ISSN 1174-5878. doi: 10.1007/s40272-013-0010-z. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s40272-013-0010-z>.
- V. Alagiozian-Angelova, D. Alagiozian, K. Antonov, and Z. Krustev. Clinical significance of serum hbeag and hbv-dna-specific values of virus replication in chronic hepatitis-b virus infection. - pubmed - ncbi. *Folia medica*, 40(4):34–41, 1998. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10371797>.
- S. M. Alavian, S. R. Ande, K. M. Coombs, B. Yeganeh, P. Davoodpour, M. Hashemi, M. Los, and S. Ghavami. Virus-triggered autophagy in viral hepatitis - possible novel strategies for drug development. *Journal of viral hepatitis*, 18(12):821–830, 2011. ISSN 1365-2893. doi: 10.1111/j.1365-2893.2011.01530.x.
- J. D. Almeida, D. Rubenstein, and E. J. Stott. New antigen-antibody system in australia-antigen-positive hepatitis. *The Lancet*, pages 1225–1227, 1971. URL <http://www.sciencedirect.com.proxy.ub.uni-frankfurt.de/science/article/pii/S0140673671905435>.
- Christian Appenzeller-Herzog and Hans-Peter Hauri. The er-golgi intermediate compartment (ergic): in search of its identity and function. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 11):2173–2183, 2006. ISSN 0021-9533. doi: 10.1242/jcs.03019. URL 16723730.
- Elizabeth L. Axe, Simon A. Walker, Maria Manifava, Priya Chandra, H. Llewelyn Roderick, Anja Habermann, Gareth Griffiths, and Nicholas T. Ktistakis. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology*, 182(4):685–701, 2008. ISSN 0021-9525. doi: 10.1083/jcb.200803137.
- J. E. Banatvala and P. Damme. Hepatitis b vaccine - do we need boosters? *Journal of viral hepatitis*, 10(1):1–6, 2003. ISSN 1365-2893. doi: 10.1046/j.1365-2893.2003.00400.x.
- Andreas Bardens, Tatjana Döring, Jens Stieler, and Reinhild Prange. Alix regulates egress of hepatitis b virus naked capsid particles in an esct-independent manner. *Cellular microbiology*, 13(4):602–619, 2011. ISSN 1462-5822. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01557.x.
- John A. Barltrop, Terence C. Owen, Ann H. Cory, and Joseph G. Cory. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (mts) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (mtt) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1(11):611–614, 1991. ISSN 0960894X. doi: 10.1016/S0960-894X(01)81162-8.

- E. Barnes. Therapeutic vaccines in hbv: lessons from hcv. *Medical microbiology and immunology*, 204(1):79–86, 2015. ISSN 1432-1831. doi: 10.1007/s00430-014-0376-8.
- H. C. Birnboim and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid dna. *Nucleic Acids Research*, 7(6):1513–1523, 1979. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC342324/>.
- H. Bläker, D. Theuer, and H. F. Otto. Pathologie der leberzirrhose und der portalen hypertension. *Der Radiologe*, 41(10):833–839, 2001. ISSN 0033-832X. doi: 10.1007/s001170170054.
- Matthieu Blanchet and Camille Sureau. Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis b virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. *Journal of Virology*, 80(24):11935–11945, 2006. doi: 10.1128/JVI.00621-06. URL 17020942.
- K. J. Blight, J. A. McKeating, and C. M. Rice. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis c virus rna replication. *Journal of Virology*, 76(24):13001–13014, 2002. doi: 10.1128/JVI.76.24.13001-13014.2002.
- B. S. Blumberg. Australian antigen and the biology of hepatitis b. *Nobel Lecture*, 1976.
- Marion M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):248–254, 1976. ISSN 00032697. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Michael Bruns, Stefan Miska, Sylvie Chassot, and Hans Will. Enhancement of hepatitis b virus infection by noninfectious subviral particles. *Journal of Virology*, 72(2):1462–1468, 1998. URL <http://jvi.asm.org/content/72/2/1462.abstract>.
- V. Bruss. A short linear sequence in the pre-s domain of the large hepatitis b virus envelope protein required for virion formation. *Journal of Virology*, 71(12):9350–9357, 1997.
- V. Bruss. Envelopment of the hepatitis b virus nucleocapsid. *Virus Research*, 106:199–209, 2004. URL <http://www.sciencedirect.com.proxy.ub.uni-frankfurt.de/science/article/pii/S0168170204003272>.
- V. Bruss and R. Thomssen. Mapping a region of the large envelope protein required for hepatitis b virion maturation. *Journal of Virology*, 68(3):1643–1650, 1994.
- Volker Bruss. Hepatitis b virus morphogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 13(1):65, 2007. ISSN 1007-9327. doi: 10.3748/wjg.v13.i1.65.
- K. Busch and R. Thimme. Natural history of chronic hepatitis b virus infection. *Medical microbiology and immunology*, 204(1):5–10, 2015. ISSN 1432-1831. doi: 10.1007/s00430-014-0369-7.
- Carl Roth GmbH + Co KG. Sicherheitsdatenblatt: Ammoniumchlorid, 2015. URL https://www.carlroth.com/downloads/sdb/de/5/SDB_5050_BE_DE.pdf.
- Ning Chai, Ho Eun Chang, Emmanuelle Nicolas, Ziyang Han, Michal Jarnik, and John Taylor. Properties of subviral particles of hepatitis b virus. *Journal of Virology*, 82(16):7812–7817, 2008. doi: 10.1128/JVI.00561-08.

- F. V. Chisari and C. Ferrari. Hepatitis b virus immunopathogenesis. *Annual review of immunology*, 13:29–60, 1995. ISSN 0732-0582. doi: 10.1146/annurev.iy.13.040195.000333.
- P. Chomczynski and N. Sacchi. Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1):156–159, 1987. ISSN 00032697. URL <http://www.sciencedirect.com.proxy.ub.uni-frankfurt.de/science/article/pii/0003269787900212>.
- Michael J. Clague and Sylvie Urbé. Multivesicular bodies. *Current biology : CB*, 18(10):R402–4, 2008. ISSN 0960-9822. doi: 10.1016/j.cub.2008.02.068. URL 18492464.
- Nathan S. Claxton, Thomas J. Fellers, and Michael W. Davidson. Laser scanning confocal microscopy. In John G. Webster, editor, *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*, pages 1–37. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, 2006. ISBN 0471732877. doi: 10.1002/0471732877.emd291.
- Consensus Report. Diagnostic problems caused by hbsag mutants – a consensus report of an expert meeting. *Intervirology*, 47(6):310–313, 2004. ISSN 0300-5526. doi: 10.1159/000080873.
- M. Cornberg and M. P. Manns. Leitliniengerechte therapie der hepatitis b. korrekte indikationsstellung ist die voraussetzung. *Pharmazie in unserer Zeit*, 40(1):45–51, 2011. ISSN 1615-1003. doi: 10.1002/pauz.201100399.
- M. Cornberg, U. Protzer, J. Petersen, H. Wedemeyer, T. Berg, W. Jilg, A. Erhardt, S. Wirth, C. Sarrazin, M. M. Dollinger, P. Schirmacher, K. Dathe, I. B. Kopp, S. Zeuzem, W. H. Gerlich, and M. P. Manns. Aktualisierung der s 3-leitlinie zur prophylaxe, diagnostik und therapie der hepatitis-b-virusinfektion. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 49(7):871–930, 2011. ISSN 1439-7803. doi: 10.1055/s-0031-1273462.
- Maura Dandri and Stephen Locarnini. New insight in the pathobiology of hepatitis b virus infection. *Gut*, 61(1):i6–i17, 2012. ISSN 1468-3288. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302056.
- D. S. Dane, C. H. Cameron, and M. Briggs. Virus-like particles in serum of patients with australia-antigen-associated hepatitis. *The Lancet*, pages 695–698, 1970. URL <http://www.sciencedirect.com.proxy.ub.uni-frankfurt.de/science/article/pii/S0140673670909268>.
- de Carvalho Dominguez Souza, Breno Frederico, Jan Felix Drexler, de Lima, Renato Santos, de Oliveira Hughes Veiga do Rosário, Mila, and Eduardo Martins Netto. Theories about evolutionary origins of human hepatitis b virus in primates and humans. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 18(5):535–543, 2014. ISSN 1413-8670. doi: 10.1016/j.bjid.2013.12.006. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867014000622>.
- François Denizot and Rita Lang. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *Journal of Immunological Methods*, 89(2):271–277, 1986. ISSN 00221759. doi: 10.1016/0022-1759(86)90368-6.
- P. Dény and F. Zoulim. Hepatitis b virus: from diagnosis to treatment. *Pathologie-biologie*, 58(4): 245–253, 2010. ISSN 1768-3114. doi: 10.1016/j.patbio.2010.05.002.

- Deutsche Leberstiftung. Biotechnologie / life sciences in baden-württembergdurchbruch in der therapie der hepatitis c, 2011. URL <http://www.bio-pro.de/magazin/index.html?lang=de&artikelid=/artikel/06434/index.html>.
- K. Döhner and B. Sodeik. The role of the cytoskeleton during viral infection. *Current topics in microbiology and immunology*, 285:67–108, 2005. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15609501>.
- Marlène Dreux and Francis V. Chisari. Viruses and the autophagy machinery. *Cell Cycle*, 9(7): 1295–1307, 2014. ISSN 1538-4101. doi: 10.4161/cc.9.7.11109.
- J. F. Drexler, A. Geipel, A. König, V. M. Corman, D. van Riel, L. M. Leijten, C. M. Bremer, A. Rasche, V. M. Cottontail, G. D. Maganga, M. Schlegel, M. A. Müller, A. Adam, S. M. Klose, A. J. Borges Carneiro, A. Stocker, C. R. Franke, F. Gloza-Rausch, J. Geyer, A. Annan, Y. Adu-Sarkodie, S. Oppong, T. Binger, P. Vallo, M. Tschapka, R. G. Ulrich, W. H. Gerlich, E. Leroy, T. Kuiken, D. Glebe, and C. Drosten. Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis b virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(40):16151–16156, 2013. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1308049110.
- B. E. Eble, V. R. Lingappa, and D. Ganem. The n-terminal (pre-s2) domain of a hepatitis b virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences. *Journal of Virology*, 64(3):1414–1419, 1990. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC249269/>.
- S. G. Eckhardt, D. R. Milich, and A. McLachlan. Hepatitis b virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus. *Journal of Virology*, 65(2):575–582, 1991.
- Thomas Efferth. *Molekulare Pharmakologie und Toxikologie: Biologische Grundlagen von Arzneimitteln und Giften*. Springer, 2007. URL <https://books.google.de/books?id=TqkfbAAAQBAJ&pg=PA182&lpg=PA182&dq=zellzyklus+%2B+arretierung&source=bl&ots=OPuhPLxZm-&sig=vb5fwd54oF9X9kcU1f8G9C7eCB4&hl=de&sa=X&ved=0ahUKEwiq77GXrbbKAhUEHQ8KHfwuCjIQ6AEISTAG#v=onepage&q=zellzyklus%20%2B%20arretierung&f=false>.
- Christina Ehrhardt, Mirco Schmolke, Andreas Matzke, Alexander Knoblauch, Carola Will, Viktor Wixler, and Stephan Ludwig. Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *Signal Transduction*, 6(3):179–184, 2006. ISSN 1615-4053. doi: 10.1002/sita.200500073.
- Andreas Eisenreich. *Differenzielle Regulation des Zytokin-induzierten alternativen Spleißens des TF-Gens in humanen Endothelzellen*. PhD thesis, Humboldt-Universität, Berlin, 2009. URL [URN:urn:nbn:de:kobv:11-100103185](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:11-100103185).
- European Consensus Group on Hepatitis B Immunity. Are booster immunisations needed for lifelong hepatitis b immunity? consensus statement. *The Lancet*, 355:561–565, 2000. URL <http://www.sciencedirect.com.proxy.ub.uni-frankfurt.de/science/article/pii/S0140673699072396>.

- C. M. Fader and M. I. Colombo. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell death and differentiation*, 16(1):70–78, 2009. ISSN 1476-5403. doi: 10.1038/cdd.2008.168; URL 19008921.
- Claudio M. Fader, Diego Sánchez, Marcelo Furlán, and María I. Colombo. Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9(2):230–250, 2008. ISSN 1600-0854. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00677.x. URL 17999726.
- D. Falke and G. Gerken. Virushepatitis. In Helmut Hahn, Dietrich Falke, Stefan H. E. Kaufmann, and Uwe Ullmann, editors, *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer-Lehrbuch, pages 636–658. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2005. ISBN 3-540-21971-4. doi: 10.1007/3-540-26529-5{\textunderscore}71. URL http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-24167-3_72#page-1.
- Mario Ferrari, Maria Chiara Fornasiero, and Anna Maria Isetta. Mtt colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *Journal of Immunological Methods*, 131(2):165–172, 1990. ISSN 00221759. doi: 10.1016/0022-1759(90)90187-Z.
- Maria Filimonenko, Susanne Stuffers, Camilla Raiborg, Ai Yamamoto, Lene Malerød, Elizabeth M. C. Fisher, Adrian Isaacs, Andreas Brech, Harald Stenmark, and Anne Simonsen. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *The Journal of cell biology*, 179(3):485–500, 2007. ISSN 0021-9525. doi: 10.1083/jcb.200702115.
- G. Filomeni, D. de Zio, and F. Cecconi. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell death and differentiation*, 22(3):377–388, 2015. ISSN 1476-5403. doi: 10.1038/cdd.2014.150.
- D. FitzSimons, G. François, A. Hall, B. McMahon, A. Meheus, A. Zanetti, B. Duval, W. Jilg, W. O. Böcher, S. Lu, U. Akarca, D. Lavanchy, S. Goldstein, J. Banatvala, and P. van Damme. Long-term efficacy of hepatitis b vaccine, booster policy, and impact of hepatitis b virus mutants. *Vaccine*, 23(32):4158–4166, 2005. ISSN 1873-2518. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.03.017.
- S. Gagliardi, P. A. Gatti, P. Belfiore, A. Zocchetti, G. D. Clarke, and C. Farina. Synthesis and structure-activity relationships of bafilomycin a1 derivatives as inhibitors of vacuolar h⁺-atpase. *Journal of medicinal chemistry*, 41:1883–1893, 1998.
- Don Ganem and Alfred M. Prince. Hepatitis b virus infection—natural history and clinical consequences. *The New England journal of medicine*, 350(11):1118–1129, 2004. ISSN 0028-4793. doi: 10.1056/NEJMra031087.
- T. Gerelsaikhan, J. E. Tavis, and V. Bruss. Hepatitis b virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic dna synthesis. *Journal of Virology*, 70(7):4269–4274, 1996. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC190358/>.

- W. H. Gerlich. Medical virology of hepatitis b: how it began and where we are now. *Virology Journal*, 10:239–264, 2013. ISSN 1743-422X. doi: 10.1186/1743-422X-10-239.
- W. H. Gerlich. Prophylactic vaccination against hepatitis b: achievements, challenges and perspectives. *Medical microbiology and immunology*, 204(1):39–55, 2015. ISSN 1432-1831. doi: 10.1007/s00430-014-0373-y.
- Denis Gerlier and Nicole Thomasset. Use of mtt colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods*, 94(1-2):57–63, 1986. ISSN 00221759. doi: 10.1016/0022-1759(86)90215-2.
- S. T. Goldstein and A. E. Fiore. Toward the global elimination of hepatitis b virus transmission. *The Journal of pediatrics*, 139(3):343–345, 2001. ISSN 0022-3476. doi: 10.1067/mpd.2001.117783.
- S. T. Goldstein, F. Zhou, S. C. Hadler, B. P. Bell, E. E. Mast, and H. S. Margolis. A mathematical model to estimate global hepatitis b disease burden and vaccination impact. *International journal of epidemiology*, 34(6):1329–1339, 2005. ISSN 0300-5771. doi: 10.1093/ije/dyi206.
- Philippe Gripon, Sylvie Rumin, Stephan Urban, Jacques Le Seyec, Denise Glaise, Isabelle Cannie, Claire Guyomard, Josette Lucas, Christian Trepo, and Christiane Guguen-Guillouzo. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis b virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24):15655–15660, 2002. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.232137699.
- L. G. Guidotti, B. Matzke, H. Schaller, and F. V. Chisari. High-level hepatitis b virus replication in transgenic mice. *Journal of Virology*, 69(10):6158–6169, 1995. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC189513/>.
- L. G. Guidotti, B. Matzke, C. Pasquinelli, J. M. Shoenberger, C. E. Rogler, and F. V. Chisari. The hepatitis b virus (hbv) precore protein inhibits hbv replication in transgenic mice. *Journal of Virology*, 70(10):7056–7061, 1996. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC190756/>.
- Z. Guo, X. H. Shi, Y. L. Feng, B. Wang, L. P. Feng, S. P. Wang, and Y. W. Zhang. Risk factors of hbv intrauterine transmission among hbsag-positive pregnant women. *Journal of viral hepatitis*, 20(5):317–321, 2013. ISSN 1365-2893. doi: 10.1111/jvh.12032.
- R. M. Hammerstingl, W. V. Schwarz, E. Schmitt, D. Faust, C. Dietrich, S. Zeuzem, and T. J. Vogl. Bildgebende diagnostik der leberzirrhose. *Der Radiologe*, 41(10):852–867, 2001. ISSN 0033-832X. doi: 10.1007/s001170170056.
- Phyllis I. Hanson, Soomin Shim, and Samuel A. Merrill. Cell biology of the escrt machinery. *Current opinion in cell biology*, 21(4):568–574, 2009. ISSN 0955-0674. doi: 10.1016/j.ceb.2009.06.002. URL 19560911.
- P. D. Hart and M. R. Young. Ammonium chloride, an inhibitor of phagosome-lysosome fusion in macrophages, concurrently induces phagosome-endosome fusion, and opens a novel pathway: Studies of a pathogenic mycobacterium and a nonpathogenic yeast. *Journal of Experimental Medicine*, 174:881–889, 1991.

- Biao He, Quanshui Fan, Fanli Yang, Tingsong Hu, Wei Qiu, Ye Feng, Zuosheng Li, Yingying Li, Fuqiang Zhang, Huancheng Guo, Xiaohuan Zou, and Changchun Tu. Hepatitis virus in long-fingered bats, myanmar. *Emerging Infectious Diseases*, 19(4):638–640, 2013. ISSN 1080-6040. doi: 10.3201/eid1904.121655. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3647427/pdf/12-1655.pdf>.
- K. H. Heermann, U. Goldmann, W. Schwartz, T. Seyffarth, H. Baumgarten, and W. H. Gerlich. Large surface proteins of hepatitis b virus containing the pre-s-sequence. *Journal of Virology*, 52(2):396–402, 1984.
- Linda Hicke and Rebecca Dunn. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annual review of cell and developmental biology*, 19:141–172, 2003. ISSN 1081-0706. doi: 10.1146/annurev.cellbio.19.110701.154617.
- Jasmin Hoffmann, Caroline Boehm, Kiyoshi Himmelsbach, Christian Donnerhak, Hendrik Roettger, Thomas S. Weiss, Daniela Ploen, and Eberhard Hildt. Identification of α -taxilin as an essential factor for the life cycle of hepatitis b virus. *Journal of hepatology*, 59(5):934–941, 2013. ISSN 1600-0641. doi: 10.1016/j.jhep.2013.06.020.
- M. Høyer-Hansen and M. Jäättelä. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell death and differentiation*, 14(9):1576–1582, 2007. ISSN 1476-5403. doi: 10.1038/sj.cdd.4402200.
- C. J. Huang, Y. H. Chen, and L. P. Ting. Hepatitis b virus core protein interacts with the c-terminal region of actin-binding protein. - pubmed - ncbi. *Journal of biomedical science*, 7(2):160–168, 2000. ISSN 1423-0127. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10754391>.
- Jatta Huotari and Ari Helenius. Endosome maturation. *The EMBO Journal*, 30(17):3481–3500, 2011. doi: 10.1038/emboj.2011.286.
- James H. Hurley and Phyllis I. Hanson. Membrane budding and scission by the esct machinery: it's all in the neck. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(8):556–566, 2010. ISSN 1471-0080. doi: 10.1038/nrm2937.
- S. M. Hurtley and A. Helenius. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annual review of cell biology*, 5:277–307, 1989. ISSN 0743-4634. doi: 10.1146/annurev.cb.05.110189.001425.
- Bingfu Jiang, Kiyoshi Himmelsbach, Huimei Ren, Klaus Boller, and Eberhard Hildt. Subviral hepatitis b virus filaments, like infectious viral particles, are released via multivesicular bodies. *Journal of Virology*, 90(7):3330–3341, 2015. doi: 10.1128/JVI.03109-15.
- W. Jilg. Epidemiologie, diagnostik und prophylaxe der virushepatitiden. *Der Chirurg*, 71(4):374–380, 2000. ISSN 0009-4722. doi: 10.1007/s001040051068.
- W. Jilg. Impfstoffe gegen die virushepatitiden a bis e. was haben sie bewirkt, was können sie bewirken? *Pharmazie in unserer Zeit*, 40(1):36–43, 2011. ISSN 1615-1003. doi: 10.1002/pauz.201100398.

- C. Jochum and G. Gerken. Klinik und diagnostik der hepatitis b, c und d. akuter oder chronischer verlauf? *Pharmazie in unserer Zeit*, 40(1):30–35, 2011. ISSN 1615-1003. doi: 10.1002/pauz.201100397.
- Chang Hwa Jung, Seung-Hyun Ro, Jing Cao, Neil Michael Otto, and Do-Hyung Kim. mtor regulation of autophagy. *FEBS letters*, 584(7):1287–1295, 2010. ISSN 1873-3468. doi: 10.1016/j.febslet.2010.01.017.
- M. C. Kew. Epidemiology of chronic hepatitis b virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis b virus-induced hepatocellular carcinoma. *Pathologie Biologie*, 58(4):273–277, 2010. doi: 10.1016/j.patbio.2010.01.005.
- K. Kidd-Ljunggren, Y. Miyakawa, and A. H. Kidd. Genetic variability in hepatitis b viruses. *Journal of General Virology*, 83(6):1267–1280, 2002.
- D. J. Klionsky, Z. Elazar, P. O. Seglen, and D. C. Rubinsztein. Does bafilomycin a 1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy*, 4(7):849–850, 2014a. ISSN 1554-8635. doi: 10.4161/auto.6845.
- Daniel J. Klionsky, Ana Maria Cuervo, and Per O. Seglen. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy*, 3(3):181–206, 2014b. ISSN 1554-8635. doi: 10.4161/auto.3678.
- B. Knowles, C. Howe, and D. Aden. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis b surface antigen. *Science*, 209(4455):497–499, 1980. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.6248960.
- S. Koh, A. Bertoletti, Sarene Koh, and Antonio Bertoletti. Circumventing failed antiviral immunity in chronic hepatitis b virus infection: triggering virus-specific or innate-like t cell response? *Medical microbiology and immunology*, 204(1):87–94, 2015. ISSN 1432-1831. doi: 10.1007/s00430-014-0377-7.
- Masaaki Komatsu and Yoshinobu Ichimura. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS letters*, 584(7):1374–1378, 2010. ISSN 1873-3468. doi: 10.1016/j.febslet.2010.02.017.
- Masaaki Komatsu, Hirofumi Kurokawa, Satoshi Waguri, Keiko Taguchi, Akira Kobayashi, Yoshinobu Ichimura, Yu-Shin Sou, Izumi Ueno, Ayako Sakamoto, Kit I. Tong, Mihee Kim, Yasumasa Nishito, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Takashi Ueno, Eiki Kominami, Hozumi Motohashi, Keiji Tanaka, and Masayuki Yamamoto. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor nrf2 through inactivation of keap1. *Nature cell biology*, 12(3):213–223, 2010. ISSN 1476-4679. doi: 10.1038/ncb2021.
- Guido Kroemer, Guillermo Mariño, and Beth Levine. Autophagy and the integrated stress response. *Molecular Cell*, 40(2):280–293, 2010. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.023.
- Akiko Kuma, Makoto Matsui, and Noboru Mizushima. Lc3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: Caution in the interpretation of lc3 localization. *Autophagy*, 3(4):323–328, 2014. ISSN 1554-8635. doi: 10.4161/auto.4012.

- M.-S. Kwak and Y. J. Kim. Occult hepatitis b virus infection. *World journal of hepatology*, 6(12): 860–869, 2014. ISSN 1948-5182. doi: 10.4254/wjh.v6.i12.860.
- J. Kyhse-Andersen. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. - pubmed - ncbi. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 10(3-4):203–209, 1984. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6530509>.
- S. K. Ladner, M. J. Otto, C. S. Barker, K. Zaifert, G.-H. Wang, J.-T. Guo, C. Seeger, and R. W. King. Inducible expression of human hepatitis b virus (hbv) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors... - pubmed - ncbi. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(8):1715–1720, 1997. ISSN 0066-4804. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9257747>.
- U. K. LAEMMLI. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–685, 1970. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/227680a0.
- Carsten Lambert, Tatjana Döring, and Reinhild Prange. Hepatitis b virus maturation is sensitive to functional inhibition of escrt-iii, vps4, and gamma 2-adaptin. *Journal of Virology*, 81(17):9050–9060, 2007. doi: 10.1128/JVI.00479-07.
- F. Lammert, N. Busch, and S. Matern. Klinik und therapie der virushepatitiden. *Der Chirurg*, 71(4): 381–388, 2000. ISSN 0009-4722. doi: 10.1007/s001040051069.
- Kenneth Bowitz Larsen, Trond Lamark, Aud Øvervatn, Ingvill Harneshaug, Terje Johansen, and Geir Bjørkøy. A reporter cell system to monitor autophagy based on p62/sqstm1. *Autophagy*, 6(6): 784–793, 2014. ISSN 1554-8635. doi: 10.4161/auto.6.6.12510.
- J. V. Lazarus, K. Safreed-Harmon, and I. Sperle. Global policy report on the prevention and control of viral hepatitis in who member states. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*, 2013. URL http://www.who.int/hiv/pub/hepatitis/global_report/en/.
- Corinna M. Leistner, Stefanie Gruen-Bernhard, and Dieter Glebe. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis b virus. *Cellular microbiology*, 10(1):122–133, 2008. ISSN 1462-5822. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01023.x.
- Charlotte Lepère-Douard, Maud Trotard, Jacques Le Seyec, and Philippe Gripon. The first transmembrane domain of the hepatitis b virus large envelope protein is crucial for infectivity. *Journal of Virology*, 83(22):11819–11829, 2009. doi: 10.1128/JVI.01026-09.
- G. Leroux-Roels. Old and new adjuvants for hepatitis b vaccines. *Medical microbiology and immunology*, 204(1):69–78, 2015. ISSN 1432-1831. doi: 10.1007/s00430-014-0375-9.
- Beth Levine and Guido Kroemer. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1):27–42, 2008. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018.
- Beth Levine, Noboru Mizushima, and Herbert W. Virgin. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, 469(7330):323–335, 2011. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature09782.

- Jianhua Li, Yinghui Liu, Zekun Wang, Kuancheng Liu, Yaohui Wang, Jiangxia Liu, Huanping Ding, and Zhenghong Yuan. Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis b virus for viral envelopment. *Journal of Virology*, 85(13):6319–6333, 2011a. doi: 10.1128/JVI.02627-10.
- Jianhua Li, Yinghui Liu, Zekun Wang, Kuancheng Liu, Yaohui Wang, Jiangxia Liu, Huanping Ding, and Zhenghong Yuan. Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis b virus for viral envelopment. *Journal of Virology*, 85(13):6319–6333, 2011b. doi: 10.1128/JVI.02627-10. URL 21507968.
- T. J. Liang. Hepatitis b: the virus and disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 49(5):13–21, 2009. ISSN 1527-3350. doi: 10.1002/hep.22881.
- Yun-Fan Liaw. Hbeag seroconversion as an important end point in the treatment of chronic hepatitis b. *Hepatology international*, 3(3):425–433, 2009. ISSN 1936-0533. doi: 10.1007/s12072-009-9140-3.
- S. Locarnini. Molecular virology of hepatitis b virus. *Seminars in liver disease*, 24(1):3–10, 2004. ISSN 0272-8087. doi: 10.1055/s-2004-828672.
- Harvey Lodish, Arnold Berk, S. Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and Darnell James. Overview of the secretory pathway. In *Molecular cell biology*. W.H. Freeman, New York, 2000. ISBN 9780716732709. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21471/>.
- A. Longatti and S. A. Tooze. Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell death and differentiation*, 16(7):956–965, 2009. ISSN 1476-5403. doi: 10.1038/cdd.2009.39;. URL 19373247.
- Joachim Lupberger, Stephanie Schaedler, Alexander Peiran, and Eberhard Hildt. Identification and characterization
World Journal of Gastroenterology, 19(44):8000–8010, 2013. ISSN 1007-9327. doi: 10.3748/wjg.v19.i44.8000.
- L. Ma, N. R. Alla, X. Li, O. A. Mynbaev, and Z. Shi. Mother-to-child transmission of hbv: review of current clinical management and prevention strategies. *Reviews in medical virology*, 24(6):396–406, 2014. ISSN 1052-9276. doi: 10.1002/rmv.1801.
- F. O. MacCallum and D. J. Bauer. Homologous serum jaundice: Transmission experiments with human volunteers. *The Lancet*, pages 622–627, 1944.
- Mark Marsh and Ari Helenius. Virus entry: open sesame. *Cell*, 124(4):729–740, 2006. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.007.
- Kohichi Matsunaga, Eiji Morita, Tatsuya Saitoh, Shizuo Akira, Nicholas T. Ktistakis, Tetsuro Izumi, Takeshi Noda, and Tamotsu Yoshimori. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the pi3-kinase complex via atg14l. *The Journal of cell biology*, 190(4):511–521, 2010. ISSN 0021-9525. doi: 10.1083/jcb.200911141.
- MBL. Lc3 - datasheet.
- H. Meisel, S. Märshenz, and D. H. Krüger. Hepatitis b virus (hbv). In G. Darai, M. Handermann, H. G. Sonntag, C. A. Tidona, and L. Zöller, editors, *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen*,

- pages 371–376. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2009. ISBN 978-3-540-39005-3. doi: 10.1007/978-3-540-39026-8{\textunderscore}448.
- Merck Millipore. Ammoniumchlorid - sicherheitsdatenblatt, 2014. URL http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Ammoniumchlorid,MDA_CHEM-101145#anchor_Sicherheitsinformationen%20gem%C3%A4%C3%9F%20GHS.
- Noboru Mizushima. The role of the atg1/ulk1 complex in autophagy regulation. *Current opinion in cell biology*, 22(2):132–139, 2010. ISSN 0955-0674. doi: 10.1016/j.ceb.2009.12.004.
- Noboru Mizushima and Tamotsu Yoshimori. How to interpret lc3 immunoblotting. *Autophagy*, 3(6): 542–545, 2014. ISSN 1554-8635. doi: 10.4161/auto.4600.
- Noboru Mizushima, Beth Levine, Ana Maria Cuervo, and Daniel J. Klionsky. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182):1069–1075, 2008. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature06639.
- Noboru Mizushima, Tamotsu Yoshimori, and Beth Levine. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 140(3):313–326, 2010. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.028.
- Susanne Modrow, Dietrich Falke, Uwe Truyen, and Hermann Schätzl. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3. aufl. edition, 2010. ISBN 3827422418.
- Eiji Morita, Virginie Sandrin, Hyo-Young Chung, Scott G. Morham, Steven P. Gygi, Christopher K. Rodesch, and Wesley I. Sundquist. Human escrt and alix proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *The EMBO Journal*, 26(19):4215–4227, 2007. doi: 10.1038/sj.emboj.7601850.
- Jorge Moscat and Maria T. Diaz-Meco. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*, 137(6):1001–1004, 2009. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.023.
- Tim Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2):55–63, 1983. ISSN 00221759. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- MP Biomedicals. Bafilomycin a1 - sicherheitsdatenblatt, 2005. URL <https://www.mpbio.com/includes/msds/eu/de/159555-DE-EU.pdf>.
- T. Noda, N. Fujita, and T. Yoshimori. The late stages of autophagy: how does the end begin? *Cell death and differentiation*, 16(7):984–990, 2009. ISSN 1476-5403. doi: 10.1038/cdd.2009.54;. URL 19424283.
- Fergal O Farrell, Tor E. Rusten, and Harald Stenmark. Phosphoinositide 3-kinases as accelerators and brakes of autophagy. *The FEBS journal*, 280(24):6322–6337, 2013. ISSN 1742-4658. doi: 10.1111/febs.12486.
- K. Oda, Y. Nishimura, Y. Ikehara, and K. Kato. Bafilomycin a1 inhibits the targeting of lysosomal acid hydrolases in cultured hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 178(1):369–377, 1991. ISSN 0006291X. doi: 10.1016/0006-291X(91)91823-U.

- Wolf-Bernhard Offensperger, Silke Offensperger, Eike Walter, Hubert E. Blum, and Wolfgang Gerok. Inhibition of duck hepatitis b virus infection by lysosomotropic agents. *Virology*, 183(1):415–418, 1991. ISSN 0042-6822. doi: 10.1016/0042-6822(91)90157-7.
- Andrea Orsi, Hannah E. J. Polson, and Sharon A. Tooze. Membrane trafficking events that partake in autophagy. *Current opinion in cell biology*, 22(2):150–156, 2010. ISSN 0955-0674. doi: 10.1016/j.ceb.2009.11.013.
- Serhiy Pankiv, Terje Høyvarde Clausen, Trond Lamark, Andreas Brech, Jack-Ansgar Bruun, Heidi Outzen, Aud Øvervatn, Geir Bjørkøy, and Terje Johansen. p62/sqstm1 binds directly to atg8/lc3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *The Journal of biological chemistry*, 282(33):24131–24145, 2007. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M702824200.
- Romuald Patient, Christophe Hourieux, Pierre-Yves Sizaret, Sylvie Trassard, Camille Sureau, and Philippe Roingard. Hepatitis b virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *Journal of Virology*, 81(8):3842–3851, 2007. doi: 10.1128/JVI.02741-06. URL 17267490.
- Romuald Patient, Christophe Hourieux, and Philippe Roingard. Morphogenesis of hepatitis b virus and its subviral envelope particles. *Cellular microbiology*, 11(11):1561–1570, 2009a. ISSN 1462-5822. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01363.x. URL 19673892.
- Romuald Patient, Christophe Hourieux, Pascal Vaudin, Jean-Christophe Pagès, and Philippe Roingard. Chimeric hepatitis b and c viruses envelope proteins can form subviral particles: implications for the design of new vaccine strategies. *New biotechnology*, 25(4):226–234, 2009b. ISSN 1871-6784. doi: 10.1016/j.nbt.2009.01.001. URL 19356608.
- E. J. Patzer, G. R. Nakamura, C. C. Simonsen, A. D. Levinson, and R. Brands. Intracellular assembly and packaging of hepatitis b surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*, 58(3):884–892, 1986.
- Kai-Henrik Peiffer, Sami Akhras, Kiyoshi Himmelsbach, Matthias Hassemer, Malin Finkernagel, Gert Carra, Michael Nuebling, Michael Chudy, Hauke Niekamp, Dieter Glebe, Christoph Sarrazin, Stefan Zeuzem, and Eberhard Hildt. Intracellular accumulation of subviral hbsag particles and diminished nrf2 activation in hbv genotype g expressing cells lead to an increased roi level. *Journal of hepatology*, 62(4):791–798, 2015. ISSN 1600-0641. doi: 10.1016/j.jhep.2014.11.028.
- J. A. Perkins. Hepatitis b virus, 2002. URL <https://people.rit.edu/japfaa/infectious.html>.
- D. H. Persing, H. E. Varmus, and D. Ganem. Inhibition of secretion of hepatitis b surface antigen by a related presurface polypeptide. *Science*, 234:1388–1391, 1986.
- J. Poorolajal, M. Mahmoodi, R. Majdzadeh, S. Nasser-Moghaddam, A. Haghdoost, and A. Fotouhi. Long-term protection provided by hepatitis b vaccine and need for booster dose: A meta-analysis. *Vaccine*, 28(3):623–631, 2010. ISSN 1873-2518. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.10.068.
- R. Prange, A. Clemen, and R. E. Streeck. Myristylation is involved in intracellular retention of hepatitis b virus envelope proteins. *Journal of Virology*, 65(7):3919–3923, 1991.

- Reinhild Prange. Host factors involved in hepatitis b virus maturation, assembly, and egress. *Medical microbiology and immunology*, 201(4):449–461, 2012. ISSN 1432-1831. doi: 10.1007/s00430-012-0267-9.
- B. Rabe, A. Vlachou, N. Pante, A. Helenius, and M. Kann. Nuclear import of hepatitis b virus capsids and release of the viral genome. *PNAS*, 100(17):9849–9854, 2003.
- Birgit Rabe, Dieter Glebe, and Michael Kann. Lipid-mediated introduction of hepatitis b virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events. *Journal of Virology*, 80(11):5465–5473, 2006. doi: 10.1128/JVI.02303-05.
- Camilla Raiborg and Harald Stenmark. The escrt machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*, 458(7237):445–452, 2009. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature07961.
- Camilla Raiborg, Tor Erik Rusten, and Harald Stenmark. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Current opinion in cell biology*, 15(4):446–455, 2003. ISSN 0955-0674. doi: 10.1016/S0955-0674(03)00080-2.
- Stanley L. Robbins, Vinay Kumar, and Ramzi S. Cotran. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA, 8th ed. edition, 2010. ISBN 978-1-4160-3121-5.
- Robert Koch-Institut. Virushepatitis b und d: Situationsbericht deutschland 2013: Zur situation bei wichtigen infektionskrankheiten in deutschland. *Epidemiologisches Bulletin*, (30), 2014. URL http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2014/30/Art_01.html;jsessionid=0BF6F53AF3010646A2B9F87DADEA50DD.2_cid298.
- W. S. Robinson and R. L. Greenman. Dna polymerase in the core of the human hepatitis b virus candidate. *Journal of Virology*, 13(6):1231–1236, 1974. URL <http://jvi.asm.org/content/13/6/1231.short>.
- W. S. Robinson, D. A. Clayton, and R. L. Greenman. Dna of a human hepatitis b virus candidate. *Journal of Virology*, 14(2):384–391, 1974. URL <http://jvi.asm.org.proxy.ub.uni-frankfurt.de/content/14/2/384.abstract>.
- P. Roingard and C. Sureau. Ultrastructural analysis of hepatitis b virus in hepg2-transfected cells with special emphasis on subviral filament morphogenesis. *Hepatology*, 28(4):1128–1133, 1998.
- A. M. Roseman, Berriman J. A., S. A. Wynne, Butler, P. J. G., and R. A. Crowther. A structural model for maturation of the hepatitis b virus core. *PNAS*, 102(44):15821–15826, 2005.
- Martina Rost, Sylvia Mann, Carsten Lambert, Tatjana Döring, Nicole Thomé, and Reinhild Prange. Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis b virus maturation. *The Journal of biological chemistry*, 281(39):29297–29308, 2006. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M603517200. URL 16867982.
- Martina Rost, Tatjana Döring, and Reinhild Prange. gamma2-adaptin, a ubiquitin-interacting adaptor, is a substrate to coupled ubiquitination by the ubiquitin ligase nedd4 and functions in the endosomal pathway. *The Journal of biological chemistry*, 283(46):32119–32130, 2008. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M802632200.

- J. E. Rothman. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, 372(6501):55–63, 1994. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/372055a0.
- J. E. Rothman. The protein machinery of vesicle budding and fusion. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 5(2):185–194, 1996. ISSN 0961-8368. doi: 10.1002/pro.5560050201.
- David C. Rubinsztein, Patrice Codogno, and Beth Levine. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, 11(9):709–730, 2012. ISSN 1474-1784. doi: 10.1038/nrd3802.
- Tor Erik Rusten and Harald Stenmark. How do escrt proteins control autophagy? *Journal of Cell Science*, 122(Pt 13):2179–2183, 2009. ISSN 0021-9533. doi: 10.1242/jcs.050021. URL <http://jcs.biologists.org/content/122/13/2179.full.pdf>.
- Tor Erik Rusten and Harald Stenmark. p62, an autophagy hero or culprit? *Nature cell biology*, 12(3):207–209, 2010. ISSN 1476-4679. doi: 10.1038/ncb0310-207.
- O. Satoh, H. Imai, T. Yoneyama, T. Miyamura, H. Utsumi, K. Inoue, and M. Umeda. Membrane structure of the hepatitis b virus surface antigen particle. *Journal of Biochemistry*, 127:543–550, 2000.
- S. Schädler and E. Hildt. Hbv life cycle: entry and morphogenesis. *Viruses*, 1(2):185–209, 2009. ISSN 1999-4915. doi: 10.3390/v1020185.
- S. Schaefer, D. Glebe, and W. H. Gerlich. Hepatitis-b-virus (hepadnaviridae). In H. W. Doerr and W. Gerlich, editors, *Medizinische Virologie*, pages 345–370. Thieme, Stuttgart, 2008. ISBN 978-3-13-113962-7.
- Stephan Schaefer. Hepatitis b virus taxonomy and hepatitis b virus genotypes. *World Journal of Gastroenterology*, 13(1):14, 2007. ISSN 1007-9327. doi: 10.3748/wjg.v13.i1.14.
- Ruth Scherz-Shouval and Zvulun Elazar. Regulation of autophagy by ros: physiology and pathology. *Trends in biochemical sciences*, 36(1):30–38, 2011. ISSN 0968-0004. doi: 10.1016/j.tibs.2010.07.007.
- Andreas Schulze, Philippe Gripon, and Stephan Urban. Hepatitis b virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 46(6):1759–1768, 2007. ISSN 1527-3350. doi: 10.1002/hep.21896.
- C. Seeger and W. S. Mason. Hepatitis b virus biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1):51–68, 2000. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98986/>.
- P. A. Sharp, B. Sugden, and J. Sambrook. Detection of two restriction endonuclease activities in haemophilus parainfluenzae using analytical agarose–ethidium bromide electrophoresis. - pubmed - ncbi. *Biochemistry*, 12(16):3055–3063, 1973. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4354250>.
- D. Shouval, H. Roggendorf, and M. Roggendorf. Enhanced immune response to hepatitis b vaccination through immunization with a pre-s1/pre-s2/s vaccine. *Medical microbiology and immunology*, 204(1):57–68, 2015. ISSN 1432-1831. doi: 10.1007/s00430-014-0374-x.

- Vera D. Siegler and Volker Bruss. Role of transmembrane domains of hepatitis b virus small surface proteins in subviral-particle biogenesis. *Journal of Virology*, 87(3):1491–1496, 2013. doi: 10.1128/JVI.02500-12. URL 23152523.
- D. Sir and J.-H. J. Ou. Autophagy in viral replication and pathogenesis. *Molecules and cells*, 29(1): 1–7, 2010. ISSN 0219-1032. doi: 10.1007/s10059-010-0014-2.
- Donna Sir, David K. Ann, and Jing-Hsiung James Ou. Autophagy by hepatitis b virus and for hepatitis b virus. *Autophagy*, 6(4):548–549, 2010a. ISSN 1554-8635. doi: 10.4161/auto.6.4.11669.
- Donna Sir, Yongjun Tian, Wen-ling Chen, David K. Ann, Tien-Sze Benedict Yen, and Jing-Hsiung James Ou. The early autophagic pathway is activated by hepatitis b virus and required for viral dna replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9):4383–4388, 2010b. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.0911373107.
- L. Stoeckl, A. Funk, A. Kopitzki, B. Brandenburg, S. Oess, H. Will, H. Sirma, and Lars Stoeckl. Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis b viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17):6730–6734, 2006. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.0509765103.
- M. Sugiyama, Y. Tanaka, T. Sakamoto, I. Maruyama, T. Shimada, S. Takahashi, T. Shirai, H. Kato, M. Nagao, Y. Miyakawa, and M. Mizokami. Early dynamics of hepatitis b virus in chimeric mice carrying human hepatocytes monoinfected or coinfecting with genotype g. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 45(4):929–937, 2007. ISSN 1527-3350. doi: 10.1002/hep.21584.
- R. D. Tanaka, A. C. Li, A. M. Fogelman, and Edwards, P., A. Inhibition of lysosomal protein degradation inhibits the basal degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase. *Journal of Lipid Research*, 27:261–273, 1986.
- Hong Tang, Liang Da, Yi Mao, Ying Li, Dong Li, Zhenhua Xu, Feng Li, Yifei Wang, Pierre Tiollais, Tsai ping Li, and Mujun Zhao. Hepatitis b virus x protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via up-regulation of beclin 1 expression. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 49(1):60–71, 2009. ISSN 1527-3350. doi: 10.1002/hep.22581. URL 19065679.
- Isei Tanida, Naoko Minematsu-Ikeguchi, Takashi Ueno, and Eiki Kominami. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous lc3 is a marker for autophagy. *Autophagy*, 1(2):84–91, 2014. ISSN 1554-8635. doi: 10.4161/auto.1.2.1697.
- Yongjun Tian, Donna Sir, Cheng-Fu Kuo, David K. Ann, and Jing-Hsiung James Ou. Autophagy required for hepatitis b virus replication in transgenic mice. *Journal of Virology*, 85(24):13453–13456, 2011. doi: 10.1128/JVI.06064-11.
- J. Timm and C. M. Walker. Mutational escape of cd8+t cell epitopes: implications for prevention and therapy of persistent hepatitis virus infection // mutational escape of cd8+ t cell epitopes: implications for prevention and therapy of persistent hepatitis virus infections. *Medical microbiology and immunology*, 204(1):29–38, 2015. ISSN 1432-1831. doi: 10.1007/s00430-014-0372-z.

- H. Towbin and J. Gordon. Immunoblotting and dot immunobinding—current status and outlook. - pubmed - ncbi. *Journal of Immunological Methods*, 72(2):313–340, 1984. ISSN 00221759. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6206159>.
- Trevigen. Tacs mtt cell proliferation assays, 2009. URL http://www.trevigen.com/item/3/15/97/685/MTT_Cell_Proliferation_Assay_Kit/.
- Tugendheim. Hbv-diagnostik, 2014. URL http://www.tugendheim.de/images/impfen/hep_b/hbv_labor_grafic_gr.png.
- Jens Tyedmers, Axel Mogk, and Bernd Bukau. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(11):777–788, 2010. ISSN 1471-0080. doi: 10.1038/nrm2993.
- Tokiko Watanabe, Ericka M. Sorensen, Akira Naito, Meghan Schott, Seungtaek Kim, and Paul Ahlquist. Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis b virus budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(24):10205–10210, 2007. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.0704000104.
- Y. Wei, C. Neuveut, P. Tiollais, and M-A Buendia. Molecular biology of the hepatitis b virus and role of the x gene. *Pathologie Biologie*, 58(4):267–272, 2010. doi: 10.1016/j.patbio.2010.03.005.
- Cindy M. Weinbaum, Ian Williams, Eric E. Mast, Susan A. Wang, Lyn Finelli, Annemarie Wasley, Stephanie M. Neitzel, and John W. Ward. Recommendations for identification and public health management of persons with chronic hepatitis b virus infection. *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports*, 57(RR-8):1–20, 2008. ISSN 1545-8601.
- WHO. Who | global alert and response (gar) - hepatitis. URL <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/en/>.
- I. T. Williams, S. T. Goldstein, J. Tufa, S. Tauillii, H. S. Margolis, and F. J. Mahoney. Long term antibody response to hepatitis b vaccination beginning at birth and to subsequent booster vaccination. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 22(2):157–163, 2003. URL http://ovidsp.tx.ovid.com.proxy.ub.uni-frankfurt.de/sp-3.14.0b/ovidweb.cgi?&S=JGNDFPKJMDDDABAINCLKOCLBLGOKAA00&Link+Set=S.sh.22.23.28.32%7c13%7cs1_10.
- T. Winckler. Systematik und biologie der hepatitis-viren. ähnliche erkrankung - unterschiedliche viren. *Pharmazie in unserer Zeit*, 40(1):14–24, 2011. ISSN 1615-1003. doi: 10.1002/pauz.201100395.
- B. Wölk. Virushepatitis. In Sebastian Suerbaum, Helmut Hahn, Gerd-Dieter Burchard, Kaufmann, Stefan H. E, and Thomas F. Schulz, editors, *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer-Lehrbuch, pages 562–579. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2012. ISBN 3642241662. URL http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-24167-3_72#.
- World Health Organization. Hepatitis b vaccines - who position paper. *Weekly Epidemiology Record*, 84(40):405–420, 2009. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/#>.

- World Health Organization. Hepatitis b vaccines: Who position paper- recommendations. *Vaccine*, 28(3):589–590, 2010. ISSN 1873-2518. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.10.110.
- World Health Organization. Prevention & control of viral hepatitis infection: Framework for global action, 2012. URL <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/Framework/en/>.
- World Health Organization. Hepatitis b - fact sheet n°204, 2014. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.
- Y. Xie, J. Zhai, Q. Deng, P. Tiollais, Y. Wang, and M. Zhao. Entry of hepatitis b virus: mechanism and new therapeutic target. *Pathologie Biologie*, 58(4):301–307, 2010. doi: 10.1016/j.patbio.2010.04.001.
- A. Yamamoto, Y. Tagawa, T. Yoshimori, Y. Moriyama, R. Masaki, and Y. Tashiro. Bafilomycin a1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, h-4-ii-e cells. *Cell Structure and Function*, 23:33–42, 1998.
- Huan Yan, Guocai Zhong, Guangwei Xu, Wenhui He, Zhiyi Jing, Zhenchao Gao, Yi Huang, Yonghe Qi, Bo Peng, Haimin Wang, Liran Fu, Mei Song, Pan Chen, Wenqing Gao, Bijie Ren, Yinyan Sun, Tao Cai, Xiaofeng Feng, Jianhua Sui, and Wenhui Li. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis b and d virus. *eLife*, 1:e00049, 2012. ISSN 2050-084X. doi: 10.7554/eLife.00049+.
- Huayu Yang, Qining Fu, Chen Liu, Taisheng Li, Yanan Wang, Hongbing Zhang, Xin Lu, Xinting Sang, Shouxian Zhong, Jiefu Huang, and Yilei Mao. Hepatitis b virus promotes autophagic degradation but not replication in autophagosome. *Bioscience trends*, 9(2):111–116, 2015. ISSN 1881-7823. doi: 10.5582/bst.2015.01049. URL 25971696.
- T. Yoshimori, A. Yamamoto, Y. Moryama, M. Futai, and Y. Tashiro. Bafilomycin ai, a specific inhibitor of vacuolar-type h+-atpase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *The Journal of biological chemistry*, 266(26):17707–17712, 1991. ISSN 0021-9258.
- Chunyan Yu, Xiaowei Huang, Ye Xu, Hongyan Li, Jing Su, Jiateng Zhong, Jinsong Kang, Yuhe Liu, and Liankun Sun. Lysosome dysfunction enhances oxidative stress-induced apoptosis through ubiquitinated protein accumulation in hela cells. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 296(1):31–39, 2013. ISSN 1932-8494. doi: 10.1002/ar.22612. URL 23125185.
- S. Zeuzem. Akute und chronische virushepatitiden. In W. F. Caspary, U. Leuschner, and S. Zeuzem, editors, *Therapie von Leber- und Gallekrankheiten*, pages 3–28. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2001. ISBN 978-3-642-63151-1. doi: 10.1007/978-3-642-56819-0{\textunderscore}1.
- Yiyu T. Zheng, Shahab Shahnazari, Andreas Brech, Trond Lamark, Terje Johansen, and John H. Brumell. The adaptor protein p62/sqstm1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(9):5909–5916, 2009. ISSN 1550-6606. doi: 10.4049/jimmunol.0900441.

11 Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Eberhard Hildt für die fortwährende Unterstützung, unerschütterliche Geduld und motivierende Betreuung meiner wissenschaftlichen Arbeit bedanken.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Ralf Einspanier, welcher als Betreuer und Erstgutachter für fachliche Fragen bereitwillig zur Verfügung stand.

Für die freundliche und kompetente Einweisung am LSM möchte ich Herrn Dr. Klaus Boller meinen Dank aussprechen.

Bei Herrn Dr. Plesker und insbesondere bei Frau Wingerter möchte ich mich für die gewissenhafte Anfertigung der Paraffinpräparate und Färbungen bedanken.

Für das fleißige und hilfreiche Korrekturlesen und die vielfältigen Anregungen möchte ich mich bei Dagmar Fecht-Schwarz sehr herzlich bedanken.

Ein großer Dank für all die Hilfestellungen gilt der gesamten Arbeitsgruppe: Andrea, Bingfu, Christian, Daniela, Fabian, Gert, Kiyoshi, Lisa, Malin, Marlene, Matthias, Matze, Mei, Meike, Regina, Sami, Sebastian, Sanita, Stefan und Wiebke. Es hat großen Spaß gemacht, mit euch zu arbeiten. Seid weiterhin schön vor-bild-lich.

Ganz besonders möchte ich mich bei Meike Gratz für ihre großartige Unterstützung, ihre warmherzige Art und das Korrekturlesen bedanken. Es hätte keine angenehmere Sitznachbarin und Freundin im Büro geben können.

Eine besondere Rolle hält Thekla inne. Deine lieben und aufbauenden Worte, unsere vielen Telefonate und jegliche sonstige Hilfestellung deinerseits haben mir enorm geholfen.

Ein großes Dankeschön gilt all meinen Freunden, welche mir während meiner Doktorarbeit ermutigend und aufbauend zur Seite standen.

Meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich für ihre großartige Unterstützung danken. Nadine, eine bessere Schwester kann man sich nicht wünschen! Christian – ohne dich hätte ich die Arbeit vermutlich an der Schreibmaschine vollendet.

Auch wenn es während der experimentellen Arbeit und des Zusammenschreibens einige Tiefpunkte gab („man muss sich aach emol quäle“), so gab es einen ganz besonders großen Lichtblick. Danke für alles, Matthias! Du hast mich ganz fabelhaft motiviert und unterstützt. Das Beste an dieser Arbeit ist, dass wir uns begegnet sind!

12 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 23.11.2017

Melanie Hassemer