



Fakultät für Medizin

**Immunkontrolle der Hepatitis-Delta-Virus-Infektion
in vitro und *in vivo***

Sebastian Maximilian Altstetter

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Carsten Schmidt-Weber

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Ulrike Protzer
2. Prof. Dr. Dirk H. Busch

Die Dissertation wurde am 10.02.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.06.2022 angenommen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
Zusammenfassung.....	11
Abstract.....	13
1. Einleitung.....	15
1.1 Das Hepatitis-B-Virus.....	15
1.1.1 Die Virionstruktur und Genomorganisation des HBV	15
1.1.2 Der HBV Replikationszyklus.....	17
1.2 Das Hepatitis-Delta-Virus.....	19
1.2.1 Die Virionstruktur von HDV.....	19
1.2.2 Die HDV Genomorganisation und die Genom-Editierung durch ADAR1.....	20
1.2.3 Der HDV Replikationszyklus.....	21
1.2.4 Therapie und Prävention der Hepatitis B und D.....	24
1.3 Die Erkennung viraler Infektionen durch das angeborene Immunsystem	26
1.3.1 Typ I Interferone und der JAK-STAT Signalweg	28
1.3.2 RIG-I-ähnliche Rezeptoren.....	29
1.3.3 Toll-like Rezeptoren	32
1.3.4 Das 2'5'Oligoadenylat-Synthetase/RNase L System	33
1.3.5 Immunmodulation durch HDV und HBV	34
1.4 Zielsetzung der Doktorarbeit	35
2. Ergebnisse.....	37
2.1 Etablierung und Charakterisierung von <i>in vitro</i> HDV Infektionsmodellen	37
2.1.1 HDV induziert ISGs in humanen Hepatomazelllinien	37
2.1.2 Die Veränderung der MOI hat wenig Einfluss auf die Induktion von ISGs.....	39
2.1.3 HBV schwächt die HDV induzierte ISG Expression nicht ab.....	40
2.2 Die Identifizierung von MDA5 als Rezeptor zur Erkennung der HDV Replikation	42
2.2.1 Der Gen-Knockout von MAVS verhindert die Induktion des angeborenen Immunsystems nach HDV Infektion.....	42
2.2.2 MDA5 und nicht RIG-I ist für die Erkennung von HDV essenziell	43

2.2.3	RNase L spielt bei der HDV induzierten angeborenen Immunantwort nur eine begrenzte Rolle	46
2.3	Der Einfluss der HDV induzierten angeborenen Immunantwort auf die HDV- Replikation und Eliminierung	50
2.3.1	Die MDA5 abhängige Erkennung von HDV hat keinen Einfluss auf dessen Replikation	50
2.3.2	Die Vorbehandlung mit Poly I:C hat keinen Effekt auf die HDV Replikation	54
2.3.3	Die Erkennung von HDV führt zu einer verstärkten Eliminierung von HBV-HDV koinfizierten Hepatozyten durch zytotoxische T-Zellen	57
2.4	Die Charakterisierung muriner HDV-Infektionsmodelle	61
2.4.1	HDV kann AML12 basierte Zellen und primäre Maushepatozyten nicht infizieren	61
2.4.2	In h/mNTCP transgenen Mäusen ist keine dauerhafte HDV Infektion möglich....	62
2.4.3	In Mäusen führt der Gen-Knockout von MDA5 zu keiner erhöhten Empfänglichkeit gegenüber HDV	65
3.	Diskussion	67
3.1	Etablierung und Charakterisierung von <i>in vitro</i> HDV Infektionsmodellen	67
3.1.1	HDV induziert die angeborene Immunität in humanen Hepatomazelllinien	67
3.1.2	Der Einfluss der HBV Koinfektion	69
3.2	Die Identifizierung des PRRs zur Erkennung von HDV	71
3.2.1	MDA5 und nicht RIG-I erkennt die HDV Replikation	71
3.2.2	Die Rolle der RNase L bei der Erkennung von HDV	73
3.3.1	Die durch HDV induzierte angeborene Immunität hat keinen Effekt auf dessen Replikation	75
3.3.2	Die HDV bedingte angeborene Immunität führt zu einer verstärkten Eliminierung HBV-HDV koinfizierter Hepatozyten durch zytotoxische T-Zellen	77
3.4	Die Charakterisierung muriner HDV-Infektionsmodelle	79
3.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	82
4.	Material und Methoden	83
4.1	Material.....	83
4.1.1	Geräte	83

4.1.2	Verbrauchsmaterial	84
4.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	85
4.1.4	Kits.....	87
4.1.5	Puffer und Lösungen	88
4.1.6	Zelllinien und Bakterien	88
4.1.7	Medien für Zellkultur und Bakterien	89
4.1.8	Antikörper.....	91
4.1.9	Oligonukleotide	91
4.1.10	Plasmide	93
4.1.11	Mausstämme.....	93
4.1.12	Software.....	94
4.2	Methoden.....	95
4.2.1	Molekularbiologische Methoden	95
4.2.2	Allgemeine Zellkulturmethoden	98
4.2.3	Produktion der HDV-Stocks.....	99
4.2.4	Produktion der AAV-HDV-Stocks	99
4.2.5	Produktion von Lentiviren zum RNase L Knockout.....	100
4.2.6	Generierung der HepG2-NTCP RNase L Knockout Zelllinien.....	101
4.2.7	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Westernblot Analyse	101
4.2.8	<i>In vitro</i> Infektionen mit HBV/HDV und Transduktion mit AAV-HDV	102
4.2.9	Transfektion mit siRNA und poly I:C.....	102
4.2.10	Quantitative PCRs.....	103
4.2.11	Immunfluoreszenzfärbung des HDAg.....	104
4.2.12	Echtzeit-Bestimmung der Zellviabilität mittels xCELLigence RTCA	105
4.2.13	Mausexperimente.....	105
5.	Abbildungsverzeichnis	107
6.	Literaturverzeichnis.....	109
	Danksagung	121
	Publikationen und Meetings.....	123

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
ADAR-1	Adenosine Deaminase Acting on RNA-1
Ad	Adenovirus
ALR	AIM2-ähnlicher Rezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	chimärer Antigenrezeptor (engl. <i>chimeric antigen receptor</i>)
CARD	Caspase aktivierungs- und rekrutierungs Domäne (engl. <i>caspase activation and recruitment domains</i>)
cccDNA	kovalent geschlossene zirkuläre (engl. <i>covalently closed circular</i>) DNA
cGAS	cyclische GMP-AMP Sythase
CTD	C-terminale Domäne
C-terminus	Carboxy-Terminus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig (engl. <i>double stranded</i>)
E.coli	Escherichia coli
EMCV	Encephalomyocarditis-Virus
Fas	First apoptosis signal receptor
FasL	First apoptosis signal Ligand
FCS	Fetales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
GE	Genomäquivalente (engl. <i>genomic equivalents</i>)
gRNA	Guide-RNA
HBeAg	Hepatitis B E-Protein Antigen (engl. <i>Hepatitis B e-protein Antigen</i>)
HBsAg	Hepatitis B Oberflächenprotein – Antigen (engl. <i>Hepatitis B surface Antigen</i>)
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HD-Ad	Helferabhängiger Adenovirus (engl. <i>helper-dependent adenovirus</i>)

HDAg	Hepatitis-Delta-Antigen
HDV	Hepatitis-Delta-Virus
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
IFNAR	IFN- α -Rezeptor
IFNLR	IFN- λ -Rezeptor
IFN- α	Interferon-alpha
IFN- β	Interferon-beta
IFN γ	Interferon-gamma
IFN ϵ	Interferon-epsilon
IFN κ	Interferon-kappa
IFN λ	Interferon-lambda
IFN ω	Interferon-omega
IFIT1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
IgG	Immunglobulin G
IKK	I κ B-Kinase
IP-10	Interferon gamma-induced protein 10
IL-10R2	Interleukin-10 Rezeptor 2
IRF	Interferon regulatorischer Faktor
IRG	Interferon reguliertes Gen
ISG	Interferon stimuliertes Gen
ISGF3	Interferon stimuliertes Gen Faktor 3
ISRE	Interferon-Stimulated Response Element
JAK	Januskinase
JEV	Japanisches-Enzephalitis-Virus
kDa	kilo Dalton
LGP2	Laboratory of genetics and physiology 2
L-HDAg	großes (engl. large) Hepatitis-Delta-Antigen
MAVS	Mitochondrial Antiviral-Signalling Protein
MDA5	Melanoma Differentiation-Associated Protein 5
MEM NEAA	Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MOI	Multiplizität der Infektion (engl. <i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	messenger ribonucleic acid
MVA	Modified-Vaccinia-Ankara-Virus
Mx	Myxovirus resistance

MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NaCl	Natriumchlorid
NAP	Nukleinsäure-Polymer (engl. <i>nucleic acid polymer</i>)
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NFX1	Nuclear RNA export factor 1
nm	Nanometer
NTCP	Sodium taurocholate cotransporting polypeptide
N-Terminus	Amino-Terminus
OAS	2-5-oligoadenylate synthetase
ORF	offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i>)
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PKR	Proteinkinase R
PrP	Prion Protein
PRR	Mustererkennungsrezeptor (engl. <i>pattern recognition receptor</i>)
qPCR	quantitative echtzeit PCR (engl. <i>quantitative real-time PCR</i>)
rcDNA	relaxiert-zirkuläre (engl. <i>relaxed circular</i>) DNA
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I
RLR	Retinoic acid-inducible gene I ähnliche Rezeptoren
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNAP I	RNA Polymerase I
RNAP II	RNA Polymerase II
RNase L	Ribonuclease L
RNP	Ribonucleoprotein
Rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Reverse-Transkriptase quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion
S-CAR	HBs spezifischer chimärer Antigenrezeptor
S-HDAg	kleines (engl. <i>small</i>) Hepatitis-Delta-Antigen
siRNA	kleine eingreifende RNA (engl. <i>small interfering RNA</i>)
ss	einzelsträngig (engl. <i>single stranded</i>)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription

STING	Stimulator of Interferon Genes
TBK1	TANK-Binding Kinase 1
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl. <i>T cell receptor</i>)
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TYK	Tyrosinkinase
vGE	virale Genomäquivalente (engl. <i>genomic equivalents</i>)
VSV	Vesikuläres-Stomatitis-Virus
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. <i>World Health Organization</i>)
WNV	West-Nil-Virus
wt	Wildtyp

Zusammenfassung

Trotz der Verfügbarkeit einer prophylaktischen Impfung sind weltweit geschätzte 296 Millionen Menschen chronisch mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) infiziert, wovon ca. 5% zusätzlich mit dessen Satellitenvirus, dem Hepatitis-Delta-Virus (HDV) koinfiziert sind. Diese Koinfektion hat die Ausbildung einer chronischen Entzündung der Leber, der Hepatitis D, zur Folge, welche rasch zur Ausbildung von Leberzirrhose und Leberzellkarzinom führt. Die Auslöser und Folgen der chronischen Hepatitis D sind nur unzureichend geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es zum einen den Rezeptor für die Erkennung der HDV Infektion durch das angeborene Immunsystem zu identifizieren. Zum anderen die Konsequenzen der HDV Infektion auf das Immunsystem und vice versa, der Einfluss des Immunsystems auf die HDV Infektion, sowie die Interaktion zwischen HBV und HDV zu erforschen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein zuverlässiges *in vitro* Modell zur Infektion mit HDV etabliert, welches ein Auslesen der angeborenen Immunantwort als Reaktion auf die HDV Infektion ermöglichte. Dadurch konnte gezeigt werden, dass HDV in verschiedenen Hepatom-Zelllinien repliziert und nach einer Latenzphase unabhängig von der Anzahl der HDV Genome in den infizierten Zellen eine ausgeprägte Induktion Interferon stimulierter Gene (ISGs) auslöste. Die durch HDV induzierte ISG Expression wurde durch das häufig koexistierende HBV in HBV transgenen Zelllinien nicht abgeschwächt.

Der zweite Teil diente der Identifikation des Mustererkennungs-Rezeptors, der für die Erkennung des HDV nach Infektion essenziell war. Mit Hilfe der CRISPR-Technologie konnten wir zeigen, dass die HDV Erkennung sowohl in infizierten Zellen als auch in Zellen mit einem Adeno-assoziierten Virus-Vektor, der ein HDV Genom transferierte, im Wesentlichen vom zytoplasmatischen Mustererkennungs-Rezeptor MDA5 und seinem Signalmolekül abhängig war. Die ebenfalls untersuchte RNase L spielte hierbei nur eine untergeordnete Rolle. Abschließend wurden diese Erkenntnisse auf ein *in vivo* HDV Infektionsmodell in Mäusen übertragen. Hierbei wurde in der Maus nur eine transiente Infektion mit HDV beobachtet und selbst durch das Ausschalten von MDA5 keine langanhaltende Replikation von HDV in Mäusen etabliert.

Mittels Immunfluoreszenzfärbungen und Kokultur-Experimenten wurde im dritten Teil der Arbeit der Einfluss der Immunantwort auf die Replikation sowie Ausbreitung des HDV untersucht. Weder die HDV-induzierte Immunantwort noch die Aktivierung von MDA5 und RIG-I durch Poly-I:C waren in der Lage, die HDV-Replikation und -Ausbreitung zu hemmen. Die durch HDV ausgelöste Immunantwort erhöhte jedoch die Zytotoxizität von T-Zellen, die einen HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptor oder Chimären Antigen-Rezeptor (CAR)-tragen. Das

deutet darauf hin, dass die persistierende HDV-Replikation einen permanenten Treiber für die T-Zell-vermittelte, adaptive Immunität darstellt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass HDV von MDA5 erkannt wird, was wiederum eine Aktivierung der angeborenen Immunität zur Folge hat. Bemerkenswerterweise ist diese Immunantwort nicht direkt in der Lage, die HDV-Infektion einzuschränken, sondern nur indirekt, indem sie die Effizienz der zytotoxischen T-Zell-Antwort erhöht. Die Tatsache, dass die spezifische Eliminierung von HBV-HDV-koinfizierten Hepatozyten durch HBV-spezifische T-Zellen durch eine Mustererkennung des HDV verbessert wurde, eröffnet die Möglichkeit, die Stimulation von Mustererkennungsrezeptoren mit anderen antiviralen Therapien zu kombinieren.

Abstract

Regardless of the availability of prophylactic vaccination, an estimated 296 million people worldwide are chronically infected with hepatitis B virus (HBV), of which approximately 5% are additionally coinfecting with its satellite virus, hepatitis delta virus (HDV). This co-infection results in the formation of chronic inflammation of the liver, known as hepatitis D, which rapidly leads to the development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The triggers and consequences of chronic hepatitis D are poorly understood.

The aim of this work was to identify the receptor for the recognition of HDV infection by the innate immune system. Secondly, to investigate the consequences of HDV infection on the immune system and vice versa, the influence of the immune system on HDV infection, and the interaction between HBV and HDV.

In the first part of this work, a reliable *in vitro* model for infection with HDV was established, which allowed readout of the innate immune response as a reaction to HDV infection. This demonstrated that HDV replicated in different hepatoma cell lines and, after a latency phase, triggered a pronounced induction of interferon stimulated genes (ISGs) independently of the number of HDV genomes in the infected cells. The ISG expression induced by HDV was not mitigated by the frequently coexisting HBV in HBV transgenic cell lines.

The second part was dedicated to the identification of the pattern recognition receptor, which was essential for HDV recognition after infection. Using CRISPR technology, we were able to show that HDV recognition was mainly dependent on the cytoplasmic pattern recognition receptor MDA5 and its signaling molecule in both infected cells but also in cells with an adeno-associated virus vector that transferred an HDV genome. RNase L, which was also studied, played only a minor role in this context. Finally, these findings were applied to an *in vivo* HDV infection model in mice. In this model, only a transient infection with HDV was observed in mice and even silencing of MDA5 did not establish a long-lasting replication of HDV in mice.

Using immunofluorescence staining and coculture experiments, the influence of the immune response on HDV replication as well as spread was investigated in the third part of the work. Neither the HDV-induced immune response nor the activation of MDA5 and RIG-I by poly-I:C were able to inhibit HDV replication and spread. However, the immune response induced by HDV increased the cytotoxicity of T cells carrying an HBV-specific T cell receptor or chimeric antigen receptor (CAR). This indicates that persistent HDV replication is a permanent driver of T cell-mediated adaptive immunity.

In summary, the results of this work show, that HDV is recognized by MDA5, which in turn results in an activation of innate immunity. Remarkably, this immune response is not directly able to limit HDV infection, but only indirectly by increasing the efficiency of the cytotoxic T cell response. The fact that specific elimination of HBV-HDV co-infected hepatocytes by HBV-specific T-cells was enhanced by pattern recognition of HDV opens the possibility of combining stimulation of pattern recognition receptors with other antiviral therapies.

1. Einleitung

1.1 Das Hepatitis-B-Virus

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) wurde erstmals 1970 durch David Dane beschrieben (Dane, et al., 1970). Es wird als das Prototypvirus innerhalb der Familie der Hepadnaviridae (zusammengesetzt aus den Begriffen für „hepar“ (lat. Leber) und „DNA“ (für das Genom)) klassifiziert und übt somit einen stark ausgeprägten Lebertropismus aus (Schaefer, 2007). Basierend auf Vergleichen zwischen den bekannten Genomsequenzen, wird HBV momentan in 9 verschiedene Genotypen eingeteilt (A bis I), welche jeweils eine charakteristische geographische Verteilung aufweisen. Dabei ist es bemerkenswert, dass geschätzte 96% aller weltweit auftretenden chronischen HBV Infektionen durch die Genotypen C (26%), D (22%), E (18%), A (17%) und B (14%) verursacht werden (Velkov, et al., 2018). Die Infektion mit HBV kann zu dessen Persistenz und folglich einer inflammatorischen Leberkrankheit, der Hepatitis B, führen. Obwohl eine effektive prophylaktische HBV-Impfung existiert, sind weltweit geschätzte 257 Millionen Menschen chronisch mit HBV infiziert. Die chronische HBV Infektion führt zu einem deutlich erhöhten Risiko, eine Leberzirrhose und im weiteren Krankheitsverlauf ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln und verursachte dadurch weltweit schätzungsweise 820000 Todesfälle im Jahr 2019 (WHO, 2021) (Hu, 2019).

1.1.1 Die Virionstruktur und Genomorganisation des HBV

Das infektiöse HBV Virion, welches nach seinem Entdecker auch als „Dane Partikel“ bezeichnet wird, ist eine sphärische, umhüllte Struktur mit einem Durchmesser von 42 nm (Dane, et al., 1970). Wie in Abbildung 1.A dargestellt, befindet sich im Inneren des Virions ein ikosaedrisch geformtes Kapsid, welches das HBV Genom enthält. Das sich selbst assemblierende Kapsid besteht aus HBV-Kapsidprotein (engl. *HBV core protein*, HBc), welches zwei verschiedene Dimere bilden kann. Zum einen werden das aus 120 Dimeren bestehende „T=4 Kapsid“, das Hauptprodukt der Assemblierung (liegt zu etwa 95% vor), sowie zum anderen das „T=3 Kapsid“ (90 Dimere) gebildet (Venkatakrisnan, et al., 2016). Die Kapside werden von einer äußeren Lipiddoppelschicht umhüllt, in welche die drei HBV-Hüllproteine, die S-, M- und L-Proteine (vom englischen *small*, *middle* und *large*) eingelagert sind. Das HBV Genom, welches als relaxiert-zirkuläre DNA (engl. *relaxed circular DNA*, rcDNA) vorliegt, ist partiell doppelsträngig und kovalent mit der viralen Polymerase (P-Protein) verbunden (Nassal, 2015). Neben diesen soeben beschriebenen „Dane Partikeln“ werden aus HBV-infizierten Hepatozyten auch nicht-infektiöse subvirale Partikel sekretiert. Zu diesen gehören einerseits filamentöse und sphärische Strukturen, welche beide in die Lipidmembran eingebetteten HBV-Hüllproteine besitzen, dafür aber keine viralen Nukleinsäuren beinhalten.

Andererseits werden auch Partikel gebildet, die aus Lipoproteinhülle und Kapsid bestehen, in die jedoch keine rcDNA verpackt wurde (Hu, et al., 2017)

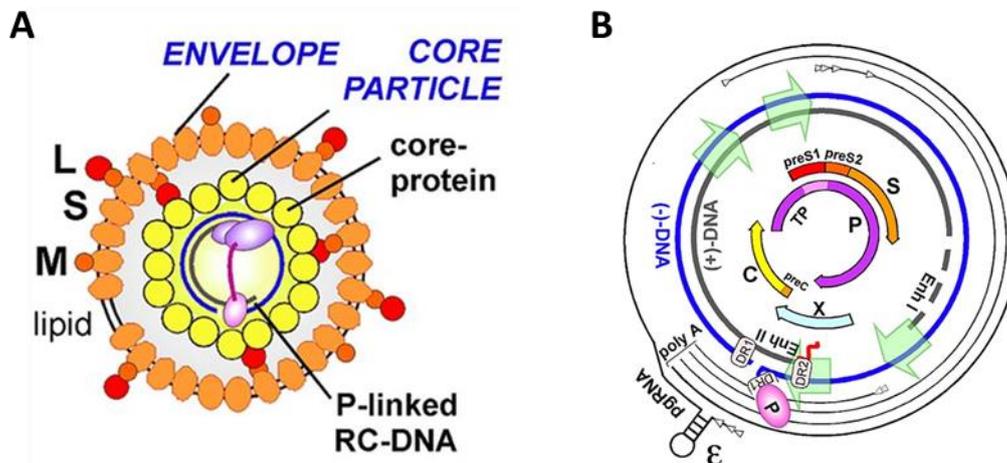


Abbildung 1: Die Struktur und Genomorganisation des HBV.

(A) Die Hülle (engl. *envelope*) besteht aus den HBV S-, M- und L-Proteinen, die in eine Lipidmembran eingebettet sind. Sie umschließt das Kapsid (engl. *core particle*), das aus HBV-Kapsidproteinen (engl. *core proteins*) aufgebaut ist und das relaxiert-zirkuläre DNA (rc-DNA) Genom beherbergt, welches kovalent mit der viralen Polymerase (P) verbunden ist (engl. *P-linked*). (B) Die äußeren Linien stellen die viralen Transkripte schematisch dar, die Startpunkte der Transkription sind mit weißen Pfeilspitzen gekennzeichnet. Das Verpackungssignal auf der prägenomischen (pg)RNA wird durch das „ε“ symbolisiert. Der un- bzw. vollständige plus (+) bzw. (-) Strang der rcDNA ist jeweils als grauer bzw. blauer Kreis dargestellt. Die inneren farbigen Pfeile stehen für die translatierten HBV-Proteine (siehe Text).

Das HBV rcDNA Genom ist, obwohl es für insgesamt sieben unterschiedliche virale Proteine kodiert, nur 3,2 kb lang. Diese Kompaktheit wird durch vier sich teilweise überlappende offene Leserahmen (engl. *open reading frames*, ORFs) erreicht (Abbildung 1.B), wobei jedes einzelne Nukleotid an der kodierenden Funktion beteiligt ist (Karayiannis, 2017). Die Oberflächenproteine des HBV werden im „PreSurface/Surface-ORF“ (preS/S ORF) kodiert und besitzen den gleichen Carboxy(C)-Terminus, unterscheiden sich jedoch in ihren jeweiligen N-Termini. Somit stellen sowohl das M- (PreS2) als auch das L-Protein (PreS1) N-terminale Erweiterungen des S-Proteins (S) dar. Im „PreCore/Core-ORF“ (preC/C ORF) werden zum einen das Kapsidprotein (C), welches als Untereinheit des Kapsids dient, als auch das HBe-Protein (PreC) kodiert (Seeger, et al., 2015). Hierbei kodiert PreC für ein zusätzliches, 19 Aminosäuren langes N-terminales Signalpeptid, welches proteolytisch abgespalten wird, um die Sekretion des HBe-Antigens (HBeAg) zu ermöglichen (Tong, et al., 2005). Für das HBeAg wird eine immunmodulatorische Funktion vermutet, da es für den Replikationszyklus nicht benötigt wird und eine Toleranz des adaptiven Immunsystems gegenüber HBV zu vermitteln scheint. Darüber hinaus dient das HBeAg im Serum infizierter Patienten als charakteristischer diagnostischer Marker der HBV Infektion (Chen, et al., 2005) (Ganem, et al., 2004). Der Polymerase-ORF (P ORF) kodiert die namensgebende Polymerase, welche während der rcDNA Synthese als reverse Transkriptase, RNaseH und Primer fungiert, um die

prägenomische HBV-RNA in rcDNA umzuschreiben (Seeger, et al., 2015). Das nicht strukturgebende HBV X-Protein (HBx) wird im X-ORF kodiert und ist für die Initiierung und Aufrechterhaltung der viralen Replikation nach Infektion essenziell (Lucifora, et al., 2011). Außerdem steht es unter Verdacht, onkogenes Potenzial zu besitzen und die HBV bedingte Karzinogenese mit zu verursachen (Bouchard, et al., 2004).

1.1.2 Der HBV Replikationszyklus

Der virale Replikationszyklus wird in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Aufgrund seines stark ausgeprägten Lebertropismus infiziert HBV ausschließlich Hepatozyten, sowie immortalisierte Hepatozytenzelllinien (Ko, et al., 2018). Zunächst findet eine unspezifische, reversible Bindung an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) auf der Oberfläche von Hepatozyten statt, wobei insbesondere Glypican 5 als wichtiger Faktor beschrieben wurde (Verrier, et al., 2016). Anschließend erfolgt die spezifische Interaktion zwischen der myristoylierten PreS1-Domäne des L-Proteins und dem Natrium-Taurocholat-cotransportierenden Polypeptid (NTCP), das als funktioneller HBV-Rezeptor identifiziert wurde (Yan, et al., 2012). Das NTCP befindet sich auf der basolateralen Membran von humanen Hepatozyten und transportiert Gallensäuren aus dem Blut in die Leberzelle (Anwer, et al., 2014). Nach der NTCP-Bindung kommt es zu einer Clathrin-vermittelten Endozytose, sowie einer anschließenden Freisetzung des Kapsids in das Zytoplasma (Huang, et al., 2012). Anschließend erfolgt der Transport des Kapsids zum Nukleus, dort wird die verpackte rcDNA freigesetzt und in den Zellkern aufgenommen (Schmitz, et al., 2010). Im Nukleus wird der partielle Doppelstrang der rcDNA durch zelluläre Proteine zur vollständig doppelsträngigen, kovalent geschlossenen zirkulären DNA (engl. *covalently closed circular DNA*, cccDNA) komplettiert (Guo, et al., 2012). In den Nuklei HBV infizierter Zellen, liegt die cccDNA episomal vor und dient als Matrize für die Transkription der verschiedenen mRNA-Transkripte, sowie der prägenomischen RNA (pgRNA) durch die RNA-Polymerase II. Im Zytosol erfolgt anschließend die Translation der viralen Proteine. Die S-, M- und L-Proteine und das X-Protein, werden ausgehend von drei subgenomischen RNA-Transkripten translatiert, das HBe-Protein wird von der PreC-mRNA und die Polymerase sowie das Kapsidprotein von der pgRNA abgelesen. Die pgRNA wird durch Bindung der viralen Polymerase innerhalb des Kapsids verpackt und reverse-transkribiert, was zur dortigen Synthese der rcDNA führt (Nassal, 2015) (Seeger, et al., 2015). Anschließend werden die dadurch gebildeten, mit rcDNA beladenen Kapside zum einen zurück zum Nukleus transportiert und reimportiert, um dort ein stabiles Reservoir an cccDNA zu gewährleisten (Lucifora, et al., 2016). Zum anderen werden sie zum endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert, umhüllt und genau wie die filamentösen subviralen Partikel über multivesikuläre Körperchen (engl. *multivesicular bodies*) exozytiert

und freigesetzt, wohingegen die sphärischen subviralen Partikel die Zelle über den Golgi-Apparat verlassen (Jiang, et al., 2015).

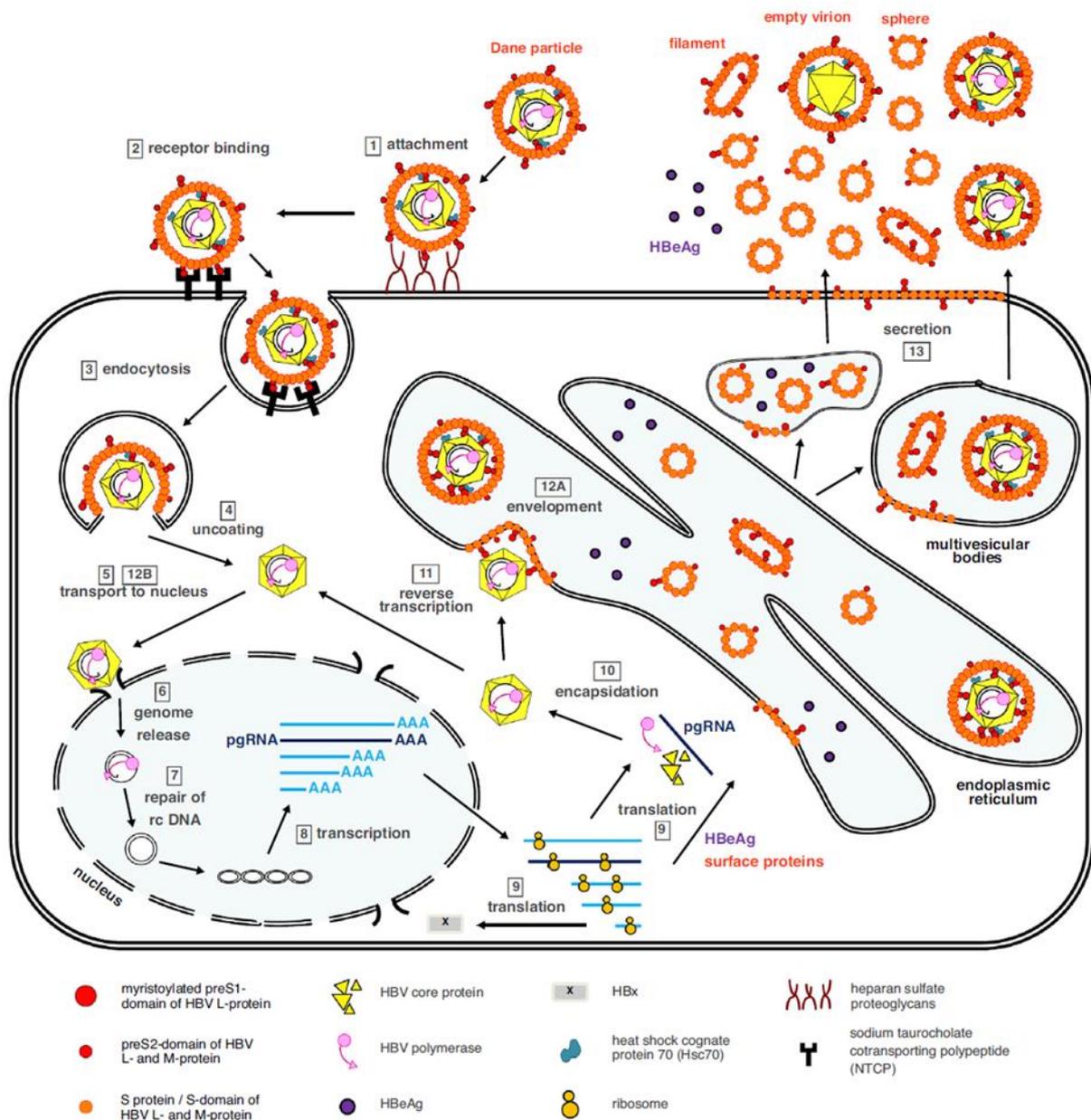


Abbildung 2: Der Replikationszyklus von HBV.

(1) Zunächst findet eine unspezifische Bindung (engl. *attachment*) des HBV an Heparansulfat-Proteoglykane und (2) die spezifische Rezeptorbindung (engl. *receptor binding*) an NTCP auf der Zelloberfläche von Hepatozyten statt. (3) Anschließend wird das Virion mittels Endozytose (engl. *endocytosis*) in die Zelle aufgenommen, (4) das Kapsid freigesetzt (engl. *uncoating*) und (5) zum Nucleus transportiert. (6) Dort wird das rcDNA Genom freigesetzt (engl. *genome release*), (7) zu cccDNA komplettiert und (8) diese dann transkribiert sowie (9) translatiert. (10) Die pgRNA wird zusammen mit der HBV Polymerase in das Kapsid eingeschlossen (engl. *encapsidation*) und (11) reverse transkribiert. (12A) Die mit rcDNA beladenen Kapside werden entweder am ER umhüllt, oder (12B) zurück zum Nucleus transportiert. (13) Die Sekretion (engl. *secretion*) neu gebildeter Virionen und subviraler Filamente (engl. *filaments*) findet mittels multivesikulärer Körperchen (engl. *multivesicular bodies*) statt, die subviralen Sphären (engl. *spheres*) verlassen die Zelle über den Golgi-Apparat (Ko, et al., 2017).

1.2 Das Hepatitis-Delta-Virus

Das Hepatitis-Delta-Virus (HDV), das 1977 zum ersten Mal beschrieben wurde (Rizzetto, et al., 1977), repräsentiert und definiert als einziges Mitglied die Gattung *Deltavirus* und ist das kleinste bekannte Virus, welches Säugetiere infiziert (Magnius, et al., 2018). Es ist ein inkomplettes RNA-Virus ohne selbst kodierte Hüllproteine und benötigt als Satellitenvirus des HBV dessen Hilfe in Form der S-, M-, und L-Proteine für die Assemblierung neuer Virionen und deren Transmission (Mentha, et al., 2019). Aufgrund dessen wurde die HDV Infektion bisher nur als Koinfektion mit HBV oder als Superinfektion chronisch HBV infizierter Personen beschrieben. Vor kurzem wurde allerdings gezeigt, dass einige weitere Virengattungen den HDV Replikationszyklus unterstützen können, indem sie die Verpackung des HDV Genoms, aufgrund seiner Zusammensetzung aus RNA und Proteinkomplexen auch als Ribonucleoprotein (RNP) bezeichnet, übernehmen. So können sowohl das Vesikuläre-Stomatitis-Virus (VSV) als auch das Hepatitis-C-Virus (HCV) als Helferviren von HDV fungieren, indem sie das HDV RNP umhüllen (Perez-Vargas, et al., 2019). Momentanen Schätzungen der WHO zufolge, sind mindestens 5% aller chronisch HBV infizierter Patienten und damit etwa 15-20 Millionen Menschen weltweit mit HDV koinfiziert (WHO, 2021), während andere Quellen, welche sich auf eine globale Meta-Analyse berufen, sogar von bis zu 70 Millionen HDV infizierter Personen ausgehen (Chen, et al., 2018). Es gibt auf Basis variierender Genomsequenzen acht beschriebene HDV Genotypen (1-8), welche eine unterschiedliche geographische Verteilung aufweisen. Hauptgebiete der HDV Prävalenz umfassen den Mittelmeerraum, den Nahen Osten, Zentral- und Nordasien, West- und Zentralafrika, die Amazonas-Region, Venezuela, Kolumbien und manche Pazifikinseln, wobei nur Genotyp 1 eine weltweite Verbreitung aufweist (Pascarella, et al., 2011). Sowohl Ko- als auch Superinfektion können zur HDV Persistenz und einer inflammatorischen Lebererkrankung, welche als Hepatitis D bezeichnet wird, führen. Diese gilt aufgrund ihres schnellen Fortschreitens hin zu Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom als schwere Form der chronischen viralen Hepatitis mit hoher Mortalität (Rizzetto, 2016).

1.2.1 Die Virionstruktur von HDV

Wie schematisch in Abbildung 3 dargestellt, sind die Virionen des HDV sphärische Partikel mit einem Durchmesser von ca. 35-37 nm. Sie bestehen aus einer das HDV-RNP umschließende Lipidhülle, in welche die HBV-Oberflächenproteine eingebettet sind (Lempp, et al., 2016). Das RNP besteht aus einer genomischen RNA, welche mit beiden Isoformen des Hepatitis-Delta-Antigens (HDAg), dem 195 Aminosäuren langen, 24 kDa schweren S-HDAg (vom englischen *small*, S), sowie dem 214 Aminosäuren langen, 27 kDa schweren L-HDAg (vom englischen *large*, L), komplexiert ist. (Tavanez, et al., 2002). Hierbei ist das L-HDAg essenziell für die Interaktion des RNPs mit den HBV-Hüllproteinen, was folglich zur Umhüllung des RNP führt

(Surreau, 2006). Mit einer relativen Zusammensetzung der HBV S-, M-, und L-Proteine von 95(S) zu 5(M) zu 1(L) ähnelt die Virushülle eher der Umhüllung subviraler HBV Partikel als die der infektiösen Dane Partikel. (Bonino, et al., 1986).

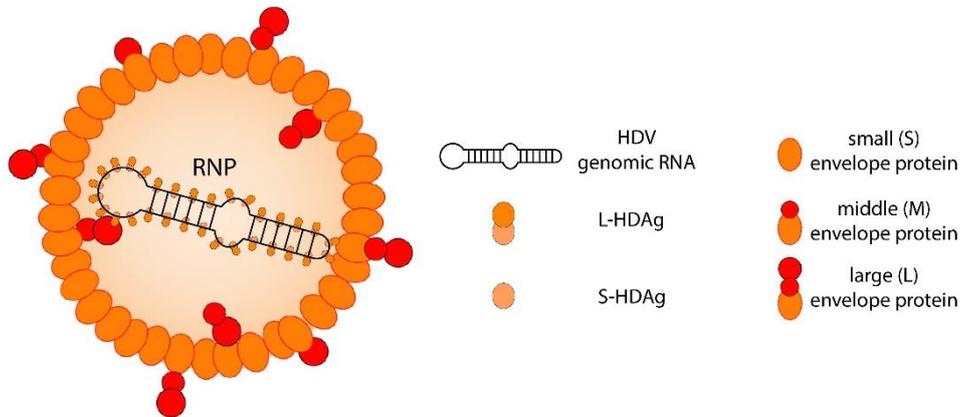


Abbildung 3: Die Struktur des HDV.

Die Hülle des HDV besteht aus einer Lipidmembran in welche die drei transmembranen von HBV stammenden S-, M- und L-Hüllproteine (engl. *small (S)*, *middle(M)* and *large (L) envelope proteins*) eingebettet sind. Sie umgibt das sogenannte Ribonucleoprotein (RNP), das aus dem stabähnlichen HDV RNA Genom (engl. *HDV genomic RNA*) und den beiden Isoformen des Hepatitis-Delta-Antigens (HDAg), dem kleinen S-HDAg (engl. *small, S*) und dem großen L-HDAg (engl. *large, L*), besteht.

1.2.2 Die HDV Genomorganisation und die Genom-Editierung durch ADAR1

Das Genom des HDV ist eine einzelsträngige, zirkuläre RNA mit negativer Polarität und einer Länge von etwa 1680 Nukleotiden. Aufgrund der ausgeprägten Basenkomplementarität innerhalb der RNA (ca. 74%) erscheint das Genom als doppelsträngige stabähnliche Struktur, vergleichbar mit der Erscheinung von Pflanzen-infizierenden Viroiden (Radjef, et al., 2004) (Wang, et al., 1986). Zusätzlich zum Genom, werden während der nach dem Prinzip des doppelten „Rolling-Circle-Mechanismus“ ablaufenden HDV Replikation im Nukleus noch zwei weitere RNAs, nämlich das Anti-Genom als das exakte Komplement des Genoms und die virale mRNA, gebildet (Modahl, et al., 1998). Obwohl im Genom mehrere offene Leserahmen vorzufinden sind, wird nur einer davon aktiv transkribiert, was zur Expression beider Isoformen des HDAg, S- und L-HDAg, führt (Gudima, et al., 2002). Da ein Stopcodon innerhalb des Genoms die anfängliche Translation von L-HDAg unterbindet, wird zu Beginn ausschließlich S-HDAg gebildet. Um die Generierung der großen Isoform des HDAg zu ermöglichen, wird das Stopcodon (UAG) innerhalb des Anti-Genoms, das während der Genomreplikation gebildet wird, durch das zelluläre Enzym ADAR1 (engl. *Adenosine Deaminase Acting on RNA* 1) in ein Tryptophan-Codon (UGG) umgewandelt. ADAR1 desaminiert Adenosin zu Inosin (UAG → UIG), welches während des nächsten Replikationszyklus von der Polymerase als Guanin erkannt wird. Anstelle des ursprünglichen AUC Basentriplets, führt dieser Prozess zur Bildung eines ACC Triplets innerhalb des Genoms und dementsprechend zu einem

Tryptophan codierenden UGG Codon in der mRNA. Folglich wird der ORF bis zum Erreichen des nächsten Stopcodons verlängert, was in der Translation von 19 zusätzlichen Aminosäuren mündet und somit zur Bildung des L-HDAg führt (Polson, et al., 1996) (Wong, et al., 2002). Dieser Vorgang wird schematisch in Abbildung 4 zusammengefasst.

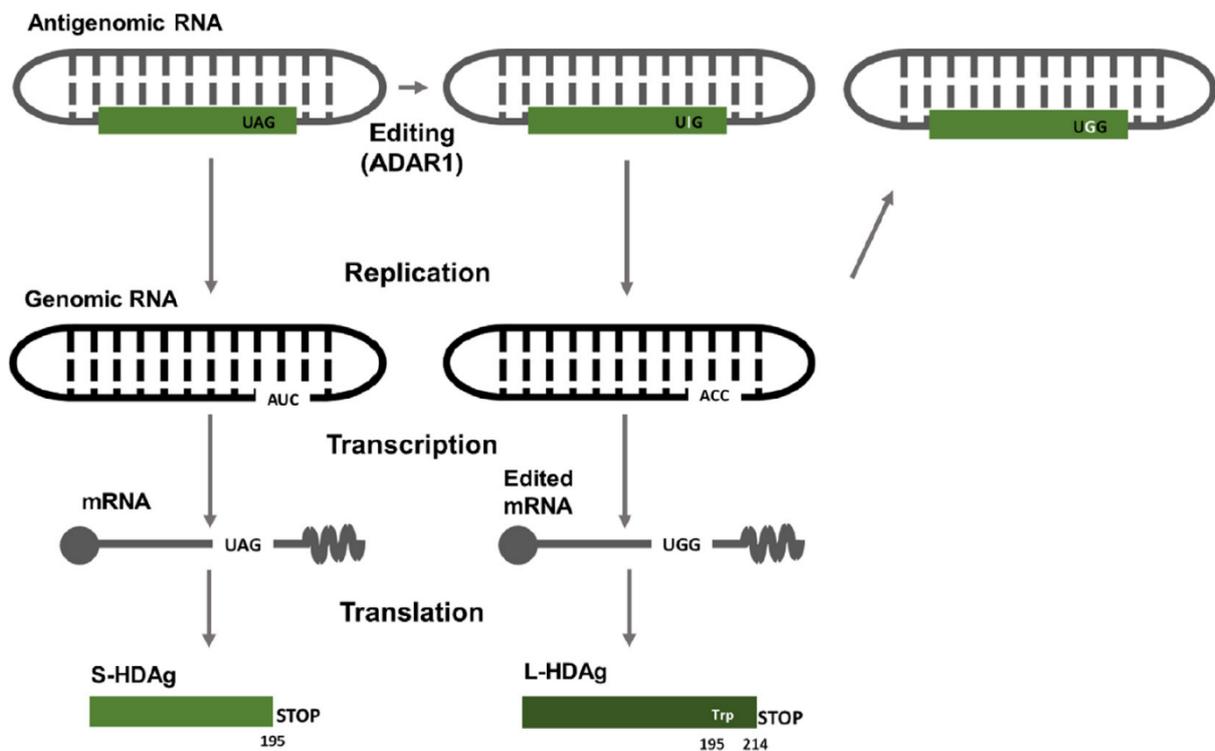


Abbildung 4: Die ADAR1 bedingte Editierung des Anti-Genoms und die Translation von S- und L-HDAg.

Beide HDAg Isoformen werden von einem einzigen offenen Leserahmen innerhalb des HDV Anti-Genoms exprimiert. Durch die Interaktion von ADAR1 (engl. *Adenosine Deaminase Acting on RNA 1*) mit dem Anti-Genom wird die Desaminierung des Adenosins zu einem Inosin innerhalb des Stopcodons (UAG → UIG), welches ansonsten zum Translationsstop und Bildung des S-HDAg führen würde, katalysiert. Im Verlauf des nächsten Replikationszyklus wird das Inosin des UIG-Basentriplets als Guanin erkannt, was zur Umwandlung des Stopcodons in ein Tryptophan-Codon (UIG → UGG) führt. Dadurch kann die Translation bis zum nächsten Stopcodon fortgesetzt werden, was das Ablesen 19 weiterer C-terminaler Aminosäuren ermöglicht und damit zur Bildung von L-HDAg führt (Mentha, et al., 2019).

1.2.3 Der HDV Replikationszyklus

Der HDV Replikationszyklus ist in Abbildung 5 schaubildlich zusammengefasst. Da HDV von den HBV-Hüllproteinen abhängig ist, nutzt es analog zu HBV dieselben zellulären Eintrittsmechanismen, was zu starkem Lebertropismus sowie ausgeprägter Wirtsspezifität von HDV so wie bei HBV führt (Li, et al., 2016). Allerdings beruht der Lebertropismus ausschließlich auf der von HBV stammenden Umhüllung, da die HDV Genomreplikation bei künstlicher Einbringung in eine Zelle in einer Vielzahl weiterer Zelltypen stattfinden kann (Taylor, 2009) (Perez-Vargas, et al., 2019). Wie bereits für HBV beschrieben, findet als erster Schritt des

HDV Replikationszyklus eine unspezifische Bindung der Virionen an HSPGs auf der Oberfläche von Hepatozyten statt. Anschließend erfolgt die spezifische Interaktion zwischen der myristoylierten PreS1-Domäne des L-Proteins und dem NTCP (Yan, et al., 2012). Im Vergleich dazu sind die nachfolgenden Schritte, wie die Freisetzung des HDV RNP ins Cytoplasma und dessen Aufnahme in den Nucleus, weniger gut charakterisiert. Es wird jedoch vermutet, dass das Genom von HDAg geführt und aufgrund seines Kernlokalisierungssignals mit Hilfe der zellulären Kernimport-Maschinerie in den Zellkern geschleust wird. (Chou, et al., 1998).

Da das HDV Genom für keine eigene RNA-abhängige RNA-Polymerase codiert und dementsprechend von den Polymerasen der Wirtszelle abhängig ist, findet die Replikation der HDV RNA ausschließlich im Nucleus statt. Hierbei ist die RNA-Polymerase I für die Transkription des Genoms in das Anti-Genom im Nucleolus verantwortlich. Die RNA-Polymerase II wird einerseits für die Genomreplikation von Anti-Genom zu Genom und andererseits für die Transkription der mRNA im Nucleoplasma benötigt. (Chen, et al., 1986) (Huang, et al., 2008). Während des HDV Replikationszyklus werden dadurch in jeder infizierten Zelle etwa 3×10^5 Genome, 6×10^4 Anti-Genome und 6×10^2 mRNAs synthetisiert (Taylor, 2015). Dabei werden sowohl das HDV Genom als auch das Anti-Genom ohne DNA-Intermediate mittels doppeltem „Rolling-Circle-Mechanismus“ gebildet. Während dieses Prozesses werden RNA-Oligomere multipler Genomlängen in sowohl genomischer als auch anti-genomischer Polarität generiert und anschließend durch die intrinsische Ribozymaktivität von Genom und Anti-Genom durch Selbstspaltung in Monomere geschnitten (Modahl, et al., 1998) (Macnaughton, et al., 1993). Anschließend werden die Monomere beider Polaritäten, vermutlich entweder durch eine selbstligierende Funktion des Ribozyms oder mit Hilfe zellulärer Ligasen, ligiert um schließlich zirkuläre Genome und Anti-Genome zu bilden (Reid, et al., 2000) (Sharmeen, et al., 1989). Aufgrund der negativen Polarität des Genoms und der strikten Lokalisation des Anti-Genoms im Zellkern, ist die Transkription der etwa 800 Nukleotide langen HDV mRNA, welche wie zelleigene mRNA am 5'-Ende mit einer „Cap“-Struktur (engl. *cap* „Kappe“) modifiziert und am 3'-Ende polyadenyliert wird, für das Virus essentiell. Die virale mRNA wird folglich aus dem Zellkern exportiert und, abhängig von der vorangegangenen Editierung durch ADAR1, entweder in S-HDAg oder L-HDAg translatiert (Hsieh, et al., 1990).

Die beiden HDAg Isoformen teilen sich mehrere funktionelle Domänen, wie die „Coiled-coil“ (bestehend aus zwei Einzelhelices) Domäne die Protein-Protein Interaktionen erleichtert (Rozzelle, et al., 1995), sowie ein zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal welches den HDAg Proteinen den Eintritt in den Nucleus ermöglicht (Xia, et al., 1992). Ihre spezifischen Funktionen sind hauptsächlich auf ihre jeweiligen posttranslationalen Modifikationen zurückzuführen. Im Falle des S-HDAg wurde gezeigt, dass erst die Phosphorylierung eines

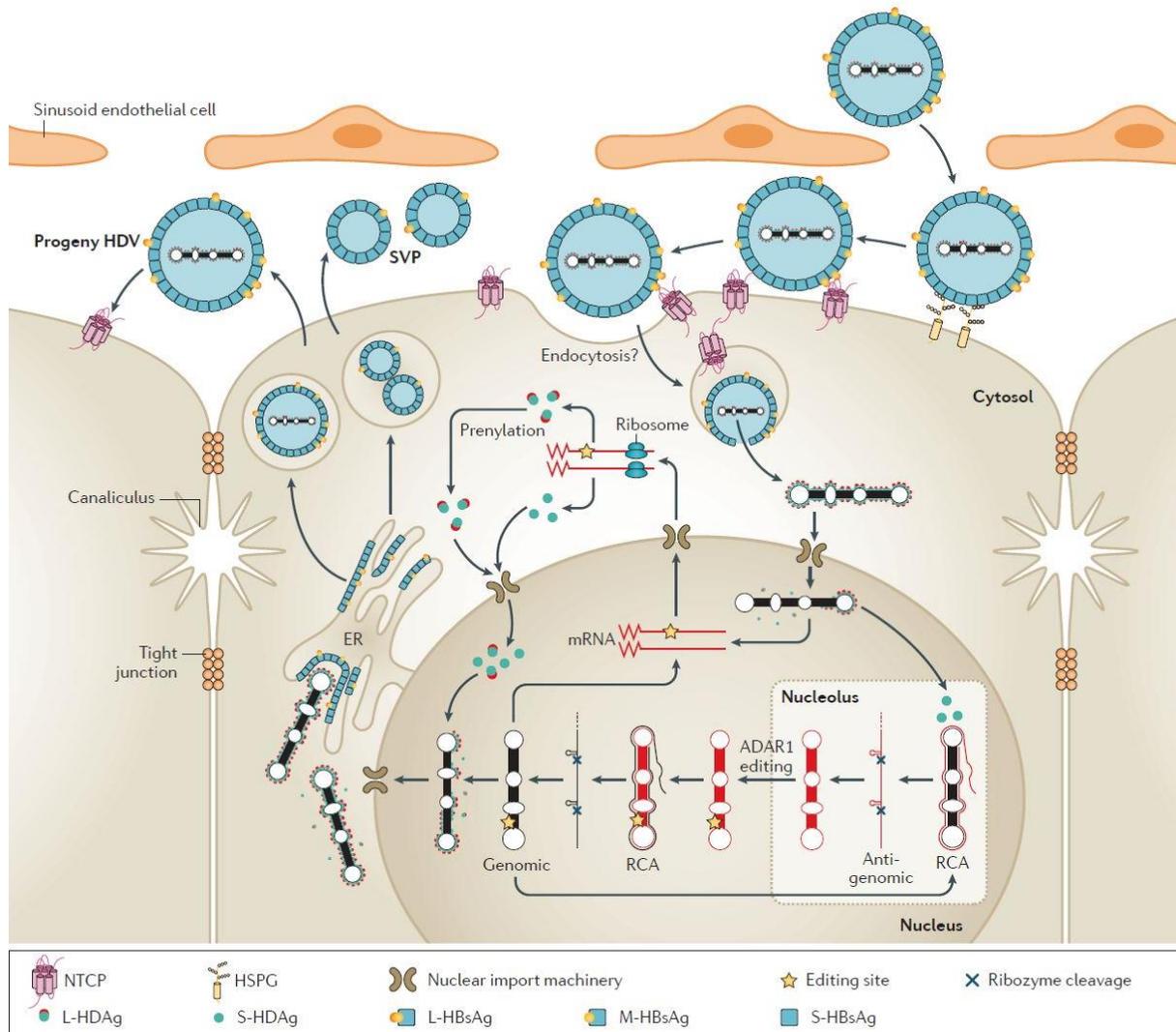


Abbildung 5: Der Replikationszyklus von HDV.

HDV lagert sich zunächst an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) an, bindet dann an NTCP und entlässt sein Ribonucleoprotein (RNP) ins Cytosol, wo es anschließend zum Zellkern geschleust und durch die zelluläre Kernimport-Maschinerie (engl. *nuclear import machinery*) in den Nucleolus aufgenommen wird. Dort dient die genomische (engl. *genomic*) RNA als Matrize für die erste „Rolling-Circle“-Amplifikation (RCA), was zur Produktion anti-genomischer (engl. *anti-genomic*) RNA Oligomere führt, die durch intrinsische Ribozymaktivität in Monomere gespalten (engl. *ribozyme cleavage*) werden. Analog dazu durchlaufen die Anti-Genome eine zweite „Rolling-Circle“-Amplifikation, um neue Genome bilden zu können. Die Editierung der Anti-Genome durch ADAR1 (engl. *ADAR1 editing*) führt zur Transkription von heterogenen viralen mRNAs, welche in S-HDAg bzw. L-HDAg translatiert werden. Beide Isoformen werden wieder in den Nucleolus transportiert, um dort die Virusreplikation zu regulieren bzw. zusammen mit dem Genom neue RNPs zu bilden. Durch die Hilfe der HBV Hüllproteine (S-, M- und L-HBsAg) werden die RNPs umhüllt um neue HDV Abkömmlinge (engl. *progeny*) zu formen, welche wahrscheinlich über den Golgi-Apparat die Zelle verlassen (Lempp, et al., 2016).

Serylrests an Position 177 die Interaktion zwischen S-HDAg und der zellulären RNA-Polymerase II ermöglicht und somit essentiell für die Genomreplikation ist (Hong, et al., 2010). Innerhalb seiner C-terminalen Verlängerung gegenüber S-HDAg, besitzt L-HDAg zum einen ein exklusives Kernexportsignal (Lee, et al., 2001) und zum anderen eine prenylierbare Stelle welche die Farnesylierung des Proteins ermöglicht. Durch die Farnesylierung des L-HDAg wird ein konformationelles Epitop verdeckt, welches in S-HDAg frei zugänglich und essentiell für

die Transaktivierung der HDV RNA Replikation ist. Somit wirkt die farnesylierte Form des L-HDAg inhibierend auf die virale Replikation (Hwang, et al., 1994). Des Weiteren ist die Farnesylierung des L-HDAg von entscheidender Bedeutung für die Assemblierung der Virionen, da sie die Interaktion des viralen Genoms mit einer tryptophanreichen Region innerhalb der cytosolischen Schleife des S-Proteins vermittelt (Sureau, 2006). Dabei können aufgrund gemeinsamer, argininreicher Struktur motive innerhalb von S- und L-HDAg beide Isoformen RNA binden und somit den RNP Komplex bilden (Rizzetto, 2009).

Der Export des RNP in das Cytoplasma, wahrscheinlich durch NXF1 (engl. *Nuclear RNA export factor 1*) und durch den zellulären Exportfaktor TAP/Aly vermittelt, ermöglicht die Assemblierung neuer HDV Virionen (Huang, et al., 2016). Hierbei kann das HDV-RNP sowohl mit dem S- als auch dem L-Oberflächenprotein effizient assembliert werden, was im Falle einer künstlich herbeigeführten Umhüllung des RNPs ausschließlich mit S-Protein zur Bildung nicht infektiöser Virionen führt (Sureau, et al., 1993). Im Kontext der natürlicherweise auftretenden HBV-HDV Koinfektion, translatieren infizierte Hepatozyten ausgehend von der HBV cccDNA alle HBV-Hüllproteine im Überschuss, weshalb hauptsächlich infektiöse HDV Virionen gebildet werden. Aufgrund der ähnlichen Hüllzusammensetzung von sphärischen subviralen HBV Partikeln und HDV Virionen scheint es wahrscheinlich, dass das HDV die Zelle mit Hilfe des Golgi-Apparats verlässt und nicht wie HBV über multivesikuläre Körperchen freigesetzt wird (Bonino, et al., 1986) (Mentha, et al., 2019).

1.2.4 Therapie und Prävention der Hepatitis B und D

Da HDV als Satellitenvirus des HBV dessen Hüllproteine für die Assemblierung neuer Virionen und deren Transmission benötigt, schützt die prophylaktische HBV-Impfung auch vor einer HDV Infektion, da die vorwiegend verwendeten Impfstoffe das rekombinant hergestellte HBV-S-Protein enthalten (Shouval, et al., 1994). Trotz der Verfügbarkeit dieser effektiven Vakzine sind weltweit geschätzte 296 Millionen Menschen chronisch mit HBV infiziert, wovon ca. 5% zusätzlich mit HDV koinfiziert sind, was eine antivirale Therapie notwendig macht (WHO, 2021). Bei chronischen HBV und HDV Infektionen werden momentan hauptsächlich pegyliertes IFN- α und Nukleosid- bzw. Nukleotidanaloga (z.B. Entecavir, Lamivudin), entweder einzeln oder in Kombination, verabreicht. Dennoch können diese Behandlungen die infizierten Patienten nicht vor der Ausbildung von Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom beschützen (Terrault, et al., 2018) (Mentha, et al., 2019).

Aufgrund dieser unzureichenden Behandlungsmöglichkeiten sind neue antivirale Therapien in klinischer Entwicklung. Dazu gehören unter anderem die Verwendung des besser verträglichen Typ III Interferons IFN- λ anstelle von IFN- α (Chan, et al., 2016), von Kapsid-Assembly-Modifikatoren (Nijampatnam, et al., 2019), von small interfering (si)RNAs (Yuen, et al., 2020) sowie von Nukleinsäure-Polymeren (engl. *nucleic acid polymers*, NAPs) welche die

Freisetzung von HBV-Hüllproteinen hemmen (Blanchet, et al., 2019). Eine weitere antivirale Strategie stellt die Hemmung des Eintritts von HBV und HDV in Hepatozyten dar, was durch die Applikation von Myrcludex B, ein vom N-Terminus des HBV-L-Proteins abgeleitetes Peptid, das den NTCP-Rezeptor blockiert, verfolgt wird (Bogomolov, et al., 2016). Myrcludex B, welches mittlerweile als Bulevirtide bezeichnet wird, wurde von der Europäischen Arzneimittelagentur im Jahr 2020 zur Behandlung der chronischen Hepatitis D bei Erwachsenen zugelassen (Urban, et al., 2021). Darüber hinaus sind auch Behandlungen in Entwicklung, die spezifisch HDV inhibieren sollen. So führt die Therapie mit Lonafarnib, einem Inhibitor der Farnesyltransferase der die Assemblierung neuer Virionen verhindert, zu deutlich reduzierten HDV RNA Mengen im Serum chronisch HDV infizierter Patienten (Koh, et al., 2015). Die genannten neuen antiviralen Medikamente werden dabei entweder allein oder in Kombination mit Interferon verabreicht (Koh, et al., 2019).

Als ultimatives Angriffsziel für eine antivirale HBV bzw. HDV Therapie wird die cccDNA von HBV angesehen, da diese durch bisherige Therapien nur unzureichend angegriffen wird und bei Behandlungsunterbrechung zu einer Reaktivierung der HBV Transkription und Replikation führt (Lucifora, et al., 2016) (Revill, et al., 2016). Hierbei könnte die T-Zell Therapie eine wichtige Rolle spielen, da sie eine spezifische Eliminierung infizierter Hepatozyten ermöglicht. Es wurde gezeigt, dass T-Zellen, welche mit einem HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptor (engl. *T cell receptor, TCR*) ausgestattet werden, das Potential einer Klärung der HBV Infektion haben (Wisskirchen, et al., 2019). Außerdem wird durch die Applikation von T-Zellen, die einen für die HBV- Hüllproteine spezifischen Chimären Antigen-Rezeptor (engl. *HBV S protein specific chimeric antigen receptor, S-CAR*) exprimieren, ein signifikanter antiviraler Effekt in HBV-transgenen Mäusen erzielt (Krebs, et al., 2013) (Festag, et al., 2019).

Ein weiteres und vielversprechendes Therapiekonzept ist die therapeutische Impfung. Diese hat das Ziel die HBV-spezifische Immuntoleranz zu überwinden und antivirale B- und T-Zell-Antworten wiederherzustellen, um die chronische HBV-Infektion und dadurch auch eine chronische HDV-Infektion zu eliminieren (Kosinska, et al., 2017). Eine mögliche Impfstrategie ist das mehrmalige Spritzen von HBV-Proteinen, um spezifische Helfer-T-Zellen und B-Zellen zu aktivieren. Dies konnte in mehreren präklinischen Experimenten in HBV-transgenen Mäusen bzw. Mäusen, welchen mittels Adeno-assoziierten Virus (AAV) ein HBV-Genom in Überlänge übertragen wurde, erfolgreich gezeigt werden. So führte die Impfung mit HBV-Proteinen, gefolgt von einer Boost-Impfung mit einem Modified-Vaccinia-Ankara-Virus (MVA) Vektor zur Überwindung der Immuntoleranz, indem HBV-spezifische B- und T-Zell-Reaktionen induziert wurden (Backes, et al., 2016) (Michler, et al., 2020).

1.3 Die Erkennung viraler Infektionen durch das angeborene Immunsystem

Als erste Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene, ist die Interferon (IFN) vermittelte angeborene Immunantwort ein elementarer Bestandteil des Immunsystems. Dabei erfolgt die Erkennung pathogener Erreger durch sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*, PRRs), welche konservierte Strukturen der Krankheitserreger detektieren können und dadurch die Immunantwort in der infizierten Zelle induzieren, indem sie die Produktion von Interferonen auslösen. Die initial gebildeten Typ I Interferone binden wiederum an spezielle, sich auf der Zelloberfläche befindende Rezeptoren, was zur Auslösung einer Signalkaskade über den JAK-STAT Signalweg (engl. *janus kinase*, JAK; *signal transducer and activator of transcription*, STAT pathway) führt. Die IFN-Signaltransduktion hat weitreichende Folgen für die transkriptionelle Regulation einer Vielzahl von IFN regulierter Gene (IRGs), welche im Falle einer gesteigerten Expression auch als IFN stimulierte Gene (ISGs) bezeichnet werden. Dieses Zusammenspiel aus Erkennung des Eindringlings und veränderter transkriptioneller Regulation ermöglicht die Etablierung eines ausgeprägten antiviralen Verteidigungszustands gegenüber vielen RNA- und DNA-Viren innerhalb infizierter Zellen (Schneider, et al., 2014) (Raftery, et al., 2017).

Die PRRs zur Erkennung viraler Infektionen sind bereits vor Eindringen der Viren in die Zelle vorhanden, ihre Genexpression wird allerdings als Teil einer positiven Rückkoppelung durch Interferone gesteigert, weshalb sie auch den ISGs zugeordnet werden können. Es gibt eine Vielzahl an unterschiedlichen PRRs und jeder davon ist auf die Erkennung eines bestimmten Pathogen-assoziierten molekularen Musters (engl. *Pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) spezialisiert: Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I) -ähnliche Rezeptoren (RLRs) erkennen doppelsträngige RNA und 5' Triphosphat-RNA (nur RIG-I) im Cytoplasma (Hornung, et al., 2006), (Pichlmair, et al., 2006), wohingegen AIM2-ähnliche Rezeptoren (ALRs) cytosolische DNA detektieren (Hornung, et al., 2009). Die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) 2 und 4 sind Transmembranproteine die virale Strukturproteine und insbesondere bakterielle Lipopolysaccharide auf der Zelloberfläche erkennen können. TLRs 3, 7 und 9 sind ebenfalls Transmembranproteine, allerdings sind sie in Endosomen lokalisiert und erkennen, ähnlich zu den RLRs, virale Nukleinsäuren (Kawai, et al., 2011). Virale RNA kann im Zytoplasma außerdem durch das Zusammenspiel von Oligoadenylatsynthetase (OAS) mit der latenten Ribonuclease L (RNase L) (Chakrabarti, et al., 2011) (Malathi, et al., 2010), sowie indirekt durch die Proteinkinase R (PKR) erkannt werden (Munir, et al., 2013). Als jüngstes Mitglied der PRR-Familie wurde die cyclische GMP-AMP-Synthase (cGAS) beschrieben, welche cytosolische DNA detektieren kann (Sun, et al., 2013).

Nachdem ein PRR durch sein spezifisches PAMP aktiviert wurde, erfolgt eine Signaltransduktion innerhalb der Zelle, welche schlussendlich zur Produktion von Interferonen und zur Expression von ISGs führt, was in Abbildung 6 zusammengefasst wird. So findet für

cGAS und die ALRs eine Signalübermittlung über STING (engl. *stimulator of interferon genes*) statt, wohingegen diese bei den RLRs RIG-I und MDA5 über MAVS (engl. *mitochondrial antiviral-signaling protein*) erfolgt. Durch die Aktivierung von STING bzw. MAVS werden die Interferon regulatorischen Faktoren (IRFs) 3 und 7 phosphoryliert, dimerisiert und in den Nucleus transloziert. Außerdem können STING und MAVS, sowie PKR, den NF-κB-Signalweg aktivieren. Im Zellkern binden IRF3, IRF7 und NF-κB unter anderem innerhalb der Promotorbereiche von IFN-β, IRFs, ISGs und PRRs, steigern deren Expression und verstärken somit die Erkennung des eingedrungenen Pathogens und führen zu einer frühen angeborenen Immunantwort. Zusätzlich induziert das gebildete Interferon via JAK-STAT Signalweg die Genexpression einer Vielzahl an ISGs, was die Immunantwort und damit die Ausbildung eines antiviralen Zustands weiter fördert. ISGs werden hierbei in antivirale Effektoren, wie beispielsweise Mx1 und Viperin, und positive bzw. negative Regulatoren der IFN Signalgebung unterteilt. Dabei ist eines der besonderen Merkmale der IFN-Signaltransduktion die Geschwindigkeit mit welcher sie auftritt, da die dafür notwendigen Komponenten bereits vor einer Infektion vorliegen (Schneider, et al., 2014) (Wu, et al., 2014).

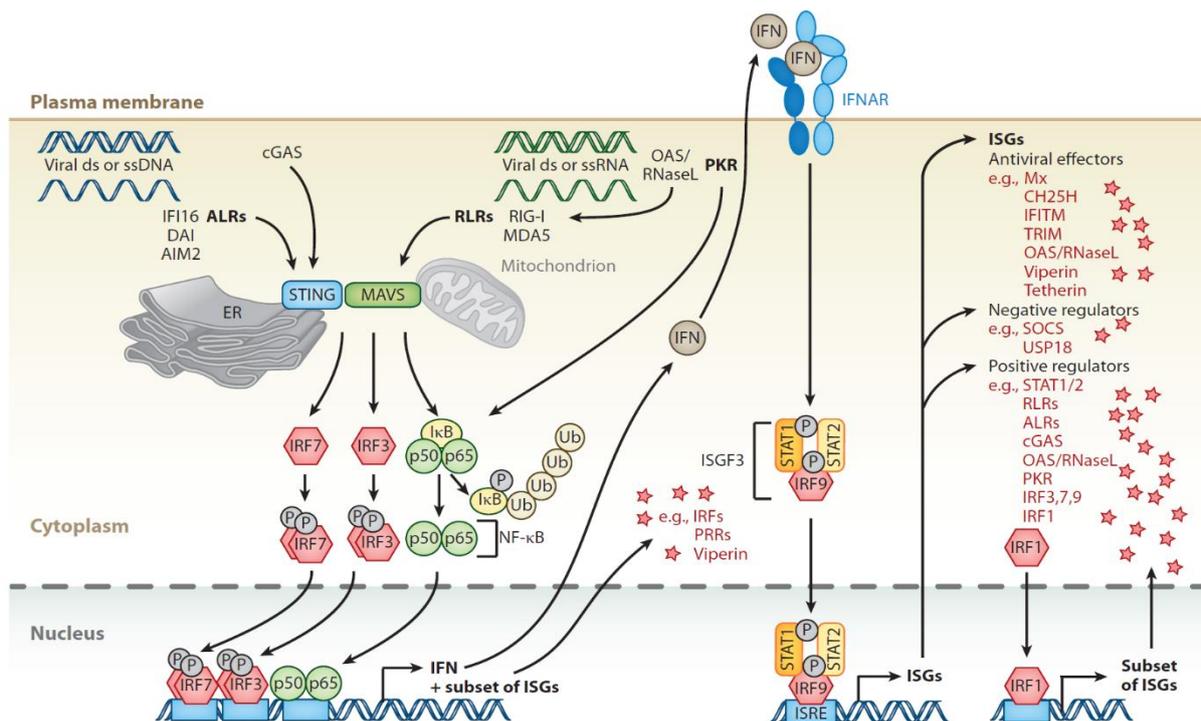


Abbildung 6: Erkennung viraler Nucleinsäuren im Zytoplasma und Aktivierung von ISGs.

Virale einzelsträngige (engl. *single-stranded*, ss) und doppelsträngige (engl. *double-stranded*, ds) DNA und RNA werden durch ihre entsprechenden Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*, PRRs) im Cytoplasma (engl. *cytoplasm*) erkannt. Die Signalweiterleitung erfolgt über STING (engl. *stimulator of interferon genes*) bzw. MAVS (engl. *mitochondrial antiviral-signaling protein*), deren Aktivierung zu einer anschließenden Phosphorylierung und Dimerisierung von Interferon regulatorischen Faktoren (IRFs) 3 und 7 führt bzw. den NF-κB-Signalweg stimuliert. Die anschließende Translokation der phosphorylierten Homodimere von IRF3/7 bzw. von NF-κB in den Nucleus ermöglicht ihre Bindung an spezifische Promotoren, was eine Expression von Interferonen und einem Teil (engl. *subset*) an ISGs auslöst. Um die Immunantwort weiter zu verstärken, induziert das gebildete Interferon via JAK-STAT Signalweg die Genexpression weiterer ISGs, welche in antivirale Effektoren (engl. *antiviral effectors*) und positive bzw. negative Regulatoren (engl. *positive/negative regulators*) der Interferon-Signaltransduktion klassifiziert werden (Schneider, et al., 2014).

1.3.1 Typ I Interferone und der JAK-STAT Signalweg

Interferone sind Proteine, welche nach Erkennung eines Pathogens durch die Zelle gebildet und sekretiert werden. Die Einteilung der Interferone erfolgt in drei Hauptgruppen (Typ I bis III), wobei die Mitglieder der Typ I Interferone, zu denen IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , und IFN- ω gehören, die größte Gruppe darstellen und über den heterodimeren Rezeptorkomplex, bestehend aus IFN- α -Rezeptor 1 (IFNAR1) und IFNAR2, wirken (Schneider, et al., 2014). Sie sind von besonderer Bedeutung für die angeborene Immunantwort, da sie nach PRR Aktivierung von nahezu jeder Zelle des Körpers produziert werden können (Trinchieri, 2010). Die verschiedenen Typ I Interferone unterscheiden sich durch ihre alternierende Expression in verschiedenen Geweben sowie der Stärke ihrer Bindeaffinität an IFNAR1/2 (Pestka, et al., 2004). Bei Bindung der Typ I Interferone an das IFNAR1/2 Heterodimer, welches permanent mit Tyrosinkinase 2 (TYK2) und Januskinase 1 (JAK1) assoziiert ist, werden zunächst TYK2 und JAK1, als auch anschließend der Rezeptorkomplex intrazellulär an konservierten Tyrosin-Resten phosphoryliert. Dies führt zur Rekrutierung und Phosphorylierung von STAT1 (engl. *signal transducer and activator of transcription 1*) und STAT2, welche ein Heterodimer formen und dann zusammen mit IRF9 eine als ISGF3 (engl. *IFN-stimulated gene factor 3*) bezeichneten Komplex bilden. Durch die Translokation von ISGF3 in den Nucleus und dessen Bindung an sogenannte ISREs (engl. *IFN-stimulated response elements*) in der Promotorregion von ISGs wird deren Expression induziert und ein antiviraler Zustand innerhalb der Zelle etabliert (Stark, et al., 2012) (Schneider, et al., 2014). Die hier beschriebene Signaltransduktion wird in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

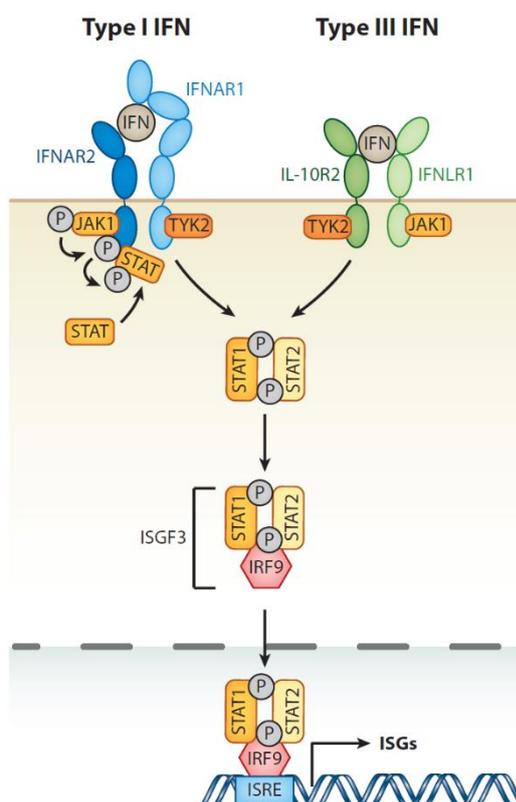


Abbildung 7: Signaltransduktion von Typ I IFN. Typ I Interferone binden an der Zelloberfläche an ihren Rezeptor, das IFNAR1/2 Heterodimer. Die Bindung führt zur intrazellulären Phosphorylierung von Tyrosinkinase 2 (TYK2) und Januskinase 1 (JAK1), sowie IFNAR1/2. Dadurch werden STAT1 (engl. *signal transducer and activator of transcription 1*) und STAT2 rekrutiert, phosphoryliert und zur Bildung des ISGF3 (engl. *IFN-stimulated response elements*) Komplexes zusammen mit dem Interferon regulatorischen Faktor 9 (IRF9) angeregt. Im Nucleus wirkt ISGF3 durch Bindung an ISREs (engl. *IFN-stimulated response elements*) stimulierend auf die Expression von ISGs. Eine sehr ähnliche Signaltransduktion findet auch bei Typ III Interferonen statt, welche jedoch zu Beginn an einen Rezeptorkomplex binden, welcher sich aus Interleukin-10 Rezeptor 2 (IL-10R2) und Interferon-Lambda Rezeptor 1 (IFNLR1) zusammensetzt (Schneider, et al., 2014).

1.3.2 RIG-I-ähnliche Rezeptoren

Die Infektion durch RNA Viren, wie beispielsweise Influenza A, führt zu einer starken Produktion von Typ I Interferonen. Als PAMP, welches erkannt und für die Typ-I IFN Antwort verantwortlich ist, fungiert die virale RNA, welche in das Cytoplasma eingeschleust wurde und bei der viralen Replikation zusätzlich angereichert wird. Hierbei nehmen die RIG-I-ähnlichen Rezeptoren (RLRs) bei der Erkennung viraler Genome, Transkripte und Replikationsprodukte eine entscheidende Rolle ein (Wu, et al., 2014) (Rehwinkel, et al., 2010).

Der Prototyp der Familie der RLRs, die RNA Helikase RIG-I (engl. *retinoic acid inducible gene-1*) sowie MDA5 (engl. *melanoma differentiation associated gene 5*) wurden im Jahr 2004 als Sensoren cytosolischer RNA identifiziert (Yoneyama, et al., 2004). Als weiteres Mitglied der RLRs wurde LGP2 (engl. *laboratory of genetics and physiology 2*) beschrieben. RIG-I, MDA5 und LGP2 gehen auf ein gemeinsames Ursprungsgen zurück und sind daher in Vertebraten stark konserviert (Zou, et al., 2009). Die drei RLRs weisen eine ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit auf (Abbildung 8): So besitzen sie eine zentrale DExD/H Box RNA-Helikase-Domäne, bestehend aus den beiden Helikasedomänen Hel-1 und Hel-2, zur Bindung und Entwindung von RNA und einer C-terminalen Domäne (CTD), welche im Zusammenspiel die RNA Erkennung ermöglichen. Im Gegensatz zu LGP2 besitzen RIG-I und MDA5 noch zwei CARD (engl. *caspase activation and recruitment domains*) Domänen, welche für die weitere Signaltransduktion über Adapter-Proteine notwendig sind (Goubau, et al., 2013) (Wu, et al., 2014).

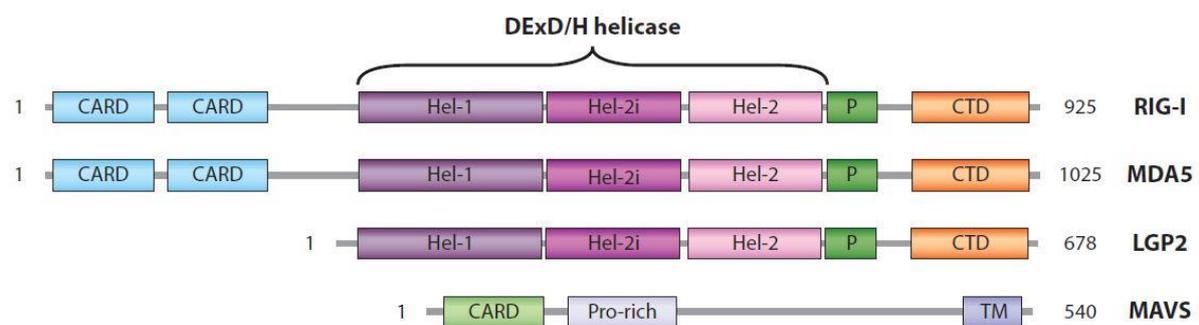


Abbildung 8: Schematische Darstellung der strukturellen Organisation der RLRs und MAVS.

Alle drei RLRs sind aus einer C-terminalen Domäne (CTD) und einer zentralen DExD/H Box RNA-Helikase-Domäne aufgebaut. Nur RIG-I und MDA5 besitzen zusätzlich noch zwei N-terminale CARD (engl. *caspase activation and recruitment domains*) Domänen. MAVS (engl. *mitochondrial antiviral-signaling protein*) dient mittels CARD-CARD-Interaktion als Adapter-Protein für RIG-I und MDA5 (Wu, et al., 2014).

Bei Stimulation durch ihr entsprechendes PAMP werden RIG-I und MDA5 aktiviert und lagern sich mit MAVS (engl. *mitochondrial antiviral-signaling protein*) per CARD-CARD Interaktion zu Homooligomeren zusammen. Auf Grund der fehlenden CARD Domäne, kommt es bei LGP2 zu keiner Interaktion mit MAVS, das auf der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert ist

(Seth, et al., 2005) (Komuro, et al., 2006). Die Interaktion zwischen RLR und MAVS führt zu dessen massiver Aggregation in der mitochondrialen Membran (Hou, et al., 2011) was neben der Rekrutierung von E3-Ubiquitinligasen wiederum zur Aktivierung von IKK- (IkB Kinase) und TBK1- (engl. *TANK-Binding Kinase 1*) Komplexen führt (Liu, et al., 2013). An den MAVS-Aggregaten werden zum einen die Dimere bildenden IRF3/IRF7 durch TBK-1 phosphoryliert, was die Expression von Typ I Interferonen induziert (Paz, et al., 2006). Zum anderen findet eine Phosphorylierung des NF- κ B-Inhibitors I κ B α durch den-IKK Komplex statt, wodurch der NF- κ B Signalweg aktiviert wird und es zusätzlich zu einer Transkription proinflammatorischer Zytokine kommt (Ramos, et al., 2011).

Ein elementarer Unterschied zwischen RIG-I und MDA5 besteht in ihrer jeweiligen Bindung der zu erkennenden doppelsträngigen RNA (dsRNA) durch die CTDs. In inaktivem Zustand liegt RIG-I in offener Konformation vor und die CTD ist frei zugänglich. Bei Bindung des Liganden an die CTD erfolgt ein Wechsel in eine geschlossene Konformation in der die dsRNA durch die CTD in unmittelbare Nähe zur Helikase gebracht und von der sie anschließend gebunden wird. Durch diesen Vorgang werden die CARD-Domänen freigelegt und ihre Interaktion mit den CARD-Domänen von MAVS ermöglicht (Kolakofsky, et al., 2012). Hierbei erfolgt die Initiale Bindung durch die CTD am RNA Terminus. Im Gegensatz dazu bindet die CTD von MDA5 nicht an das Ende, sondern innerhalb der dsRNA. Die CTDs der MDA5 Moleküle interagieren hierbei mit der charakteristischen Duplexstruktur innerhalb der dsRNA (Wu, et al., 2013). Dadurch kommt es zur Anlagerung des MDA5 als filamentöses Oligomer entlang der RNA und schließlich zur Freilegung der CARD-Domänen, um die Interaktion mit MAVS zu ermöglichen. (Peisley, et al., 2011).

1.3.2.1 RIG-I

Die RNA Helikase RIG-I ist ein Protein mit einer Länge von 925 Aminosäuren und einer Masse von 102 kDa (Ranji, et al., 2010). Wie experimentell gezeigt wurde, erkennt es synthetische Inosin-Cytosin Polynucleotid (Poly I:C) dsRNA-Fragmente von eher kurzer Länge (ca. 300 bp) (Kato, et al., 2008). Dabei wurde zunächst angenommen, dass für die RIG-I basierte Erkennung die Präsenz einer Triphosphat-Gruppe am 5'-Ende der RNA essenziell sei, welche bei den mRNAs der Wirtszelle fehlt und somit die Unterscheidung zwischen körpereigen und körperfremd ermöglicht (Hornung, et al., 2006), (Pichlmair, et al., 2006). In einer späteren Studie wurde allerdings gezeigt, dass bereits eine Diphosphat-Gruppe am 5'-Ende der RNA für eine RIG-I basierte Erkennung ausreichend ist (Goubau, et al., 2014). Neben der 5'-Tri- bzw. Diphosphorylierung der RNA scheint des Weiteren auch die RNA-Struktur selbst eine wichtige Rolle für die Detektion durch RIG-I zu spielen. So können einzelsträngige (engl. *single stranded*, ss) 5'Triphosphat Oligoribonukleotide nicht an RIG-I binden und aktivieren, wohingegen deren Synthese zu einem Doppelstrang mit glattem Ende zu einer Aktivierung

und Erkennung führt (Schlee, et al., 2009). Diese synthetisierten Strukturen ähneln den partiell doppelsträngigen Regionen der sogenannten „Panhandle“-Struktur (zu Deutsch „Pfannenstiel“-Struktur) mancher ssRNA Viren. Diese „Panhandle“-Struktur gilt als Grundlage für die Erkennung auch einzelsträngiger RNA Viren durch RIG-I (Weber, et al., 2013). Darüber hinaus scheinen die Degradationsprodukte der RNase L, kurze dsRNA 5'-Hydroxyl (5'-OH) und 3'-Monophosphoryl (3'-p) Stücke, auch als Liganden für RIG-I zu wirken (Malathi, et al., 2007). Zusammengefasst ist RIG-I damit in der Lage, virale Genome, Replikationsintermediate und Transkripte und damit auch DNA-Viren, sowie durch Rnase L generierte dsRNA zu erkennen. In der Literatur beschriebene Viren, welche durch RIG-I detektiert werden umfassen zum einen Viren aus der Familie der *Paramyxoviridae* (z.B. das Sendai- und Newcastle-Disease-Virus), wie auch Viren aus der Familie der *Flaviviridae* (z.B. das Japanische-Enzephalitis-Virus, JEV und Hepatitis-C-Virus, HCV) und Viren aus der *Rhabdoviridae*-Familie (z.B. das Vesikuläre-Stomatitis-Virus, VSV) sowie das Influenzavirus aus der Familie der *Orthomyxoviridae* (Kato, et al., 2006) (Wu, et al., 2014). Als Besonderheit von RIG-I sticht dessen Fähigkeit heraus, auch DNA-Viren zu erkennen, wenn diese RNA basierte Replikationsintermediate bilden. So transkribiert die RNA-Polymerase III cytosolische DNA zu doppelsträngiger 5' Triphosphat RNA, welche dann durch RIG-I detektiert wird. Durch diesen Mechanismus wird das Epstein-Barr-Virus als doppelsträngiges DNA-Virus aus der Familie der *Herpesviridae* indirekt über seine Replikationsintermediate erkannt und die Produktion von Typ I Interferonen ausgelöst (Ablasser, et al., 2009).

1.3.2.2 MDA5

Mit einem Molekulargewicht von 117 kDa und einer Länge von 1035 Aminosäuren ist das MDA5 Protein etwas größer als RIG-I (Ranji, et al., 2010). Genau wie RIG-I lässt sich MDA5 mit dem synthetischen dsRNA Analogon Poly I:C stimulieren, wobei MDA5 insbesondere durch längere dsRNA-Fragmente (> 4 kbp) aktivierbar zu sein scheint (Kato, et al., 2008). In Picornavirus infizierten Zellen ist MDA5 in der Lage die 7,5 kbp lange doppelsträngige Replikationsform zu erkennen und eine starke Typ I Interferonantwort auszulösen (Feng, et al., 2012). Die weiteren nötigen Eigenschaften des MDA5-Liganden sind nicht so klar charakterisiert wie für RIG-I, dabei könnte die Struktur bzw. die Komplexität der RNA sogar entscheidender für die MDA5 Aktivierung sein als deren reine Länge. Es wurde berichtet, dass sich MDA5 durch ein komplexes Netz, das sich aus Einzel- und Doppelstrangbereichen verschiedener RNA-Stränge zusammensetzt, aktivieren lässt (Pichlmair, et al., 2009). Neben den bereits genannten *Picornaviridae* (z.B. Poliovirus und Encephalomyocarditis-Virus, EMCV) wurde während dieser Dissertation auch das HDV als durch MDA5 detektierbar beschrieben (Zhang, et al., 2018) (Altstetter, et al., 2021). Die Erkennung mancher Viren erfolgt im Gegensatz dazu nicht nur durch einen einzigen RLR. Manche Viren werden sowohl von

RIG-I als auch MDA5 erkannt, dazu zählen beispielsweise das Dengue-Virus und das West-Nil-Virus (WNV), beides Vertreter aus der Familie der *Flaviviridae* (Fredericksen, et al., 2008) (Wu, et al., 2014).

1.3.2.3 LGP2

Aufgrund der fehlenden N-terminalen CARD-Domänen, ist LGP2 mit einer Masse von 75 kDa und einer Länge von 678 Aminosäuren der kleinste Vertreter unter den RLRs und kann nicht direkt mit MAVS interagieren (Ranji, et al., 2010). Dementsprechend trägt es trotz dessen Fähigkeit dsRNA zu binden nicht direkt zur Signalgebung bei und auf der Grundlage von LGP2-Überexpressionsstudien zunächst wurde angenommen, dass es sich bei LGP2 um einen inhibitorischen Faktor der RLR Signaltransduktion handelt (Yoneyama, et al., 2005). Im Gegensatz dazu, zeigten anschließende *in vivo* Studien, dass LGP2 die IFN Produktion nach Infektion mit RNA Viren, wie EMCV und VSV fördert, indem es als positiver Regulator von RIG-I und MDA5 auftritt (Satoh, et al., 2010) (Venkataraman, et al., 2007). Insbesondere für die Funktion von MDA5 scheint LGP2 eine unterstützende Rolle zu spielen, da es bei der MDA5-Filamentbildung entlang der RNA assistiert (Bruns, et al., 2014). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sogenannte Pumilio-Proteine wichtig für die RNA Erkennung durch LGP2 sind, indem sie dessen RNA-Bindeaffinität erhöhen und dadurch die RIG-I-Signaltransduktion positiv regulieren (Narita, et al., 2014). Zusammengefasst zeigen LGP2 Knockout Studien somit ein diffuses Bild über die Rolle von LGP2 bei der Detektion von RNA Viren, vermutlich da die ersten Experimente als LGP2-Überexpressionsstudien durchgeführt wurden. Der aktuelle Stand der Forschung deutet aber eher auf eine unterstützende als eine inhibierende Funktion des LGP2 im Kontext der RLR-Signaltransduktion hin (Yoneyama, et al., 2015).

1.3.3 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind Transmembranproteine, die aus Ekto-, Transmembran- und Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Domänen aufgebaut sind und sowohl in Wirbeltieren als auch Insekten evolutionär stark konserviert sind (Bauer, et al., 2008). Die hufeisenförmige Ektodomäne der TLRs, erkennt mit Hilfe leucinreicher Wiederholungseinheiten extrazelluläre PAMPs eindringender Pathogene, was mittels intrazellulärer TIR-Domäne zu einer Signaltransduktion über die Adapterproteine TRIF (engl. *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) und MyD88 (engl. Myeloid differentiation primary response 88) führt (Kawai, et al., 2010). Unter den 10 im Menschen bzw. 13 in der Maus identifizierten TLRs sind fünf, im speziellen TLRs 3, 7, 8, 9 und 13, für die Erkennung von Nukleinsäuren involviert. Diese Rezeptoren überwachen das Lumen von Endosomen auf Nukleinsäuren pathogenen Ursprungs und ihre Aktivierung führt entweder zur Signaltransduktion über TRIF (für TLR3)

bzw. über MyD88 (für TLRs 7, 8, 9 und 13). In beiden Fällen wird der NF- κ B Signalweg aktiviert, wohingegen IRF3 durch TRIF und IRF7 durch MyD88 aktiviert wird (Wu, et al., 2014). Unter den Nukleinsäuren-erkennenden TLRs, sind es im Menschen die TLRs 3, 7 und 8 bei denen RNA als Ligand fungiert. Experimentell wurde durch die Verwendung von poly I:C als synthetischer Ligand gezeigt, dass dsRNA von TLR3 erkannt werden kann (Alexopoulou, et al., 2001). Im Verlaufe einer natürlich auftretenden viralen Infektion erkennt TLR3 dsRNA, die bei der Replikation von ssRNA Viren wie beispielsweise WNV und EMCV produziert wird (Kawai, et al., 2008). Die phylogenetisch zu TLR3 nah verwandete TLRs 7 und 8 teilen sich die Spezifität für ssRNA viralen Ursprungs, hierbei ist die Erkennung allerdings speziesspezifisch. So wird Guanin/Uracil (GU)-reiche ssRNA in Mäusen durch TLR7 erkannt, wohingegen im Menschen TLR8 für die Erkennung verantwortlich ist. TLR8 hat in Mäusen keine Relevanz da der Rezeptor in diesen Tieren nicht funktional ist. Dies deutet auf eine abweichende Funktion der TLRs in verschiedenen Spezies hin (Heil, et al., 2004) (Kawai, et al., 2010).

1.3.4 Das 2'5'Oligoadenylat-Synthetase/RNase L System

Noch deutlich vor der Entdeckung der RLRs, wurde die 2'5'Oligoadenylat-Synthetase (OAS) als dsRNA erkennendes Protein beschrieben, welches eine antivirale Antwort in der Zelle auslösen kann (Minks, et al., 1979). Bei Bindung von dsRNA wird die OAS aktiviert und katalysiert die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) in 2'5'Oligoadenylate, welche wiederum an die latent exprimierte RNase L binden und diese aktivieren. Dadurch werden sowohl virale als auch zelluläre einzelsträngige RNAs degradiert (Silverman, 2007). Die RNase L Abbauprodukte stimulieren dabei den RIG-I und MDA5 Signalweg und induzieren somit die Produktion von Typ I Interferonen (Malathi, et al., 2007) (Malathi, et al., 2010).

Das eigentliche Effektorprotein, die RNase L (L steht für latent) ist eine Ribonuclease mit einer Länge von 741 Aminosäuren und einer Masse von 83,5 kDa, welches ubiquitär exprimiert wird (Zhou, et al., 1993). Sie ist aus drei Hauptdomänen, einer N-terminalen regulatorischen ARD- (engl. *ankyrin repeat domain*) Domäne, einer Proteinkinase (PK)-ähnlichen Domäne und einer C-terminalen Ribonuclease-Domäne aufgebaut (Chakrabarti, et al., 2011). In inaktiver, geschlossener Form liegt die RNase L als Monomer vor. Die Bindung von 2'5'Oligoadenylat an die ARD-Domäne löst einen Übergang in eine offene Konformation aus, wodurch eine Ausbildung von RNase L-Homodimeren möglich ist und die C-terminale, katalytisch aktive Ribonuclease-Domäne freigelegt wird (Dong, et al., 1995) (Tanaka, et al., 2004). Diese schneidet RNA bevorzugt am 3'-Ende einer UU, UA oder UG-Sequenz und ausschließlich in Einzelstrangbereichen, hierbei entstehen RNA Stücke (< 200 Nukleotide) mit einer 5' OH-Gruppe und einem 2'3'zyklischen Phosphat. (Floyd-Smith, et al., 1981) (Chakrabarti, et al., 2011). So wird der antivirale Effekt der RNase L zum einen direkt über das Schneiden des ssRNA Genoms und damit einer Inhibition der viralen Replikation, wie beispielsweise bei

EMCV, vermittelt (Silverman, 2007). Zum anderen wird durch RNase L Aktivität auch die zelluläre ribosomale RNA degradiert und somit die Translation viraler Proteine gehemmt (Silverman, et al., 1983). Ein weiterer antiviraler Mechanismus umfasst die Aktivierung der RIG-I und MDA5 basierten Signaltransduktion durch RNase L Abbauprodukte. So wird durch 2'5'Oligoadenylat induzierte RNase L Aktivität, nach Erkennung viraler dsRNA durch die OAS, zelleigene RNA geschnitten. Ein bestimmter, jedoch unbekannter Teil dieser RNA-Fragmente dient anschließend als Ligand für RIG-I was zu einer Expression von IFN- β und damit zur Ausbildung einer antiviralen angeborenen Immunantwort führt (Malathi, et al., 2007) (Malathi, et al., 2010).

1.3.5 Immunmodulation durch HDV und HBV

Da das HDV Genom als einzelsträngige, zirkuläre RNA beschrieben ist und aufgrund von ausgeprägter Basenkomplementarität eine doppelsträngige, stabähnliche Struktur vorweist (Mentha, et al., 2019), musste man vermuten, dass das Virus mittels RLRs erkannt wird. Diese Hypothese wurde im Verlauf dieser Arbeit bestätigt, als zum einen berichtet wurde, dass eine Transduktion von HDV Genomen mittels AAV-HDV in MAVS Knockout Mäuse eine signifikante Abschwächung der angeborenen Immunität, verglichen mit der Transduktion von Wildtyp-Mäusen, zur Folge hat (Suárez-Amarán, et al., 2017). Zum anderen konnten wir und andere anschließend unabhängig davon zeigen, dass die HDV induzierte Immunaktivierung und die Expression von Interferonen in humanen primären Hepatozyten sowie Hepatomazelllinien von MDA5 abhängig ist (Zhang, et al., 2018) (Altstetter, et al., 2021). Während hauptsächlich die HDV RNA als PAMP für die Immunaktivierung angesehen wird, existieren auch Berichte über eine direkte Induktion der angeborenen Immunantwort durch S- und L-HDAg (Williams, et al., 2009).

Im Gegensatz zu HDV gilt HBV als „stummes“ (engl. *stealth*) Virus, welches vom angeborenen Immunsystem nicht erkannt wird bzw. dieses nicht inhibiert und die HBV Replikation somit keine Expression von Typ I Interferonen nach sich zieht (Wieland, et al., 2005) (Suslov, et al., 2018) (Mutz, et al., 2018). Allerdings wurde auch berichtet, dass Makrophagen HBV Partikel erkennen können und manche HBV Proteine aktiv mit der Erkennung des Virus durch das angeborene Immunsystem interferieren (Hösel, et al., 2009) (Cheng, et al., 2017). So kann in chimären Mäusen mit humanisierten Lebern eine HBV bedingte Inhibition der Immunantwort der Hepatozyten auf IFN- α festgestellt werden (Lütgehetmann, et al., 2011). Außerdem gibt es Hinweise, dass der RIG-I Signalweg zum einen durch das X-Protein inhibiert wird, indem es die Signaltransduktion über MAVS inhibiert (Wei, et al., 2010) und es zum anderen durch die HBV-Polymerase zu einer Interferenz mit der IRF3 bzw. TBK1 Aktivierung kommt (Yu, et al., 2010).

1.4 Zielsetzung der Doktorarbeit

Da permissive Zellkultursysteme zu Beginn dieser Doktorarbeit noch nicht lange verfügbar waren, war die Auswirkung der HDV Infektion auf das Immunsystem, sowie die Interaktion zwischen HBV und HDV nur wenig erforscht. Es war bekannt, dass HDV vom angeborenen Immunsystem erkannt wird und die Produktion von Interferonen auslösen kann, jedoch waren die Konsequenzen für das Immunsystem und das Virus dabei weitgehend ungeklärt.

Deshalb sollte im ersten Teil der Arbeit ein *in vitro* Infektionsmodell für HDV in HepG2 und HepaRG basierten Zellen etabliert werden, das eine robuste Induktion Interferon stimulierter Gene (ISGs) durch HDV erlaubte. Außerdem wurde damit der Einfluss von HBV auf die HDV bedingte angeborene Immunität untersucht.

Auf Grundlage dieser Infektionsmodelle sollte anschließend der Rezeptor identifiziert werden, der für die HDV Erkennung durch das angeborene Immunsystem verantwortlich ist. Hierfür sollten HepG2 Hepatom-Zellen mittels CRISPR/Cas9 Methode systematisch mit Gen-Knockouts der potenziellen PRRs aus der Familie der RIG-I ähnlichen Rezeptoren, sowie die an der Signaltransduktion beteiligten Moleküle versehen werden. Außerdem sollte die Rolle weiterer, unterstützender Mechanismen der HDV Erkennung erforscht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit sollte es sein, sich mit den Konsequenzen der HDV Muster-Erkennung und der damit verbundenen Aktivierung des angeborenen Immunsystems auseinanderzusetzen und die Auswirkungen auf die Persistenz und Replikationsfähigkeit des HDV zu untersuchen. Dabei sollte zum einen der Einfluss der PRR-Knockouts auf die HDV Infektion, zum anderen der eines künstlich herbeigeführten antiviralen Zustands untersucht werden. Zudem sollte der Effekt der HDV induzierten, angeborenen Immunantwort auf die Eliminierung HBV-infizierter Hepatozyten durch Effektor-T-Zellen, die das HBV-Hüllprotein erkennen, analysiert werden.

Abschließend sollten diese Erkenntnisse auf ein *in vivo* HDV Infektionsmodell in Mäusen übertragen werden. Hierbei sollte untersucht werden, wie gut sich NTCP-humanisierte Mäuse mit HDV infizieren lassen und welchen Einfluss die PRR bedingte Erkennung hierbei auf die HDV Infektion hat.

2. Ergebnisse

2.1 Etablierung und Charakterisierung von *in vitro* HDV Infektionsmodellen

Für die Experimente dieser Doktorarbeit war es notwendig, ein reproduzierbares Protokoll zur Infektion von immortalisierten Hepatozytenzelllinien mit HDV zu etablieren, welches ein Auslesen der angeborenen Immunantwort als Reaktion auf die HDV Infektion ermöglicht. Als Grundlage hierfür dienten die Protokolle zur Produktion von HDV, sowie zur Infektion von Hepatomazelllinien aus meiner Masterarbeit (Altstetter, 2016) am Institut für Virologie der Technischen Universität München, welche weiter optimiert und standardisiert wurden.

2.1.1 HDV induziert ISGs in humanen Hepatomazelllinien

Aus meiner Masterarbeit (Altstetter, 2016) ging hervor, dass eine HDV Infektion von HepG2-NTCP und HepaRG Zellen zu einer angeborenen Immunantwort in Form von erhöhter Expression von ISGs führt, was auch durch Berichte weiterer Gruppen bestätigt wurde (Alfaiate, et al., 2016). Auf Grundlage dieser Beobachtung wurden zu Beginn dieser Dissertation die HepG2-NTCP Zellen 2 Tage und die HepaRG Zellen 14 Tage lang differenziert bevor sie mit HDV infiziert wurden. Allerdings erwies sich die Induktion von ISGs in HepG2-NTCP Zellen als sehr schwach, weswegen die Dauer der Zelldifferenzierung von 2 auf 14 Tage, wie bei der HepaRG Zelllinie, angehoben wurde. Die Infektion beider Zelllinien erfolgte mit 20 Virionen pro Zelle (entspricht einer MOI = 20 - engl. *multiplicity of infection*) und um den Infektionsverlauf nachzuverfolgen, wurden die Zellen jeweils 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 und 10 Tage nach der Infektion (engl. *days post infection - dpi*) lysiert, die RNA extrahiert und die viralen Genomäquivalente (engl. *viral genome equivalents* – vGE) per One-Step RT-qPCR bestimmt. Eine Zunahme der viralen Genomäquivalente im zeitlichen Verlauf des Experiments bedeutete, dass die Zelllinien erfolgreich infiziert wurden und HDV in den Zellen replizieren konnte. Bei den HepaRG Zellen erfolgte zusätzlich an den Tagen 5 und 6 nach Infektion eine Analyse, um eine lückenlose Kinetik zu erhalten. Dabei zeigte sich, dass bis einschließlich Tag 2 nach Infektion kein Anstieg viraler Genomäquivalente und somit keine HDV Replikation stattfand. Erst nach 3 Tagen stieg die Anzahl von HDV- Genomäquivalenten sprunghaft an und erreichte ab Tag 7 nach Infektion ein Plateau ohne weitere Anstiege. Insgesamt nahmen die gemessenen viralen Genomäquivalente in etwa um den Faktor 100 zu (Abbildung 9 A) (Altstetter, et al., 2021).

Im Falle der HepG2-NTCP Zellen zeigte sich aufgrund der ausbleibenden viralen Replikation in den ersten beiden Tagen nach Infektion ein vergleichbares Bild wie bei den HepaRG Zellen, jedoch war die initiale Anzahl an gemessenen HDV-Genomäquivalenten ca. doppelt so hoch. Ab Tag 3 nach Infektion nahm diese dann ohne Stagnation bis Tag 7 stark zu (Faktor 250) und erreichte ab diesem Zeitpunkt ebenfalls ein Plateau (Abbildung 9 B) (Altstetter, et al., 2021).

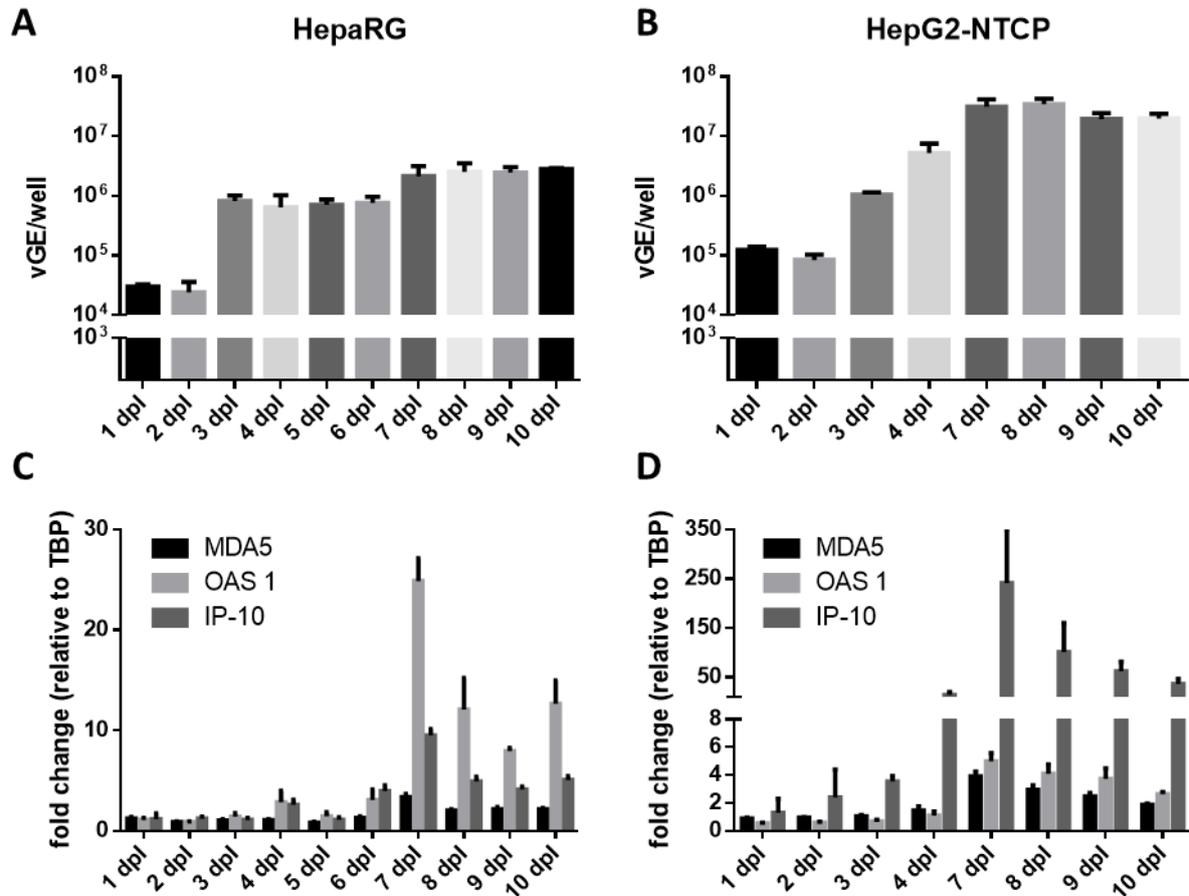


Abbildung 9: Die Kinetik der HDV Infektion und ISG Expression in HepaRG und HepG2-NTCP Zellen.

Die HDV Infektion erfolgte mit 20 Virionen pro Zelle nach 14 Tagen Zelldifferenzierung, die Zellyse und RNA Extraktion wurde an den angegebenen Tagen nach Infektion (engl. *days post infection*, dpl) durchgeführt. **(A)** Die viralen Genomäquivalente pro Well (engl. *viral genome equivalents per well*, vGE/well) wurden mittels RT-qPCR in HepaRG Zellen (ausgesät in 6-Well Platten) und **(B)** HepG2-NTCP Zellen (ausgesät in 24-Well Platten) absolut quantifiziert. **(C)** Die Veränderung der mRNA Menge von *MDA5*, *OAS1* und *IP-10* nach HDV Infektion in HepaRG und **(D)** HepG2-NTCP Zellen wurde mittels qPCR als Vielfaches (engl. *fold change*) in Relation zu TBP (TATA-Box-Binde-Protein) bestimmt.

Die Analyse der ISG Expression erfolgte per relativer qPCR Quantifizierung der mRNA Menge des jeweiligen ISGs in Relation zur mRNA Menge des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens (engl. *housekeeping gene*) TATA-Box-Binde-Protein (TBP). Hierbei wurde die extrahierte RNA, die auch für die Bestimmung der HDV-Genomäquivalente verwendet wurde, in cDNA umgeschrieben und die Genexpression infizierter Zellen im Vergleich zu uninfizierten Zellen per qPCR analysiert. HDV infizierte HepaRG Zellen zeigten erst ab Tag 7 nach Infektion eine deutlich gesteigerte OAS1 Expression, die bis Tag 10 langsam wieder abnahm. Die Induktion von IP-10 erfolgte ebenfalls ab Tag 7 nach Infektion und nahm bis zu Tag 10 kontinuierlich ab, ohne dabei auf den Ursprungswert abzuflachen. Die Expression von MDA5 wurde durch die HDV Infektion von HepaRG Zellen kaum gesteigert (Abbildung 9 C) (Altstetter, et al., 2021). Bei den mit HDV infizierten HepG2-NTCP Zellen konnte schon ab Tag 4 nach Infektion eine gesteigerte IP-10 Expression beobachtet werden, die analog zu den Beobachtungen in

HepaRG Zellen an Tag 7 nach Infektion gipfelte und dann langsam zurückging. Die jeweiligen Induktionen von OAS1 bzw. MDA5 erfolgten ab Tag 7 nach Infektion und nahmen bis zu Tag 10 kontinuierlich ab. (Abbildung 9D). Interessanterweise korrelierte der Expressionsanstieg der ISGs in beiden Fällen nicht direkt mit der sprunghaften Zunahme der HDV-Genomäquivalente, sondern fand deutlich zeitversetzt statt, als sich HDV schon über einen langen Zeitraum repliziert hatte (Altstetter, et al., 2021).

2.1.2 Die Veränderung der MOI hat wenig Einfluss auf die Induktion von ISGs

Um herauszufinden, ob zunächst eine bestimmte Menge an HDV Genomen benötigt wird, bevor ISGs induziert werden können, wurden HepG2-NTCP Zellen mit verschiedenen MOIs (2, 5, 10, 20 und 50 Virionen pro Zelle) infiziert. Die Zellyse erfolgte nach 1, 3, 4 und 7 Tagen nach der Infektion, da sich diese Zeitpunkte, wie in 2.1.1 gezeigt, zur Analyse der HDV bedingten ISG Induktion sehr gut eigneten. Die Quantifizierung der HDV-Genomäquivalente mittels RT-qPCR ergab, dass sich HDV über alle verwendeten MOIs hinweg erfolgreich replizieren konnte und die absolute Anzahl an viralen Genomäquivalenten direkt mit der MOI korrelierte. Relativ zu den Basiswerten, welche einen Tag nach Infektion bestimmt wurden, war die jeweilige Zunahme der Genomäquivalente allerdings kaum von der MOI abhängig und lag in etwa bei Faktor 100-200 (Abbildung 10 A).

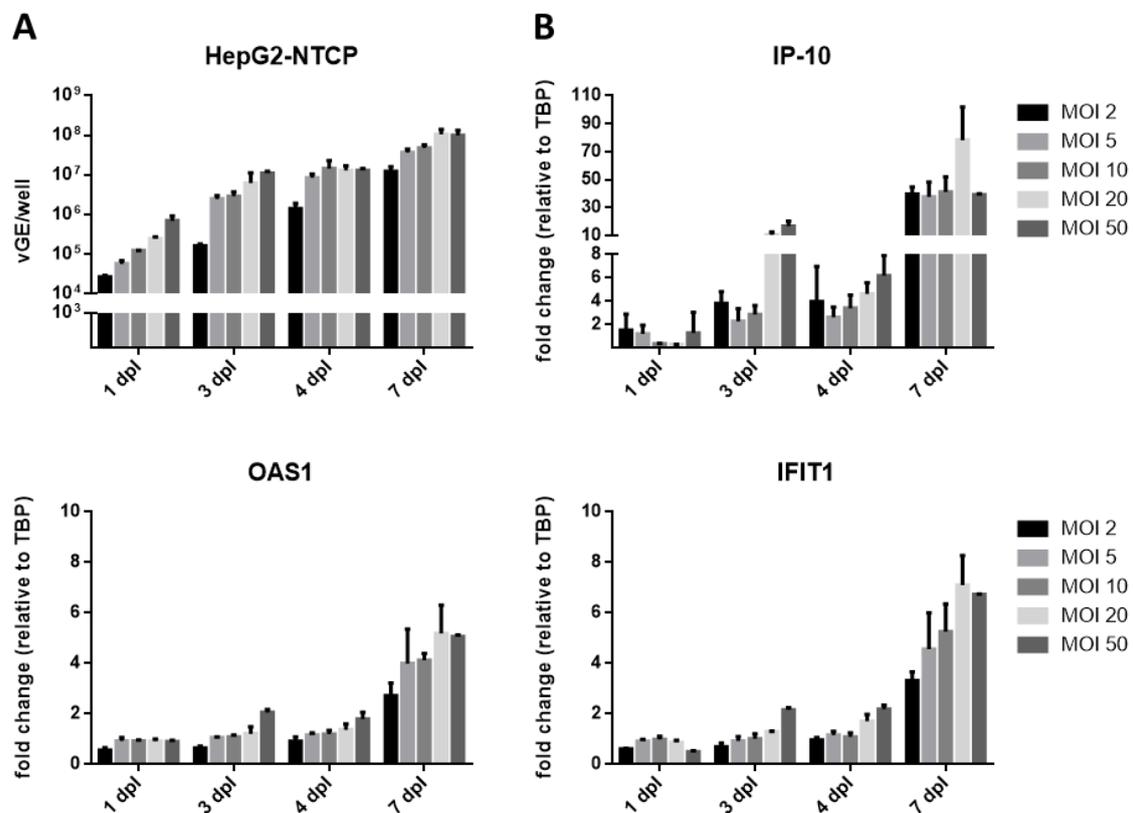


Abbildung 10: Der Einfluss der MOI auf die Expression von ISGs in HepG2-NTCP Zellen.

Die HDV Infektion 14 Tage differenzierter HepG2-NTCP Zellen (ausgesät in 24-Well Platten) erfolgte mit MOIs von 2, 5, 10, 20 und 50 Virionen pro Zelle. Die Zellyse wurde 1, 3, 4 und 7 Tage nach Infektion (dpi) durchgeführt. **(A)** Die viralen Genomäquivalente pro Well (vGE/well) wurden mittels RT-qPCR absolut quantifiziert. **(B)** Die Veränderung der mRNA Menge von *IP-10*, *OAS1* und *IFIT1* nach HDV Infektion wurde mittels qPCR als Vielfaches (engl. *fold change*) in Relation zu TBP bestimmt.

Auch auf die Induktion von ISGs hatte eine Erhöhung bzw. Verminderung der MOI größtenteils keinen Einfluss. So befand sich der Zeitpunkt für die maximale ISG Induktion, wie bereits in 2.1.1 festgestellt, bei 7 Tagen nach HDV Infektion. Lediglich im Falle von IP-10 führte eine höhere MOI (20 und 50 Virionen pro Zelle) bereits nach 3 Tagen zu dessen gesteigerter Expression, für OAS1 und IFIT1 traf dies nicht zu (Abbildung 10 B). Somit schien die absolute Anzahl an initial vorhandenen HDV Genomen nur eine untergeordnete Rolle auf die Induktion von ISGs zu haben (Altstetter, et al., 2021).

2.1.3 HBV schwächt die HDV induzierte ISG Expression nicht ab

Da eine HDV Infektion im Menschen nie allein, sondern immer entweder als Koinfektion mit HBV oder als Superinfektion bereits mit chronisch HBV infizierter Patienten auftritt, sollte der Einfluss von HBV auf die HDV induzierte angeborene Immunantwort untersucht werden. Wie von *Jung et al.* zusammengefasst, wurde unter anderem bereits von einer direkten Blockade des Interferon Signalwegs durch die HBV-Oberflächenproteine (Xu, 2016) und das X-Protein (Tsunematsu, et al., 2017) berichtet. Außerdem wurde gezeigt, dass das X-Protein mit dem MAVS Signalweg interferieren kann und dadurch möglicherweise eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch HDV verhindert werden könnte (Wei, et al., 2010) (Jung, et al., 2020a). Um zu vermeiden, dass im Experiment HDV monoinfizierte Zellen vorlagen, wurden HepG2 (-NTCP) basierte HBV-transgene Zelllinien verwendet. Dabei handelte es sich um HepG2 Zellen, welche ein 1,3-faches HBV Genom trugen (HepG2 1.3) und im Falle der HepG2 1.3X- und HepG2-NTCP 1.3L- Zellen kein X-Protein (HepG2 1.3X-) bzw. kein L-Protein (HepG2-NTCP 1.3L-) bildeten. Da weder die HepG2 1.3 noch die HepG2 1.3X-Zelllinien den für eine HDV Infektion notwendigen NTCP Rezeptor besaßen, wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Gloria González Aseguinolaza [Direktorin am CIMA, Pamplona, Spanien] ein NTCP unabhängiges Adeno-assoziiertes Virus-HDV Konstrukt (AAV-HDV) verwendet. Hierbei handelte es sich um ein AAV, in dessen Kapsid des Serotyps 8 ein 1,2-faches wildtypisches HDV-Überlängengenom verpackt wurde und welches sich als Vektor zur Transduktion von Hepatomazelllinien eignet (Suárez-Amarán, et al., 2017).

Nachdem die Zellen für 14 Tage differenziert wurden, erfolgte die AAV-HDV vermittelte Transduktion des HDV Genoms mit einer MOI von 2×10^4 Virionen pro Zelle. Die HBV-transgenen Zelllinien wurden 4, 7, 11 und 14 dpi lysiert und die viralen Genomäquivalente sowie die ISG Induktion mittels qPCR mit HBV-freien HepG2-NTCP Zellen verglichen. Bei allen mit AAV-HDV transduzierten Zelllinien konnte ein Anstieg der Genomäquivalente im zeitlichen Verlauf beobachtet werden, was auf eine erfolgreiche Replikation des HDV Genoms schließen ließ (Abbildung 11 A). Bezüglich der ISG Induktion war auffällig, dass diese verglichen mit den Ergebnissen aus 2.1.1 erst ab Tagen 11 bzw. 14, je nach gemessenem ISG, ihren jeweiligen Höhepunkt hatte. Dabei zeigten die HepG2-NTCP Zellen eine

schwächere Expression von *IFNB1* sowie den beiden ISGs *OAS1* und *IFIT1*, als die HepG2 basierten HBV-transgenen Zelllinien. Insbesondere die HepG2 1.3 und HepG2 1.3X- Zellen wiesen eine starke Immunstimulation auf, wohingegen die HepG2-NTCP 1.3L- Zellen schwächer stimuliert wurden, dabei aber immer noch eine höhere ISG Induktion aufwiesen, als die HepG2-NTCP Zellen (Abbildung 11 B). Folglich konnte eine durch HBV vermittelte Abschwächung der HDV induzierten ISG Expression, wie sie zuvor beschrieben wurde, nicht bestätigt werden.

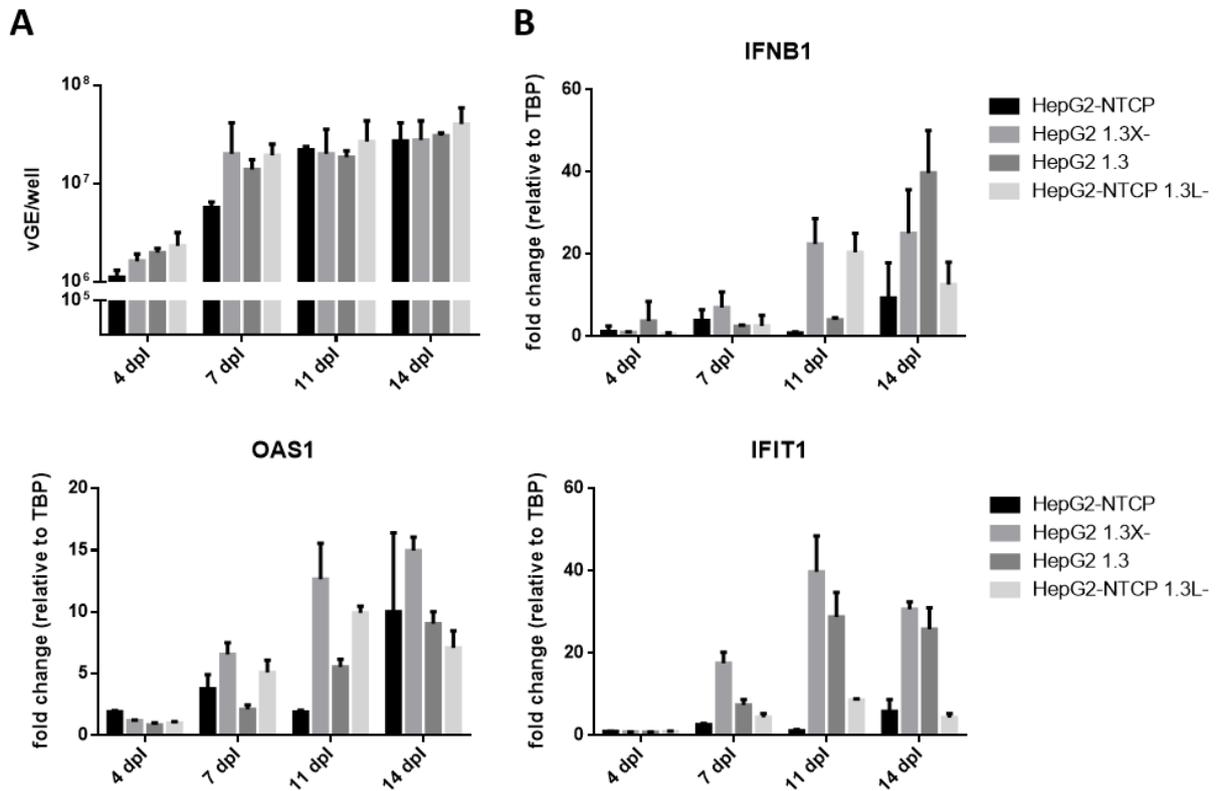


Abbildung 11: Der Einfluss von HBV auf die HDV induzierte ISG Expression.

HepG2-NTCP sowie HBV transgene HepG2 1.3X-, HepG2 1.3 und HepG2-NTCP 1.3L- Zellen wurden 14 Tage in einer 24-Well Platte differenziert und anschließend mittels AAV-HDV transduziert ($MOI=2 \times 10^4$ Virionen pro Zelle). Zellyse und RNA Isolation erfolgten 4, 7, 11 und 14 Tage nach Transduktion. **(A)** Die viralen Genomäquivalente pro Well (vGE/well) wurden mittels RT-qPCR absolut quantifiziert. **(B)** Die Veränderung der mRNA Menge von *IFNB1*, *OAS1* und *IFIT1* nach AAV-HDV Transduktion wurde mittels qPCR als Vielfaches (engl. *fold change*) in Relation zu TBP bestimmt.

2.2 Die Identifizierung von MDA5 als Rezeptor zur Erkennung der HDV Replikation

Wie aus dem vorherigen Teil der Arbeit hervorgeht, führt eine HDV Infektion von Hepatomazelllinien zu einer Aktivierung ihres angeborenen Immunsystems. Dies bedeutet, dass das Virus von einem PRR der Zelle erkannt werden muss, damit die anschließende Signalkaskade ablaufen und ISGs induziert werden können. Zu Beginn dieser Doktorarbeit war nicht bekannt, welcher Rezeptor für die Erkennung der HDV Infektion verantwortlich ist. Da das HDV Genom als einzelsträngige RNA mit stark ausgeprägten Sekundärstrukturen vorliegt, wurde vermutet, dass, neben den Toll-like Rezeptoren (TLRs) 3,7 und 8, entweder RIG-I oder MDA5 aus der Familie der RIG-I-ähnlichen Rezeptoren (engl. *RIG-I-like receptors*, *RLRs*) eine wichtige Rolle bei der Erkennung von HDV spielen, da diese intrazelluläre virale RNA erkennen können (Schneider, et al., 2014) (Wu, et al., 2014). Dementsprechend handelt dieser Teil meiner Doktorarbeit von der Identifikation des Rezeptors, der für die Erkennung der HDV Infektion essenziell ist.

2.2.1 Der Gen-Knockout von MAVS verhindert die Induktion des angeborenen Immunsystems nach HDV Infektion

Um zu überprüfen, ob RIG-I und/oder MDA5 für die Erkennung von HDV benötigt werden, wurde in Kooperation mit Dr. Francesca Pinci [Postdoktorandin am Genzentrum München der Ludwig-Maximilians-Universität München] und Prof. Veit Hornung [Professor am Genzentrum München der Ludwig-Maximilians-Universität München] mittels CRISPR/Cas-Methode ein MAVS Gen-Knockout in die bereits verwendeten HepG2-NTCP Zellen eingebracht (im Folgenden als HepG2-NTCP MAVS KO bezeichnet) und damit sowohl die RIG-I als auch die MDA5 basierte Signalgebung ausgeschaltet. Sowohl die nativen HepG2-NTCP Zellen als auch die HepG2-NTCP MAVS KO Zellen wurden 14 Tage differenziert und anschließend wie zuvor beschrieben mit HDV infiziert und die ISG Expression per qPCR 1, 4, 7 und 11 Tage nach Infektion analysiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit HBV infiziert (MOI = 100 Virionen pro Zelle), da HBV im Gegensatz zu HDV die angeborene Immunantwort nicht aktiviert und somit keine ISGs induziert (Mutz, et al., 2018).

In HDV infizierten HepG2-NTCP Zellen wurde an Tag 7 nach Infektion, wie bereits in 2.1 berichtet, eine klare Induktion der Expression von IP-10 und IFIT1 detektiert, die an Tag 11 größtenteils wieder abgeklungen war. Bei den HBV infizierten HepG2-NTCP Zellen konnte keine Induktion der ISGs festgestellt werden (Abbildung 12 A). Der Gen-Knockout von MAVS hatte zur Folge, dass die Expression von IP-10 und IFIT1 in HDV infizierten Zellen nicht angeregt wurde. Die ISG Induktion war, wie bei der mit HBV infizierten Kontrollgruppe, nicht detektierbar (Abbildung 12 B). Zusammengefasst lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass MAVS essenziell für die Aktivierung der angeborenen Immunantwort nach HDV Infektion

ist und somit HDV entweder durch RIG-I oder MDA5 innerhalb der Zelle erkannt wird (Altstetter, et al., 2021).

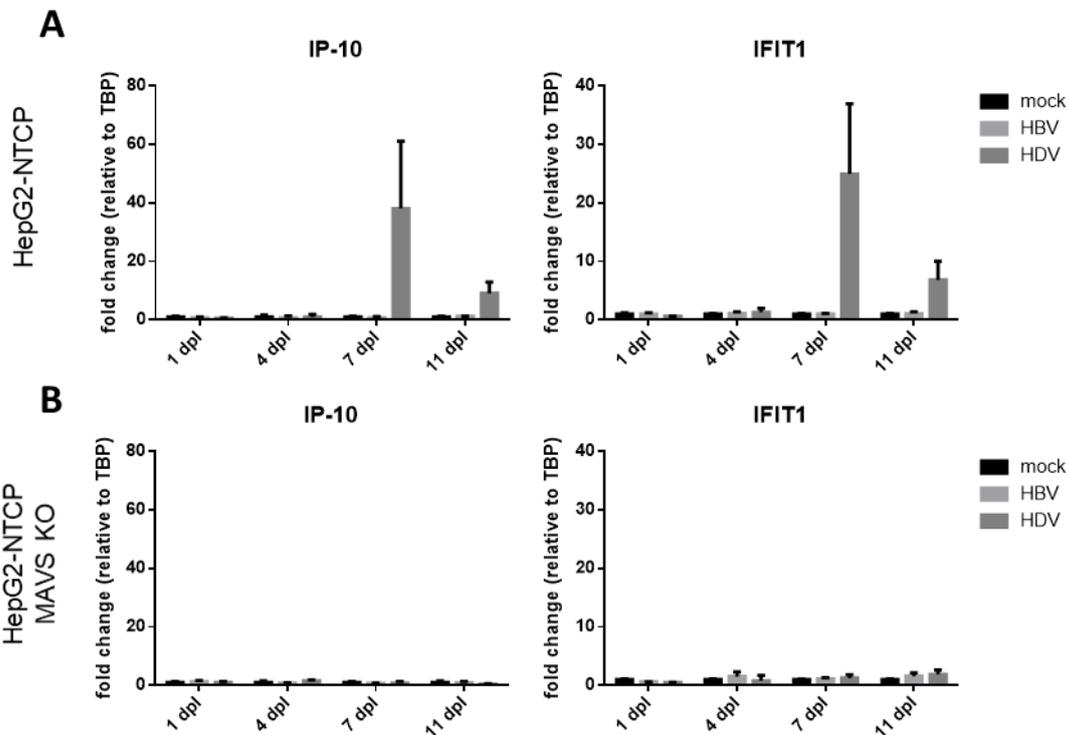


Abbildung 12: Der Einfluss des MAVS Genknockouts auf die ISG Expression in HepG2-NTCP Zellen nach HDV Infektion.

HepG2-NTCP sowie HepG2-NTCP MAVS KO Zellen wurden nach 14 Tagen Zelldifferenzierung in einer 24-Well Platte entweder mit HDV (MOI=20 Virionen pro Zelle), HBV (MOI=100 Virionen pro Zelle) oder nicht (mock) infiziert. Die Zellyse und RNA Extraktion wurden 1, 4, 7 und 11 Tage nach Infektion (dpi) durchgeführt. **(A)** Die Veränderung der mRNA Menge in HepG2-NTCP und **(B)** HepG2-NTCP MAVS KO Zellen von *IP-10* und *IFIT1* nach HDV Infektion wurde mittels qPCR als Vielfaches (engl. *fold change*) in Relation zu TBP bestimmt.

2.2.2 MDA5 und nicht RIG-I ist für die Erkennung von HDV essenziell

Die Ergebnisse aus 2.2.1 lassen die Folgerung zu, dass entweder RIG-I oder MDA5 für die Erkennung von HDV in infizierten Zellen verantwortlich ist, da MAVS mit beiden PRRs interagiert und elementar für die Signaltransduktion und damit die anschließende angeborene Immunantwort ist (Kawai, et al., 2005). Um herauszufinden, welcher der beiden Rezeptoren für die Induktion der angeborenen Immunantwort nötig ist, wurden in erneuter Kooperation mit Dr. Francesca Pinci und Prof. Veit Hornung weitere HepG2-NTCP basierte Gen-Knockout Zellklone für RIG-I und MDA5 mittels CRISPR/Cas-Methode erzeugt (im Folgenden als HepG2-NTCP RIG-I KO bzw. HepG2-NTCP MDA5 KO bezeichnet) und in Stimulationsexperimenten auf ihre Funktionalität überprüft (durchgeführt von Dr. Francesca Pinci). Hierfür wurden die Zellen zum einen mit synthetischer dsRNA aus Inosin-Cytosin Polynucleotiden (engl. *polyinosinic:polycytidylic acid, poly I:C*), welche TLR3, RIG-I/MDA5 und PKR aktivieren kann, als auch mit dem synthetischen RIG-I-Ligand IVT4 (engl. *in vitro transcript 4*) stimuliert. Die wildtypischen HepG2-NTCP Zellen ließen sich sowohl durch

poly I:C als auch IVT4 stark stimulieren, was zur Produktion von IP-10 (CXCL10) führte. Die beiden HepG2-NTCP MDA5 KO Klone A4 und A12 wurden durch beide Liganden insgesamt etwas schwächer, aber ausreichend stark stimuliert, die HepG2-NTCP RIG-I KO Klone A2 und G7 reagierten erwartungsgemäß nur auf poly I:C. Bezüglich beider HepG2-NTCP MAVS KO Klone D3 und D4 konnte keiner der beiden Stimulantien eine IP-10 Produktion induzieren (Abbildung 13 A). Auf Grundlage dessen, wurden alle folgenden Infektionsexperimente mit diesen Klonen durchgeführt: HepG2-NTCP MDA5 KO A4, HepG2-NTCP RIG-I KO G7 und HepG2-NTCP MAVS KO D4.

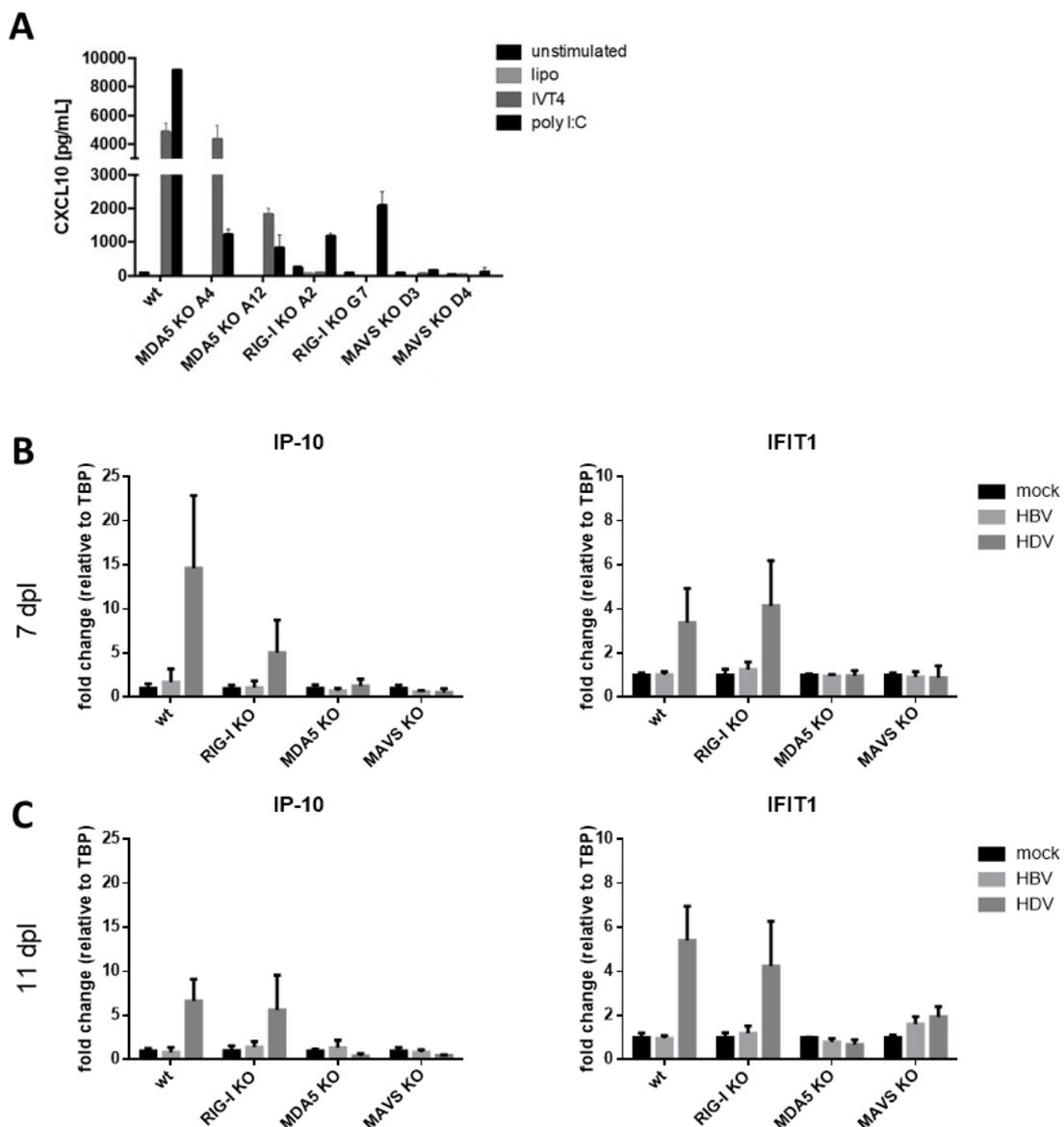


Abbildung 13: Die Rollen von RIG-I und MDA5 bei der Erkennung der HDV Replikation.

(A) Die Klone der HepG2-NTCP (MDA5- RIG-I- bzw. MAVS KO) Zellen wurden mit IVT4 und poly I:C stimuliert und die Produktion von IP-10 (CXCL10) im Vergleich zu unstimulierten (unstimulated) bzw. Lipofectamin (lipo) behandelten Zellen mittels ELISA bestimmt. (B) HepG2-NTCP (MDA5- RIG-I- bzw. MAVS KO) Zellen wurden nach 14 tägiger Differenzierung mit HDV (MOI=20 Virionen pro Zelle), HBV (MOI=100 Virionen pro Zelle) oder nicht (mock) infiziert. 7 Tage (C) bzw. 11 Tage nach Infektion (dpl) wurde die Veränderung der mRNA Menge von *IP-10* und *IFIT1* mittels qPCR als Vielfaches (engl. *fold change*) in Relation zu TBP bestimmt.

Sowohl die wildtypischen HepG2-NTCP Zellen als auch die jeweiligen HepG2-NTCP Knockout Zellen wurden 14 Tage differenziert und anschließend mit HDV bzw. HBV infiziert. Auf Grundlage der Ergebnisse aus 2.2.1 erfolgte die Analyse an den Tagen 7 und 11 nach Infektion, da zu früheren Zeitpunkten keine klare ISG Induktion zu beobachten war. 7 Tage nach Infektion konnte im Falle der HDV-, aber nicht HBV-Infektion bei den HepG2-NTCP und den HepG2-NTCP RIG-I KO Zelllinien eine gesteigerte Expression von IP-10 und IFIT1 beobachtet werden, wohingegen die Induktion dieser beiden ISGs, wie in 2.2.1 beschrieben, bei den HepG2-NTCP MAVS KO Zellen ausblieb. Wie die Expressionsanalyse der HepG2-NTCP MDA5 KO Zellen ergab, konnte die HDV Infektion in diesen Zellen keine angeborene Immunantwort auslösen (Abbildung 13 B). Dieselben Beobachtungen galten auch für Tag 11 nach Infektion, der Gen-Knockout von RIG-I hatte, im Gegensatz zu den Knockouts von MAVS und MDA5, keinen Einfluss auf die ISG Induktion (Abbildung 13 C). Dies bedeutet, dass RIG-I bei der Erkennung der HDV Infektion in den HepG2-NTCP Zellen keine Rolle spielt und MDA5 der entscheidende Faktor für die Aktivierung der angeborenen Immunantwort ist (Altstetter, et al., 2021).

Um diese Hypothese weiter zu untermauern, wurde der Versuch mit dem unter 2.1.3 beschriebenen AAV-HDV Vektor wiederholt. Die AAV-HDV vermittelte Transduktion des HDV Genoms erfolgte mit einer MOI von 2×10^4 Virionen pro Zelle und die Zellen wurden 4, 7 und 11 Tage danach lysiert. Wie zuvor beobachtet, erfolgte die ISG Induktion mit diesem Modellsystem generell 3 bis 4 Tage später als bei der direkten Infektion mit HDV. Demensprechend konnte an Tagen 4 und 7 nach Transduktion keine erhöhte Expression von ISGs festgestellt werden. An Tag 11 wurden dann in den HepG2-NTCP RIG-I KO, aber nicht in den HepG2-NTCP MDA5 KO und HepG2-NTCP MAVS KO Zelllinien eine gesteigerte Expression von IP-10, IFIT1, OAS1 und IFNL1 detektiert (Abbildung 14 A-D).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die HDV Replikation durch MDA5 detektiert wird, was eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems in Form einer ISG Induktion zur Folge hat (Altstetter, et al., 2021).

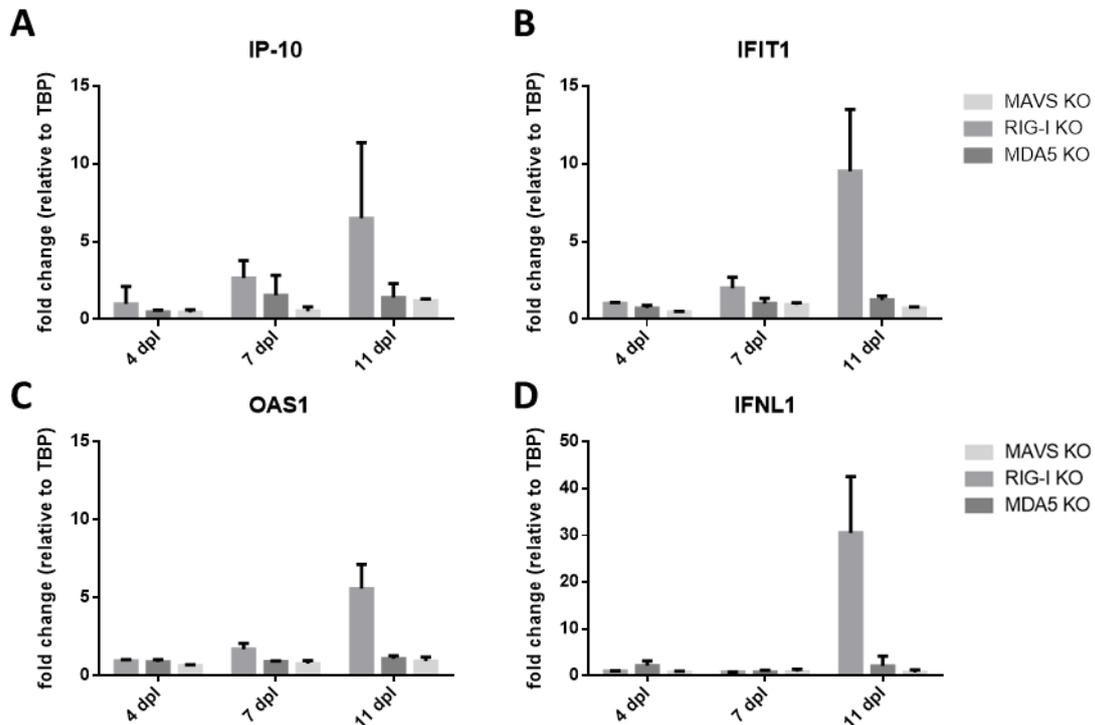


Abbildung 14: Die ISG Expression nach AAV-HDV Transduktion in HepG2-NTCP basierten Zellen
 HepG2-NTCP (MDA5- RIG-I- bzw. MAVS KO) Zellen wurden nach 14-tägiger Differenzierung in einer 24-Well Platte mit AAV HDV transduziert (MOI=2x10⁴ Virionen pro Zelle) und die Zellen nach 4, 7 und 11 Tagen lysiert und die RNA extrahiert. Die Veränderung der mRNA Menge von **(A) IP-10** **(B) IFIT1** **(C) OAS1** und **(D) IFNL1** nach AAV-HDV Transduktion wurde mittels qPCR als Vielfaches (engl. *fold change*) in Relation zu TBP bestimmt.

2.2.3 RNase L spielt bei der HDV induzierten angeborenen Immunantwort nur eine begrenzte Rolle

Nachdem MDA5 als HDV-detektierender Rezeptor identifiziert wurde, was auch durch weitere Berichte untermauert wurde (Zhang, et al., 2018), sollte untersucht werden, ob noch weitere Elemente des angeborenen Immunsystems eine Rolle bei der Erkennung der HDV Infektion spielen. Grundlage dieser Annahme war die Beobachtung, dass bei den HepG2-NTCP Zellen eine Differenzierungsdauer von 2 Tagen nicht ausreichte, um eine klare, durch HDV induzierte ISG Expression hervorzurufen. Erst eine Verlängerung der Differenzierungsdauer auf 14 Tage machte eine HDV bedingte ISG Induktion messbar. Deswegen wurde eine Analyse der Genexpression von verschiedenen PRRs und Proteinen der Signaltransduktion im Verlaufe der Zelldifferenzierung durchgeführt. Hierfür wurden HepG2-NTCP Zellen ausgesät und 2 Tage später differenziert. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen nach entweder 1, 2, 4, 7, 10 oder 14 Tagen lysiert und ihre Genexpression zum jeweiligen Zeitpunkt per qPCR analysiert (Abbildung 15 A). Weder MDA5, RIG-I, LGP2 noch OAS1 wurden im Verlauf der Differenzierung stark in ihrer Expression gesteigert. Das Gleiche galt auch für die Signalmoleküle MAVS und STAT1. Allerdings konnte eine ausgeprägte, durch die Zelldifferenzierung induzierte Expression von RNase L beobachtet werden, die nach 7 Tagen Differenzierung um den Faktor 14 gesteigert wurde (Abbildung 15 B).

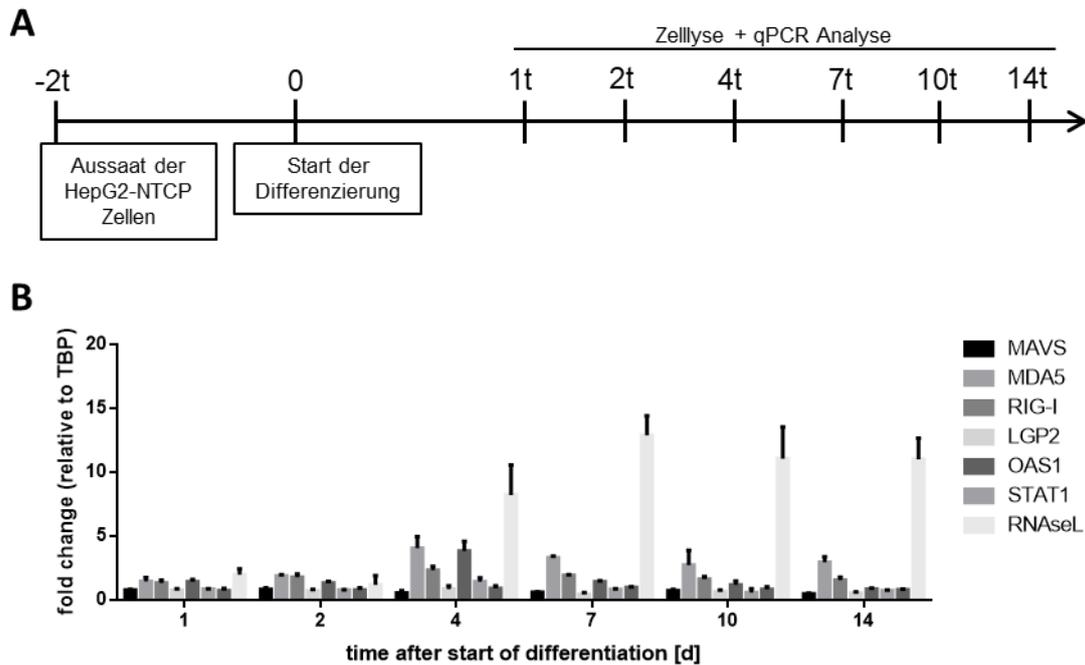


Abbildung 15: Analyse der Genexpression während der Differenzierung von HepG2-NTCP Zellen. (A) HepG2-NTCP Zellen wurden in einer 24-Well Platte ausgesät und differenziert. Dabei wurden sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1, 2, 4, 7, 10 und 14 Tage nach Start der Differenzierung) lysiert und die RNA isoliert. (B) Die Analyse der Genexpression erfolgte anhand der mRNA Menge von MAVS, MDA5, RIG-I, LGP2, OAS1, STAT1 und RNase L mittels qPCR als Vielfaches (engl. fold change) in Relation zu TBP.

In der Literatur wurde bereits von RNase L als Verstärker der antiviralen angeborenen Immunität berichtet (Malathi, et al., 2007) (Malathi, et al., 2010), weshalb in den folgenden Experimenten die Rolle der RNase L bei der Induktion von ISGs nach HDV Infektion untersucht wurde. Zunächst wurde versucht, einen per siRNA (engl. *small interfering RNA*) verursachten RNase L-Gen-Knockdown in HepG2-NTCP Zellen einzubringen. Durch den Vorgang der RNA-Interferenz, welcher durch die in die Zelle eingebrachte siRNA ausgelöst wird, wird die Expression von Genen vorübergehend unterdrückt, indem die vom Zielgen transkribierte mRNA spezifisch degradiert wird (Laganà, et al., 2015). Um einen durch RNA-Interferenz bedingten Gen-Knockdown von RNase L zu erreichen, wurden HepG2-NTCP Zellen 14 Tage nach Beginn der Differenzierung mit siRNA spezifisch für RNase L-mRNA transfiziert und für 2 Tage inkubiert, um den Großteil der RNase L aus dem System zu eliminieren. Anschließend wurden die Zellen mit HDV infiziert, 1, 4 und 7 Tage danach lysiert und die viralen Genomäquivalente sowie die ISG Induktion mittels qPCR mit Kontroll-siRNA transfizierten HepG2-NTCP Zellen verglichen. Wie die Quantifizierung der HDV-Genomäquivalente zeigte, replizierte HDV im zeitlichen Verlauf in allen Gruppen gleich effizient (Abbildung 16 A). Generell löste die HDV Infektion, unabhängig von der Behandlung, eine Induktion von ISGs aus, jedoch war 4 Tage nach Infektion bei den mit RNase L-siRNA transfizierten HepG2-NTCP Zellen ein Rückgang der Expression von IP-10, IFIT1 und OAS1 verglichen mit der Kontrolle zu beobachten. Allerdings war diese Verminderung nach 7 Tagen wieder verschwunden und

die ISG Induktion war sogar stärker als bei der Kontrollgruppe (Abbildung 16 B). Möglicherweise wurde zu diesem Zeitpunkt die transfizierte siRNA bereits vollständig abgebaut und dementsprechend wieder RNase L exprimiert, um die angeborene Immunantwort wieder zu verstärken.

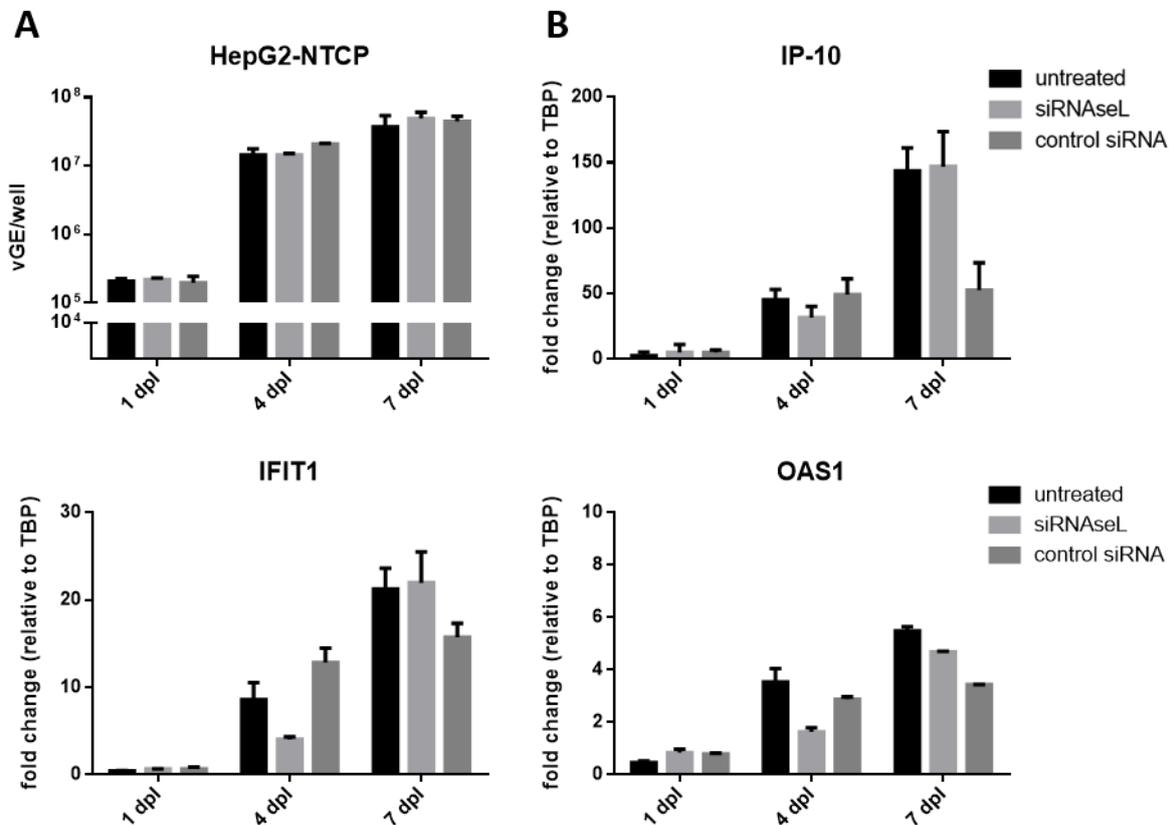


Abbildung 16: Der Einfluss des Knockdowns von RNase L auf die ISG Expression.

HepG2-NTCP Zellen wurden in einer 24-Well Platte für 14 Tage differenziert und anschließend mit siRNA spezifisch für RNase L-mRNA (siRNase L) bzw. funktionsloser Kontroll-siRNA (control siRNA) transfiziert oder unbehandelt (untreated) gelassen. Die Zellen wurden 2 Tage danach mit HDV (MOI=20 Virionen pro Zelle) infiziert und die Zellen 1, 4 und 7 Tage nach Infektion (dpl) lysiert und die RNA extrahiert. **(A)** Die viralen Genomäquivalente pro Well (vGE/well) wurden mittels RT-qPCR absolut quantifiziert. **(B)** Die Veränderung der mRNA Menge von *IP-10*, *IFIT1* und *OAS1* nach HDV Infektion wurde mittels qPCR als Vielfaches (engl. *fold change*) in Relation zu TBP bestimmt.

Um solch einen temporären Effekt, bedingt durch den transienten Ansatz des Gen-Knockdowns, auszuschließen, sollten HepG2-NTCP basierte Zelllinien mit dauerhaftem Gen-Knockout des RNase L Gens erzeugt werden. Hierfür wurden 4 verschiedene, RNase L spezifische sgRNAs (engl. *single guide*) entworfen, jeweils in Plasmide kloniert und damit Lentiviren als Vektoren der sgRNAs produziert (Shalem, et al., 2014). Anschließend wurden HepG2-NTCP Zellen, welche Cas9 exprimierten (HepG2-NTCP Cas9), mit den lentiviralen Vektoren transduziert und mit Hilfe von Puromycin Zellpopulationen selektioniert. Der Gen-Knockout der transduzierten Zellen, im Folgenden als HepG2-NTCP RNase L KO1-4 bezeichnet, wurde per Westernblot bestätigt. Im Gegensatz zu den Kontroll-Zellen, konnte bei den HepG2-NTCP RNase L KO1-4 Zellen kaum Protein nachgewiesen werden (Abbildung 17

A). Zur Überprüfung des Effekts des RNase L-Gen-Knockouts auf die Induktion von ISGs nach HDV Infektion, wurden die HepG2-NTCP RNase L KO1-4 Zellen 2 Wochen differenziert, mit HDV infiziert und die viralen Genomäquivalente sowie die ISG Induktion mittels qPCR mit den HepG2-NTCP Cas9 Zellen verglichen. Hierbei zeigte sich, dass HDV alle Zellen infizieren und sich in ihnen replizieren konnte. Der Gen-Knockout von RNase L schien dabei eine leicht verstärkte virale Replikation zu ermöglichen, da die detektierten HDV-Genomäquivalente gegenüber der Kontrolle etwas erhöht waren (Abbildung 17 B). Bei der HDV induzierten ISG Expression konnte bei den HepG2-NTCP RNase L KO Zellen keine deutlich verminderte Expression von IFIT1 und IP-10, verglichen mit der Kontrolle, beobachtet werden. Der Knockout von RNase L hatte 7 Tage nach der Infektion tendenziell sogar eine Steigerung der IFIT1 Expression zur Folge, wohingegen die Induktion von IP-10 bei den HepG2-NTCP RNase L KO 3 und 4 Zellen etwas schwächer war (Abbildung 17 C). Zusammengefasst lässt sich auf Basis dieser Daten keine maßgebliche Rolle der RNase L bei der Aktivierung der angeborenen Immunantwort bei HDV Infektion feststellen.

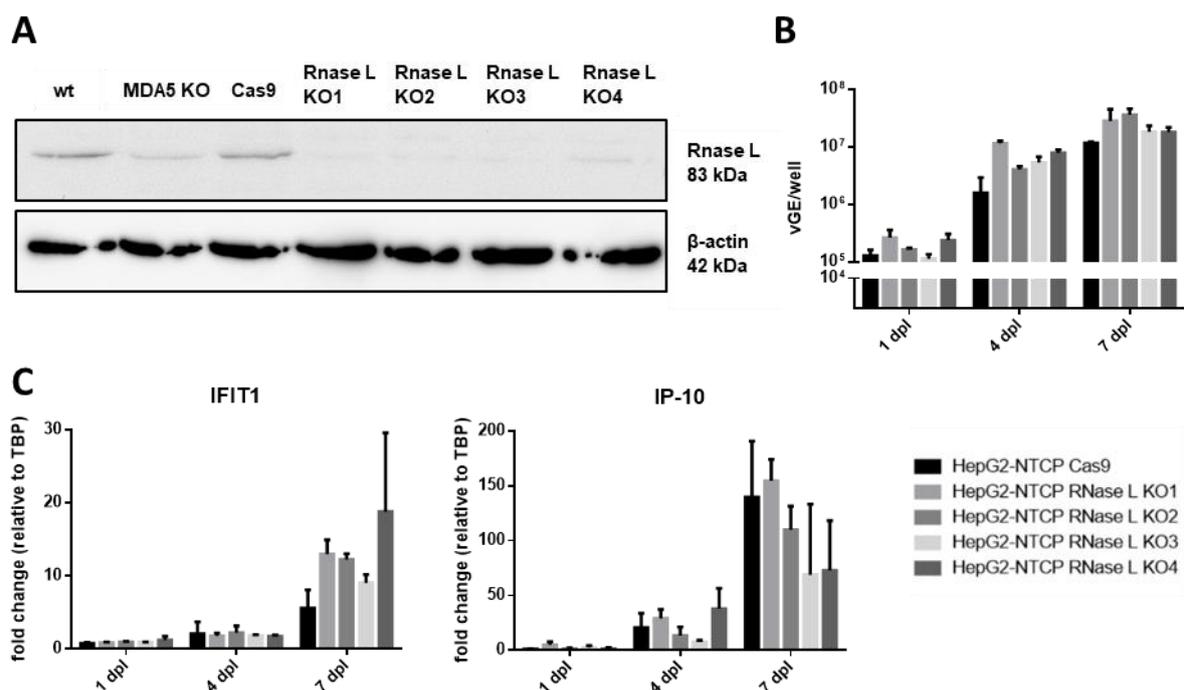


Abbildung 17: Analyse der ISG Expression bei HepG2-NTCP RNase L KO Zellen.

(A) HepG2-NTCP Cas9 Zellen (Cas9) wurden mit 4 verschiedenen Lentiviren zum Knockout von RNase L transduziert und mit Puromycin selektioniert (RNase L KO1-4). Der RNase L Knockout wurde per Westernblot im Vergleich zu HepG2-NTCP MDA5 KO (MDA5 KO) und HepG2-NTCP (wt) Zellen verifiziert. (B) HepG2-NTCP Cas9 sowie HepG2-NTCP RNase L KO1-4 Zellen wurden nach 14 tägiger Differenzierung mit HDV (MOI=20 Virionen pro Zelle) infiziert und die viralen Genomäquivalente pro Well (vGE/well) mittels RT-qPCR 1, 4 und 7 Tage nach Infektion (dpi) absolut quantifiziert. (C) Die Veränderung der mRNA Menge von *IP-10*, und *IFIT1* nach HDV Infektion wurde mittels qPCR als Vielfaches (engl. *fold change*) in Relation zu TBP bestimmt.

2.3 Der Einfluss der HDV induzierten angeborenen Immunantwort auf die HDV- Replikation und Eliminierung

Der vorangegangene Teil dieser Dissertation zeigt die essenzielle Rolle von MDA5 bei der Erkennung der HDV Infektion und Replikation innerhalb der Zelle. Durch diese Erkennung kann die Zelle einen antiviralen Status etablieren, um die verschiedenen Schritte des Replikationszyklus eines Virus zu inhibieren und es damit einzudämmen (Schneider, et al., 2014). Im folgenden Abschnitt soll deshalb der Einfluss der angeborenen Immunantwort auf die Replikation sowie Eliminierung von HDV ermittelt werden.

2.3.1 Die MDA5 abhängige Erkennung von HDV hat keinen Einfluss auf dessen Replikation

Zur Untersuchung des Einflusses der Aktivierung des angeborenen Immunsystems auf die HDV Replikation wurden die unter 2.2.2 beschriebenen HepG2-NTCP basierten MDA5, RIG-I bzw. MAVS Gen-Knockout Zelllinien verwendet. Wenn die HDV Erkennung und die damit verbundene Induktion von ISGs eine Wirkung auf das Virus haben, hätte HDV in HepG2-NTCP MDA5 KO und MAVS KO Zellen aufgrund der ausbleibenden Detektion einen Replikationsvorteil gegenüber wildtypischen HepG2-NTCP und HepG2-NTCP RIG-I KO Zellen. Diese Hypothese konnte durch die Quantifizierung der HDV-Genomäquivalente im zeitlichen Verlauf einer HDV Infektion besagter Zelllinien überprüft werden. Um eine wie in 2.2.2 beobachtete ISG Induktion zu erreichen, wurden die Zellen vor der Infektion 14 Tage differenziert und die Analyse erfolgte 1, 4, 7 und 11 Tage nach Infektion.

Hierbei konnte festgestellt werden, dass sich HDV unabhängig von der Zelllinie und dementsprechend auch unabhängig von seiner Erkennung durch das angeborene Immunsystem replizieren konnte. (Abbildung 18 A) (Altstetter, et al., 2021).

Um diese Beobachtungen zu überprüfen, wurde außerdem eine Immunfluoreszenzfärbung des HDAg der infizierten Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen 5 und 11 Tage nach der Infektion fixiert, permeabilisiert und das HDAg mittels monoklonalem Antikörper HDAg#280 (Buchmann, et al., 2017) bzw. der Zellkern mit dem DNA-Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Die Analyse mittels konfokaler Mikroskopie ergab, dass bereits 5 Tage nach Infektion HDAg in den infizierten Zellen gebildet wurde und somit gefärbt werden konnte (=HDAg positiv). Hierbei war es unerheblich, ob ein Knockout von MDA5, RIG-I oder MAVS vorlag oder ob die wildtypischen HepG2-NTCP Zellen betrachtet wurden, der Anteil HDAg-positiver Zellen variierte kaum. 11 Tage nach der Infektion, also einem Zeitpunkt aktiver angeborener Immunantwort (wie in 2.2.1 und 2.2.2 gezeigt), war der Anteil HDAg gefärbter Zellen, analog zu den per qPCR gemessenen HDV-Genomäquivalenten, ebenfalls gleichmäßig angestiegen.

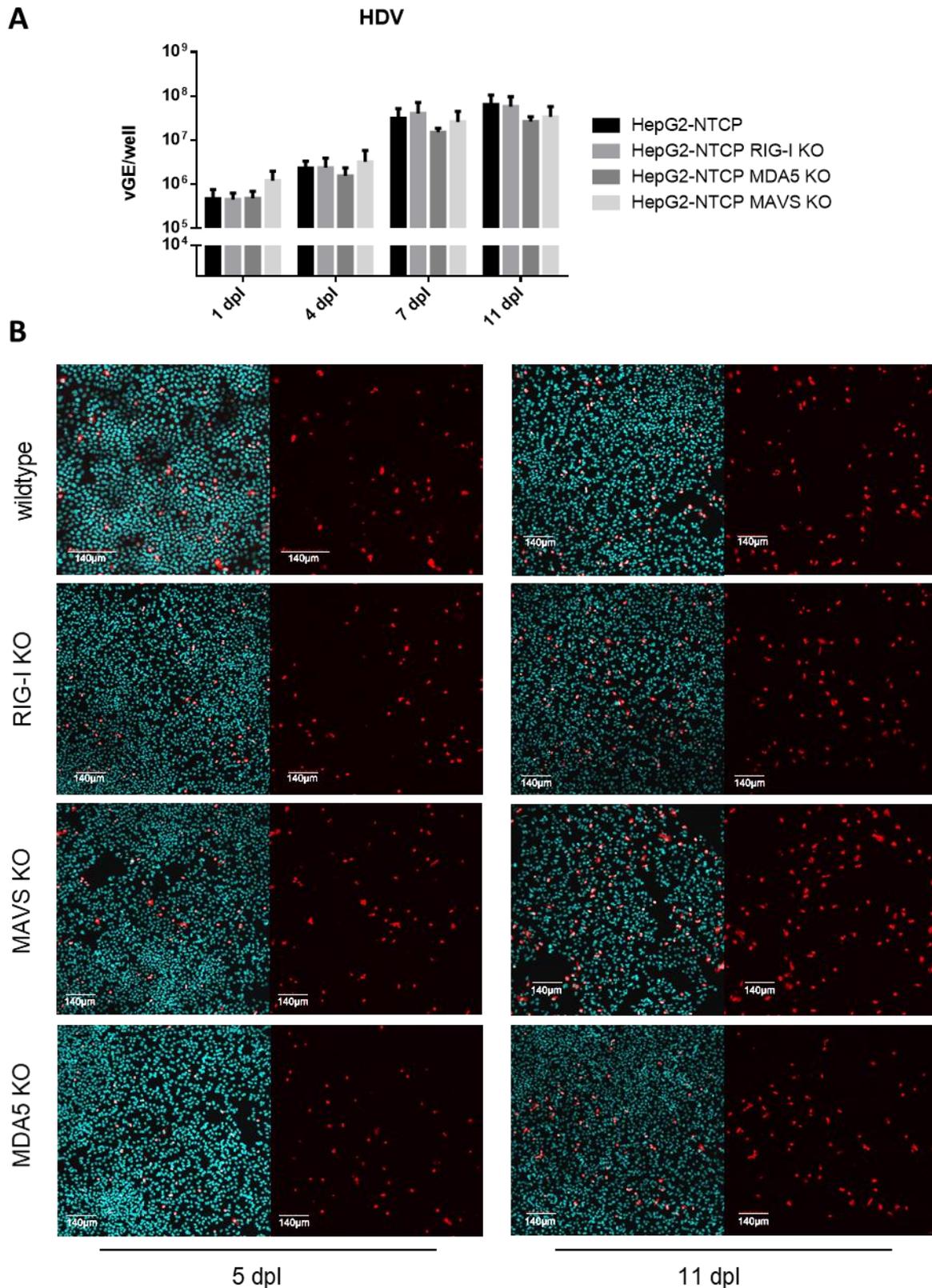


Abbildung 18: Charakterisierung der HDV Infektion von HepG2-NTCP (MDA5- RIG-I- bzw. MAVS KO) Zellen.

HepG2-NTCP (MDA5- RIG-I- bzw. MAVS KO) Zellen wurden nach 14 tägiger Differenzierung (ausgesät in 24-Well Platten) mit HDV infiziert (MOI=20 Virionen pro Zelle). **(A)** Die viralen Genomäquivalente pro Well (vGE/well) wurden mittels RT-qPCR 1, 4, 7 und 11 Tage nach Infektion (dpi) absolut quantifiziert. **(B)** HDAg (rot) und die Zellkerne (blau) wurden 5 und 11 Tage nach Infektion mittels monoklonalem Antikörper HDAg#280+ AlexaFluor594gam bzw. DAPI gefärbt und die Immunfluoreszenzfärbung mittels Konfokalmikroskopie analysiert.

Erneut trugen die Gen-Knockouts von MDA5 und MAVS nicht maßgeblich zu einer Erhöhung der relativen Menge HDAg-positiver Zellen bei (Abbildung 18 B). Dies deutete darauf hin, dass die Erkennung von HDV und die damit verbundene Induktion von ISGs keine Konsequenzen für die Replikation des Virus hatten (Altstetter, et al., 2021).

Als nächstes wurde dieser Versuch mit dem AAV-HDV Vektor wiederholt und die viralen Genomäquivalente 4, 7 und 11 Tage nach Transduktion per qPCR quantifiziert. Aufgrund der hohen Anzahl an Virionen (2×10^4 pro Zelle), welche für die Transduktion eingesetzt wurde, konnten bereits an Tag 4 verhältnismäßig viele virale Genomäquivalente gemessen werden. Dies war zu großen Teilen auf die DNA des AAV-HDV Vektors und nicht auf neu gebildete HDV Genome zurückzuführen. Unabhängig davon war die virale Replikation in der HepG2-NTCP RIG-I KO Zelllinie nicht schwächer als in den HepG2-NTCP MDA5 KO und MAVS KO Zellen (Abbildung 19 A). Um die Limitation der qPCR basierten Quantifizierung der HDV Genome bei der Verwendung des AAV-HDV Vektors zu umgehen, wurde erneut eine Immunfluoreszenzfärbung des HDAg 8 und 12 Tage nach Transduktion durchgeführt. Analog zu den Beobachtungen, die bei der direkten Infektion mit HDV gemacht wurden, konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des Anteils HDAg-positiver Zellen zwischen den jeweiligen Zelllinien observiert werden (Abbildung 19 B) (Altstetter, et al., 2021).

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich festhalten, dass HDV durch die Erkennung durch MDA5 und MAVS keinen Nachteil in Form einer eingeschränkten Replikation hat und die Aktivierung des angeborenen Immunsystems somit keine direkten Konsequenzen für HDV zu haben scheint.

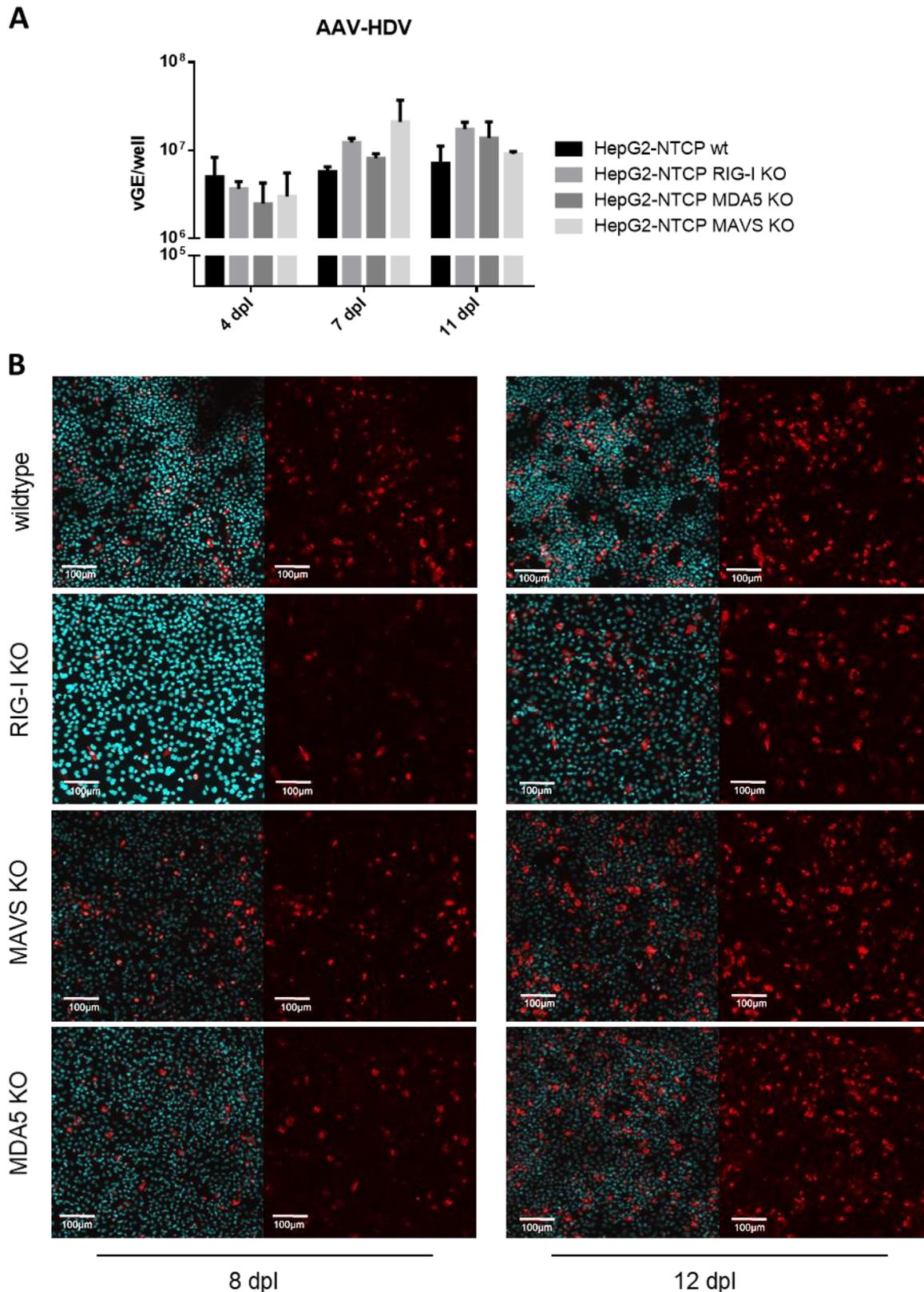


Abbildung 19: Charakterisierung der AAV-HDV Transduktion von HepG2-NTCP (MDA5- RIG-I- bzw. MAVS KO) Zellen.

HepG2-NTCP (MDA5- RIG-I- bzw. MAVS KO) Zellen wurden nach 14 tägiger Differenzierung mit AAV-HDV transduziert (MOI=2x10⁴ Virionen pro Zelle, ausgesät in 24-Well Platten). **(A)** Die viralen Genomäquivalente pro Well (vGE/well) wurden mittels RT-qPCR 4, 7 und 11 Tage nach Transduktion absolut quantifiziert. **(B)** HDVAg (rot) und die Zellkerne (blau) wurden 8 und 12 Tage nach Transduktion mittels monoklonalem Antikörper HDVAg#280+ AlexaFluor594gam bzw. DAPI gefärbt und die Immunfluoreszenzfärbung mittels konfokaler Mikroskopie analysiert.

2.3.2 Die Vorbehandlung mit Poly I:C hat keinen Effekt auf die HDV Replikation

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, hat die während der HDV Infektion ausgelöste angeborene Immunantwort keinen direkten Einfluss auf die HDV Replikation. Da die Induktion von ISGs aufgrund unbekannter Mechanismen erst mit etwa 4 Tagen Verzögerung eintritt, ist die Latenzphase, in der das Virus ungehindert replizieren kann, verhältnismäßig lang. In diesem Zusammenhang sollte im folgenden Teil untersucht werden, welchen Einfluss eine Vorstimulation der Zellen und damit eine von Beginn an vorliegende Aktivierung des angeborenen Immunsystems auf das HDV hat. Hierfür wurden HepG2-NTCP (MDA5 KO) Zellen mit poly I:C transfiziert, Lipofectamin diente als Transfektionsreagenz. Als Agonist von TLR3, RIG-I/MDA5 und PKR, konnte poly I:C die Zellen somit in einen antiviralen Zustand versetzen, bevor mit HDV infiziert wurde. Die Infektion erfolgte 6 Stunden nach der poly I:C Stimulation und die Induktion der ISGs wurde mittels qPCR bestimmt. Anschließend wurden die Zellen nach 1, 3 und 6 Tagen lysiert. Außerdem erfolgte in einem weiteren Ansatz eine zusätzliche poly I:C Stimulation nach 4 Tagen, in diesem Fall wurden die Zellen 1, 4, 7 und 11 Tage nach Infektion lysiert und die HDV-Genomäquivalente quantifiziert (Abbildung 20 A).

6 Stunden nach poly I:C Stimulation wurde in den HepG2-NTCP sowie HepG2-NTCP MDA5 KO Zellen eine gesteigerte Expression von IFNB1, IFIT1 und IP-10 festgestellt, wobei diese in letzteren, bedingt durch das Fehlen von MDA5, etwas geringer ausfiel. Beide Zelllinien konnten also erfolgreich mit poly I:C stimuliert und bereits vor der Infektion mit HDV in einen antiviralen Zustand versetzt werden (Abbildung 20 B). Die Quantifizierung der HDV-Genomäquivalente ergab, dass die HDV Infektion beider Zelllinien trotz vorheriger poly I:C Stimulation nicht beeinträchtigt wurde, da unabhängig von der Behandlung ein Anstieg der Anzahl an viralen Genomäquivalenten von Zeitpunkt zu Zeitpunkt festgestellt wurde. Hierbei schien die Transfektion mit poly I:C für die HDV Replikation nicht inhibierend zu sein (Abbildung 20 C). Auch bei einer erneuten Stimulation 4 Tage nach der Infektion konnte kein Rückgang bei der Anzahl gebildeter HDV-Genomäquivalente, im Vergleich mit der Lipofectamin-Kontrolle, beobachtet werden und HDV konnte sich unabhängig von der Behandlung erfolgreich replizieren. Allerdings konnten bei der einmaligen poly I:C Stimulation insgesamt mehr HDV-Genomäquivalente detektiert werden als bei der zweimaligen Stimulation (Abbildung 20 D) (Altstetter, et al., 2021).

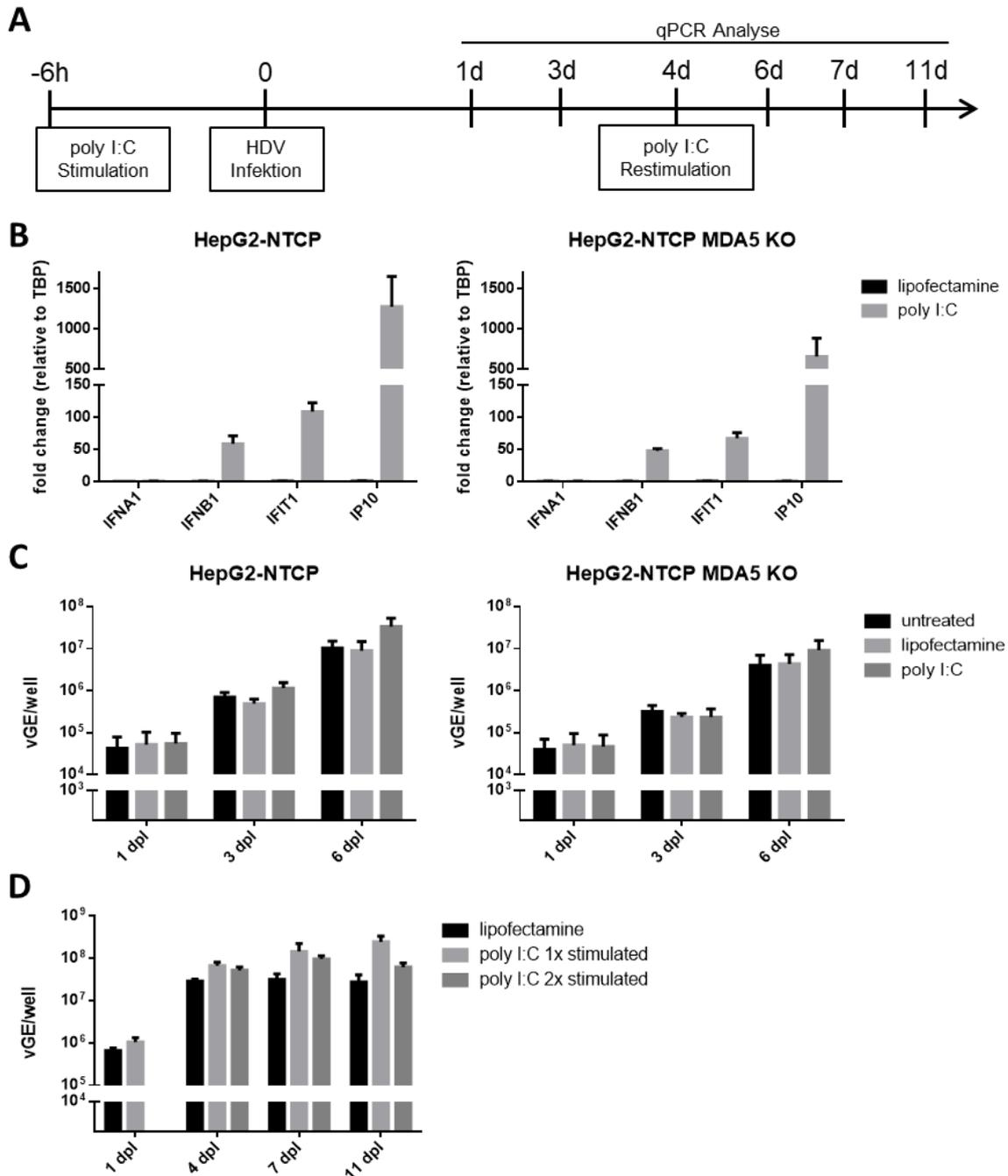


Abbildung 20: Der Einfluss der poly I:C Stimulation auf die HDV Replikation.

(A) HepG2-NTCP (MDA5 KO) Zellen wurden 6 Stunden vor HDV Infektion (MOI=20 Virionen pro Zelle, ausgesät in 24-Well Platten) mit 30 ng poly I:C transfiziert (poly I:C 1x stimulated) bzw. in einer weiteren Gruppe 4 Tage nach Infektion erneut mit poly I:C restimuliert (poly I:C 2x stimulated). (B) Analyse der Veränderung der mRNA Menge von *IFNA1*, *IFNB1*, *IP-10* und *IFIT1* 6 Stunden nach poly I:C Transfektion mittels qPCR als Vielfaches (engl. *fold change*) in Relation zu TBP. (C) Bestimmung der viralen Genomäquivalente pro Well (vGE/well) mittels RT-qPCR 1, 3 und 6 Tage nach Infektion in unbehandelten (untreated), Lipofectamin behandelten (lipofectamine) und poly I:C transfizierten HepG2-NTCP (MDA5 KO) Zellen. (D) Absolute Quantifizierung der viralen Genomäquivalente pro Well (vGE/well) nach einmaliger bzw. zweimaliger Transfektion mit poly I:C

Um die Ergebnisse qPCR basierten Quantifizierung der HDV Replikation zu überprüfen, wurde zusätzlich eine Immunfluoreszenzfärbung des nach HDV Infektion gebildeten HDAg innerhalb stimulierter und nicht-stimulierter HepG2-NTCP Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen nach 4 und 7 Tagen fixiert und das HDAg, wie in 2.3.1 bereits geschildert, gefärbt und analysiert. Die Auswertung ergab, dass innerhalb der ausschließlich mit Lipofectamin behandelten Kontrollgruppe 4 Tage nach Infektion in etwa gleich viele HDAg-positive Zellen wie bei der mit poly I:C stimulierten Gruppe vorlagen (Abbildung 21 A). Verglichen dazu nahm der Anteil HDAg-positiver Zellen 7 Tage nach Infektion insgesamt zu, dabei war es jedoch unerheblich ob die HepG2-NTCP Zellen einmalig bzw. zweimalig mit poly I:C transfiziert wurden oder sie gar nicht stimuliert wurden (Abbildung 21 B).

Auf der Grundlage dieser Beobachtungen lässt sich konstatieren, dass die durch poly I:C ausgelöste Vorstimulation der Zellen und damit eine von Beginn an induzierte angeborene Immunantwort keinen Einfluss auf die HDV Replikation hat (Altstetter, et al., 2021).

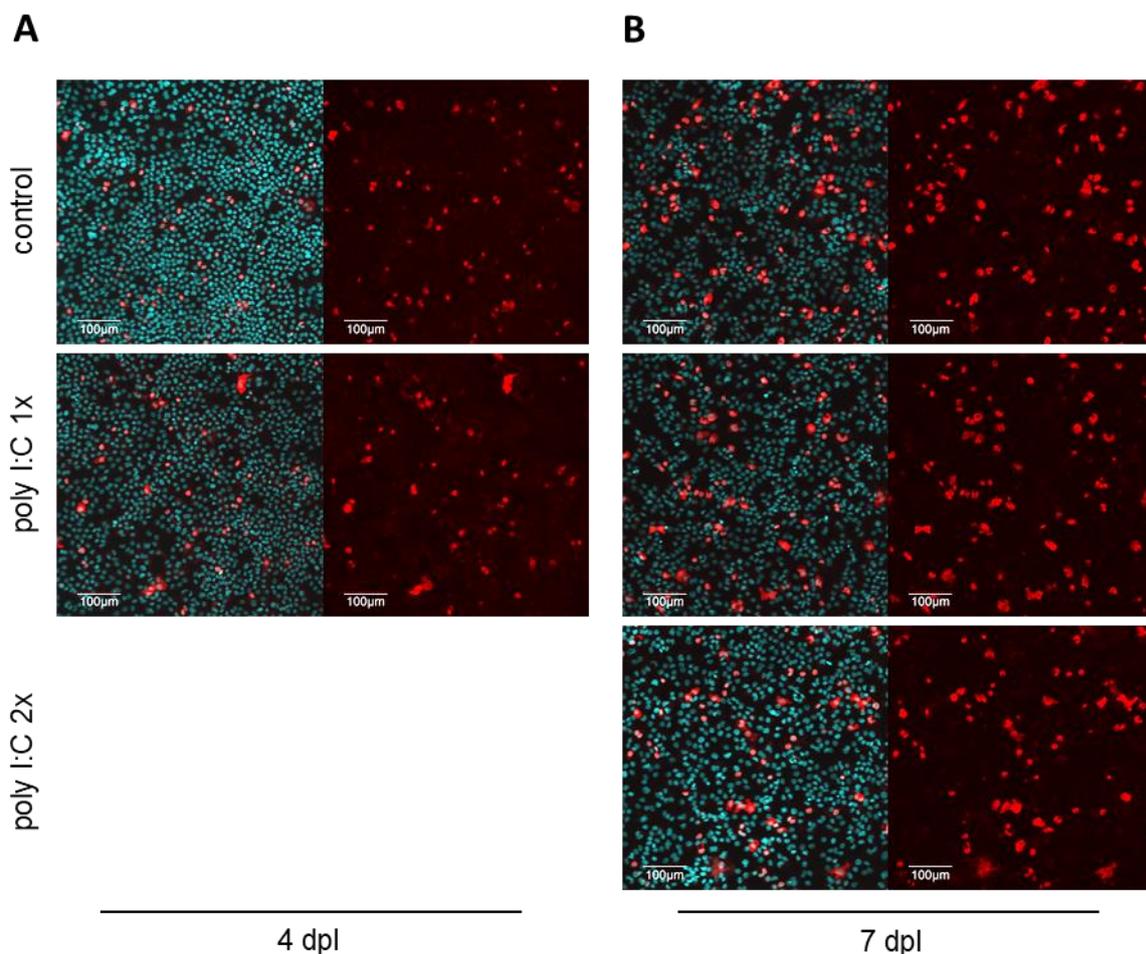


Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung des HDAg in poly I:C stimulierten HepG2-NTCP Zellen. HepG2-NTCP (MDA5 KO) Zellen wurden 6 Stunden vor HDV Infektion (MOI=20 Virionen pro Zelle, ausgesät in 24-Well Platten) mit 30 ng poly I:C transfiziert (poly I:C 1x) bzw. in einer weiteren Gruppe 4 Tage nach Infektion erneut mit poly I:C restimuliert (poly I:C 2x) bzw. nur mit Lipofectamin inkubiert (control). (A) HDAg (rot) und die Zellkerne (blau) wurden 4 und (B) 7 Tage nach HDV Infektion mittels monoklonalem Antikörper HDAg#280+ AlexaFluor594gam bzw. DAPI gefärbt und die Immunfluoreszenzfärbung mittels Konfokalmikroskopie analysiert.

2.3.3 Die Erkennung von HDV führt zu einer verstärkten Eliminierung von HBV-HDV koinfizierten Hepatozyten durch zytotoxische T-Zellen

Nachdem in den beiden vorherigen Abschnitten gezeigt wurde, dass HDV von der infizierten Zelle zwar detektiert wird, diese Erkennung aber keine Auswirkung auf die virale Replikation und die intrazelluläre Eliminierung des Virus hat, sollte im folgenden Teil untersucht werden, ob die Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch HDV einen Einfluss auf die Eliminierung HBV-HDV koinfizierter Hepatozyten durch zytotoxische T-Zellen hat. Vorhergehende Ergebnisse aus unserem Institut zeigten, dass HBV infizierte HepG2-NTCP Zellen durch den Einsatz von T-Zellen, welche mit einem HBV-spezifischen T-Zell-Rezeptor (engl. *T cell receptor*, *TCR*) ausgestattet wurden, effizient eliminiert werden konnten (Wisskirchen, et al., 2019). Des Weiteren konnte durch die Applikation von T-Zellen, die einen für die HBV- Oberflächenproteine spezifischen Chimären Antigen-Rezeptor (engl. *HBV S protein specific chimeric antigen receptor*, *S-CAR*) exprimierten, ein signifikanter antiviraler Effekt in HBV-transgenen Mäusen erzielt werden (Krebs, et al., 2013). Der Einfluss der durch HDV Infektion ausgelösten adaptiven Immunantwort auf das T-Zell-induzierte Abtöten der infizierten Hepatozyten wurde dabei nicht untersucht. Deshalb wurden im folgenden Experiment neben den HepG2-NTCP Zellen auch die HepG2-NTCP MDA5 KO Zellen mit HBV bzw. HBV und HDV (ko-) infiziert und zusammen mit T-Zellen, welche einen für die HBV-Oberflächenproteine spezifischen T-Zell-Rezeptor (4G-TCR) exprimieren, kokultiviert. Die Infektion erfolgte nach 14-tägiger Differenzierung mit einer MOI von 500 Virionen pro Zelle (HBV) bzw. 40 Virionen pro Zelle (HDV). Anschließend wurden die Zellen für 7 Tage inkubiert, um eine Etablierung der Infektion sowie die Induktion der angeborenen Immunantwort im Falle der HBV-HDV Koinfektion zu gewährleisten. Die Analyse der Zellviabilität erfolgte mit Hilfe der xCELLigence Plattform für einen Zeitraum von insgesamt 9 Tagen (Abbildung 22 A). Die Kokultur wurde mit verschiedenen Verhältnissen von Effektor (T-Zelle) zu Zielzelle (Target = Hepatozyt), im Folgenden als E:T-Verhältnis ausgedrückt, durchgeführt.

Bei einem E:T-Verhältnis von 1:1 konnte bei den HBV-HDV koinfizierten HepG2-NTCP Zellen eine stärkere T-Zell induzierte Eliminierung der Zellen beobachtet werden als bei den ausschließlich HBV infizierten Zellen, wohingegen die uninfizierten Zellen weiter proliferierten. Das Gleiche galt auch für ein E:T-Verhältnis von 1:9, hierbei begann die Eliminierung der infizierten Hepatozyten aufgrund der geringeren Anzahl an 4G-TCR transduzierten T-Zellen jedoch deutlich später (Abbildung 22 B). Im Gegensatz dazu spielte es bei den HepG2-NTCP MDA5 KO Zellen keine Rolle, ob diese nur mit HBV oder zusätzlich mit HDV koinfiziert wurden, da zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied in ihrer jeweiligen Eliminierung festzustellen war. Insgesamt setzte das Absterben der HepG2-NTCP MDA5 KO Zellen etwa 25 Stunden später ein und war unabhängig vom E:T-Verhältnis insgesamt klar schwächer als bei den HepG2-NTCP Zellen (Abbildung 22 C). Zusammengefasst führt die durch HDV

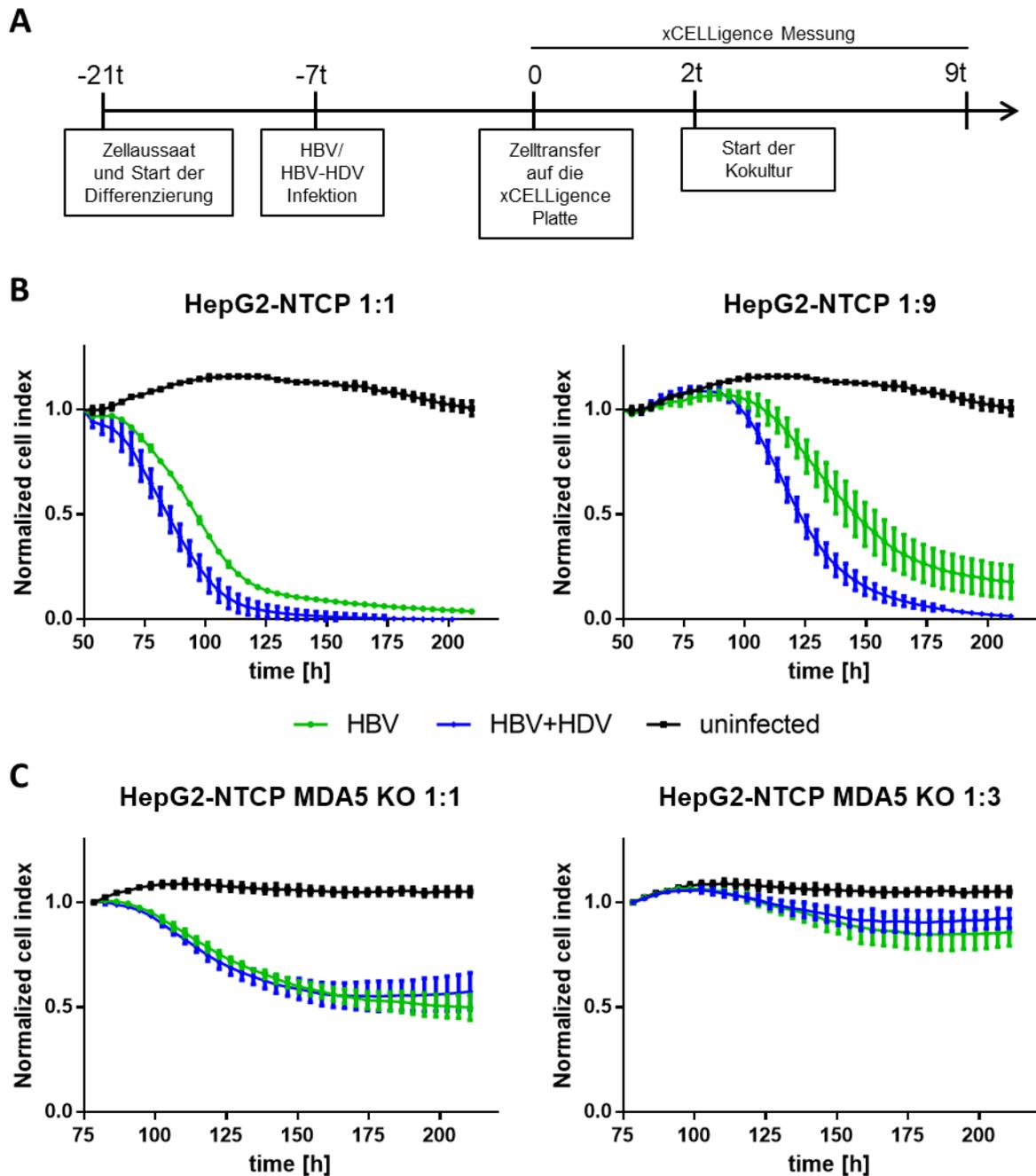


Abbildung 22: Der Einfluss von HDV auf die Eliminierung HBV-HDV koinfizierter HepG2-NTCP (MDA5 KO) Zellen durch 4G-TCR transduzierte T-Zellen.

(A) HepG2-NTCP (MDA5 KO) Zellen wurden nach 14 tägiger Zelldifferenzierung mit HBV (MOI=500 Virionen pro Zelle) bzw. HBV und HDV (MOI: HBV=500 Virionen pro Zelle, HDV=20 Virionen pro Zelle) infiziert und 7 Tage danach auf ein 96-well xCELLigence Platte überführt und für 2 Tage ruhen gelassen. Anschließend wurden 4G-TCR transduzierte T-Zellen in verschiedenen Effektor:Target (E:T)-Verhältnissen auf die adhärennten HepG2-NTCP (MDA5 KO) Zellen gegeben und die Kokultur gestartet. (B) Viabilitätsmessung der HBV bzw. HBV/HDV (ko)-infizierten HepG2-NTCP Zellen (E:T-Verhältnis 1:1 bzw. 1:9) und (C) HepG2-NTCP MDA5 KO Zellen (E:T-Verhältnis 1:1 bzw. 1:3) nach Start der Kokultur im Vergleich zu uninfizierten (uninfected) Zellen. Die Messung wird als normalisierter Zellindex (engl. *normalized cell index*) in Relation zur Zeit in Stunden (engl. *time in hours*, time [h]) nach Aussaat der Zellen angezeigt (Altstetter, et al., 2021).

induzierte angeborene Immunantwort der HepG2-NTCP Zellen zu einer gesteigerten Eliminierung HBV infizierter Zellen durch 4G-TCR exprimierende T-Zellen. Dieser Effekt geht bei den HepG2-NTCP MDA5 KO Zellen verloren, da diese keine Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch HDV ermöglichen (Altstetter, et al., 2021).

In einem weiteren Kokultur-Experiment sollte untersucht werden, ob die HDV Infektion von HepG2-NTCP Zellen auch bei Verwendung von S-CAR transduzierten T-Zellen zu einer verstärkten Abtötung von HBV-HDV koinfizierten Zellen führt. Im Gegensatz zu einem klassischen T-Zell-Rezeptor, wie er auch im vorherigen Experiment verwendet wurde, erkennen Chimäre Antigen-Rezeptoren native Antigene auf der Zelloberfläche und sind daher nicht von einer Peptidpräsentation auf Haupthistokompatibilitätskomplexen (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) abhängig (Harris, et al., 2016). Durch die Nutzung S-CAR exprimierender T-Zellen kann deshalb überprüft werden, ob die verstärkte Eliminierung der infizierten Hepatozyten auf eine durch HDV induzierte Veränderung der Präsentation von prozessierten Peptiden der HBV-Oberflächenproteine auf MHC Molekülen zurückzuführen ist. Hierbei erfolgte der Ablauf des Experiments, mit Ausnahme der Verwendung von S-CAR anstelle von 4G-TCR exprimierender T-Zellen, nach demselben Schema wie zuvor beschrieben.

Die Analyse der Zellviabilität mittels der xCELLigence Plattform ergab, dass HBV-HDV koinfizierte HepG2-NTCP Zellen durch die S-CAR transduzierten T-Zellen stärker eliminiert wurden, als ausschließlich HBV infizierte HepG2-NTCP Zellen. Diese Beobachtung galt sowohl bei einem E:T-Verhältnis von 1:1 als auch 1:3, bei Letzterem setzte das Absterben der Zellen bedingt durch die verringerte Anzahl an T-Zellen jedoch später ein. Insgesamt war die Eliminierung infizierter HepG2-NTCP Zellen durch die 4G-TCR exprimierenden T-Zellen etwas effektiver als das durch die S-CAR T-Zellen (Abbildung 23 A). Der Knockout von MDA5 hatte erneut zur Folge, dass die Viabilität der ausschließlich HBV sowie der HBV-HDV koinfizierten Zellen in gleichem Maße abnahm, ihre Eliminierung somit mit gleicher Effektivität erfolgte. Wie bei der Kokultur mit den 4G-TCR transduzierten T-Zellen zeigte sich, dass die HepG2-NTCP MDA5 KO Zellen insgesamt schlechter abgetötet werden konnten, was auf eine Zelllinien spezifische Eigenschaft hindeutete. Bei einem E:Z-Verhältnis von 1:3 konnte verglichen mit uninfizierten Zellen kaum noch ein Absterben festgestellt werden, hierbei war die Eliminierung HBV monoinfizierter, verglichen mit HBV-HDV koinfizierter Zellen, sogar effektiver (Abbildung 23 B) (Altstetter, et al., 2021).

Zusammengefasst lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass die Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch HDV die Eliminierung HBV-HDV koinfizierter Hepatozyten durch zytotoxische T-Zellen verstärkt. Dieser, durch die HDV Infektion herbeigeführte Effekt, scheint dabei nicht von einer veränderten Expression von MHC Molekülen bzw. von einer veränderten Peptidpräsentation abzuhängen.

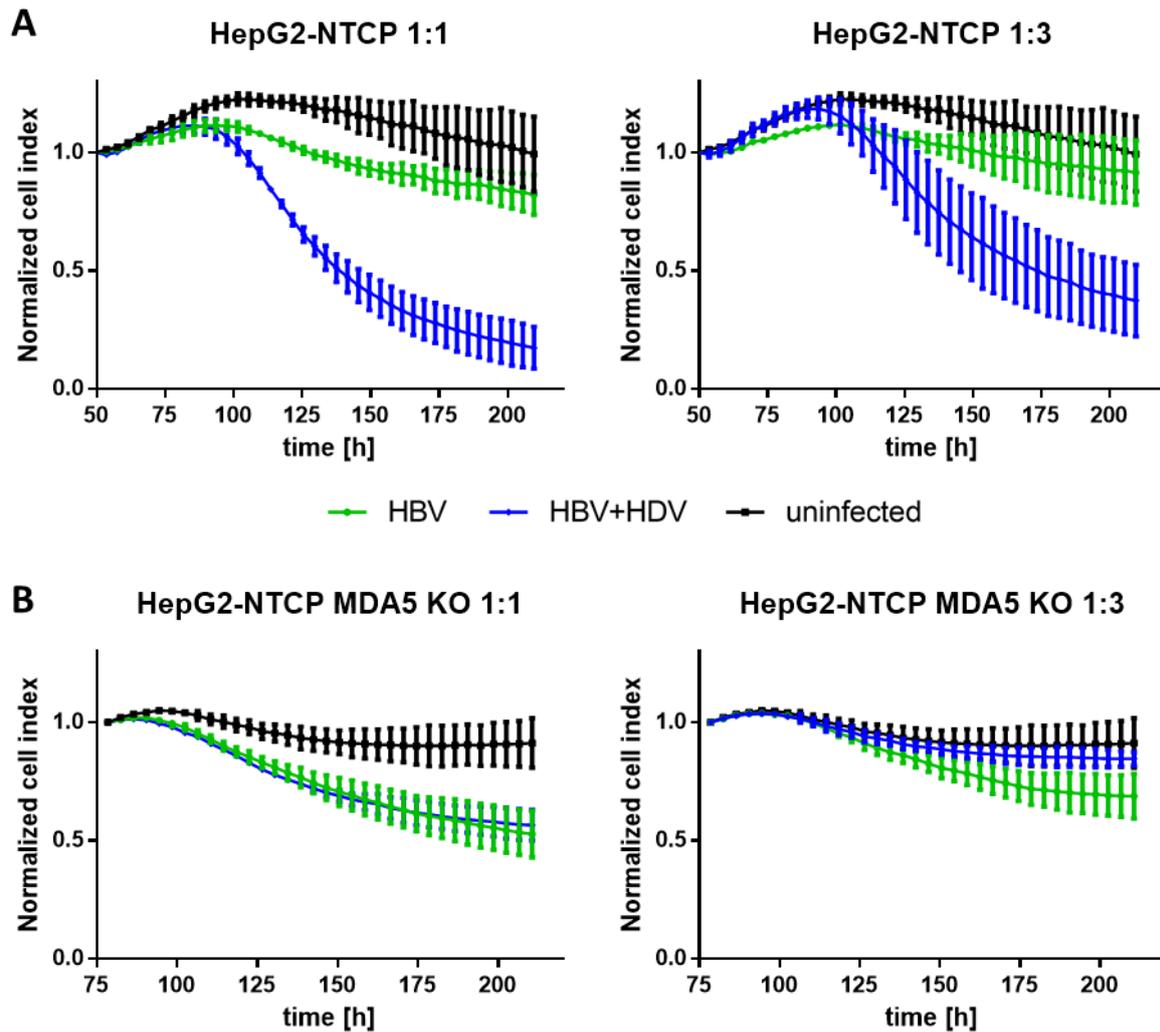


Abbildung 23: Der Einfluss von HDV auf die Eliminierung HBV-HDV koinfizierter HepG2-NTCP (MDA5 KO) Zellen durch S-CAR transduzierte T-Zellen.

HepG2-NTCP (MDA5 KO) Zellen wurden nach 14 tägiger Zelldifferenzierung mit HBV (MOI=500 Virionen pro Zelle) bzw. HBV und HDV (MOI: HBV=500 Virionen pro Zelle, HDV=20 Virionen pro Zelle) infiziert und 7 Tage danach auf ein 96-well xCELLigence Platte überführt und für 2 Tage ruhen gelassen. Anschließend wurden S-CAR transduzierte T-Zellen in verschiedenen E:T-Verhältnissen auf die adhärennten HepG2-NTCP (MDA5 KO) Zellen gegeben und die Kokultur gestartet. **(A)** Viabilitätsmessung der HBV bzw. HBV/HDV (ko-)infizierten HepG2-NTCP Zellen (E:T-Verhältnis 1:1 bzw. 1:3) und **(B)** HepG2-NTCP MDA5 KO Zellen (E:T-Verhältnis 1:1 bzw. 1:3) nach Start der Kokultur im Vergleich zu uninfizierten (uninfected) Zellen. Die Messung wird als normalisierter Zellindex (engl. *normalized cell index*) in Relation zur Zeit in Stunden (engl. *time in hours*, time [h]) nach Aussaat der Zellen angezeigt (Altstetter, et al., 2021).

2.4 Die Charakterisierung muriner HDV-Infektionsmodelle

Nachdem alle bisherigen Experimente in humanen Hepatomazelllinien durchgeführt wurden, sollte die HDV Infektion auch in murinen Hepatozyten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht werden. Maushepatozyten sind per se nicht mit HDV infizierbar, da das murine NTCP (mNTCP) keine Aufnahme des Virus in die Zelle zulässt. Es wurde jedoch gezeigt, dass murine Hepatozyten bei künstlicher Expression des humanen NTCPs (hNTCP) für eine HDV Infektion empfänglich werden (Lempp, et al., 2016). Dementsprechend sollte zunächst die Infektion der murinen AML12 Leberzelllinie, sowie von primären Maushepatozyten mit HDV überprüft werden und anschließend *in vivo* Experimente durchgeführt werden.

2.4.1 HDV kann AML12 basierte Zellen und primäre Maushepatozyten nicht infizieren

Um die HDV Infektion muriner Leberzellen zu testen, wurden neben hNTCP transgener AML12 Zellen (AML12-NTCP) auch native AML12 Kontrollzellen mit HDV inokuliert. Außerdem wurde in Kooperation mit Dr. Martin Mück-Häusl zur Expression von hNTCP in AML12 Zellen ein adenoviraler Vektor der dritten Generation (Hd-Ad, engl. *Helper-dependent adenoviral vector*) verwendet. Die Transduktion dieses Hd-Ad-NTCP Vektors zur Expression des hNTCPs wurde bereits erfolgreich in primären Makaken-Hepatozyten durchgeführt (Burwitz, et al., 2017) und erfolgte 3 Tage vor der Infektion mit HDV. Die Zellen wurden 1, 4, 7 und 11 Tage nach der Infektion lysiert und die HDV-Genomäquivalente mittels qPCR bestimmt.

Dabei zeigte sich, dass keine Zunahme der viralen Genomäquivalente bei den AML12-NTCP erfolgte, da deren Anzahl von Tag 1 bis Tag 11 nach Infektion in etwa konstant war. Für die AML12 Kontrollzellen, sowie die mit Hd-Ad-NTCP transduzierten AML12 Zellen wurde tendenziell eine Abnahme der HDV-Genomäquivalente von Zeitpunkt zu Zeitpunkt beobachtet. Da weder in den AML12-NTCP noch in den Hd-Ad-NTCP transduzierten AML12 Zellen eine Zunahme viraler Genomäquivalente festgestellt werden konnte, schien keine HDV Replikation abgelaufen zu sein (Abbildung 24 A). Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurde außerdem eine Immunfluoreszenzfärbung des HDAg in AML12-NTCP Zellen 4, 7 und 11 Tage nach der Inokulation mit HDV durchgeführt. Die Analyse mittels Konfokalmikroskopie bestätigte die Ergebnisse der qPCR, da sich die Zellen nicht positiv auf das HDAg färben ließen (Abbildung 24 B). Neben den AML12 Zellen wurden des Weiteren primäre Maushepatozyten mit dem Hd-Ad-NTCP transduziert, um diese permissiv für eine Infektion mit HDV zu machen. Die Transduktion erfolgte 3 Tage vor der Inokulation mit HDV, was eine ausreichende Expression des hNTCP ermöglichen sollte. Die Auswertung der qPCR der HDV-Genomäquivalente nach 1, 4 und 7 Tagen nach Infektion ergab, dass keine HDV Replikation stattgefunden hat, da die Anzahl viraler Genomäquivalente im zeitlichen Verlauf stetig abnahm (Abbildung 22 C).

Somit konnte, im Gegensatz zu den Berichten anderer Arbeitsgruppen, keine Infektion und Replikation von HDV in murinen Hepatozyten bestätigt werden.

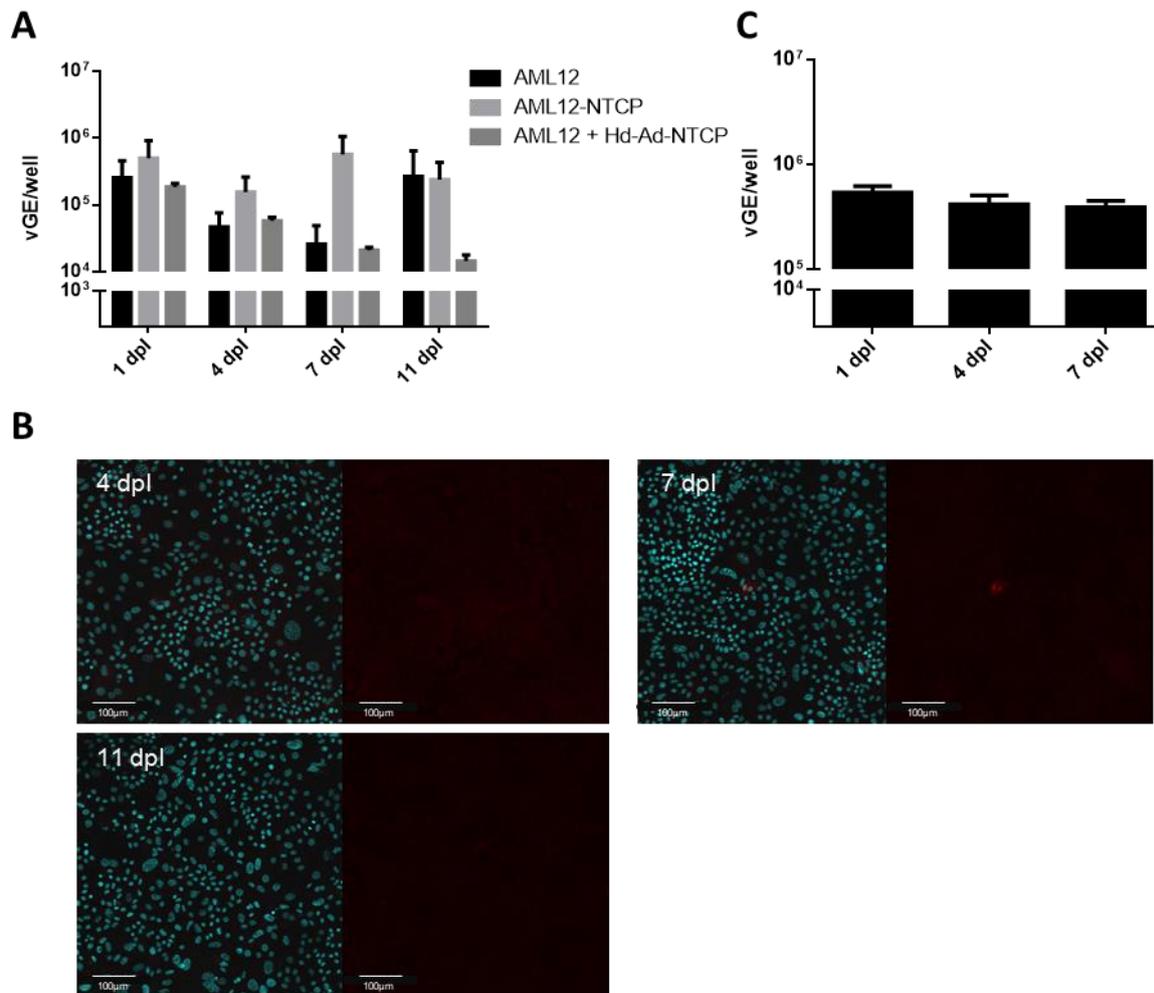


Abbildung 24: Charakterisierung der HDV Infektion von AML12 basierten Zellen und primären Maushepatozyten.

(A) AML12 (-NTCP) Zellen und mit Hd-Ad-NTCP Vektor transduzierte AML12 Zellen wurden mit HDV (MOI=20 Virionen pro Zelle) inokuliert und die viralen Genomäquivalente pro Well (vGE/well) mittels RT-qPCR 1, 4, 7 und 11 Tage nach Infektion (dpi) absolut quantifiziert. Die Transduktion mit Hd-Ad-NTCP erfolgte 3 Tage vor der Infektion mit HDV. (B) Immunfluoreszenzfärbung von HDV (rot) und Zellkernen (blau) der mit HDV inokulierten AML12-NTCP Zellen 4, 7, und 11 Tage nach Infektion mittels monoklonalem Antikörper HDV#280+ AlexaFluor594gam bzw. DAPI. (C) RT-qPCR gestützte Quantifizierung der vGE/well von Hd-Ad-NTCP transduzierten primären Maushepatozyten 1, 4 und 7 Tage nach Inokulation mit HDV (MOI=20 Virionen pro Zelle). Die Transduktion mit Hd-Ad-NTCP erfolgte 3 Tage vor Inokulation mit HDV.

2.4.2 In h/mNTCP transgenen Mäusen ist keine dauerhafte HDV Infektion möglich

Trotz des nicht erfolgreichen Versuchs der Infektion von AML12 - und primären Mausleberzellen sollte versucht werden, *in vivo* eine HDV Infektion von Mäusen zu etablieren. Aus der Literatur war bekannt, dass transgene Mäuse, die das humane NTCP (hNTCP) exprimierten, eine schwache HDV Infektion erlaubten, welche allerdings nach 20 Tagen nicht mehr detektierbar war (He, et al., 2015). In unserem Institut wurden deshalb für das NTCP humanisierte Mäuse erzeugt, welche im Folgenden als h/mNTCP Mäuse bezeichnet werden.

Im Unterschied zu den von *He et al.* beschriebenen Mäusen, handelte es sich beim NTCP der h/mNTCP Tiere um ein chimäres Molekül, welches nur den für die Aufnahme von HBV und HDV benötigten Teil des humanen NTCP (Aminosäuren 84-87) besaß und der Rest des Proteins unverändert blieb. Da eine Ausbreitung von HDV ohne die Oberflächenproteine von HBV nicht möglich war, wurde in Kooperation mit Dr. Julia Festag außerdem ein AAV-HBV Vektor verwendet (Hasreiter, 2018). Dieser wurde h/mNTCP transgenen Mäusen 14 Tage vor HDV Infektion intravenös (i.v.) verabreicht, um eine HBV Infektion nachzuahmen. Anschließend wurde den Tieren HDV i.v. injiziert und 3, 7, 10, 14 und 28 Tage danach jeweils die Leber zur RNA-Isolation entnommen. Außerdem wurde den Mäusen Blut abgenommen, um eine systemische Ausbreitung des HDV in den mit AAV-HBV transduzierten Tieren detektieren zu können (Abbildung 25 A).

Die HDV-Genomäquivalente wurden wie zuvor beschrieben per qPCR quantifiziert. Dabei wurde mit zunehmender Infektionsdauer sowohl für HDV mono- als auch für HBV-HDV koinfizierte Mäuse ein Rückgang der viralen Genomäquivalente in der Leber beobachtet, welche ab Tag 14 kaum und ab Tag 28 nicht mehr detektierbar waren (Abbildung 25 B). Im Serum konnten nur bis Tag 7 nach HDV Injektion Genomäquivalente gemessen werden, hierbei lag die Anzahl in den zusätzlich mit AAV-HBV transduzierten Tieren nur unwesentlich über der in den HDV monoinfizierten, in denen keine Ausbreitung in das Serum möglich war (Abbildung 25 C). Um eine mögliche Induktion angeborener Immunität zu bestimmen, wurde die aus den Leberlysaten gewonnene RNA zur Quantifizierung von ISGs verwendet. Wie die Analyse der OAS1 und IP-10 Expression ergab, fand über den gesamten Zeitraum der Untersuchung keine Induktion des angeborenen Immunsystems, weder nach HDV-Monoinfektion noch nach HBV-HDV Koinfektion, statt (Abbildung 25 D). An Tag 7 nach Injektion von HDV wurde in Kooperation mit Dr. Marc Ringelhan eine immunhistochemische Färbung auf das HDAg von Leberschnitten der h/mNTCP transgenen Mäuse durchgeführt. Die Analyse zeigte eine vereinzelte braune Färbung der Nuclei innerhalb der Hepatozyten HBV-HDV koinfizierter Mäuse, auf die Gesamtzahl an Leberzellen gesehen war diese Anzahl allerdings als äußerst gering zu betrachten (Abbildung 25 E).

Zusammengefasst konnte somit lediglich eine transiente Infektion der h/mNTCP transgenen Mäuse mit HDV erzielt werden, welche selbst bei gleichzeitig vorhandenen HBV-Oberflächenproteinen nicht zu einer systemischen Ausbreitung des HDV führte und keine angeborene Immunantwort in den Leberzellen hervorrufen konnte.

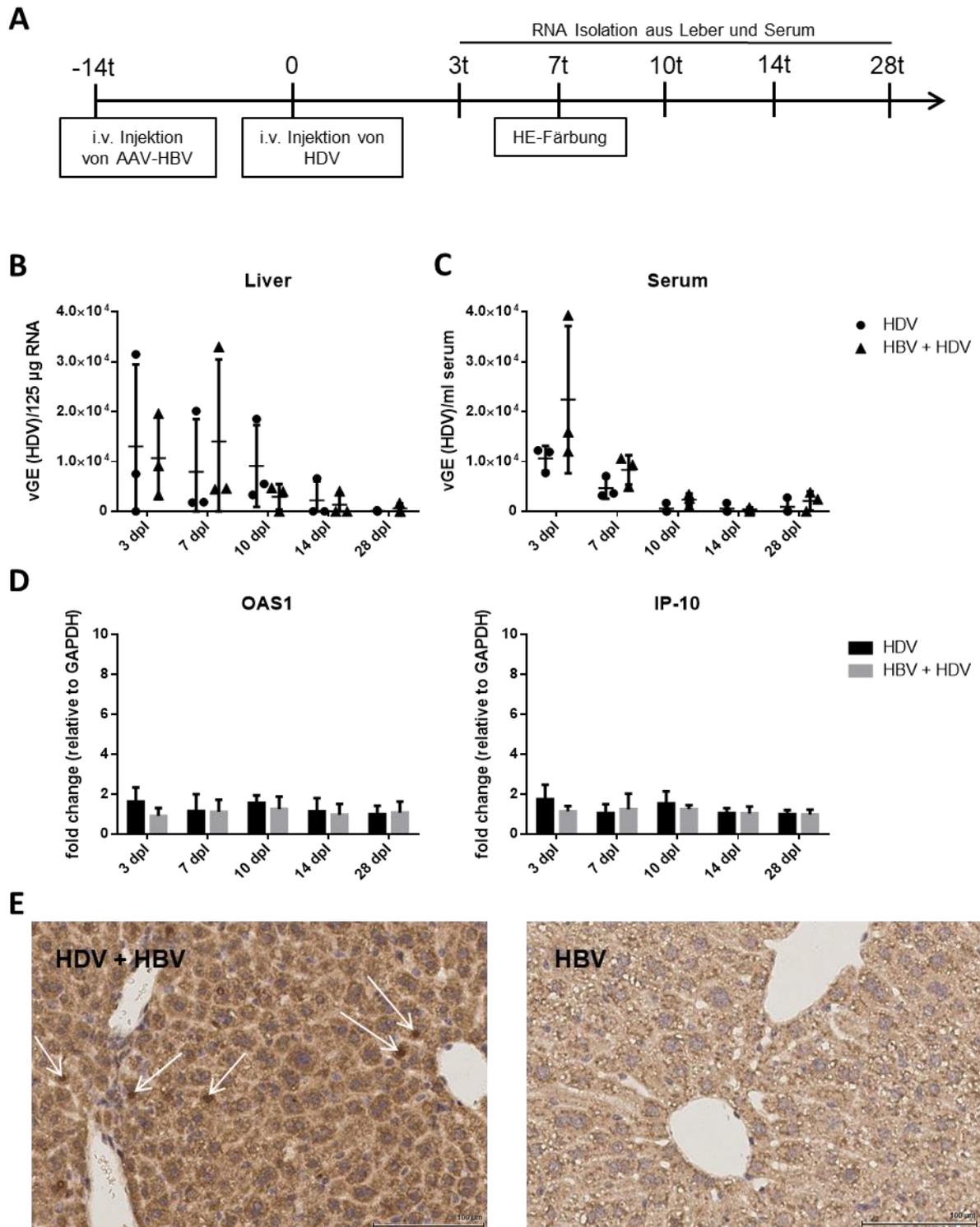


Abbildung 25: Charakterisierung der HDV Infektion von h/mNTCP transgenen Mäusen.

(A) h/mNTCP transgene C57BL/6 Mäuse wurden 14 Tage vor i.v. Injektion mit HDV (2×10^7 vGE) teilweise mit AAV-HBV (1×10^{10} vGE) i.v. injiziert. Die Lebern wurden 3, 7, 10, 14 und 28 Tage nach der Injektion von HDV entnommen. Außerdem wurden den Mäusen an selben Tagen Blut abgenommen und aus Lebern und Serum die RNA extrahiert. (B) Quantifizierung der HDV-Genomäquivalente in Leber (C) und Serum der h/mNTCP Mäuse mittels RT-qPCR. (D) Analyse der mRNA Menge von *OAS1* und *IP-10* in der Leber mittels qPCR als Vielfaches (engl. *fold change*) in Relation zur Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Expression. (E) HE-Färbung des HDaAg von Leberschnitten von HDV+AAV-HBV bzw. AAV-HBV inokulierten Mäusen 7 Tage nach Injektion. Die weißen Pfeile markieren die positiv braun gefärbten Nuclei HDV infizierter Hepatozyten.

2.4.3 In Mäusen führt der Gen-Knockout von MDA5 zu keiner erhöhten Empfänglichkeit gegenüber HDV

Nachdem in h/mNTCP transgenen Mäusen keine langanhaltende Infektion mit HDV erzielt werden konnte, wurde untersucht, ob ein Gen-Knockout von MDA5 zu einer verlängerten HDV Infektion *in vivo* führt. In MAVS defizienten Mäusen wurde, verglichen mit Wildtyp Mäusen, eine gesteigerte Anzahl an HDV positiven Zellen nach Transduktion mit AAV-HDV berichtet (Suárez-Amarán, et al., 2017). Aufgrund dessen wurde vermutet, dass bei MDA5 defizienten Tieren ein ähnlicher Effekt auftritt. Da diese Tiere kein hNTCP exprimierten, wurde zur Infektion mit HDV in erneuter Kooperation mit Dr. Martin Mück-Häusl der Hd-Ad-NTCP Vektor eingesetzt. Neben der Injektion von HDV wurde zum Vergleich ebenfalls jener, von Suárez-Amarán et al. und unter 2.1.3 beschriebene, AAV-HDV Vektor zur Transduktion des HDV Genoms in die Hepatozyten der MDA5 Knockout Mäuse verwendet. Die Transduktion mit dem Hd-Ad-NTCP zur Expression des hNTCPs in Wildtyp und MDA5 Knockout Mäusen erfolgte 7 Tage vor der Verabreichung von HDV. Als Kontrolle wurden zusätzlich MDA5 Mäuse ohne vorherige Transduktion durch den Hd-Ad-NTCP eingesetzt, in denen keine HDV Infektion stattfinden konnte. Weitere 7 und 14 Tage nach der Injektion von HDV bzw. AAV-HDV wurden die Lebern der Wildtyp und MDA5 Knockout Mäuse entnommen, um daraus RNA für die qPCR basierte Quantifizierung der HDV-Genomäquivalente zu extrahieren (Abbildung 26 A).

Im Vergleich zu den Wildtyp- und Kontrolltieren zeigte sich, dass durch den MDA5 Knockout keine HDV Infektion und Replikation ermöglicht wurde, da die Anzahl der HDV-Genomäquivalente in dem MDA5 Knockout Tieren nicht von der Kontrollgruppe abwich. (Abbildung 26 B). Die Transduktion des HDV Genoms durch den AAV-HDV Vektor funktionierte wie von Suárez-Amarán et al. beschrieben, jedoch war der Unterschied zwischen den Wildtyp und MDA5 Knockout Mäusen sehr gering und ließ keine Rückschlüsse auf einen Replikationsvorteil für HDV bei fehlendem MDA5 zu (Abbildung 26 C).

Insgesamt konnte somit auch durch das Ausschalten von MDA5 als Rezeptor zur Detektion der HDV Replikation keine langanhaltende Infektion von HDV in Mäusen etabliert werden. Des Weiteren scheint bei dem AAV-HDV vermittelten HDV Genomtransfer in die Leberzelle der Knockout von MDA5 keinen klaren Vorteil bei der HDV Genomreplikation *in vivo* zu bringen.

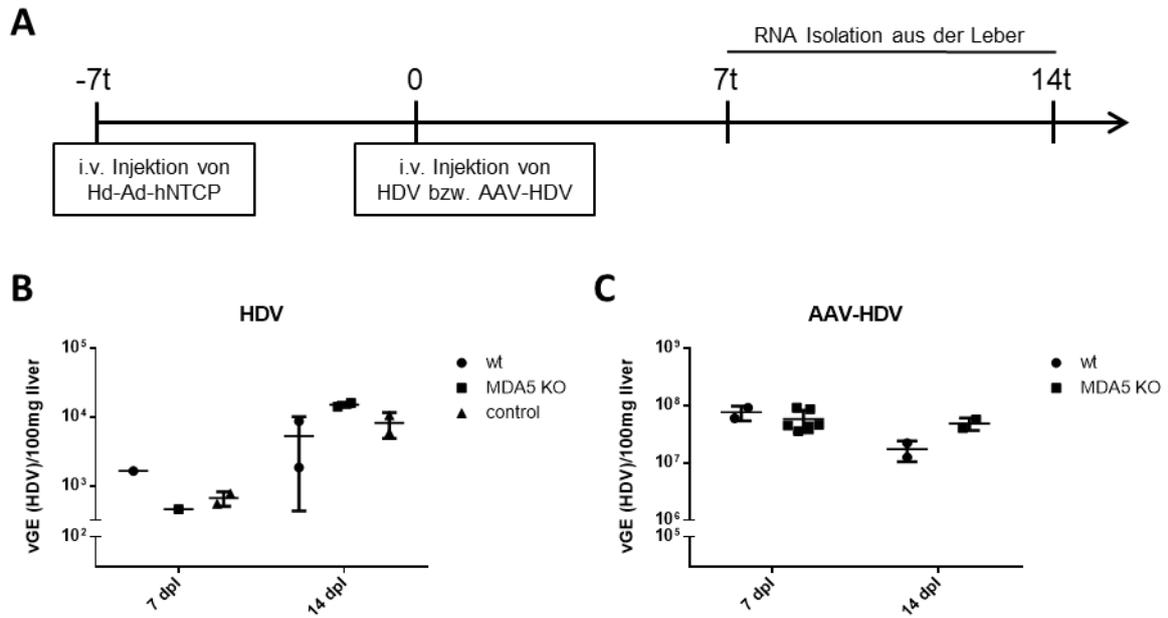


Abbildung 26: Der Einfluss des MDA5 Knockouts auf die HDV Infektion *in vivo*.

(A) Wildtyp (wt) und MDA5 Knockout (MDA5 KO) C57BL/6 Mäuse wurden 7 Tage vor i.v. Injektion mit HDV (6×10^7 vGE) mit Hd-Ad-hNTCP transduziert bzw. ausschließlich mit AAV-HDV (2×10^{10} vGE) injiziert. Außerdem wurde eine Kontrollgruppe mit HDV injiziert ohne vorherige Verabreichung des Hd-Ad-hNTCP (control). Anschließend wurden die Lebern 7 und 14 Tage nach HDV bzw. AAV.HDV Injektion entnommen und daraus RNA isoliert. **(B)** Quantifizierung der HDV-Genomäquivalente in der Leber HDV injizierter **(C)** und AAV-HDV injizierter Mäuse mittels RT-qPCR.

3. Diskussion

3.1 Etablierung und Charakterisierung von *in vitro* HDV Infektionsmodellen

Zu Beginn dieser Doktorarbeit war bekannt, dass HDV im Gegensatz zu HBV vom angeborenen Immunsystem erkannt wird und die Produktion von Interferonen auslösen kann (Giersch, et al., 2015). Allerdings blieben die Konsequenzen der HDV induzierten angeborenen Immunität für das Immunsystem dabei weitgehend ungeklärt, gleiches galt für die Auswirkung der Erkennung auf die HDV Replikation und die Interaktion zwischen HBV und HDV. Deshalb sollte zunächst der Rezeptor identifiziert werden, welcher für die HDV Erkennung durch das angeborene Immunsystem verantwortlich ist, und anschließend die Konsequenzen der HDV Erkennung und die damit verbundene Aktivierung des angeborenen Immunsystems untersucht werden. Somit war es zunächst essenziell, ein reproduzierbares Protokoll zur Infektion von Hepatozytenzelllinien mit HDV zu etablieren, welches ein verlässliches Auslesen angeborener Immunität als Reaktion auf die HDV Infektion ermöglichte.

3.1.1 HDV induziert die angeborene Immunität in humanen Hepatomazelllinien

Während meiner Masterarbeit (Altstetter, 2016) wurde bereits ein vorläufiges Infektionsprotokoll von HepG2-NTCP und HepaRG Zellen mit HDV etabliert, das ein erstes Auslesen Interferon stimulierter Gene (ISGs) ermöglichte. Dabei eignet sich die Quantifizierung der Expression von ISGs sehr gut zur Charakterisierung der durch HDV induzierten angeborenen Immunität, da diese direkt auf die Erkennung einer viralen Infektion zurückzuführen ist (Schneider, et al., 2014).

Es konnte gezeigt werden, dass eine HDV Infektion in HepaRG bzw. HepG2-NTCP Zellen eine Induktion von ISGs nach sich zieht (Altstetter, 2016) (Alfaiate, et al., 2016) (Zhang, et al., 2018). Allerdings zeigte sich, dass eine ISG Induktion in HDV infizierten HepG2-NTCP Zellen sehr gering bzw. nicht verlässlich reproduzierbar war, wenn diese vor der HDV Infektion nur für 2 Tage differenziert wurden. Erst die Verlängerung der Differenzierungszeit auf 14 Tage, welche auch bei HepaRG Zellen durchgeführt wird, führte zu einer gesteigerten Expression der ISGs (Altstetter, et al., 2021). Der Effekt der verlängerten Differenzierung auf die Erkennung von HDV wird im Abschnitt 3.2.2 weiterführend diskutiert.

Durch diese Maßnahme konnte eine ISG-Induktion durch HDV-Infektion reproduzierbar beobachtet werden, jedoch war auffällig, dass die Induktion der ISGs erst deutlich zeitversetzt zum Infektionsbeginn einsetzte und erst an Tag 7 nach Infektion ein Maximum erreichte. Dabei ist eines der besonderen Merkmale des angeborenen Immunsystems normalerweise die Schnelligkeit, mit welcher es auf eindringende Pathogene reagiert, da die dafür notwendigen PRRs und Proteine der Signaltransduktion bereits vor einer Infektion vorliegen (Schneider, et

al., 2014). So kann bei direkter Applikation von Typ I und III Interferonen in Hepatozyten eine Zunahme der ISG Expression bereits innerhalb weniger Stunden anhand gesteigerter mRNA Mengen gemessen werden kann (Bolen, et al., 2014). Auch bei anderen viralen Infektionen kann eine ISG Induktion bereits nach 24 bis 48 Stunden nachgewiesen werden, wie Studien für das Influenza A Virus und Sendai Virus zeigen (Crotta, et al., 2013) (Gitlin, et al., 2010). Eine mögliche Erklärung für die späte ISG Induktion nach Infektion mit HDV liefert zum einen die Infektionsrate, welche bei der verwendeten MOI=20 Virionen pro Zelle über den gesamten Zeitraum der Infektion nicht über 10 -15% liegt. Damit ist sie möglicherweise zu gering, um auf Grundlage der Gesamtzahl der Zellen einen signifikanten Anstieg der ISG Expression zu einem frühen Zeitpunkt detektieren zu können. Zum anderen ist es möglich, dass in der Zelle durch virale Replikation zuerst eine gewisse Menge an HDV RNA akkumuliert werden muss, damit die PRRs aktiviert werden. Dabei ist denkbar, dass die RNA Menge zum Zeitpunkt des initialen HDV Eintritts noch nicht ausreicht, um den Schwellenwert zur Aktivierung der PRRs zu überschreiten und dadurch eine angeborene Immunantwort auszulösen (Altstetter, et al., 2021).

Um die Kinetik der ISG Induktion weiter zu untersuchen und zu überprüfen ob ein bestimmter Schwellenwert von PAMPs im Zusammenhang mit der HDV-Replikation überschritten werden muss, bevor das angeborene Immunsystem aktiviert wird, wurden die Zellen mit verschiedenen MOIs (engl. *multiplicities of infection*) infiziert. Es zeigte sich, dass die verwendete MOI, dabei wenig Einfluss auf die Induktion der ISGs hat. So konnte lediglich für IP-10 bereits 3 Tage nach Infektion eine gesteigerte Expression bei einer MOI von 20 und 50 Virionen pro Zelle festgestellt werden, die allerdings einen Tag später wieder abgenommen hatte. Selbst bei einer MOI=2 Virionen pro Zelle wurde die IP-10 Expression 7 Tage nach Infektion deutlich gesteigert und lag auf demselben Niveau wie bei der Infektion mit einer MOI=50 Virionen pro Zelle und somit einer initial 25-fach größeren Anzahl an HDV Virionen. Auf Grundlage dieser Beobachtungen konnte konstatiert werden, dass die ISG Induktion nicht von der initialen Anzahl an HDV Partikeln, sondern von einer aktiven viralen Replikation abhängt (Altstetter, et al., 2021). Auch *Zhang et al.* berichten, dass die eine aktive HDV RNA Replikation zur Stimulation des angeborenen Immunsystems notwendig ist, da durch UV-Strahlung inaktivierte HDV Virionen keinen Effekt auf die Expression von Interferonen hat (Zhang, et al., 2018). Darüber hinaus sekretieren HDV infizierte Zellen extrazelluläre Vesikel, welche nur bei vorangegangener aktiver viraler Replikation innerhalb der infizierten Zellen, zu einer Produktion proinflammatorischer Zytokine durch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. *peripheral blood mononuclear cell, PBMC*) sowie Makrophagen führen (Jung, et al., 2020b).

Interessanterweise ist es für die HDV Infektionseffizienz möglicherweise sogar förderlich, eine angeborene Immunität auszulösen, da sein Replikationszyklus von dem zellulären Enzym

ADAR1 (engl. *Adenosine Deaminase Acting on RNA 1*) abhängt. ADAR1 existiert in zwei Isoformen, dem konstitutiv exprimierten ADAR1-S und dem durch Interferon induzierten ADAR1-L, letzteres stellt somit selbst ein ISG dar. So führt die Behandlung von Zellen mit IFN- α zu einer Induktion von ADAR1-L und infolgedessen zu einer Verdopplung der ADAR1 bedingten Editierung der HDV RNA (Hartwig, et al., 2006) (Casey, 2012). Da L-HDAg inhibierend auf die HDV Genomreplikation wirkt (Hwang, et al., 1994) und für die Assemblierung der Virionen nötig ist (Surreau, 2006), hätte eine frühzeitige Synthese von L-HDAg negative Auswirkungen auf den gesamten Replikationszyklus. Deshalb wäre zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Infektion eine durch HDV selbst induzierte Expression von ADAR1-L förderlich, um die Freisetzung des Virus aus der Zelle zu initiieren. Allerdings konnte in dieser Doktorarbeit keine HDV-induzierte gesteigerte Expression von ADAR1-L beobachtet werden [Daten nicht gezeigt].

3.1.2 Der Einfluss der HBV Koinfektion

Der Einfluss der HBV Infektion auf die HDV bedingte angeborene Immunantwort bzw. die Erkennung von HBV durch das angeborene Immunsystem ist in der Literatur ein kontrovers geführtes Thema. Wie von *Xia und Protzer* zusammengefasst, ist HBV sensitiv gegenüber Cytokinen, da sie auf die HBV Replikation auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene inhibierend wirken (Xia, et al., 2017). Daher ist es schlüssig, dass sich HBV als „heimliches“ (engl. *stealth*) Virus gibt, welches vom angeborenen Immunsystem nicht erkannt wird bzw. nicht mit diesem interagiert und die HBV Replikation somit keine Expression von Typ I Interferonen nach sich zieht. Dennoch gibt es Berichte, dass HBV einerseits dazu in der Lage ist die angeborene Immunität und andererseits die Interferon bedingte Signaltransduktion unter anderem mit Hilfe des X-Proteins zu inhibieren (Tsunematsu, et al., 2017) (Wei, et al., 2010) (Jiang, et al., 2010).

Um diese Beobachtungen zu überprüfen, wurden HepG2 basierte HBV1.3-transgene Zelllinien mit Knockouts des X- und L-Proteins bzw. mit unverändertem HBV1.3 Überlänge genom verwendet und mit AAV-HDV transduziert, um das HDV Genom in die Zellen einzubringen. Eine direkte Infektion mit HDV war nicht bei allen Zelllinien möglich, da sie den zum Zelleintritt essenziellen NTCP-Rezeptor nicht exprimierten (Yan, et al., 2014). Der verwendete AAV-HDV Vektor wurde bereits von *Suárez-Amarán et al.* beschrieben und führte in Wildtyp C57BL/6 Mäusen, im Gegensatz zu einem AAV-Luciferase Kontrollvektor, zu einer Typ I Interferon bedingten Induktion von ISGs und eignete sich somit zur Untersuchung des HBV Einflusses auf die HDV induzierte angeborene Immunantwort (Suárez-Amarán, et al., 2017). Nach Transduktion mit AAV bildet das mit ITRs (engl. *inverted terminal repeats*) flankierte Transgen, in diesem Fall das HDV1.2 Überlänge genom, erst zirkuläre Concatemere, die dann als Episomen im Nukleus transduzierter Zellen persistieren. Ausgehend von dieser episomalen

DNA kann dann das HDV RNA Genom transkribiert und repliziert werden (Naso, et al., 2017). Somit beginnt die Replikation des HDV Genoms nach Transduktion mittels AAV-Vektor erst nach Ausbildung der Episomen und dadurch erst später als bei einer direkten Infektion mit HDV, da hier kein DNA Intermediat gebildet werden muss. Dies spiegelt sich in der Kinetik der HDV Genomreplikation nach AAV-HDV Transduktion wider, welche verglichen mit der HDV Infektion um etwa 3 Tage nach hinten versetzt stattfand. Dementsprechend fand auch die Induktion der ISGs zeitversetzt statt, welche 11 und 14 Tage nach Transduktion am stärksten war. Hierbei zeigten die HepG2 basierten, HBV transgenen Zellen eine klar gesteigerte Expression von ISGs, welche über alle gemessenen Gene hinweg durchschnittlich sogar stärker war als bei den HBV-freien HepG2-NTCP Zellen. Auch bei der Studie von *Suárez-Amarán et al.* konnte bei Kotransduktion von AAV-HDV mit AAV-HBV eine Induktion von ISGs, die sich nicht signifikant von der der AAV-HDV Monotransduktion unterschied, und somit kein generell inhibierender Effekt von HBV auf die angeborene Immunität beobachtet werden (Suárez-Amarán, et al., 2017). Bei der Verwendung von zwei verschiedenen Konstrukten zur Transduktion der viralen Genome besteht die Möglichkeit, dass Zellen nicht gleichzeitig mit beiden, sondern nur mit einem Vektor transduziert werden und somit entweder HBV oder HDV bzw. keines der beiden vorliegt. Dieser Zustand konnte durch die Verwendung HBV-transgener Zelllinien ausgeschlossen werden, doch auch in diesem Versuchsaufbau führten HBV bzw. dessen virale Proteine nicht zu einer Reduktion der HDV induzierten ISG Expression. Somit konnte ein aktives Eingreifen von HBV in die angeborene Immunantwort hierbei nicht bestätigt werden.

Wie auch *Jung et al.* hypothesieren, sollte eine HBV Koinfektion mit einem positiven Effekt für HDV einhergehen, da das HDV RNP auch von anderen Helferviren als HBV umhüllt und verbreitet werden kann (Jung, et al., 2020a). So wurde beispielsweise gezeigt, dass das Vesikuläre-Stomatitis-Virus (VSV) ebenfalls als Helfervirus von HDV fungieren kann, indem es dessen RNP umhüllt und damit dazu beiträgt, dass HDV seinem durch HBV auferlegten Lebertropismus prinzipiell entgehen und HEK293 Zellen infizieren kann (Perez-Vargas, et al., 2019). Da HBV die HDV induzierte Expression von ISGs nicht klar zu beeinflussen scheint, bleibt offen wie HDV, abgesehen von der Umhüllung, genau von der Koinfektion mit HBV profitiert. Eine Möglichkeit stellt die Inhibition des Tumornekrosefaktor (engl. *tumor necrosis factor*, TNF) vermittelten Zelltods durch HBV dar (siehe Doktorarbeit von Sandra Lampl, Institut für molekulare Immunologie und experimenteller Onkologie, TUM), wodurch HDV indirekt durch die Koinfektion mit HBV geschützt wäre. Dennoch sind weitere Untersuchungen nötig, um diese Frage abschließend zu klären.

3.2 Die Identifizierung des PRRs zur Erkennung von HDV

Wie aus dieser Doktorarbeit und weiteren Berichten anderer Arbeitsgruppen hervorgeht, ist HDV dazu in der Lage, neben HepaRG Zellen auch in HepG2 basierten Zellen eine Aktivierung der angeborenen Immunität auszulösen (Alfaiate, et al., 2016) (Zhang, et al., 2018) (Altstetter, et al., 2021). Somit ist offenkundig, dass das Virus von den Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt werden muss. Als Pathogen-assoziiertes molekulares Musters (engl. *Pathogen-associated molecular pattern*, PAMP), welches als Ligand für die Erkennung dient, wurde die HDV RNA vermutet, da im Falle viraler Infektionen hauptsächlich Nukleinsäuren viralen Ursprungs, wie sie beispielsweise bei der Virus-Replikation entstehen, für die Induktion der angeborenen Immunantwort verantwortlich sind (Jung, et al., 2020a). Zur zellulären Erkennung viraler RNA dienen zwei große Familien der Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*, PRRs), zum einen die TLRs zur Detektion endosomaler RNA und zum anderen die RLRs im Cytoplasma (Wu, et al., 2014). Da das HDV Genom nach der Replikation im Nukleus zur Assemblierung neuer Virionen in das Cytoplasma transportiert wird (Mentha, et al., 2019), galten zu Beginn der Doktorarbeit insbesondere die beiden in der Leber funktionell exprimierten RLRs RIG-I (engl. *retinoic acid inducible gene-1*) und MDA5 (engl. *melanoma differentiation associated gene 5*) als Kandidaten für die HDV Erkennung. Allerdings wird das HDV Genom vor dem Export in das Zytoplasma bereits im Nukleus mit beiden Isoformen des HDAg komplexiert, um zusammen das RNP zu bilden (Lempp, et al., 2016). In dieser Form ist die RNA für eine Erkennung durch RIG-I bzw. MDA5 nicht direkt zugänglich und somit war es unklar, ob diese Komplexierung eine Detektion durch diese beiden RLRs verhinderte.

3.2.1 MDA5 und nicht RIG-I erkennt die HDV Replikation

Um herauszufinden, inwiefern die HDV Erkennung durch die RLRs und an der Signaltransduktion beteiligten Moleküle abhängt, wurden Knockout Zelllinien für MAVS (engl. *mitochondrial antiviral-signaling protein*), RIG-I und MDA5 auf Basis der HepG2-NTCP Zellen generiert. Dies geschah in Kooperation mit Dr. Francesca Pinci und Prof. Veit Hornung am Genzentrum München der LMU München mittels CRISPR/Cas Methode, indem in die entsprechenden Gene beider Allele Rasterschubmutationen via Insertion bzw. Deletion eingefügt und per Western-Blot validiert wurden (Altstetter, et al., 2021).

Da MAVS als essenzielles Adapter-Protein der RLR- Signaltransduktion nach Stimulation von RIG-I und MDA5 mit beiden PRRs interagiert, führt ein Gen-Knockout von MAVS zu einer kompletten Verhinderung der RLR-induzierten angeborenen Immunreaktion auf eindringende Pathogene (Sun, et al., 2006) (Wu, et al., 2014). Im Fall der HDV Infektion von HepG2-NTCP Zellen führte der Knockout von MAVS, im Vergleich zu Wildtyp HepG2-NTCP Zellen, zu einem kompletten Verlust der ISG Induktion. Diese ausbleibende ISG Induktion in den MAVS

Knockout Zellen ließ auf eine essenzielle Beteiligung von RLRs bei der Erkennung von HDV RNA schließen (Altstetter, et al., 2021). Auch *Suárez-Amarán et al.* kommen zu dieser Schlussfolgerung, da sie in Mäusen ebenfalls MAVS als ein Schlüsselprotein der IFN- β Induktion nach Transduktion mit AAV-HDV identifizieren konnten (Suárez-Amarán, et al., 2017).

Die anschließende Infektion der HepG2-NTCP RIG-I bzw. MDA5 Knockout Zellen zeigte, dass MDA5, aber nicht RIG-I für die Erkennung von HDV elementar war. Die Analyse der ISG Expression ergab, dass die HDV Infektion sowohl in den wildtypischen als auch in den RIG-I Knockout HepG2-NTCP Zellen eine Aktivierung der angeborenen Immunität nach sich zog, diese hingegen bei den MDA5 und MAVS Knockout Zellen ausblieb. Um die Ergebnisse zu bestätigen, wurde der Versuch mit dem AAV-HDV Vektor wiederholt. Dabei gilt der AAV-Vektor per se als kaum immunogen (Naso, et al., 2017), weshalb eine Stimulation der angeborenen Immunität von der Immunogenität der einzubringenden Nukleinsäure, in diesem Fall also die des HDV Genoms, abhängt. Auch bei der Verwendung des AAV-HDV Vektors zeigte sich, dass im Falle des Gen-Knockouts von MDA5 bzw. MAVS keine gesteigerte Expression von ISGs einsetzte, wohingegen der Knockout von RIG-I keinen Einfluss auf die Induktion angeborener Immunität hatte (Altstetter, et al., 2021). Diese Beobachtungen wurde auch von *Zhang et al.* bestätigt, welche keine veränderte IFN-Induktion nach HDV Infektion von HepG2 basierten RIG-I und TLR3 Knockdown Zellen feststellten. Der Knockdown von MDA5 führte jedoch zu einem fast gänzlichem Ausbleiben der angeborenen Immunantwort (Zhang, et al., 2018).

Somit stellt sich die RNA Helikase MDA5 als entscheidender Rezeptor zur Erkennung der HDV RNA heraus, wobei bislang ungeklärt ist, welche Struktur bzw. Bereich der viralen RNA genau für die spezifische Aktivierung von MDA5 aber nicht RIG-I verantwortlich ist. Da die HDV Replikation ausschließlich im Zellkern stattfindet (Taylor, 2015), können die dabei gebildeten RNA Intermediate nicht durch die cytosolischen RLRs erkannt werden. Erst durch die Komplexierung des Genoms mit L-HDAg, kann RNA in Form des RNPs durch die Hilfe der zellulären Kernexportfaktoren TAP and Aly in das Cytoplasma exportiert werden (Huang, et al., 2016). Abgesehen vom RNP, wird nur noch die virale mRNA aktiv exportiert. Wie die zelleigene mRNA ist sie am 5'-Ende mit einer "Cap"-Struktur modifiziert und somit die immunogene 5'-Triphosphat-Gruppe verdeckt, was eine Detektion der viralen mRNA durch das angeborene Immunsystem unwahrscheinlich macht (Hsieh, et al., 1990) (Gebhardt, et al., 2017). Dadurch verhindert HDV möglicherweise die RIG-I vermittelte Erkennung der Triphosphat-Gruppe am 5'-Ende der viralen mRNA (Hornung, et al., 2006) (Pichlmair, et al., 2006), was erklärt, wieso RIG-I bei der Detektion der HDV Infektion keine Rolle spielt. Wie diese Doktorarbeit und *Zhang et al.* jedoch aufzeigen, ist die aktive virale Replikation für die Erkennung durch das angeborene Immunsystem von großer Bedeutung (Altstetter, et al.,

2021) (Zhang, et al., 2018). Zusammengefasst deutet dies darauf hin, dass es vermutlich die nach Replikation ins Zytoplasma exportierten und mit HDAg komplexierten HDV Genome sind, die von MDA5 erkannt werden, (Suslov, et al., 2018). Dennoch können nur tiefgreifendere Strukturanalysen bzw. ein Mapping der verschiedenen Bereiche des HDV Genoms die Antwort darauf liefern, was genau bei der HDV Infektion als Ligand für MDA5 fungiert und wie es die RNA trotz ihrer Komplexierung mit den HDAGs erkennen kann.

3.2.2 Die Rolle der RNase L bei der Erkennung von HDV

Für HepaRG Zellen ist charakteristisch, dass sie im Gegensatz zu HepG2 basierten Ziellinien, ein vergleichbares Genexpressionsprofil von Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und RIG-I-ähnlichen Rezeptoren (RLRs) wie primäre humane Hepatozyten aufweisen und damit ihre angeborene Immunität vergleichsweise leicht stimulierbar sind (Luangsay, et al., 2015) (Maire, et al., 2008). Wie bereits in Abschnitt 3.1.1 erwähnt wurde, war somit nur eine sehr schwache ISG Induktion in HDV infizierten HepG2-NTCP Zellen nach 2 Tagen Differenzierung zu beobachten. Durch die auf 14 Tage verlängerte Differenzierung wurde deshalb versucht, die Expression von PRRs und Proteinen der Signaltransduktion in HepG2 basierten Zelllinien zu steigern, um eine durch HDV induzierte ISG Expression ähnlich wie in den HepaRG Zellen zu erreichen. Wie sich zeigte, konnte dadurch in der Tat eine ISG Induktion nach HDV Infektion beobachtet werden, weshalb sich die Frage stellte, welcher Faktor dafür verantwortlich war. Um diese Fragestellung näher zu beleuchten, wurden die Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen differenziert und die sich währenddessen verändernde Genexpression potenzieller, zur Mustererkennung bzw. Signaltransduktion nötiger Faktoren (z.B. RLRs, MAVS, OAS, STAT) analysiert. So wurde unter anderem die Expression des LGP2 untersucht, welches aufgrund fehlender CARD-Domänen selbst nicht als direkter Rezeptor zur Erkennung von Pathogenen in Erscheinung tritt, jedoch eine regulatorische Funktion für die beiden anderen Mitglieder der Familie der RLRs, RIG-I und MDA5, aufweist (Wu, et al., 2014). Insbesondere in Kombination mit dem für die HDV Erkennung so wichtigen MDA5 weist LGP2 eine synergistische Funktion auf und steigert die MDA5 basierte antivirale Signalgebung (Bruns, et al., 2015). Allerdings veränderte sich die Genexpression von LGP2, wie auch von MDA5, über den gesamten Differenzierungsvorgang kaum und lag auf einem Level mit undifferenzierten HepG2-NTCP Zellen. Somit schien es keinen essenziellen Teil zur Erkennung des HDV beizutragen.

Aus zwei Berichten von *Malathi et al.* geht hervor, dass die RNase L eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort bei viralen Infektionen einnimmt. So schneidet sie zelluläre RNA in kleinere Fragmente, welche anschließend als Liganden für RIG-I dienen und dadurch eine IFN- β Expression auslösen (Malathi, et al., 2007) (Malathi, et al., 2010). Auch für eine weitere RNase, die RNase T2, wird ein ähnlicher Effekt beschrieben. Hierbei schneidet die RNase T2 einzelsträngige, exogene RNA Moleküle ebenfalls in kleinere Fragmente, welche

dann wiederum als agonistische Liganden für TLR8 im Endosom fungieren (Greulich, et al., 2019). Wie aus der Genexpressionsanalyse hervorging, wurde die RNase L, im Vergleich zu allen weiteren untersuchten Faktoren, im Laufe der Differenzierung tatsächlich verstärkt exprimiert. Deshalb schien es möglich, dass die RNase L eine Rolle bei der Detektion von HDV einnimmt. Um die Funktion der RNase L bei der Induktion der angeborenen Immunität nach HDV Infektion zu untersuchen, wurde zunächst versucht ihre Expression transient mit Hilfe von siRNA (engl. *small interfering RNA*) zu inhibieren. Durch den Vorgang der RNA-Interferenz, welcher durch die in die Zelle eingebrachte, für RNase L spezifische siRNA ausgelöst wird, wird die Expression der RNase L vorübergehend unterdrückt, indem die vom RNase L-Gen transkribierte mRNA spezifisch degradiert wird (Laganà, et al., 2015). Der transiente Knockdown von RNase L führte zu einem leichten Rückgang der ISG Induktion 4 Tage nach HDV Infektion, hatte 7 Tage nach Infektion jedoch keinen Effekt mehr. Da zu diesem Zeitpunkt die siRNA möglicherweise bereits komplett degradiert war, konnte eine wiedereinsetzende Expression der RNase L nicht ausgeschlossen werden. Um den Nachteil des temporären Gen-Knockdowns der RNA-Interferenz zu umgehen, wurden mittels CRISPR/Cas Methode HepG2 -NTCP basierte RNase L-Knockout Zelllinien erzeugt und der Knockout mittels Westernblot validiert. Allerdings wurde in den HepG2-NTCP RNase L Knockout Zelllinien, im Vergleich zu den Kontrollzellen, keine klare Reduktion der ISG Expression nach HDV Infektion festgestellt. Zusammengefasst lässt sich auf Basis dieser Beobachtungen keine unterstützende Rolle der RNase L bei der durch HDV bedingten angeborenen Immunantwort festhalten.

3.3 Der Einfluss der HDV induzierten angeborenen Immunität auf die HDV Replikation und Persistenz

Obwohl momentan einige neue Ansätze erforscht werden, existieren gegenwärtig keine direkt gegen HDV gerichteten antiviralen Behandlungsmöglichkeiten. Die bisherige Empfehlung zur Behandlung der chronischen Hepatitis D ist zum einen auf eine langfristige Verabreichung von pegyliertem IFN- α und zum anderen auf die Hemmung des Viruseintritts durch das Peptid Bulevirtide beschränkt. Dabei wird für IFN- α , je nach Studie, in weniger als 40% der Fälle nach Beendigung der Behandlung keine HDV RNA mehr detektiert und es bleibt weiterhin unklar, aufgrund welchen genauen Mechanismus IFN- α antiviral auf HDV wirkt (Mentha, et al., 2019) (Urban, et al., 2021). Außerdem führt die HDV Infektion aufgrund der Erkennung der zytoplasmatischen HDV RNA durch MDA5, per se zu einer Produktion von Interferonen und zur Ausbildung eines antiviralen Zustandes (Altstetter, et al., 2021) (Zhang, et al., 2018). Deshalb wird im Folgenden der Einfluss der durch HDV und externe Faktoren (z.B. Typ I Interferone) ausgelösten angeborenen Immunantwort auf die Replikation von HDV und dessen Persistenz weiterführend diskutiert.

3.3.1 Die durch HDV induzierte angeborene Immunität hat keinen Effekt auf dessen Replikation

Um den Effekt des durch HDV Infektion aktivierten angeborenen Immunsystems auf die virale Replikation zu untersuchen, wurden zum einen die viralen Genomäquivalente nach HDV Infektion von HepG2-NTCP basierten MDA5, RIG-I bzw. MAVS Knockout Zelllinien quantifiziert und mit denen HDV infizierter Wildtyp HepG2-NTCP Zellen verglichen. Zum anderen wurde außerdem eine Immunfluoreszenzfärbung des HDAg der infizierten Zellen durchgeführt. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den jeweiligen Zelllinien festgestellt werden, da sich das HDV unabhängig von dessen Erkennung durch MDA5 in gleichem Maße replizieren konnte und dadurch der Anteil HDAg-positiver Zellen 5 und 11 Tage nach Infektion kaum variierte. Vergleichbares galt auch, wenn Anstelle der HDV Infektion der AAV-HDV Vektor zur Genomtransduktion verwendet wurde, da die Quantifizierung der HDV-Genomäquivalente und die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung des HDAg keinen Replikationsvorteil in MDA5 und MAVS Knockout- gegenüber Wildtyp und RIG-I Knockout Zellen offenbarten (Altstetter, et al., 2021). Auch *Zhang et al.* berichten, dass die HDV Erkennung durch MDA5, trotz der daraus resultierenden angeborenen Immunantwort, nur einen sehr geringen Effekt auf die HDV Replikation hat (Zhang, et al., 2018). Deshalb stellt sich die Frage, wieso HDV zwar durch das angeborene Immunsystem erkannt, aber von der Etablierung eines antiviralen Zustandes nicht wirklich tangiert wird.

Wie *Suslov et al.* hypothesieren, stehen HDV zwei Möglichkeiten zur Verfügung, um dem angeborenen Immunsystem zu entgehen. Zum einen ein direktes Blockieren der IFN-Signaltransduktion oder zum anderen die Inhibierung bzw. Vermeidung IFN induzierter antiviraler Effektormoleküle (Pugnale, et al., 2009) (Giersch, et al., 2015). So konnte gezeigt werden, dass nach der Transfektion von HuH7 Zellen mit dem pSVL(D3) Plasmid, das für das HDV-Genom kodiert und auch die Grundlage für die in dieser Arbeit produzierten und verwendeten HDV Stocks bildete, HDV mit der IFN- α -Signaltransduktion interferiert. Hierbei inhibiert das HDV die Phosphorylierung der STAT-Proteine und schwächt somit die Expression von ISGs wie beispielsweise Mx1 ab (Pugnale, et al., 2009). Im Gegensatz dazu existieren allerdings auch Berichte, dass bei einer HDV Infektion bzw. nach der Transfektion von S- und L-HDAg kodierenden Plasmiden die Mx1 Expression nicht abgeschwächt, sondern sogar gesteigert wird (Zhang, et al., 2018) (Williams, et al., 2009). Bei der HBV/HDV-Koinfektion humanisierter Mäuse, berichten *Giersch et al.* von einer Akkumulation und Aktivierung humanem STATs in den Lebern infizierter Tiere. Allerdings ist die Zunahme von STAT in den Nuklei HDV infizierter Hepatozyten, welche besonders viel HDAg aufweisen, deutlich schwächer. Dies legt nahe, dass HDV mit der STAT basierten Signalgebung interferiert, was allerdings nicht ausreichend ist, um einen signifikanten Anstieg der Expression humaner ISGs zu verhindern (Giersch, et al., 2015). Zusammengefasst scheint damit die IFN-

Signaltransduktion durch HDV unter gewissen Umständen zwar beeinträchtigt zu sein, was jedoch offensichtlich nicht ausreichend ist, um eine Induktion von ISGs zu vermeiden (Altstetter, et al., 2021).

Da in HepG2-NTCP Zellen eine messbare ISG Induktion erst mehrere Tage nach HDV Infektion auftrat, hatte das Virus möglicherweise genug Zeit, um eine stabile Infektion zu etablieren, bevor antivirale Effektoren die virale Replikation inhibieren konnten. Auf Grund dessen wurden HepG2-NTCP Zellen vor Infektion mit Poly I:C transfiziert und die angeborene Immunität durch Poly I:C Bindung an die RLRs (Kato, et al., 2008) und TLR3 (Zhou, et al., 2013) stimuliert. Dadurch wurde bereits zum Zeitpunkt der HDV Infektion ein antiviraler Zustand innerhalb der Zelle erreicht. Allerdings hatte die von Beginn an wirkende angeborene Immunität gegenüber HDV erneut keinen Effekt, was sich in der Kinetik der HDV Replikation niederschlug, welche sich kaum von der Kontrollgruppe unterschied. Auch eine zweimalige Stimulation mit poly I:C, einmal unmittelbar vor und einmal 4 Tage nach der Infektion, hatte keinen messbaren Einfluss auf die HDV Replikation, wie zusätzlich die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung des HDAg ergab. Unabhängig von der Transfektion mit poly I:C wurde eine vergleichbare Anzahl an HDAg positiven Zellen gefärbt. Diese Ergebnisse untermauerten die bisherigen Beobachtungen, dass die durch HDV verursachte angeborene Immunantwort nur einen sehr geringen Effekt auf die HDV Replikation hat (Altstetter, et al., 2021).

Einen möglichen Erklärungsansatz liefert die Tatsache, dass sich HDV nur im Nukleus repliziert und antiviralen Effektoren mit Hilfe der Kompartimentalisierung der Zelle vermeidet. Dadurch könnten die Replikationsintermediate für IFN induzierte Effektoren nicht zugänglich (Taylor, 2015). So interferiert beispielsweise nur siRNA, welche gegen die im Zytoplasma lokalisierte HDV mRNA gerichtet ist, mit der HDV Replikation, wohingegen siRNAs, welche gegen die sich im Zellkern befindlichen (Anti-) Genome gerichtet sind, keinen Effekt haben (Chang, et al., 2003).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse sowohl aus diesem Teil der Doktorarbeit als auch aus der Literatur, dass sich die HDV Replikation *in vitro* kaum durch einen antiviralen Zustand, wie er beispielsweise durch die Verwendung von Interferonen erreicht wird, beeinflussen lässt. Dies ist eine mögliche Erklärung, weshalb die Verabreichung von pegyliertem IFN- α bei der chronischen Hepatitis D nur in einem Teil der Patienten effektiv ist (Yurdaydin, 2019). Hierbei ist zu beachten, dass nicht alle Patienten mit demselben Genotyp infiziert sind. So könnte neben individuellen Faktoren auch der HDV Genotyp eine Rolle spielen, da die jeweiligen Genotypen mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen assoziiert werden. Somit ist es denkbar, dass der Genotyp möglicherweise einen Einfluss auf die Erkennung durch das angeborene Immunsystem, sowie auf die Sensitivität gegenüber der Interferonbehandlung hat. (Negro, 2014) (Borzacov, et al., 2016). Interessanterweise berichten *Giersch et al.* von einer

Unterdrückung der HDV Replikation nach Applikation pegyliertem IFN-Alpha in HBV/HDV koinfizierten humanisierten Mäusen (Giersch, et al., 2017), was im Widerspruch zum Bericht dieser, sowie anderer Arbeiten steht (Chang, et al., 2006) (Zhang, et al., 2018) (Altstetter, et al., 2021). Eine mögliche Erklärung für die beobachtete unterschiedliche Wirksamkeit von IFN- α findet sich zum einen in den Charakteristika der jeweiligen Modellsysteme (*in vivo* vs. *in vitro*) und vor allem in der Koinfektion mit HBV, welche nur bei Giersch et al. vorlag. Wie von Xia und Protzer diskutiert, ist HBV sensitiv gegenüber Cytokinen, da sie auf die HBV Replikation inhibierend wirken (Xia, et al., 2017). Somit scheint es wahrscheinlich, dass der Effekt welcher durch die Therapie mit pegyliertem IFN- α erzielt wird nur indirekt auf HDV wirkt, indem es sein Helfervirus, das HBV, inhibiert und somit die weitere Verbreitung des Virus verhindert wird (Taylor, 2006).

3.3.2 Die HDV bedingte angeborene Immunität führt zu einer verstärkten Eliminierung HBV-HDV koinfizierter Hepatozyten durch zytotoxische T-Zellen

Wie bereits in den vorherigen Abschnitten beschrieben wurde, ist aufgrund der momentan verfügbaren und größtenteils unzureichenden Behandlungsmöglichkeiten der chronischen Hepatitis B und D die Erforschung neuer antiviraler Therapien von großer Wichtigkeit. Hierbei konzentrieren sich die neuen Strategien zur spezifischen Eliminierung infizierter Hepatozyten hauptsächlich auf HBV, da dessen Bekämpfung automatisch auch einen indirekten Effekt auf die HDV Persistenz hat. Eine Möglichkeit zur spezifischen Eliminierung HBV und HDV infizierter Hepatozyten stellt die T-Zell Therapie dar. So wurde gezeigt, dass T-Zellen, welche mit einem HBV-Hüllprotein-spezifischen T-Zell-Rezeptor (engl. *T cell receptor*, *TCR*, im Folgenden als 4G-TCR bezeichnet) ausgestattet werden, das Potential einer Klärung der HBV Infektion haben (Wisskirchen, et al., 2019). Des Weiteren wird durch die Expression eines ebenfalls für HBV- Hüllproteine spezifischen Chimären Antigen-Rezeptors (engl. *HBV S protein specific chimeric antigen receptor*, *S-CAR*) in transduzierten T-Zellen ein signifikanter antiviraler Effekt bei deren Verwendung in HBV-transgenen Mäusen erzielt (Krebs, et al., 2013) (Festag, et al., 2019).

Bei beiden Ansätzen wurde dabei der Einfluss der durch HDV induzierten Aktivierung des angeborenen Immunsystems auf die Eliminierung infizierter Hepatozyten nicht untersucht. Deshalb wurde zunächst ein Kokultur Experiment von HBV bzw. HBV/HDV (ko-) infizierten HepG2-NTCP (MDA5 KO) Zellen mit 4G-TCR transduzierten T-Zellen durchgeführt. Dabei wurden HBV/HDV koinfizierte HepG2-NTCP Zellen durch die T-Zellen stärker eliminiert als bei der HBV Monoinfektion, wohingegen dieser Effekt bei den HepG2-NTCP MDA5 KO Zellen nicht auftrat (Altstetter, et al., 2021). Dies ließ zum einen die Schlussfolgerung zu, dass die Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch die MDA5 bedingte Erkennung der HDV Infektion einen eindeutigen Effekt auf die Eliminierung infizierter Hepatozyten durch das

adaptive Immunsystem hat. Zum anderen verdeutlichte dieser Versuch, dass die Therapie einer chronischen HBV Infektion mit transduzierten T-Zellen durch HDV nicht gestört wird, sondern im Gegenteil, die spezifische Abtötung infizierter Zellen sogar erleichtert. Diese Ergebnisse decken sich mit Studien von *Tham et al.*, die berichten, dass eine HBV-HDV-Koinfektion zu einer verstärkten Eliminierung von HBV infizierten Zellen durch zytotoxische T-Zellen führt (Tham, et al., 2020).

Dabei ist die Erkennung der infizierten Zellen durch den T-Zell-Rezeptor von der Peptidpräsentation auf Haupthistokompatibilitätskomplexen (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) auf der Oberfläche der Hepatozyten abhängig (Harris, et al., 2016). Eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Eliminierung könnte somit eventuell eine veränderte Expression von MHC Molekülen in den Hepatozyten liefern, welche durch die Aktivierung der angeborenen Immunität durch HDV herbeigeführt wurde. Ein vergleichbarer Effekt existiert in dendritischen Zellen, die nach Stimulation mit Typ I Interferonen die Antigenpräsentation auf MHC Molekülen erhöhen und dabei die Peptidprozessierung nicht herunterregulieren (Simmons, et al., 2012). Abgesehen von Immunzellen steigern auch alle anderen Zelltypen die Expression von MHC I Molekülen als Antwort auf Typ I Interferone (Murphy, et al., 2016). Allerdings zeigte die Wiederholung des Versuchs mit S-CAR transduzierten T-Zellen, dass die gesteigerte Eliminierung der koinfizierten Hepatozyten nicht von einer veränderten Expression von MHC Komplexen und damit einer veränderten Peptidpräsentation abhängig war. Im Gegensatz zu klassischen T-Zell-Rezeptoren, erkennen Chimäre Antigen-Rezeptoren native Antigene und sind deshalb nicht durch die Antigenpräsentation auf MHC Molekülen limitiert (Harris, et al., 2016). So konnte bei der Kokultur von S-CAR transduzierten T-Zellen mit HBV bzw. HBV/HDV (ko-) infizierten HepG2-NTCP (MDA5 KO) Zellen derselbe Effekt wie bei der Kokultur mit mit 4G-TCR transduzierten T-Zellen beobachtet werden. Die Koinfizierten Zellen wurden erneut stärker eliminiert als die HBV-Monoinfizierten Zellen solange die Erkennung von HDV durch MDA5 gewährleistet war (Altstetter, et al., 2021). Sowohl bei der Kokultur mit 4G-TCR als auch S-CAR transduzierten T-Zellen war das Abtöten der wildtypischen HepG2-NTCP Zellen generell stärker als das der MDA5 Knockout Derivate, unabhängig von Ko- oder Monoinfektion der Zellen, was vermutlich auf einen Zelllinien spezifischen Effekt und nicht auf die T-Zellen zurückzuführen war.

Da durch die Verwendung der S-CAR transduzierten T-Zellen eine veränderte MHC Expression als Ursache für die verstärkte Eliminierung ausgeschlossen werden konnte, muss die durch HDV Infektion induzierte angeborene Immunantwort einen anderen Einfluss auf die Interaktion zwischen T- und infizierter Zelle haben. CD8 positive T-Zellen initiieren die Apoptose ihrer Zielzellen zum einen durch die Interaktion von FasL (engl. *first apoptosis signal ligand*) mit dem Fas-Rezeptor, der sich auf der Zielzelle befindet, sowie durch die Sekretion von Perforin und Granzyme B. Beide Mechanismen aktivieren die Caspase-Kaskade in den

Zielzellen und lösen dadurch deren Apoptose aus (Murphy, et al., 2016). Somit ist es denkbar, dass die Aktivierung des angeborenen Immunsystems eine gesteigerte Expression des Fas-Rezeptors auf der Oberfläche der infizierten Hepatozyten zur Folge hat und diese folglich effizienter eliminiert werden können. Unabhängig davon zeigen diese Ergebnisse, dass die Behandlung der chronischen Hepatitis D mittels 4G-TCR bzw. S-CAR transduzierter T-Zellen eine vielversprechende Alternative zu den momentanen Behandlungsstrategien darstellen kann.

3.4 Die Charakterisierung muriner HDV-Infektionsmodelle

Maushepatozyten sind per se nicht mit HBV und HDV infizierbar, da das murine NTCP (mNTCP) keine Aufnahme des Virus in die Zelle zulässt. Wie Lempp et al. für die AML12 Mausepatozelllinie zeigen, ist diese Restriktion umgänglich, indem in murine Hepatozyten das humane NTCPs (hNTCP) künstlich eingebracht sowie exprimiert wird und diese dadurch sowohl für eine HBV als auch eine HDV Infektion empfänglich werden (Lempp, et al., 2016). Interessanterweise konnte im Gegensatz dazu im Laufe dieser Doktorarbeit keine Infektion von hNTCP-AML12 Zellen erzielt werden, da zum einen die Anzahl an HDV Genomäquivalenten nach Infektion sich nicht von nativen AML12 Zellen unterschied und zum anderen keine mit HDV inokulierten hNTCP-AML12 Zellen positiv auf das HDAg gefärbt werden konnten. Des Weiteren wurde versucht das humane NTCP mittels adenoviralem Vektor der dritten Generation (Hd-Ad, engl. *Helper-dependent adenoviral vector*) in AML12 Zellen und primäre Maushepatozyten einzubringen. Hierfür wurden die Zellen mit dem Hd-Ad-NTCP Vektor zur Expression des hNTCPs transduziert, welcher bereits zur erfolgreichen HBV Infektion primärer Makaken-Hepatozyten verwendet wurde (Burwitz, et al., 2017). Jedoch konnte auch hierbei sowohl in AML12 basierten Zellen als auch in primären murinen Hepatozyten keine HDV Infektion erzielt werden. Auch bei weiteren Arbeiten am Institut zeigten sich die hNTCP-AML12 Zellen nicht permissiv gegenüber einer Infektion mit HBV [Daten nicht gezeigt]. Wie sich gegen Ende der Doktorarbeit herausstellte, war die nicht vorhandene Permissivität der AML12 Zellen wahrscheinlich auf die Eigenarten der Zelllinie zurückzuführen, welche ursprünglich vom Hersteller geliefert wurde, da sich eine neu bestellte AML12-NTCP Zelllinie auch an unserem Institut mit HBV infizieren ließ.

Weshalb die primären Maushepatozyten nach Transduktion mit dem Hd-Ad-NTCP Vektor nicht permissiv für eine Infektion mit HDV wurden, ist unklar. Möglicherweise existieren neben der spezifischen Bindung an NTCP noch weitere Voraussetzungen für eine Permissivität der Zelle gegenüber HDV. Da das HDV Genom bei künstlicher Einbringung in das Cytoplasma einer Vielzahl weiterer Zelltypen erfolgreich replizieren kann und neben HBV auch weitere Helferviren zur Umhüllung und Verbreitung seines RNPs verwenden kann (Taylor, 2009) (Perez-Vargas, et al., 2019), scheint eine Limitation nach dem Eindringen in die murine

Leberzelle unwahrscheinlich. Deshalb ist es wahrscheinlicher, dass neben der Expression eines funktionalen NTCP-Rezeptors auch die speziesspezifische Zusammensetzung der Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) auf der Oberfläche der Hepatozyten eine Rolle spielt, um die initiale Bindung des Virions und dadurch eine Infektion zu gewährleisten (Verrier, et al., 2016).

Nichts desto trotz wurde versucht, die *in vivo* HDV Infektion von C57BL/6 h/mNTCP Mäusen, welche ein chimäres NTCP exprimieren, zu etablieren. Das NTCP der h/mNTCP Mäuse ist an den für die Aufnahme von HDV kritischen Aminosäuren 84-87 humanisiert und besitzt ansonsten die normale murine Sequenz. Um eine Ausbreitung des HDV zu gewährleisten, wurde außerdem ein AAV-HBV Vektor verwendet, um die HBV-Hüllproteine für eine mögliche Assemblierung neuer HDV Partikel zu liefern. Allerdings konnte sowohl bei der HDV Monoinfektion als auch bei der durch Transduktion mit AAV-HBV herbeigeführten Imitation der HBV/HDV Koinfektion nur eine sehr transiente Infektion der h/mNTCP transgenen Mäuse mit HDV erzielt werden, bei der 14 Tage nach Infektion keine HDV RNA mehr in der Leber detektiert werden konnte. Hierbei wurde in den Leberzellen keine angeborene Immunantwort nach HDV Injektion ausgelöst und es konnten bei der zusätzlichen Transduktion mit AAV-HBV keine neu gebildeten HDV Partikel im Serum detektiert werden.

Wie *He et al.* berichten, können C57BL/6 Mäuse, welche das humane NTCP (hNTCP) exprimieren, mit HDV infiziert werden. Allerdings ist auch hier die Infektion eher schwach und transient, da nach 20 Tagen keine intrahepatische HDV RNA mehr nachweisbar ist. Des Weiteren wird keine HDV Infektion etabliert, wenn die Mäuse ein gewisses Alter überschreiten. So sind nur sehr junge Tiere, die nicht älter als 17 Tage sind, für die HDV Infektion empfänglich, wohingegen 4 Wochen alte Mäuse keine Etablierung der Infektion zulassen obwohl sie das hNTCP effizient exprimieren (He, et al., 2015). Interessanterweise konnten *He et al.* in einer darauffolgenden Studie zeigen, dass auch adulte, 10 Wochen alte h/mNTCP Mäuse gegenüber einer HDV Infektion permissiv sind, wenn sie auf Basis des FVB-Mausstamms gezüchtet werden. Dabei scheint allerdings nicht der Mausstamm entscheidend für die Effizienz der Infektion zu sein, da heterozygote h/mNTCP Mäuse eine deutlich reduzierte Empfänglichkeit gegenüber HDV zeigen, als homozygote Tiere. Bei den hNTCP exprimierenden Mäusen aus der vorangegangenen Studie war die Infektionseffizienz allerdings unabhängig von der Homozygotie der Tiere, da heterozygote hNTCP Mäuse mit derselben Effizienz infiziert werden konnten. Dies deutet darauf hin, dass das wildtypische murine NTCP, welches in den heterozygoten h/mNTCP Mäusen exprimiert wird und in den Homozygoten nicht gebildet wird, möglicherweise eine inhibitorische Wirkung auf die Aufnahme von HDV in die Zelle hat (He, et al., 2016). Die homozygoten h/mNTCP Tiere, welche während dieser Doktorarbeit mit HDV inokuliert wurden, waren zum Zeitpunkt der Injektion mindestens 10 Wochen alt und somit möglicherweise zu alt für die HDV Infektion (He,

et al., 2015). Darüber hinaus war die applizierte Menge an HDV Partikeln technisch bedingt auf 2×10^7 limitiert und somit deutlich geringer als bei den eben beschriebenen Publikationen von *He et al.* (5×10^{10}). Zusammengefasst liefern diese methodischen Limitationen mögliche Begründungen, für die sehr schwache und transiente HDV Infektion der h/mNTCP Mäuse, welche unter dem Level war, das von *He et al.* beschrieben wird.

Da selbst mit einem sehr hohen HDV Inokulum nur eine transiente Infektion von hNTCP Mäusen möglich ist, (He, et al., 2015) (He, et al., 2016) sollte untersucht werden, inwiefern die Erkennung der Infektion durch das angeborene Immunsystem hierbei eine Rolle spielt. Wie in 3.2 diskutiert, ist MDA5 für die Detektion der HDV Replikation *in vitro* und damit zur Aktivierung der angeborenen Immunantwort essenziell. Deshalb wurde untersucht, ob ein Knockout von MDA5 *in vivo* zu einer gesteigerten HDV Infektion verglichen zu Wildtyp Tieren führt. Da diese Tiere kein hNTCP exprimierten, wurden diese vor der HDV Injektion mit dem Hd-Ad-NTCP Vektor transduziert. Zum Vergleich wurde den Tieren außerdem den von *Suárez-Amarán et al.* beschriebenen AAV-HDV Vektor injiziert (Suárez-Amarán, et al., 2017).

Insgesamt konnte auch durch den Gen-Knockout von MDA5 keine langanhaltende Infektion von HDV in Mäusen etabliert werden. Auch *He et al.* berichten, dass die HDV Infektion von hNTCP Mäusen, die zusätzlich einen Knockout des Typ I Interferon Rezeptors tragen, zwar anfangs eine deutlich gesteigerte Infektionseffizienz aufweisen, die Infektion aber dennoch nach zwei Wochen geklärt wird (He, et al., 2015). Darüber hinaus wurde in MAVS defizienten Mäusen, verglichen zu Wildtyp Tieren, eine gesteigerte Anzahl an HDAg positiven Zellen nach Transduktion mit AAV-HDV berichtet (Suárez-Amarán, et al., 2017). Dieser Replikationsvorteil konnte bei der Verwendung der MDA5 Knockout Tiere nicht beobachtet werden, allerdings war die Anzahl der für diesen Versuch verwendeten Tiere auch zu gering, um diesbezüglich eine eindeutige Aussage zu treffen. Wie jedoch auch die *in vitro* Experimente dieser Arbeit nahelegen, wird die HDV Replikation und Persistenz durch die angeborene Immunität kaum beeinflusst, was auf eine elementare Rolle des adaptiven Immunsystems für die Klärung der HDV Infektion *in vivo* hindeutet. Interessanterweise zeigen *He et al.* durch die Verwendung von SCID- (engl. *severe combined immunodeficiency*) Mäusen, welche keine funktionellen B- und T-Zellen bilden können, dass das adaptive Immunsystem nicht für die Klärung der HDV Infektion in hNTCP Mäusen verantwortlich ist, da auch in den SCID-Mäusen nur eine transiente Infektion möglich ist (He, et al., 2015). Im Gegensatz zu den rein murinen Modellsystemen wurde für chimäre Mausmodelle, welche eine humanisierte Leber besitzen, allerdings eine langanhaltende (mindesten 6 Wochen) und von HBV unabhängige HDV Infektion beobachtet (Giersch, et al., 2014). Zusammengefasst scheint es abgesehen von NTCP und MDA5 also weitere, unbekannte und speziesspezifische Faktoren zu geben, welche essenziell für eine Infektion mit HDV sind und über die virale Persistenz in Mäusen bestimmen.

3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass trotz der vermeintlichen Simplizität des HDV, dessen Interaktionen mit der Wirtszelle sowie dem Helfervirus HBV sehr komplex sind. Dabei liefert die Arbeit klare Erkenntnisse zum Prozess der Erkennung der HDV Infektion sowie dessen funktionellen Konsequenzen. So wurde zum einen MDA5 als der PRR zur Erkennung der HDV Infektion identifiziert. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die dadurch ausgelöste Aktivierung angeborener Immunität interessanterweise jedoch kaum einen direkten Einfluss auf die Replikation und Persistenz des Virus hat. Hierbei bleibt weiterhin unklar, welcher Teil bzw. welche Struktur des HDV Genoms von MDA5 erkannt wird, weshalb weiterführende Untersuchungen zur Interaktion zwischen HDV RNA und MDA5 nötig sind. Trotz bisheriger Untersuchungen sollte des Weiteren geklärt werden, wie es dem HDV gelingt, durch das angeborene Immunsystem zwar einerseits erkannt zu werden und dieses zu stimulieren und andererseits dabei nicht offenkundig von antiviralen Effekten innerhalb der Zelle betroffen zu sein.

Darüber hinaus verdeutlicht die Arbeit das Potential der T-Zell Therapie der chronischen Hepatitis D, welche durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch HDV möglicherweise sogar noch effizienter sein könnte als bei der HBV Monoinfektion. Um eine Therapie der chronischen Hepatitis D mit beispielsweise S-CAR transduzierten T-Zellen in Mäusen zu untersuchen, bedarf es vorher noch einer weiterführenden Untersuchung, wieso die HDV Infektion von hNTCP exprimierenden Mäusen lediglich zu einer schwachen und transienten Infektion führt, welche auch nicht durch den Knockout von MDA5 gesteigert wird. Alternativ könnte auch das AAV-HDV System verwendet werden, das eine langanhaltende HDV Replikation ermöglicht.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
BEP III System	Siemens, Erlangen, Deutschland
ECL Chemocam	Intas, Göttingen, Deutschland
Einfrierhilfe	Nalgene, New York, USA
Fusion Fx7	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Biberach, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C) HFU 506	Heraeus, Hanau, Deutschland
Gelkammer für Agarosegele	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Gelkammer für SDS-PAGE	Bio-Rad, Hercules, USA
Hera-cell 150-Zell-Inkubator	Heraeus, München, Deutschland
Incubator for bacteria	Heraeus, Munich, Germany
Isotemp GPD 20 - Wasserbad	Thermo Scientific, Waltham, USA
Konfokalmikroskop Fluoview FV10i	Olympus, Hamburg, Deutschland
LightCycler® 480 Real-time PCR 96-well system II	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
MasterFlex Pumpe L/S	Cole-Parmer, Wertheim, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40 C	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikrozentrifuge 5417 C/R	Eppendorf, Wesseling, Deutschland
NanoDrop One	Thermo Scientific, Waltham, USA
Nanodrop Photometer	Implen, Münche, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
PCR Thermocycler	Core Life Sciences, Laguna Niguel, USA
Pipette "Accu-jet pro"	Brand, Wertheim, Deutschland
Sicherheitswerkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl, Deutschland
Tecan Plattenleser Infinite F200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Wesseling, Germany

TissueLyser LT Gewebehomogenisierer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ultrazentrifuge Beckman SW55ti rotor	Beckman Coulter, Brea, USA
Vortexer	VWR International, Radnor, USA
Western Blotting Kammer (Transblot SD Semi-Dry)	Bio-Rad, Hercules, USA
xCELLigence RTCA Single Plate	ACEA Biosciences, San Diego, USA
Zentrifuge 5920R	Eppendorf, Wesseling, Deutschland

4.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Bezugsquelle
96-well Platten zur qPCR, FrameStar 480/96	4titude, Berlin, Deutschland
Cryo Konservierungsgefäße	Greiner Bio-One, Munich, Deutschland
E-Plate VIEW 96	ACEA Biosciences, San Diego, USA
Filter 0,2/0,45 µm	Greiner Bio-One, München, Deutschland
Gefilterte Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, München, Deutschland
HiTrap™ Heparin HP-Säulen	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland
Kanülen	Braun, Melsungen, Deutschland
Nunc™ EasyFill™ Cell Factory™	Thermo Scientific, Rockford, USA
PCR Reaktionsgefäße	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, München, Deutschland
PVDF Membran	Bio-Rad, Hercules, USA
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Eppendorf, Wesseling, Deutschland
Reaktionsgefäße 15 and 50 ml	Greiner Bio-One, München, Deutschland
Serologische Pipetten	Greiner Bio-One, München, Deutschland
Spritzen 0,5; 2 und 50 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Vivaspin Turbo 15 Ultrafiltration Unit, 50kDa	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Whatman-Papier	Bio-Rad, Hercules, USA
Zellkulturflaschen, und Platten	Techno Plastic Products AG (TPP), Schweiz

4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Bezugsquelle
10x FastDigest Green Puffer	Thermo Scientific, Waltham, USA
10x T4 Ligase Puffer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Amersham ECL Prime Western Blotting Detektionsreagenz	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
APS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Basticidin	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Benzonase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Beta-Mercaptoethanol (50 nM)	Gibco, Darmstadt, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Collagen R Lösung 2.0%, steril, 10x	SERVA, Heidelberg, Deutschland
DAPI Fluoromount-G	SouthernBiotech, Birmingham, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DNA Smart ladder (1kb)	Eurogentec, Cologne, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FBS Fetalclone II, Hyclone	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland
FCS (100X)	Gibco, Darmstadt, Deutschland
FuGENE® HD Transfektionsreagenz	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Hydrocortison	Pfizer, New York, USA
Insulin (Insuman Rapid)	Sanofi Aventis, Frankfurt, Deutschland
Iodixanol (Optiprep Dichtegradienten-Medium	Progen, Heidelberg, Deutschland

Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamat (100X)	Gibco, Darmstadt, Deutschland
LightCycler 480 SYBR Green I master mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Lipofectamine 2000	Life Technologies, Carlsbad, USA
Lipofectamine 3000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MEM NEAA (100X)	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat (100X)	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Opti-MEM	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Page Ruler Plus Prestained protein ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd (PFA) 4%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS pH 7.4, (10X)	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (100X)	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Phenolrot-Lösung (0.5 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pierce RIPA Puffer	Thermo Scientific, Rockford, USA
Polybren	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Poly I:C	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Polyacrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Polyethylenglykol (PEG) 6000	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences, Warrington, USA
Protease Inhibitor (Complete)	Roche, Mannheim, Deutschland
Puromycin	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
rDNAse	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
RNA/ater RNA Stabilisierungsreagenz	Qiagen, Hilden, Deutschland

Roti-Safe Gelfarbstoff	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Sucrose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau 0.4%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin (10X)	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Trypton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Versene	Gibco, Darmstadt, Deutschland
William´s Medium E	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Zeocin	InvivoGen, Toulouse, Frankreich

4.1.4 Kits

Produkt	Bezugsquelle
AAVpro [®] Titrations-Kit	Takara, Kusatsu, Japan
Gene Jet Plasmid Gelextraktions-Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
Gene Jet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
NucleoSpin RNA Isolations Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin Tissue Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Phusion [®] Hot Start Flex Kit	New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland
Plasmid PlusMidi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PureLink HiPure Plasmid Gigaprep Kit	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
QIAamp MinElute Virus Spin Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAGEN Plasmid <i>Plus</i> Midi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuantiTect Virus +ROX Vial Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperScript [®] III First-Strand Synthesis System für RT-PCR	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

4.1.5 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
50x TAE Puffer	Tris 2M Essigsäure 2M EDTA pH 8,0 50 mM in H ₂ O
AAV Lyse-Puffer	50mM Tris 150mM NaCl 5mM MgCl ₂ x 6 x H ₂ O in H ₂ O
ACK Lyse-Puffer	NH ₄ Cl 150 mM KHCO ₃ 10 mM Na ₂ EDTA 0,1 mM pH 7,2 – 7,4 in H ₂ O
SDS-Page Lauf-Puffer (10x)	Tris 250 mM Glycin 2 M SDS 1% in H ₂ O
TBS-T Puffer	Tris 20 mM NaCl 150 mM Tween 20 0.1% in H ₂ O
Westernblot Transferpuffer	3 g/l Tris 14,4 g/l Glycin 20 % Methanol in H ₂ O

4.1.6 Zelllinien und Bakterien

Name	Beschreibung	Bezugsquelle
AML12 (-NTCP)	AML12: differenzierte murine Hepatozytenzelllinie (stabil mit NTCP transfiziert, um die HBV/HDV Infektion zu ermöglichen)	Institut für Virologie, TU München, Deutschland
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzelllinie; mit Fragmenten der Adenovirus Typ 5 DNA transformiert. Exprimiert eine mutierte Version des großen SV40 T-Antigens	Institut für Virologie, TU München, Deutschland
HepaRG	Humane Hepatomzelllinie, kann in Hepatozyten ähnliche Zellen differenziert werden, empfänglich gegenüber HBV/HDV	Institut für Virologie, TU München, Deutschland

HepG2 (-NTCP)	Humane Hepatomzelllinie (stabil mit NTCP transfiziert, um die HBV/HDV Infektion zu ermöglichen)	Institut für Virologie, TU München, Deutschland
HepG2-NTCP RIG-I/MDA5/MAVS knockout	Humane Hepatomzelllinie mit durch CRISPR/Cas9-Methode eingebrachte Gen-Knockouts für RIG-I, MDA5 bzw. MAVS	Genzentrum München / Hornung Lab, LMU, Deutschland
HepG2 HBV1.3 (X-)	Humane Hepatomzelllinie, in die ein 1,3-faches HBV Überlänge genom stabil integriert wurde (und einen Knockout für das X-Protein hat)	Institut für Virologie, TU München, Deutschland
HepG2-NTCP HBV1.3 L-	Humane Hepatomzelllinie, in die ein 1,3-faches HBV Überlänge genom stabil integriert wurde und einen Knockout des L-Proteins hat, exprimiert NTCP	Institut für Virologie, TU München, Deutschland
HepG2-NTCP Cas9	Humane Hepatomzelllinie, stabil mit NTCP transfiziert. Exprimiert das Cas9 Protein	Institut für Virologie, TU München, Deutschland
HepG2-NTCP RNase L KO 1-4	Humane Hepatomzelllinie, stabil mit NTCP transfiziert. Durch CRISPR/Cas9-Methode eingebrachter Gen-Knockout von RNase K	Institut für Virologie, TU München, Deutschland
HuH7	Differenzierte humane Hepatomzelllinie	Institut für Virologie, TU München, Deutschland
One Shot® Stbl3™ chemisch kompetente E. coli	Chemisch kompetente <i>Escherichia coli</i> Bakterien	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

4.1.7 Medien für Zellkultur und Bakterien

Die Zellkulturmedien und die jeweiligen Supplemente wurde von der Gibco Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland bezogen.

Medium	Zusammensetzung	
DMEM Vollmedium	DMEM	500 ml
	FCS	50 ml
	L-Glutamat, 200 mM	5,5 ml
	Pen/Strep, 10000 U/ml	5,5 ml
	MEM NEAA, 100x	5,5 ml
	Natriumpyruvat, 100mM	5,5 ml
DMEM Differenzierungsmedium	DMEM	500 ml
	FCS	50 ml
	L-Glutamat, 200 mM	5,5 ml
	Pen/Strep, 10000 U/ml	5,5 ml
	MEM NEAA, 100x	5,5 ml
	Natriumpyruvat, 100mM	5,5 ml

	DMSO	13,75 ml
DMEM Transfektionsmedium	DMEM	500 ml
	FCS	50 ml
	L-Glutamat, 200 mM	5,5 ml
	NEAA, 100x	5,5 ml
	Natriumpyruvat, 100 mM	5,5 ml
Einfriermedium	FCS	450 µl
	DMSO	50 µl
humanes T-Zell-Medium	RPMI 1640	500 ml
	FCS	50 ml
	Pen/Strep, 10,000 U/ml	5,5 ml
	L-Glutamat, 200 mM	5,5 ml
	MEM-NEAA, 100x	5,5 ml
	Natriumpyruvat, 100 mM	5,5 ml
	HEPES	5,5 ml
Gentamicin	208 µl	
LB Medium	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	Natriumchlorid	10 g
	H ₂ O	1000 ml
PMH Erhaltungsmedium	DMEM	500 ml
	FCS	50 ml
	Pen/Strep, 10,000 U/ml	5,5 ml
	L-Glutamin, 200 mM	5,5 ml
	HEPES	11,5 ml
	Insulin, 40 IU/ml	2,865 ml
	Glucose, 50 mg/ml	6 ml
	Gentamicin, 50mg/ml	0,55 ml
	Hydrocortison, 4,42 mg/ml	0,549 ml
	Inosin, 2,5 mg/ml	2,8 ml
PMH Präperfusionsmedium	HBSS	500 ml
	Pen/Strep, 10,000 U/ml	5,5 ml
	L-Glutamin, 200 mM	5,5 ml
	Natriumpyruvat, 100 mM	28 ml
	HEPES	11,5 ml
	Insulin, 40 IU/ml	0,328 ml
	Glucose, 50 mg/ml	6 ml
EDTA, 100 mM	2,8 ml	
PMH Verdaumedium	Williams Medium E	500 ml
	Pen/Strep, 10,000 U/ml	5,5 ml
	L-Glutamin, 200 mM	5,5 ml
	Natriumpyruvat, 100 mM	30 ml
	HEPES	11,5 ml
	Insulin, 40 IU/ml	0,328 ml
	Glucose, 50 mg/ml	6 ml
CaCl ₂ , 1 M	1,8 ml	

William´s E Standardmedium	Williams Medium E	500 ml
	FBS Fetalclone II	50 ml
	Pen/Strep, 10000 U/ml	5,5 ml
	L-Glutamat, 200 mM	5,5 ml
	Humanes Insulin, 40 IU/ml	320 µl
	Hydrocortison, 4.42 mg/ml	580 µl
	Gentamicin 50mg/ml	550 µl
William´s E Differenzierungsmedium	Williams Medium E	500 ml
	FBS Fetalclone II	50 ml
	Pen/Strep, 10000 U/ml	5,5 ml
	L-Glutamat, 200 mM	5,5 ml
	Humanes Insulin, 40 IU/ml	320 µl
	Hydrocortison, 4.42 mg/ml	580 µl
	Gentamicin 50mg/ml	550 µl
DMSO	9,9 ml	
William´s E Transfektionsmedium	Williams Medium E	500 ml
	FCS	50 ml
	L-Glutamat 200 mM	5,5 ml
	Pen/Strep 10000 U/ml	5,5 ml

4.1.8 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Verwendung	Bezugsquelle
Alexa Flour 594 Ziege anti-Maus IgG	1:750	IF	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Anti-Beta-Actin	1:10000	WB	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-Maus WB Sekundärantikörper	1:10000	WB	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HDAg#280	1:500	IF	AG Thomas von Hahn, MH Hannover, Deutschland
RNase L Antikörper (E-9): sc-74405	1:100	WB	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA

4.1.9 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der MicroSynth AG, Balgach, Schweiz bezogen.

Primer	Sequenz 5' → 3'
gRNA1 RNaseL Oligo fw	CAC CGA TTC ATC GTC TCT TCC ATC C
gRNA1 RNaseL Oligo rev	AAA CGG ATG GAA GAG ACG ATG AAT C
gRNA2 RNaseL Oligo fw	CAC CGC GAC TGT CTG AGT GAC CTG C

gRNA2 RNaseL Oligo rev	AAA CGC AGG TCA CTC AGA CAG TCC C
gRNA3 RNaseL Oligo fw	CAC CGC TAT AGG ACG CTT CGG AAT G
gRNA3 RNaseL Oligo rev	AAA CCA TTC CGA AGC GTC CTA TAG C
gRNA4 RNaseL Oligo fw	CAC CGC CAC GTC CTC CAG CGG TAG A
gRNA4 RNaseL Oligo rev	AAA CTC TAC CGC TGG AGG ACG TGG C
HDV fw	CCC TTA GCC ATC CGA GTG G
HDV rev	TCC TCT TCG GGT CGG CA
HDV Sonde	ATG CCC AGG TCG GAC CGC G
hIP-10 fw	ACT GTA CGC TGT ACC T
hIP-10 rev	TGG CCT TCG ATT CTG GA
hOAS1 fw	AGA GCT GGA CGG ATG TTA GC
hOAS1 rev	GGT TTG GTG CCA GAA CTG AG
IFIT1 fw	GAT CAG CCA TAT TTC ATT TTG AAT C
IFIT1 rev	GAA AAT TCT CTT CAG CTT TTC TGT G
IFNB1 fw	GCC GCA TTG ACC ATC T
IFNB1 rev	AGT TTC GGA GGT AAC CTG
IFNL1 fw	TAG CGA GCT TCA AGA AGG CC
IFNL1 rev	ACA GGG CGC TCC CTC AC
MDA5 fw	GGC ACC ATG GGA AGT GAT T
MDA5 rev	ATT TGG TAA GGC CTG AGC TG
mGAPDH fw	ACC AAC TGC TTA GCC C
mGAPDH rev	CCA CGA CGG ACA CAT T
mIP-10 fw	CCA GTG AGA ATG AGG GCC ATA
mIP-10 rev	CTC AAC ACG TGG GCA GGA T
mOAS1 fw	CTG GGT CAT GTT AAT ACT TCC
mOAS1 rev	CAC TCG GGA ACC ATC CTT TTT A
TBP1 fw	TAT AAT CCC AAG CGC TTT GC
TBP1 rev	CTG TTC TTC ACT CTT GGC TCC

4.1.10 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Bezugsquelle
593-pSVL (D3)	Kodiert für drei Kopien des HDV Genoms, wurde für die HDV Produktion verwendet	AG Protzer
594-pT7HB2.4	Kodiert die HBV Hüllproteine	AG Protzer
660-pRR_PRomotorS1_L_M_S_X_IRES_Puro	Kodiert die HBV Hüllproteine und das X-Protein	AG Protzer
pAAV-HDV1.2	Kodiert für das 1,2-Fache HDV Überlänge genom, flankiert von ITRs	Dr. Gloria Gonzalez-Aseguinolaza
pXR8	Kodiert AAV Verpackungsproteine (Rep, Cap)	AG Protzer
pXX6	Kodiert adenovirale Helferproteine (E2A, E4 und V4)	AG Protzer
psPAX2	Kodiert lentivirale Helferproteine (gag, pol)	Addgene
pVSV-G	Kodiert das VSV G Glykoprotein	AG Protzer
p246LentiGuide-Puro	Backboneplasmid für gRNAs zur Produktion von lentiviralen Vektoren	Addgene
p246 gRNA1_RNaseL	P246 basiertes Plasmid mit gRNA1 zum spezifischen Knockout von RNase L	Sebastian Altstetter
p246 gRNA2_RNaseL	P246 basiertes Plasmid mit gRNA2 zum spezifischen Knockout von RNase L	Sebastian Altstetter
p246 gRNA3_RNaseL	P246 basiertes Plasmid mit gRNA3 zum spezifischen Knockout von RNase L	Sebastian Altstetter
p246 gRNA4_RNaseL	P246 basiertes Plasmid mit gRNA4 zum spezifischen Knockout von RNase L	Sebastian Altstetter

4.1.11 Mausstämme

Alle erzeugten Mausstämme wurden auf Basis des C57Bl/6J Mausstamms gezüchtet.

Mausstamm	Beschreibung	Bezugsquelle
C57Bl/6J	Wildtyp C57Bl/6J Mäuse	Charles River
h/mNTCP	C57Bl/6J Mäuse, welche ein chimäres NTCP, exprimieren, sind transgen für den für die Aufnahme von HBV und HDV benötigten Teil des humanen NTCP (Aminosäuren 84-87)	AG Protzer
MDA5 k.o.	C57Bl/6J Mäuse, welche einen Knockout im MDA5 Locus haben und dieses nicht exprimieren	Bernhard Holzmann

4.1.12 Software

Software	Bezugsquelle
Graph Pad Prism 6.01	Graph Pad, La Jolla, USA
ImageJ	NIH, Bethesda, USA
LightCycler 480 Software 1.5.1.62	Roche, Mannheim, Deutschland
Olympus FluoView	Olympus, Hamburg, Deutschland
RTCA Software 2.0	ACEA Biosciences, San Diego, USA
Serial Cloner 2.6.1	Serial Basics
Windows 7/8/10, MS Office	Microsoft, Redmond, USA

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 DNA-Gelelektrophorese

Um die jeweiligen Größen von PCR Produkten bzw. von Fragmenten, welche per Restriktionsverdau erzeugt wurden, zu überprüfen, wurde grundsätzlich eine Gelelektrophorese mit einprozentigem Agarosegel durchgeführt. Als Laufpuffer wurde TAE (1x) verwendet und die Färbung der DNA erfolgte mit Roti-Safe (5 µl pro 100ml Gel). Um eine bessere Sichtbarkeit beim Auftragen zu ermöglichen, wurden die DNA-Proben vorher mit Färbepuffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100-120 Volt für 30 bis 40 min, anschließend wurden die DNA-Banden mittels UV-Bestrahlung (312 nm), anhand einer definierten DNA ladder analysiert.

4.2.1.2 Generierung der gRNA Plasmide zum Knockout von RNase L

Zunächst wurde das lentiGuide-Puro Backbone-Plasmid mit BsmBI für 30 Minuten bei 37 °C folgendermaßen linearisiert:

Substanz	Volumen/Menge
p246LentiGuide-Puro	5 µg
FastDigest BsmBI	3 µl
10X FastDigest Puffer	3µl
ddH ₂ O	auf 30 µl auffüllen

Anschließend wurde der Restriktionsverdau mittels Elektrophorese aufgetrennt und die größere Bande (das linearisierte Backbone Plasmid) mit dem Gene Jet Plasmid Gelextraktions-Kit anhand der Instruktionen des Herstellers aufgereinigt. Als nächstes wurden anhand der Publikation von *Shalem et al.* vier verschiedene Oligonukleotidpaare designt, welche für potenzielle gRNA Sequenzen zum Knockout von RNase L kodierten (Shalem, et al., 2014). Hierfür wurden die jeweiligen Oligonukleotide (fw und rev) nach folgendem Schema zu einem Paar hybridisiert (engl. *annealing*):

Substanz	Volumen
Oligonukleotid fw (100 µM)	1 µl
Oligonukleotid rev (100 µM)	1 µl
10X T4 Ligation Puffer (NEB)	1 µl
ddH ₂ O	7 µl

Das Annealing erfolgte für 37 °C für 30 min, gefolgt von 95 °C für 5 min und abschließender Abkühlung auf 25 °C (Abkühlung um 5°C pro Minute).

Anschließend wurden die Oligonukleotidpaare 1:100 in ddH₂O verdünnt und mit dem linearisierten lentiGuide-Puro Plasmid für 10 min bei RT nach folgendem Schema ligiert:

Substanz	Volumen/Menge
BsmBI verdautes p246LentiGuide-Puro	50 ng
Oligonukleotidpaar	1 µl
2X Quick Ligase Puffer	5 µl
Quick Ligase (NEB M2200S)	1 µl
ddH ₂ O	auf 11 µl auffüllen

Die daraus erhaltenen Plasmide p246 gRNA1-4_RNaseL wurden anschließend in *Stb13* Bakterien transformiert und zur Überprüfung sequenziert.

4.2.1.3 Transformation

Zur Amplifikation von Plasmiden, wurden chemisch kompetente *E. coli Stb13* mittels Hitzeschock transformiert. Hierfür wurden 50 µl der aliquotierten Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 500 ng des zu amplifizierenden Plasmids gemischt. Anschließend wurden die Zellen für 20 Minuten auf Eis inkubiert und danach der Hitzeschock (42 °C für 90 Sekunden) im Wasserbad durchgeführt. Im Anschluss wurden die Bakterien zum Abkühlen kurz auf Eis gestellt, dann 200 µl SOC Medium dazugegeben und die Zellen für 30 Minuten bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert (600g, 5 min), der Überstand verworfen und die Zellen in 100 µl frischem SOC Medium resuspendiert. Je nach auf dem Plasmid kodierten Resistenzgenen, wurden die Bakterien auf Kanamycin bzw. Ampicillin supplementierten LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.2.1.4 Isolierung der Plasmid-DNA

Nach erfolgreicher Transformation wurden einzelne Kolonien gepickt und für ca. 8 Stunden bei 37 °C, 185 rpm in 3 ml LB-Flüssigmedium inokuliert, welches je nach Selektionsmarker mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin supplementiert wurde. Nach der Inkubation wurden die Bakterien durch Zentrifugation (2 min, 6800g) pelletiert und die Plasmide mittels GeneJET Plasmid Miniprep Kit aufgereinigt, wenn nur geringe Plasmidmengen nötig waren. Als Alternative für große Plasmidmengen, wurden 50 µl aus dem 3 ml Inokulum in 100 ml frisches LB-Flüssigmedium (erneut mit Ampicillin bzw. Kanamycin supplementiert) überführt

und über Nacht bei 37 °C, 185 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienkulturen durch Zentrifugation (3400g, 10 min, 4 °C) pelletiert und die Plasmid-DNA mittels Plasmid *Plus* Midi Kit anhand der Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

4.2.1.5 RNA-Extraktion

Zelluläre RNA aus Zellkulturexperimenten wurde mittels NucleoSpin RNA isolation Kit gemäß der Anleitung des Herstellers isoliert. Nachdem die Zellen durch den RA1-Puffer (mit 1% β -Mercaptoethanol supplementiert) lysiert wurden, wurden die Lysate bei -80 °C gelagert und anschließend die RNA-Extraktion durchgeführt. Wenn die RNA im weiteren Verlauf zur cDNA Synthese und qPCR verwendet werden sollte, wurde ein DNA-Verdau durchgeführt (15 min, RT).

Zur RNA Isolation aus Lebergewebe, wurden 30 mg der in *RNA/ater* Reagenz eingelegten Leberwürfel zunächst mittels TissueLyser LT in 600 μ l RLT Puffer für 3 Minuten bei 50 Hz homogenisiert. Anschließend wurde die RNA mittels RNeasy Mini Kit entsprechend der Anleitung des Herstellers isoliert, dabei wurde zur RNA-Fällung 50 prozentiges Ethanol verwendet.

Um RNA und gleichzeitig DNA aus Serum zu isolieren, wurde das QIAamp MinElute Virus Spin Kit entsprechend der Anleitung des Herstellers verwendet.

4.2.1.6 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden am NanoDrop One gemessen. Hierfür wurde zunächst mit 1 μ l des entsprechenden Elutionspuffers der Referenzwert bestimmt und anschließend 1 μ l des DNA bzw. RNA Proben aufgetragen und die Konzentration gemessen.

4.2.1.7 Sequenzierung

Zur Sequenzierung von Plasmiden bzw. Proben, wurden diese auf eine Konzentration von 30 – 100 ng/ μ l eingestellt. Anschließend wurden 20 μ l der Probe und 20 μ l des entsprechenden Primers (10 μ M) zum sequenzieren an den externen Anbieter GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) gesendet.

4.2.1.8 cDNA Synthese

Zur cDNA Synthese ausgehend von extrahierter RNA, wurde das SuperScript® III First-Strand Synthesis System für RT-PCR Kit verwendet. Dabei wurden 4 μ l der RNA Probe (maximal bis zu 500 ng) mit 5 μ l 2x RT Reaktions-Mix und 1 μ l RT Enzym-Mix gemischt und anschließend im PCR Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

Schritt	T [°C]	T [min]
Vorwärmen	25	5
Synthese	50	30
Inaktivierung	85	5
Kühlen	4	-

Danach wurde 0.5 µl RNaseH pro Sample hinzugegeben und die RNA für 20 min bei 37 °C im Thermocycler degradiert. Vor der qPCR wurden die cDNA Proben 1:10 bzw. 1:20 mit H₂O verdünnt und anschließend bei -20 °C gelagert.

4.2.2 Allgemeine Zellkulturmethoden

Alle Zelllinien wurden unter sterilen Konditionen kultiviert und Zellkulturexperimente wurden unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Zellinkubator bei 37 °C, 5% CO₂ and 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

4.2.2.1 Aufrechterhaltung der Zellkultur

Zum Passagieren der Zellkultur, wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen, dann zum Ablösen der Zellen mit Trypsin für 5 bis 10 Minuten bei 37 °C inkubiert und in dem entsprechenden Zellkulturmedium resuspendiert. Alle HepG2, HuH7 und HEK293 basierten Zelllinien wurden alle 3 bis 4 Tage 1:10, HepaRG und AML12 basierte Zellen einmal wöchentlich 1:5 passagiert. Alle Platten und Flaschen, die zur Kultivierung von HepG2 und AML12 basierten Zelllinien verwendet wurden, wurden vorher kollagenisiert (Collagen R, 1:10 in H₂O, 30 min, 37°C gefolgt von 2x Waschen mit PBS). HepG2, Huh7 und HEK293 basierte Zellen wurden in DMEM Vollmedium und HepaRG und AML12 Zellen in William´s E Standardmedium kultiviert.

4.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen einzufrieren, wurden sie durch Zentrifugation (350 g, 5 min, RT) pelletiert, in 500 µl Einfriermedium pro Kryoröhrchen (90% FCS und 10% DMSO) resuspendiert und in 1,5 ml Kryoröhrchen aliquotiert. Die Röhrchen wurden direkt in eine Einfrierhilfe überführt, um einen langsamen und konstanten Temperaturabfall für 24 Stunden auf -80 °C im Gefrierschrank zu ermöglichen. Zur Kurzzeitlagerung wurden die Zellen bei -80°C gehalten und alternativ zur Langzeitlagerung in Flüssigstickstofftanks überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen kurz in ein Wasserbad (37 °C) gehalten, bis ungefähr die Hälfte der Zellsuspension aufgetaut war. Anschließend wurde tröpfchenweise 1 ml vorgewärmtes Medium zugegeben und die verdünnten Zellen in 20 ml Kulturmedium überführt.

Danach wurden die Zellen zentrifugiert (350 g, 5 min), der Überstand verworfen, die Zellen in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und zur weiteren Kultivierung in eine T25-Flasche überführt.

4.2.2.3 Zellzählung

Vor der Zellzählung wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau zur lebend-tot-Färbung gemischt. Dann wurden 10 µl dieser Mischung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und lebensfähige, nicht gefärbte Zellen wurden unter einem Lichtmikroskop gezählt. Um die Zellzahl zu berechnen, wurde für zwei gezählte Quadrate die folgende Formel verwendet:

$$N \left(\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right) = \text{Anzahl der gezählten Zellen} \times 10^4 / \text{ml}$$

4.2.3 Produktion der HDV-Stocks

Für die HDV-Produktion wurden 1×10^6 HuH7-Zellen einen Tag vor der Transfektion in William's E-Transfektionsmedium pro 10 cm Petrischale ausgesät. Die Zellen wurden mit den Plasmiden p593-pSVL (D3), das drei Kopien des gesamten HDV-Genoms kodiert und p660-pRR_PromotorS1_L_M_S_X_IRES_Puro, das für die HBV-Hüllproteine und das X-Protein kodiert, im Verhältnis 1:1 kotransfiziert. Pro Schale wurde die Transfektion mit 10 µg der jeweiligen Plasmide und 60 µl FugeneHD-Transfektionsreagenz in 1 ml Opti-MEM durchgeführt. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um die Menge des Input-Plasmids zu verringern, anschließend wurde 15 ml frisches William's E-Transfektionsmedium zugegeben. Die Überstände wurden alle 2-3 Tage bis einschließlich 17 Tage nach der Transfektion gesammelt und bei 4 °C gelagert, bis sie für die Reinigung mittels Heparinsäule verwendet wurden. Vor der Reinigung wurden die gesammelten Überstände filtriert (0,22 µm), um Zellaggregate zu entfernen, und dann auf eine 5 ml Heparinsäule geladen. Um die Menge der Input-Plasmid-DNA zu reduzieren, wurde ein DNA-Verdau auf der Säule mit 200 U rDNase (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) für 1 Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurden die an die Heparinsäule gebundenen Virionen mit 3xPBS eluiert und die gesammelte Elution wurde durch Zentrifugation (3500 g, 4 °C) in Vivaspin Turbo 15 Ultrafiltrationssäulen (50 kDa Cutoff) konzentriert. Der HDV-Titer wurde über qPCR, wie in 4.2.10.1 beschrieben, bestimmt und die HDV-Stocks bei -80 °C gelagert (Altstetter, et al., 2021).

4.2.4 Produktion der AAV-HDV-Stocks

Die Produktion von Adeno-assoziiertem Virus (AAV) Serotyp 2, welcher in einem AAV-Serotyp 8-Kapsid verpackt wurde, erfolgte in transient transfizierten HEK293T Zellen. Diese wurden auf 15 cm²-Schalen (insgesamt 18) kultiviert und bei einer Konfluenz von ~ 80% geerntet, dann

in zwei Flaschen DMEM-Vollmedium resuspendiert und in eine Zellfabrik (Nunc™ EasyFill™ Cell Factory™) mit 10 Ebenen überführt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit dem pXX6-Helperplasmid (Xiao et al., 1998), dem AAV-HDV-Vektorplasmid pAAV-HDV 1.2 und dem Verpackungsplasmid pXR8 (Gao et al., 2004) in einem Verhältnis von 4:1:1 unter Zuhilfenahme von 1 mg / ml Polyethylenimin (PEI) transfiziert. Im Detail wurden 442,5 µg pXR8, 442,5 µg pAAV-HDV 1.2 und 1720,8 µg pXX6 in 45 ml DMEM-Transfektionsmedium (Mix 1) verdünnt und zusätzlich 4 ml PEI zu weiteren 45 ml DMEM-Transfektionsmedium (Mix 2) gegeben. Danach wurden Mix 1 und 2 gemischt, sorgfältig resuspendiert und schließlich 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurde diese Transfektionsmischung zu 1000 ml DMEM-Transfektionsmedium gegeben und damit das Medium in der Zellfabrik ersetzt. Nach sechsständiger Inkubation wurde das Transfektionsmedium gegen DMEM-Vollmedium ausgetauscht. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, pelletiert (1000 g, 15 min, 8 ° C), mit PBS gewaschen und in 7,4 ml AAV-Lyse-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ in H₂O) resuspendiert. Danach wurde das Zelllysate insgesamt drei Einfrier-Auftau-Zyklen (-80 °C Gefrierschrank dann 37 °C Wasserbad und dann wieder -80 °C Gefrierschrank) ausgesetzt und schließlich 30 Minuten bei 37 °C mit 50 U/ml Benzonase behandelt. Die Reinigung des AAV-HDV 1.2-Stocks wurde über einen Iodixanol-Gradienten (60, 40, 25 und 15% Iodixanol in PBS-MK (1 mM MgCl₂ und 2,5 mM KCl in 1 × PBS)) durchgeführt. Die 15% -Phase wurde mit 1 M NaCl (PBS-MKN) ergänzt, die 60%-igen und 25%-igen Iodixanolphasen wurden mit 1,25 µl bzw. 2,5 µl Phenolrot (0,5%) pro ml ergänzt. Die Schichtung des Gradienten wurde durchgeführt, indem 600 µl 60%-ige mit 600 µl 40%-iger Iodixanollösung überlagert wurden und dann mit 25%-iger und 15%-iger Iodixanollösung nahezu aufgefüllt wurde. Schließlich wurde das verarbeitete Zelllysate auf den Gradienten gegeben (insgesamt 6 Röhrchen). Nach 2-stündiger Zentrifugation in einem SW55Ti-Rotor bei 50.000 rpm und 4 °C, wurde der AAV-HDV-Vektor aus der 40%-igen Iodixanolphase gesammelt. Virale DNA wurde isoliert, indem 5 µl Virus-Stock mit 5 µl TE-Puffer (aus dem Plasmid Gigaprep Kit) und 10 µl NaOH (2 M) 30 Minuten lang bei 56 °C inkubiert und danach 480 µl HCl (40 mM) zugegeben wurde. Die viralen Genomäquivalente wurden durch qPCR unter Verwendung des AAVpro® Titrations Kits gemäß den Anweisungen des Herstellers bestimmt. Die AAV-HDV Stocks wurden bei -80 °C gelagert (Altstetter, et al., 2021).

4.2.5 Produktion von Lentiviren zum RNase L Knockout

Zur Produktion lentiviraler Vektoren, welche zur Einbringung von gRNAs zum Gen-Knockout von RNase L bestimmt waren, wurden 8×10^5 HEK293T Zellen pro Well (6 Well Platte) in 2 ml DMEM Vollmedium ausgesät und über Nacht in den Inkubator gestellt. Am folgenden Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit den Plasmiden psPAX2, pLP-VSV-G und einem der

jeweiligen gRNA kodierenden Plasmiden p246 gRNA1-4_RNaseL (siehe 4.2.1.2) mit Lipofectamine 2000 in folgendem Verhältnis:

p246 gRNA1-4_RNaseL : psPAX2 : pVSV-G = 1,5µg : 1,07µg : 0,35µg und 9µl Lipo2000 in 1,5 ml DMEM Vollmedium pro Well. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und 3 Tage nach Transfektion wurden die jeweiligen Überstände gesammelt, zentrifugiert und filtriert. Die Lagerung der jeweiligen Virusstocks erfolgte bei -80 °C.

4.2.6 Generierung der HepG2-NTCP RNase L Knockout Zelllinien

Zur Generierung der HepG2-NTCP RNase L Knockout Zelllinien wurden $0,5 \times 10^6$ HepG2-NTCP Cas9 Zellen pro Well einer kollagenisierten 6-Well Platte in DMEM Vollmedium ausgesät und am nächsten Tag (ca. 50% Konfluent) mit den produzierten Lentiviren (siehe 4.2.5) transduziert. Dazu wurden 0,5 ml der jeweiligen Virusstocks mit 0,5 ml DMEM Vollmedium und 6 µg/ml Polybren gemischt und auf die ausgesäten HepG2-NTCP Cas9 Zellen gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und die Selektion der transduzierten Zellen, durch Zugabe von 1,5 µg/ml Puromycin in das DMEM Vollmedium, gestartet. Die Selektion der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 2 Wochen. Anschließend wurden die positiv selektionierten Zellen gepoolt und der RNase L Knockout mittels Westernblot überprüft. Dadurch wurden vier verschiedene RNase L Knockout-Zelllinien generiert, die als HepG2-NTCP RNase L KO 1, 2, 3 bzw. 4 bezeichnet wurden.

4.2.7 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Westernblot Analyse

Zur Analyse des RNase L Gen-Knockouts wurden die Zellen mit Pierce RIPA Puffer mit supplementiertem Protease Inhibitor (Complete) lysiert und mit reduzierendem SDS Ladepuffer gemischt und bei 95 °C, 5 min, 800 rpm aufgekocht. Anschließend wurden die Lysate zusammen mit einem Proteinladder auf das SDS-Gel aufgetragen. Dies setzte sich wie folgt zusammen:

Trenngel	12,5 %	Sammelgel	5 %
40% Polyacrylamid	2,5 ml	40% Polyacrylamid	0,24 ml
1M Tris pH 8.8	3 ml	1M Tris pH 8.8	0,5 ml
10% SDS	80 µl	10% SDS	20 µl
VE-Wasser	2,5 ml	VE-Wasser	1,25 ml
TEMED	7 µl	TEMED	2 µl
APS	40 µl	APS	15 µl

Die Elektrophorese erfolgte bei 20mA pro Gel in SDS-Page Lauf-Puffer für ca. 2 Stunden. Die Proteine wurden auf einer, durch Methanol aktivierten, PVDF Membran per Wet-Blot in Transferpuffer geblottet. Das Blotting erfolgte bei 300 mA für 2 Stunden. Anschließend wurde die Membran mit 5% Milchpulver in TBS-T für 1 Stunde bei RT geblockt und danach mit dem Primärantikörper (1:100 RNase L Antikörper (E-9): sc-74405 bzw. anti-Beta-Actin 1:10000 in 5% Milchpulver in TBS-T) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran 3x mit TBS-T für 10 min gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper (1:10000 Anti-Maus mit Peroxidase gekoppelt in 5% Milchpulver in TBS-T) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Die Entwicklung der Westernblots erfolgte nach dreimaligem Waschen mit Amersham ECL Prime Western Blotting Substrat und gefolgt von der Analyse mittels ECL Chemocam.

4.2.8 *In vitro* Infektionen mit HBV/HDV und Transduktion mit AAV-HDV

Der Virus-Stock, für alle während dieser Arbeit durchgeführten HBV-Infektionen, wurde freundlicherweise von Jochen Wettengel zur Verfügung gestellt. HDV-Infektionen wurden mit den selbst hergestellten Stocks durchgeführt (siehe 4.2.3). Sowohl HBV- als auch HDV-Infektionen folgten demselben Protokoll. Hierbei wurden differenzierte Zellen über Nacht mit 5% PEG in Differenzierungsmedium mit den angegebenen HBV bzw. HDV MOIs inokuliert. Ungefähr 18 Stunden nach Start der Infektion, wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und frisches Differenzierungsmedium zugegeben. Die Transduktion mit AAV-HDV erfolgte nach demselben Protokoll, die verwendete MOI betrug stets 2×10^4 Virionen pro Zelle. Im Fall von HepG2-basierten Zelllinien, welche in 24-Well-Platten ausgesät wurden, erfolgte die Zelldifferenzierung vor der Infektion mittels DMEM-Differenzierungsmedium für 14 Tage. Für HepaRG-basierte Zelllinien, die in William's E-Standardmedium in einem 12-Well-Format ausgesät und für zwei Wochen kultiviert wurden, wurde vor der Infektion eine Differenzierung für zwei Wochen in William's E-Differenzierungsmedium durchgeführt. AML12 basierte Zellen wurden für 2 Tage mit William's E-Differenzierungsmedium differenziert und anschließend infiziert. Die AML12 Zellen und primären murinen Hepatozyten, welche kein hNTCP exprimierten, wurden 3 Tage vor der HDV Infektion zusätzlich mit 1×10^7 TU/ μ l Hd-Ad-NTCP Vektor von Dr. Martin Mück-Häusl transduziert (Altstetter, et al., 2021).

4.2.9 Transfektion mit siRNA und poly I:C

Die Transfektion differenzierter, HepG2 basierter Zelllinien mit siRNA und poly I:C erfolgte mit Lipofectamin 3000. Die siRNA für den RNase L Gen-Knockdown wurde von Santa Cruz Biotechnology bezogen (RNase L siRNA (h): sc-45965). Im Vorlauf wurden 1×10^5 Zellen pro Well in eine 24-Well Platte ausgesät und für 14 Tage in DMEM Differenzierungsmedium differenziert, um bei Transfektion eine Konfluenz von 80-90% zu erreichen. Für die

Transfektion wurden pro Well 1,5 µl Lipofectamin 3000 Reagenz mit 25 µl Opti-MEM gemischt und gevortext. Anschließend wurden die in 25 µl Opti-MEM verdünnte siRNA bzw. das poly I:C zu der Lipofectamin/Opti-MEM Mischung gegeben, kurz gevortext und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden pro Well 50 µl der Suspension auf die Zellen gegeben. Die finale Konzentration pro Well betrug für die siRNA 30pmol und für das poly I:C 30 ng. Die Infektion der Zellen erfolgte 2 Tage nach siRNA- bzw 6 Stunden nach poly I:C-Transfektion.

4.2.10 Quantitative PCRs

Im Allgemeinen wurden alle qPCRs durch Pipettieren von 4 µl Probe, Standard oder H₂O-Kontrolle und 6 µl des jeweiligen Master-Mixes zusammen in ein Well einer 96-Well-PCR-Platte (FrameStar 480) in einem Kühlblock, durchgeführt. Danach wurde die Platte versiegelt, zentrifugiert (300 g, kurzer Spin) und die Analyse im LightCycler 480 Real-Time PCR 96-Well-System II durchgeführt.

4.2.10.1 qPCR zur Detektion von HDV

Zum Nachweis von HDV-Virionen in infizierten Zellen bzw. produzierten Stocks wurde die daraus extrahierte RNA direkt mit dem QuantiTect Virus + ROX Vial Kit in einem einstufigen qPCR-Ansatz analysiert. Zum Nachweis von viraler RNA wurde eine HDV-spezifische TaqMan-Sonde verwendet. Zunächst wurde ein Primer-Sonden-Mix hergestellt, indem 4 µl der TaqMan-Sonde (100 µM) zusammen mit 8 µl der HDV-spezifischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer (100 µM) in 80 µl H₂O pipettiert wurden. Der Master-Mix bestand aus 2 µl 5x QuantiTect Virus NR Master Mix, 0,5 µl Primer-Sonden-Mix, 0,1 µl 100x QuantiTect Virus RT Mix und 3,5 µl DEPC H₂O. Im Falle einer gewünschten Bestimmung der Menge an HDV-Input-Plasmid, wurde der 100x QuantiTect Virus RT Mix aus dem Master-Mix entfernt. Um die HDV-Genomäquivalente (GE) absolut zu quantifizieren, wurde eine Verdünnungsreihe eines HDV-Plasmidstandard mit definierter Konzentration verwendet. Das durchgeführte qPCR-Programm ist im Folgenden aufgeführt (Altstetter, et al., 2021):

Schritt	T [°C]	t [sek]	Zyklen
Reverse Transkription	50	1200	1
Denaturierung	95	300	1
Amplifikation	95	15	45
	60	45	
Kühlen	40	300	1

4.2.10.2 qPCR zur Analyse der Genexpression

Für die qPCR-basierte Genexpressionsanalyse wurde zunächst ein Master-Mix, bestehend aus 5 µl LightCycler 480 SYBR Green I-Master-Mix und 0,5 µl des jeweiligen Vorwärts- und Rückwärtsprimers (20 µM), hergestellt. Die Quantifizierung der Genexpression wurde mittels relativen Ansatzes durchgeführt, indem TBP1 (bei humanen Analysen) bzw. GAPDH (bei murinen Analysen) als Referenzgene verwendet wurden. Der Standard wurde aus den Positivkontrollen gepoolt und eine Verdünnungsreihe durchgeführt, um die PCR-Effizienz zu bestimmen. Die Genexpression wurde mit folgendem qPCR-Programm gemessen:

Schritt	T [°C]	t [sek]	Zyklen
Denaturierung	95	300	1
Amplifikation	95	15	45
	60	10	
	72	25	
Schmelzen	95	10	1
	60	45	
	95		
Kühlen	40	30	1

4.2.11 Immunfluoreszenzfärbung des HDAg

Um die HDV-Replikation in infizierten Zellen sichtbar zu machen, wurde HDAg intrazellulär gefärbt. Vor der Färbung wurden die Zellen auf kollagenisierten Deckgläsern ausgesät, differenziert und mit HDV infiziert. Der zur Färbung verwendete HDAg#280-Antikörper murinen Ursprungs wurde freundlicherweise von Thomas von Hahn von der MH Hannover zur Verfügung gestellt (Buchmann, et al., 2017). Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der HDV-Infektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurde die Fixierung der Zellen durchgeführt, indem 4% PFA pro Well zugegeben, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen wurde. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von PBS/0,25% Triton-X-100 für 10 Minuten permeabilisiert, dann erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend wurde mit 5% BSA in PBS für 1 Stunde geblockt. Die anschließende HDAg-Färbung wurde mit dem Primärantikörper HDAg#280 (1:500 in 1% BSA) durchgeführt, der zu den Zellen gegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde ein weiterer Waschschrift durchgeführt (3 × PBS für 5 Minuten) und die Zellen mit dem Sekundärantikörper (Alexa Flour 594 Ziege-

Anti-Maus-IgG, 1:750 in 1% BSA) für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Zellen erneut mit PBS (3x für 5 Minuten) gewaschen, gefolgt von der Fixierung der Deckgläser mit DAPI Fluoromount-G auf einem Objektträger. Der Objektträger wurde bei 4 ° C gelagert, bis eine Analyse mit dem Konfokalmikroskop Fluoview FV10i durchgeführt wurde. Dabei wurde sichergestellt, dass alle Proben mit konstanter Laserintensität und Sensorempfindlichkeit gemessen wurden, um einen korrekten Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen und Experimenten zu ermöglichen (Altstetter, et al., 2021).

4.2.12 Echtzeit-Bestimmung der Zellviabilität mittels xCELLigence RTCA

Um den Einfluss der HDV-Erkennung auf die Viabilität von Zielzellen in Ko-Kultur-Experimenten zu bestimmen, wurde das xCELLigence RTCA-System verwendet. Daher wurden 5×10^4 HBV-mono-, HBV-HDV-koinfizierte sowie nicht infizierte HepG2-NTCP und HepG2-NTCP MDA5 KO Zellen zwei Tage vor Beginn der Ko-Kultur in 200 µl/Well DMEM-Differenzierungsmedium auf zwei kollagenisierten xCELLigence 96-Well-Platten ausgesät. In der Zwischenzeit wurde die Impedanz kontinuierlich über die integrierten Goldelektroden der Platte gemessen, um die Lebensfähigkeit und das Wachstum der Zellen zu überwachen. Einen Tag vor Beginn der Ko-Kultur wurden S-CAR-, TCR-4G- und mock-transduzierte T-Zellen, die freundlicherweise von Antje Malo bereitgestellt wurden, frisch aufgetaut und bei einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in humanem T-Zellmedium ruhen gelassen. Am Tag des Beginns der Ko-Kultur wurden 100 µl Medium aus den Wells der ausgesäten Zellen entfernt und die jeweiligen transduzierten T-Zellen wurden in 100 µl humanem T-Zellmedium in verschiedenen Verhältnissen aus Effektor- zu Zielzellen (1:1, 1:3, 1:9) zugegeben. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde anhand des normalisierter Zellindex zu Beginn der Ko-Kultur durch kontinuierliche Messung der Impedanz anhaftender Zielzellen bestimmt (Altstetter, et al., 2021).

4.2.13 Mausexperimente

4.2.13.1 Isolierung primärer Maushepatozyten

Zunächst wurde das PMH Verdaumedium mit Collagenase IV (30 mg pro 100 ml medium) supplementiert, filtriert und auf 37 °C (30 bis 60 Minuten) vorgewärmt, damit sich die Collagenase im Medium lösen konnte. Etwa 30 min vor dem Beginn der Isolation der primären Maushepatozyten (PMH) wurde den Mäusen 200 µl Heparin (1000 IU/ml) i.p. verabreicht, um eine spätere Koagulation zu verhindern. Die Mäuse wurden mit CO₂ abgetötet, geöffnet und eine Kanüle in die Portalvene der Leber eingeführt, um die Leber mit 60 ml Präperfusionsmedium zu perfundieren. Anschließend wurde die Perfusion mit 80 ml Kollagenase supplementiertem PMH Verdaumedium fortgeführt und die Leber danach entnommen. Unter Zuhilfenahme von Skalpell und Pinzetten wurden die Leberzelle aus der

Leberkapsel entfernt und gefiltert (70 µm), um die Zellen voneinander zu lösen. Im Folgenden wurden die isolierten Zellen dreimal mit PMH Erhaltungsmedium gewaschen (50g, 2min, 4°C), gezählt und auf $2,5 \times 10^5$ Zellen pro ml Erhaltungsmedium verdünnt. Danach wurden die Zellen in kollagenisierten 12-Well Platten ausgesät (1ml pro Well), für 4 Stunden im Inkubator ruhen gelassen und anschließend mit PBS gewaschen und mit PMH Erhaltungsmedium über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag wurde das Medium durch PMH Erhaltungsmedium, welches mit 1,8% DMSO supplementiert wurde, ausgetauscht und mit 1×10^7 TU/µl Hd-Ad-NTCP Vektor von Dr. Martin Mück-Häusl transduziert.

4.2.13.2 Injektion und Bluten

Generell erfolgte die Injektion von HDV, AAV-HDV, AAV-HBV bzw. Hd-Ad-NTCP (alle maximal 200 µl in PBS) intravenös in die Schwanzvene. Die Anzahl der jeweils injizierten viralen Partikel ist bei der Beschreibung des jeweiligen Experiments angegeben.

Zur Bestimmung neu gebildeter HDV Partikel im Serum wurden die Mäuse alternierend aus der rechten und linken Backe geblutet. Das Blut wurde in 1,1 ml Z-Gel Röhrchen gesammelt und das Serum wurde anschließend per Zentrifugation (10000g, 5 min) abgetrennt und für die RNA Isolation verwendet.

4.2.13.3 Organentnahme und Prozessierung

Vor der Organentnahme wurden die Mäuse mit CO₂ abgetötet und anschließend geöffnet, um die Organe freilegen zu können. Das Blut wurde aus der Hohlvene entnommen und in 1,1 ml Z-Gel Röhrchen gesammelt. Anschließend wurde die Leber entnommen und für verschiedene Analysen verwendet. Zum einen wurde ein kleiner Teil der Leber in kleine Würfel geschnitten (ca. 5mm Kantenlänge) und diese in RNAlater Reagenz eingelegt, um später eine RNA Isolation zu ermöglichen (siehe 4.2.1.5). Der Rest der Leber wurde in 4 % PFA für 24 Stunden fixiert und anschließend bis zur Einbettung in Paraffin in PBS eingelegt. Die Leberschnitte wurden durch die „Comparative experimental Pathology (CeP)“- Gruppe unter der Leitung von Katja Steiger angefertigt. Anschließend wurde eine immunhistochemische Färbung auf das HDAg in Kooperation mit Dr. Marc Ringelhan durchgeführt, hierfür wurde der HDAg#280-Antikörper verwendet.

5. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die Struktur und Genomorganisation des HBV.	16
Abbildung 2:	Der Replikationszyklus von HBV.	18
Abbildung 3:	Die Struktur des HDV.	20
Abbildung 4:	Die ADAR1 bedingte Editierung des Anti-Genoms und die Translation von S- und L-HDAg.	21
Abbildung 5:	Der Replikationszyklus von HDV.	23
Abbildung 6:	Erkennung viraler Nukleinsäuren im Zytoplasma und Aktivierung von ISGs.	27
Abbildung 7:	Signaltransduktion von Typ I IFN.	28
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der strukturellen Organisation der RLRs und MAVS.	29
Abbildung 9:	Die Kinetik der HDV Infektion und ISG Expression in HepaRG und HepG2-NTCP Zellen.	38
Abbildung 10:	Der Einfluss der MOI auf die Expression von ISGs in HepG2-NTCP Zellen.	39
Abbildung 11:	Der Einfluss von HBV auf die HDV induzierte ISG Expression.	41
Abbildung 12:	Der Einfluss des MAVS Genknockouts auf die ISG Expression in HepG2-NTCP Zellen nach HDV Infektion.	43
Abbildung 13:	Die Rollen von RIG-I und MDA5 bei der Erkennung der HDV Replikation.	44
Abbildung 14:	Die ISG Expression nach AAV-HDV Transduktion in HepG2-NTCP basierten Zellen.	46
Abbildung 15:	Analyse der Genexpression während der Differenzierung von HepG2-NTCP Zellen.	47
Abbildung 16:	Der Einfluss des Knockdowns von RNase L auf die ISG Expression.	48
Abbildung 17:	Analyse der ISG Expression bei HepG2-NTCP RNase L KO Zellen.	49
Abbildung 18:	Charakterisierung der HDV Infektion von HepG2-NTCP (MDA5- RIG-I- bzw. MAVS KO) Zellen.	51
Abbildung 19:	Charakterisierung der AAV-HDV Transduktion von HepG2-NTCP (MDA5- RIG-I- bzw. MAVS KO) Zellen.	53
Abbildung 20:	Der Einfluss der poly I:C Stimulation auf die HDV Replikation.	55
Abbildung 21:	Immunfluoreszenzfärbung des HDAg in poly I:C stimulierten HepG2-NTCP Zellen.	56
Abbildung 22:	Der Einfluss von HDV auf die Eliminierung HBV-HDV koinfizierter HepG2-NTCP (MDA5 KO) Zellen durch 4G-TCR transduzierte T-Zellen.	58

Abbildung 23: Der Einfluss von HDV auf die Eliminierung HBV-HDV koinfizierter HepG2-NTCP (MDA5 KO) Zellen durch S-CAR transduzierte T-Zellen.	60
Abbildung 24: Charakterisierung der HDV Infektion von AML12 basierten Zellen und primären Maushepatozyten.	62
Abbildung 25: Charakterisierung der HDV Infektion von h/mNTCP transgenen Mäusen.	64
Abbildung 26: Der Einfluss des MDA5 Knockouts auf die HDV Infektion in vivo.	66

6. Literaturverzeichnis

- Ablasser, A., et al. 2009.** RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nature immunology*. 2009, 10(10), S. 1065-1072.
- Alexopoulou, L., et al. 2001.** Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001, 413(6857), S. 732-738.
- Alfaiate, D., et al. 2016.** HDV RNA replication is associated with HBV repression and interferon-stimulated genes induction in super-infected hepatocytes. *Antiviral research*. 2016, 136, S. 19-31.
- Altstetter, S.M. 2016.** Establishment of in vitro infection models for hepatitis viruses. (Masterthesis M.Sc.). 2016, Universitätsbibliothek der Technischen Universität München.
- Altstetter, S.M., et al. 2021.** Hepatitis-D Virus Infection Is Not Impaired by Innate Immunity but Increases Cytotoxic T-Cell Activity. *Cells*. 2021, 10(11):3253.
- Anwer, M.S. und Stieger, B. 2014.** Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: more than solute transporters. *Pflugers Archiv*. 2014, 466(1), S. 77-89.
- Backes, S., et al. 2016.** Protein-prime/modified vaccinia virus Ankara vector-boost vaccination overcomes tolerance in high-antigenemic HBV-transgenic mice. *Vaccine*. 2016, 34(7), S. 923-32.
- Bauer, S., et al. 2008.** Recognition of nucleic acid and nucleic acid analogs by Toll-like receptors 7, 8 and 9. *Immunobiology*. 2008, 213(3-4), S. 315-328.
- Blanchet, M., et al. 2019.** Inhibition of HBsAg secretion by nucleic acid polymers in HepG2.2.15 cells. *Antiviral research*. 2019, 164, S. 97-105.
- Bogomolov, P., et al. 2016.** Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B: First results of a phase Ib/IIa study. *Journal of hepatology*. 2016, 65(3), S. 490-498.
- Bolen, C.R., et al. 2014.** Dynamic expression profiling of type I and type III interferon-stimulated hepatocytes reveals a stable hierarchy of gene expression. *Hepatology*. 2014, 59(4), S. 1262-1272.
- Bonino, F., et al. 1986.** Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *Journal of virology*. 1986, 58(3), S. 945-950.
- Borzacov, L.M., et al. 2016.** Treatment of hepatitis delta virus genotype 3 infection with peg-interferon and entecavir. *International journal of infectious diseases*. 2016, 46, S. 82-88.
- Bouchard, M.J. und Schneider, R.J. 2004.** The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *Journal of virology*. 2004, 78(23), S. 12725-12734.
- Bruns, A.M. und Horvath, C.M. 2015.** LGP2 synergy with MDA5 in RLR-mediated RNA recognition and antiviral signaling. *Cytokine*. 2015, 74(2), S. 198-206.
- Bruns, A.M., et al. 2014.** The innate immune sensor LGP2 activates antiviral signaling by regulating MDA5-RNA interaction and filament assembly. *Molecular cell*. 2014, 55(5), S. 771-781.
- Buchmann, B., et al. 2017.** A screening assay for the identification of host cell requirements and antiviral targets for hepatitis D virus infection. *Antiviral Research*. 2017, 141, S. 116-123.

- Burwitz, B.J., et al. 2017.** Hepatocytic expression of human sodium-taurocholate cotransporting polypeptide enables hepatitis B virus infection of macaques. *Nature communications*. 2017, 8(1):2146 doi: 10.1038/s41467-017-01953-y.
- Casey, J.L. 2012.** Control of ADAR1 editing of hepatitis delta virus RNAs. *Current topics in microbiology and immunology*. 2012, 353, S. 123-143.
- Chakrabarti, A., Jha, B.K. und & Silverman, R.H. 2011.** New insights into the role of RNase L in innate immunity. *Journal of interferon & cytokine research*. 2011, 31(1), S. 49-57.
- Chan, H.L.Y., et al. 2016.** Peginterferon lambda for the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B: A randomized phase 2b study (LIRA-B). *Journal of hepatology*. 2016, 64(5), S. 1011-1019.
- Chang, J. und Taylor, J.M. 2003.** Susceptibility of human hepatitis delta virus RNAs to small interfering RNA action. *Journal of virology*. 2003, 77(17), S. 9728-9731.
- Chang, J., et al. 2006.** Action of inhibitors on accumulation of processed hepatitis delta virus RNAs. *Journal of virology*. 2006, 80(7), S. 3205-3214.
- Chen, H.Y., et al. 2018.** Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Gut*. 2018, DOI: 10.1136/gutjnl-2018-316601.
- Chen, M., et al. 2005.** Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. *Journal of virology*. 2005, 79(5), S. 3016-3027.
- Chen, P.J., et al. 1986.** Structure and replication of the genome of the hepatitis δ virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986, 83(22), S. 8774-8778.
- Cheng, X., et al. 2017.** Hepatitis B virus evades innate immunity of hepatocytes but activates cytokine production by macrophages. *Hepatology*. 2017, 66, 1779–1793.
- Chou, H.C., et al. 1998.** Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA. *Journal of virology*. 1998, 72(5), S. 3684-3690.
- Crotta, S., et al. 2013.** Type I and type III interferons drive redundant amplification loops to induce a transcriptional signature in influenza-infected airway epithelia. *PLoS Pathogens*. 2013, 9(11):e1003773.
- Dane, D.S, Cameron, C.H und Briggs, M. 1970.** Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*. 1970, 1(7649):695-8.
- Dong, B. und Silverman, R.H. 1995.** 2-5A-dependent RNase molecules dimerize during activation by 2-5A. *The journal of biological chemistry*. 1995, 270(8), S. 4133-4137.
- Feng, Q., et al. 2012.** MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells. *Cell reports*. 2012, 2(5), S. 1187-1196.
- Festag, M.M., et al. 2019.** Evaluation of a Fully Human, Hepatitis B Virus-Specific Chimeric Antigen Receptor in an Immunocompetent Mouse Model. *Molecular therapy: the journal of the American Society of gene therapy*. 2019, 27(5), S. 947-959.
- Floyd-Smith, G., Slattery, E. und & Lengyel, P. 1981.** Interferon action: RNA cleavage pattern of a (2'-5')oligoadenylate--dependent endonuclease. *Science*. 1981, 212(4498), S. 1030-1032.

- Fredericksen, B.L., et al. 2008.** Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1. *Journal of virology*. 2008, 82(2), S. 609-616.
- Ganem, D. und Prince, A.M. 2004.** Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *The New England journal of medicine*. 2004, 350(11), S. 1118-1129.
- Gebhardt, A., Laudenschlager, B.T. und Pichlmair, A.. 2017.** Discrimination of Self and Non-Self Ribonucleic Acids. *Journal of interferon & cytokine research*. 2017, 37(5), S. 184-197.
- Giersch, K., et al. 2017.** Both interferon alpha and lambda can reduce all intrahepatic HDV infection markers in HBV/HDV infected humanized mice. *Scientific reports*. 2017, 7(1):3757.
- Giersch, K., et al. 2015.** Hepatitis Delta co-infection in humanized mice leads to pronounced induction of innate immune responses in comparison to HBV mono-infection. *Journal of hepatology*. 2015, 63(2), S. 346-353.
- Giersch, K.1, et al. 2014.** Persistent hepatitis D virus mono-infection in humanized mice is efficiently converted by hepatitis B virus to a productive co-infection. *Journal of hepatology*. 2014, 60(3), S. 538-544.
- Gitlin, L., et al. 2010.** Melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) is involved in the innate immune response to Paramyxoviridae infection in vivo. *PLoS pathogens*. 2010, 6(1):e1000734.
- Goubau, D., Deddouche, S. und & Reis e Sousa, C. 2013.** Cytosolic sensing of viruses. *Immunity*. 2013, 38(5), S. 855-869.
- Goubau, D., et al. 2014.** Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature*. 2014, 514(7522), S. 372-375.
- Greulich, W., et al. 2019.** TLR8 Is a Sensor of RNase T2 Degradation Products. *Cell*. 2019, 179(6), S. 1264-1275.
- Gudima, S., et al. 2002.** Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA. *Journal of virology*. 2002, 76(8), S. 3709-3719.
- Guo, H., et al. 2012.** Characterization of the host factors required for hepadnavirus covalently closed circular (ccc) DNA formation. *PLoS one*. 2012, 7(8): e43270.
- Harris, D.T. und Kranz, D.M. 2016.** Adoptive T Cell Therapies: A Comparison of T Cell Receptors and Chimeric Antigen Receptors. *Trends in pharmacological sciences*. 2016, 37(3), S. 220-230.
- Hartwig, D., et al. 2006.** The large form of ADAR 1 is responsible for enhanced hepatitis delta virus RNA editing in interferon-alpha-stimulated host cells. *Journal of viral hepatitis*. 2006, 13(3), S. 150-157.
- Hasreiter, J. 2018.** Immunotherapeutic Approaches for the Treatment of Chronic HBV Infection. *Doktorarbeit*. 2018.
- He, W., et al. 2015.** Hepatitis D Virus Infection of Mice Expressing Human Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide. *PLoS pathogens*. 2015, 11(4):e1004840.
- He, W., et al. 2016.** Modification of Three Amino Acids in Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide Renders Mice Susceptible to Infection with Hepatitis D Virus In Vivo. *Journal of virology*. 2016, 90(19), S. 8866-8874.

- Heil, F., et al. 2004.** Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004, 303(5663), S. 1526-1529.
- Hong, S.Y. und Chen, P.J. 2010.** Phosphorylation of serine 177 of the small hepatitis delta antigen regulates viral antigenomic RNA replication by interacting with the processive RNA polymerase II. *Journal of Virology*. 2010, Bd. 84(3), S. 1430-1438.
- Hornung, V., et al. 2006.** 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*. 2006, 314(5801), S. 994-997.
- Hornung, V., et al. 2009.** AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*. 2009, 458(7237), S. 514-518.
- Hösel, M., et al. 2009.** Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2009, 50(6), S. 1773-82.
- Hou, F., et al. 2011.** MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell*. 2011, 146(3), S. 448-461.
- Hsieh, S.Y., et al. 1990.** Hepatitis delta virus genome replication: a polyadenylated mRNA for delta antigen. *Journal of virology*. 1990, 64(7), S. 3192-3198.
- Hu, J. und Liu, K. 2017.** Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles: Formation, Function, and Application. *Viruses*. 2017, 9(3). pii: E56.
- Hu, J., Protzer, U. and Siddiqui, A. 2019.** Revisiting Hepatitis B Virus: Challenges of Curative Therapies. *Journal of virology*. 2019, 93(20). pii: e01032-19.
- Huang, H.C., et al. 2016.** Cellular Nuclear Export Factors TAP and Aly Are Required for HDAG-L-mediated Assembly of Hepatitis Delta Virus. *Journal of biological chemistry*. 2016, 291(50), S. 26226-26238.
- Huang, H.C., et al. 2012.** Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *Journal of virology*. 2012, 86(17), S. 9443-9453.
- Huang, W.H., Chen, Y.S. und Chen, P.J. 2008.** Nucleolar targeting of hepatitis delta antigen abolishes its ability to initiate viral antigenomic RNA replication. *Journal of Virology*. 2008, 82(2), S. 692-699.
- Hwang, S.B. und Lai, M.M. 1994.** Isoprenylation masks a conformational epitope and enhances trans-dominant inhibitory function of the large hepatitis delta antigen. *Journal of virology*. 1994, 68(5), S. 2958-2964.
- Jiang, B., et al. 2015.** Subviral Hepatitis B Virus Filaments, like Infectious Viral Particles, Are Released via Multivesicular Bodies. *Journal of virology*. 2015, 90(7), S. 3330-3341.
- Jiang, J. und Tang, H. 2010.** Mechanism of inhibiting type I interferon induction by hepatitis B virus X protein. *Protein & cell*. 2010, 1(12), S. 1106-1117.
- Jung, S., Altstetter, S.M. und Protzer, U. 2020a.** Innate Immune Recognition and Modulation in Hepatitis Delta Virus Infection. *World journal of gastroenterology*. 2020a, 26(21):2781-2791.
- Jung, S., et al. 2020b.** Extracellular vesicles derived from Hepatitis-D Virus infected cells induce a proinflammatory cytokine response in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages. *Science matters*. 2020b.
- Karayannis, P. 2017.** Hepatitis B virus: virology, molecular biology, life cycle and intrahepatic spread. *Hepatology international*. 2017, 11(6), S. 500-508.

- Kato, H., et al. 2006.** Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*. 2006, 441(7089), S. 101-105.
- Kato, H., et al. 2008.** Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *The journal of experimental medicine*. 2008, 205(7), S. 1601-1610.
- Kawai, T. und Akira, S. 2010.** The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*. 2010, 11(5), S. 373-384.
- Kawai, T. und Akira, S. 2008.** Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008, 1143, S. 1-20.
- Kawai, T. und Akira, S.. 2011.** Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011, 34(5), S. 637-650.
- Kawai, T., et al. 2005.** IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature immunology*. 2005, 6(10), S. 981-988.
- Ko, C., et al. 2018.** Hepatitis B virus genome recycling and de novo secondary infection events maintain stable cccDNA levels. *Journal of hepatology*. 2018, 69(6), S. 1231-1241.
- Ko, C., Michler, T. und Protzer, U. 2017.** Novel viral and host targets to cure hepatitis B. *Current opinion in virology*. 2017, 24, S. 38-45.
- Koh, C., et al. 2015.** Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial. *The Lancet. Infectious diseases*. 2015, 15(10), S. 1167-1174.
- Koh, C., Heller, T. und Glenn, J.S. 2019.** Pathogenesis of and New Therapies for Hepatitis D. *Gastroenterology*. 2019, 156(2), S. 461-476.
- Kolakofsky, D., Kowalinski, E. und & Cusack, S. 2012.** A structure-based model of RIG-I activation. *RNA*. 2012, 18(12), S. 2118-2127.
- Komuro, A. und & Horvath, C.M. 2006.** RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. *Journal of virology*. 2006, 80(24), S. 12332-12342.
- Kosinska, A.D., Bauer, T. und Protzer, U. 2017.** Therapeutic vaccination for chronic hepatitis B. *Current Opinion in Virology*. 2017, 23, S. 75-81.
- Krebs, K., et al. 2013.** T cells expressing a chimeric antigen receptor that binds hepatitis B virus envelope proteins control virus replication in mice. *Gastroenterology*. 2013, 145(2), S. 456-465.
- Laganà, A., et al. 2015.** Computational design of artificial RNA molecules for gene regulation. *Methods in molecular biology*. 2015, 1269, S. 393-412.
- Lee, C.H., et al. 2001.** A novel chromosome region maintenance 1-independent nuclear export signal of the large form of hepatitis delta antigen that is required for the viral assembly. *The Journal of biological chemistry*. 2001, 276(11), S. 8142-8148.
- Lempp, F.A., et al. 2016.** Hepatitis B Virus Infection of a Mouse Hepatic Cell Line Reconstituted with Human Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide. *Journal of virology*. 2016, 90(9), S. 4827-4831.
- Lempp, F.A., Ni, Y. und Urban, S. 2016.** Hepatitis delta virus: insights into a peculiar pathogen and novel treatment options. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. 2016, 13(10), S. 580-589.

- Li, W. und Urban, S. 2016.** Entry of hepatitis B and hepatitis D virus into hepatocytes: Basic insights and clinical implications. *Journal of hepatology*. 2016, 64(1), S. 32-40.
- Liu, S., et al. 2013.** MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *Elife*. 2013, 2:e00785.
- Luangsay, S., et al. 2015.** Expression and functionality of Toll- and RIG-like receptors in HepaRG cells. *Journal of hepatology*. 2015, 63(5), S. 1077-1085.
- Lucifora, J. und Protzer, U. 2016.** Attacking hepatitis B virus cccDNA--The holy grail to hepatitis B cure. *Journal of hepatology*. 2016, 64(1 Suppl), S. 41-48.
- Lucifora, J., et al. 2011.** Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *Journal of hepatology*. 2011, 55(5), S. 996-1003.
- Lütgehetmann, M., et al. 2011.** Hepatitis B virus limits response of human hepatocytes to interferon- α in chimeric mice. *Gastroenterology*. 2011, 140(7), S. 2074-2083.
- Macnaughton, T.B, Wang, Y.J und Lai, M.M. 1993.** Replication of hepatitis delta virus RNA: effect of mutations of the autocatalytic cleavage sites. *Journal of Virology*. 1993, 67(4), S. 2228-2234.
- Magnius, L., et al. 2018.** ICTV Virus Taxonomy Profile: Deltavirus. *Journal of General Virology*. 2018, 99, S. 1565–1566.
- Maire, M., et al. 2008.** Characterization of the double-stranded RNA responses in human liver progenitor cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008, 68(3), S. 556-562.
- Malathi, K., et al. 2010.** RNase L releases a small RNA from HCV RNA that refolds into a potent PAMP. *RNA*. 2010, 16(11), S. 2108-2119.
- Malathi, K., et al. 2007.** Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature*. 2007, 448(7155), S. 816-819.
- Mentha, N., et al. 2019.** A review on hepatitis D: From virology to new therapies. *Journal of Advanced Research*. 2019, 17, S. 3-15.
- Michler, T., et al. 2020.** Knockdown of Virus Antigen Expression Increases Therapeutic Vaccine Efficacy in High-Titer Hepatitis B Virus Carrier Mice. *Gastroenterology*. 2020, 158(6), S. 1762-1775.
- Minks, M.A., et al. 1979.** Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2',5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells. *Journal of biological chemistry*. 1979, 254(20), S. 10180-10183.
- Modahl, L.E. und Lai, M.M. 1998.** Transcription of hepatitis delta antigen mRNA continues throughout hepatitis delta virus (HDV) replication: a new model of HDV RNA transcription and replication. *Journal of virology*. 1998, 72(7), S. 5449-5456.
- Munir, M. und Berg, M. 2013.** The multiple faces of proteinkinase R in antiviral defense. *Virulence*. 2013, 4(1), S. 85-89.
- Murphy, K. und Weaver, C. 2016.** Janeway's immunobiology. *Garland Science*. 2016.
- Mutz, P., et al. 2018.** HBV Bypasses the Innate Immune Response and Does Not Protect HCV From Antiviral Activity of Interferon. *Gastroenterology*. 2018, 154(6), S. 1791-1804.e22.

- Narita, R., et al. 2014.** A novel function of human Pumilio proteins in cytoplasmic sensing of viral infection. *PLoS pathogens*. 2014, 10(10):e1004417.
- Naso, M.F., et al. 2017.** Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2017, 31(4), S. 317-334.
- Nassal, M. 2015.** HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut*. 2015, 64(12), S. 1972-1984.
- Negro, F. 2014.** Hepatitis D virus coinfection and superinfection. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2014, 4(11):a021550.
- Nijampatnam, B. und Liotta, D.C. 2019.** Recent advances in the development of HBV capsid assembly modulators. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2019, 50, S. 73-79.
- Pascarella, S. und Negro, F. 2011.** Hepatitis D virus: an update. *Liver international*. 2011, 31(1), S. 7-21.
- Paz, S., et al. 2006.** Induction of IRF-3 and IRF-7 phosphorylation following activation of the RIG-I pathway. *Cellular and molecular biology*. 2006, 52(1), S. 17-28.
- Peisley, A., et al. 2011.** Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011, 108(52), S. 21010-21015.
- Perez-Vargas, J., et al. 2019.** Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo. *Nature communications*. 2019, 10(1), S. 2098 DOI: 10.1038/s41467-019-10117-z.
- Pestka, S. und Krause, C.D. & Walter, M.R. 2004.** Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological reviews*. 2004, 202, S. 8-32.
- Pichlmair, A., et al. 2009.** Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *Journal of virology*. 2009, 83(20), S. 10761-10769.
- Pichlmair, A., et al. 2006.** RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*. 2006, 314(5801), S. 997-1001.
- Polson, A.G., Bass, B.L. und Casey, J.L. 1996.** RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase. *Nature*. 1996, 380(6573), S. 454-456.
- Pugnale, P., et al. 2009.** Hepatitis delta virus inhibits alpha interferon signaling. *Hepatology*. 2009, 49(2), S. 398-406.
- Radjef, N., et al. 2004.** Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades. *Journal of virology*. 2004, 78(5), S. 2537-2544.
- Raftery, N. und Stevenson, N.J. 2017.** Advances in anti-viral immune defence: revealing the importance of the IFN JAK/STAT pathway. *Cellular and molecular life sciences*. 2017, 74(14), S. 2525-2535.
- Ramos, H.J. und & Gale, M. Jr. 2011.** RIG-I like receptors and their signaling crosstalk in the regulation of antiviral immunity. *Current opinion in virology*. 2011, 1(3), S. 167-176.
- Ranji, A. und & Boris-Lawrie, K. 2010.** RNA helicases: emerging roles in viral replication and the host innate response. *RNA biology*. 2010, 7(6), S. 775-787.

- Rehwinkel, J. und & Reis e Sousa, C. 2010.** RIGorous detection: exposing virus through RNA sensing. *Science*. 2010, 327(5963), S. 284-286.
- Reid, C.E. und Lazinski, D.W. 2000.** A host-specific function is required for ligation of a wide variety of ribozyme-processed RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000, 97(1), S. 424-429.
- Revill, P., et al. 2016.** Global strategies are required to cure and eliminate HBV infection. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. 2016, 13(4), S. 239-248.
- Rizzetto, M. 2016.** Chronic Hepatitis D; at a Standstill? *Digestive diseases*. 2016, 34(4), S. 303-307.
- Rizzetto, M. 2009.** Hepatitis D: Thirty years after. *Journal of Hepatology*. 2009, 50, S. 1043–1050.
- Rizzetto, M., et al. 1977.** Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/antidelta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut*. 1977, 18, S. 997–1003.
- Rozzelle, J.E.Jr., et al. 1995.** Self-association of a synthetic peptide from the N-terminus of the hepatitis delta virus protein into an immunoreactive alpha-helical multimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995, 92, S. 382–386.
- Satoh, T., et al. 2010.** LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010, 107(4), S. 1512-1517.
- Schaefer, S. 2007.** Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World journal of gastroenterology*. 2007, 13(1), S. 14-21.
- Schlee, M., et al. 2009.** Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity*. 2009, 31(1), S. 25-34.
- Schmitz, A., et al. 2010.** Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket. *PLoS pathogens*. 2010, 6(1): e1000741.
- Schneider, W.M. und Chevillotte, M.D. & Rice, C.M. 2014.** Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annual review of immunology*. 2014, 32, S. 513-545.
- Seeger, C. und W.S., Mason. 2015.** Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*. 2015, 479-480, S. 672-686.
- Seth, R.B., et al. 2005.** Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*. 2005, 122(5), S. 669-682.
- Shalem, O., et al. 2014.** Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*. 2014, 343(6166), S. 84-87.
- Sharmeen, L., Kuo, M.Y. und Taylor, J. 1989.** Self-ligating RNA sequences on the antigenome of human hepatitis delta virus. *Journal of virology*. 1989, 63(3), S. 1428-1430.
- Shouval, D., et al. 1994.** Improved immunogenicity in mice of a mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine containing pre-S1 and pre-S2 antigens as compared with conventional yeast-derived vaccines. *Vaccine*. 1994, 12(15), S. 1453-1459.
- Silverman, R.H. 2007.** Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *Journal of virology*. 2007, 81(23), S. 12720-12729.

- Silverman, R.H., et al. 1983.** rRNA cleavage as an index of ppp(A2'p)nA activity in interferon-treated encephalomyocarditis virus-infected cells. *Journal of virology*. 1983, 46(3), S. 1051-1055.
- Simmons, D.P., et al. 2012.** Type I IFN drives a distinctive dendritic cell maturation phenotype that allows continued class II MHC synthesis and antigen processing. *Journal of immunology*. 2012, 188(7), S. 3116-3126.
- Stark, G.R. und & Darnell, J.E. Jr. 2012.** The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*. 2012, 36(4), S. 503-514.
- Suárez-Amarán, L., et al. 2017.** A new HDV mouse model identifies mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) as a key player in IFN- β induction. *Journal of hepatology*. 2017, 67(4), S. 669-679.
- Sun, L., et al. 2013.** Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*. 2013, 339(6121), S. 786-791.
- Sun, Q., et al. 2006.** The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity*. 2006, 24(5), S. 633-642.
- Sureau, C., Guerra, B. und Lanford, R.E. 1993.** Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. *Journal of virology*. 1993, 67(1), S. 366-372.
- Sureau, C. 2006.** The role of the HBV envelope proteins in the HDV replication cycle. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006, 307, S. 113-131.
- Suslov, A., et al. 2018.** Hepatitis B Virus Does Not Interfere With Innate Immune Responses in the Human Liver. *Gastroenterology*. 2018, 154(6), S. 1778-1790.
- Suslov, A., Heim, M.H. und Wieland, S. 2018.** New insights into HDV-induced innate immunity: MDA5 senses HDV replication. *Journal of hepatology*. 2018, 69(1), S. 5-7.
- Tanaka, N., et al. 2004.** Structural basis for recognition of 2',5'-linked oligoadenylates by human ribonuclease L. *The EMBO journal*. 2004, 23(20), S. 3929-3938.
- Tavanez, J.P., et al. 2002.** Hepatitis delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *RNA*. 2002, 8(5), S. 637-646.
- Taylor, J.M. 2015.** Hepatitis D Virus Replication. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015, 5(11) a021568.
- Taylor, J.M. 2009.** Replication of the hepatitis delta virus RNA genome. *Advances in virus research*. 2009, 74:, S. 103-121.
- Taylor, J.M. 2006.** Structure and replication of hepatitis delta virus RNA. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006, 307, S. 1-23.
- Terrault, N.A., et al. 2018.** Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis. *Hepatology*. 2018, 67(4), S. 1560-1599.
- Tham, C.Y.L., et al. 2020.** Hepatitis Delta Virus Infection Increases the Efficacy of HBV-Specific T Cell-Based Therapies. *Cell Rep. Med*. 2020.
- Tong, S., et al. 2005.** Hepatitis B Virus e Antigen Variants. *International journal of medical sciences*. 2005, 2(1), S. 2-7.
- Trinchieri, G. 2010.** Type I interferon: friend or foe? *The journal of experimental medicine*. 2010, 207(10), S. 2053-2063.

- Tsunematsu, S., et al. 2017.** Hepatitis B virus X protein impairs α -interferon signaling via up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3 and protein phosphatase 2A. *Journal of medical virology*. 2017, 89(2), S. 267-275.
- Urban, S., Neumann-Haefelin, C. und Lampertico, P. 2021.** Hepatitis D virus in 2021: virology, immunology and new treatment approaches for a difficult-to-treat disease. *Gut*. 2021, 70(9):1782-1794.
- Velkov, S., et al. 2018.** The Global Hepatitis B Virus Genotype Distribution Approximated from Available Genotyping Data. *Genes*. 2018, 9(10) pii: E495.
- Venkatakrishnan, B. und Zlotnick, A. 2016.** The Structural Biology of Hepatitis B Virus: Form and Function. *Annual review of virology*. 2016, 3(1), S. 429-451.
- Venkataraman, T., et al. 2007.** Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *Journal of immunology*. 2007, 178(10), S. 6444-6455.
- Verrier, E.R., et al. 2016.** A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses. *Hepatology*. 2016, 63(1), S. 35-48.
- Wang, K.S., et al. 1986.** Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. *Nature*. 1986, 323(6088), S. 508-514.
- Weber, M., et al. 2013.** Incoming RNA virus nucleocapsids containing a 5'-triphosphorylated genome activate RIG-I and antiviral signaling. *Cell host & microbe*. 2013, 13(3), S. 336-346.
- Wei, C., et al. 2010.** The hepatitis B virus X protein disrupts innate immunity by downregulating mitochondrial antiviral signaling protein. *Journal of immunology*. 2010, 185(2), S. 1158-1168.
- WHO. 2021.** Hepatitis B, Fact Sheet. 2021, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> [Accessed 04.12.2021].
- WHO. 2021.** Hepatitis D, Fact Sheet. 2021, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-d> [Accessed 04.12.2021].
- Wieland, S.F. und Chisari, F.V. 2005.** Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *Journal of virology*. 2005, 79(15), S. 9369-9380.
- Williams, V., et al. 2009.** Hepatitis delta virus proteins repress hepatitis B virus enhancers and activate the alpha/beta interferon-inducible MxA gene. *The journal of general virology*. 2009, 90(Pt 11), S. 2759-2767.
- Wisskirchen, K., et al. 2019.** T cell receptor grafting allows virological control of Hepatitis B virus infection. *The journal of clinical investigation*. 2019, 129(7), S. 2932-2945.
- Wong, S.K. und Lazinski, D.W. 2002.** Replicating hepatitis delta virus RNA is edited in the nucleus by the small form of ADAR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002, 99(23), S. 15118–15123.
- Wu, B., et al. 2013.** Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell*. 2013, 152(1-2), S. 276-289.
- Wu, J. und Chen, Z.J. 2014.** Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annual review of immunology*. 2014, 32, S. 461-488.
- Xia, Y. und Protzer, U. 2017.** Control of Hepatitis B Virus by Cytokines. *Viruses*. 2017, 9(1). pii: E18.

- Xia, Y.P., et al. 1992.** Characterization of nucleartargeting signal of hepatitis delta antigen: nuclear transport as a protein complex. *Journal of Virology*. 1992, 66, S. 914–921.
- Xu, F., Song, H., Li, N. & Tan, G. 2016.** HBsAg blocks TYPE I IFN induced up-regulation of A3G through inhibition of STAT3. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016, 473(1), S. 219-223.
- Yan, H., et al. 2012.** Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife*. 2012, 1: e00049.
- Yan, H., et al. 2014.** Viral entry of hepatitis B and D viruses and bile salts transportation share common molecular determinants on sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Journal of virology*. 2014, 88(6), S. 3273-3284.
- Yoneyama, M., et al. 2005.** Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *Journal of immunology*. 2005, 175(5), S. 2851-2858.
- Yoneyama, M., et al. 2004.** The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology*. 2004, 5(7), S. 730-737.
- Yoneyama, M., et al. 2015.** Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Current opinion in immunology*. 2015, 32, S. 48-53.
- Yu, S., et al. 2010.** Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKKepsilon and. *The journal of general virology*. 2010, 91(Pt 8), S. 2080-2090.
- Yuen, M.F., et al. 2020.** RNA Interference Therapy With ARC-520 Results in Prolonged Hepatitis B Surface Antigen Response in Patients With Chronic Hepatitis B Infection. *Hepatology*. 2020, 72(1), S. 19-31.
- Yurdaydin, C. 2019.** New treatment options for delta virus: Is a cure in sight? *Journal of viral hepatitis*. 2019, 26(6):, S. 618-626.
- Zhang, Z., et al. 2018.** Hepatitis D virus replication is sensed by MDA5 and induces IFN- β / λ responses in hepatocytes. *Journal of hepatology*. 2018, 69(1), S. 25-35.
- Zhou, A., Hassel, B.A. und & Silverman, R.H. 1993.** Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell*. 1993, 72(5), S. 753-765.
- Zhou, Y., et al. 2013.** TLR3 activation efficiency by high or low molecular mass poly I:C. *Innate immunity*. 2013, 19(2), S. 184-192.
- Zou, J., Chang, M., Nie, P. und & Secombes, C.J. 2009.** Origin and evolution of the RIG-I like RNA helicase gene family. *BMC evolutionary biology*. 2009, 9: 85.

Danksagung

Zunächst möchte ich meiner Erstbetreuerin Prof. Ulrike Protzer für ihre Betreuung während meiner Promotionszeit danken. Du hast mich in all den Jahren unterstützt und mir sehr wertvolle Anregungen für mein Projekt gegeben. Ohne diese Hilfe wäre diese Arbeit nicht so erfolgreich verlaufen.

Vielen Dank sowohl an meinen Zweitprüfer Prof. Percy Knolle und meinen Mentor Prof. Veit Hornung für die Zeit, die sich beide genommen haben, und für die interessanten Ideen und wichtigen Inputs zu meinem Projekt während der Thesis Committee Meetings und der gemeinsamen Retreats.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Jun.-Prof. Stephanie Jung für ihre unermüdliche Unterstützung und Hilfe. Ich konnte mich immer auf dich verlassen und bin sehr dankbar, dass du eingesprungen bist und meine Betreuung mitübernommen hast. Dieser Einsatz ist für mich nicht selbstverständlich.

Als nächstes möchte ich mich auch bei Dr. Francesca Pinci und nochmals Prof. Veit Hornung für die Kooperation bedanken, auf dessen Grundlage essentielle Ergebnisse dieser Doktorarbeit entstanden sind. Ohne die gemeinsame Arbeit an dem HDV Infektionsmodell und den HepG2 Knockout Zellen wäre diese Dissertation so nicht möglich gewesen. Gleiches gilt auch für Prof. Dr. Gloria González Aseguiolaza, die mir die Plasmide zur Produktion des AAV-HDV zur Verfügung gestellt hat.

Ein Dankeschön geht auch an Dr. Felix Bohne, der mich noch während meiner Masterarbeit am Institut betreut hat. Ohne dich hätte ich diese Dissertation nicht angefangen. In diesem Zuge möchte ich auch den Mitgliedern der ehemaligen AG Bohne, Dr. Oliver Quitt und Dr. Lisa Wolff sowie Florian Wilsch für die Hilfe bei Experimenten, konstruktive Diskussionen und, für mich am wichtigsten, für ihre Freundschaft herzlich danken.

Da Mausexperimente allein nur schwer zu meistern sind geht ein großes Dankeschön auch an Natalie Röder, Dr. Anna Kosinska, Dr. Julia Festag, Dr. Martin Mück-Häusl, Philipp Hagen und Hortenzia Imhof für ihren Support.

Ein besonderer Dank geht an Theresa Asen und Romina Bester, für ihre tägliche Hilfe im Labor. Ohne ihren Einsatz würde der Laboralltag nicht funktionieren.

Außerdem möchte ich mich bei allen anderen derzeitigen und ehemaligen Labormitgliedern bedanken namentlich Fenna Kolbe, Dr. Karin Wisskirchen, Dr. Wen-Min Chou, Dr. Martin Feuerherd, Sophia Schreiber, Antje Malo, Dr. Jochen Wettengel, Dr. Marvin Festag, Dr. Chunkyu Ko, Julia Sacherl, Martin Kächele, Stoyan Velkov, Dr. Andreas Oswald, Dr. Thomas Michler, Dr. Maarten van der Klundert, Dr. Eva Loffredo-Verde und Susanne Miko für ihre direkte oder indirekte Unterstützung und Hilfe. Jeder von Ihnen hat in irgendeiner Weise zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen, und dafür bin ich sehr dankbar.

Ein ganz liebes Dankeschön möchte ich auch meinen Freunden außerhalb des Labors sagen, hierbei insbesondere an meine lieben Allgäuer und Franken. Mit euch habe ich immer sehr viel Spaß, was so manchen Rückschlag für mich schnell wieder vergessen gemacht hat.

Zum Abschluss und doch für mich am wichtigsten: Ein riesengroßes Dankeschön an meine Familie und meine Freundin Maria. Für eure bedingungslose Unterstützung und euren Rückhalt, egal ob durch die tiefsten Täler oder über die höchsten Gipfel. Ohne euch hätte ich es nicht geschafft und dafür bin ich euch für immer unendlich dankbar. Ihr seid die Besten!

Publikationen und Meetings

a) Publikationen in Fachzeitschriften mit Peer-Review

Jung, S., **Altstetter, S.M.**, Protzer, U. Innate immune recognition and modulation in hepatitis D virus infection. *World J Gastroenterol* 2020; 26(21): 2781-279

Jung, S., Jacobs, K.F.K., Shein, M., Schütz, A.K., Mohr, F., Stadler, H., Stadler, D., Lucko A.M., **Altstetter, S.M.**, Wilsch, F., Deng, L. und Protzer, U. Efficient and reproducible depletion of hepatitis B virus from plasma derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2020 Dec;10(2):e12040

Jung, S., **Altstetter, S.M.**, Wilsch, F., Shein, M., Schütz, A.K. und Protzer, U. Extracellular vesicles derived from Hepatitis-D Virus infected cells induce a proinflammatory cytokine response in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages. *Matters*. 2020, 1-10.

Altstetter, S.M.; Quitt, O.; Pinci, F.; Hornung, V.; Lucko, A.M.; Wisskirchen, K.; Jung, S.; Protzer, U. Hepatitis-D Virus Infection Is Not Impaired by Innate Immunity but Increases Cytotoxic T-Cell Activity. *Cells* 2021, 10(11):3253

b) Internationale Konferenzen

2018 International HBV Meeting – The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses

Oktober 03 – 06, 2018, Taormina, Italien

Poster presentation: Cell-intrinsic immune control of hepatitis delta virus infection in vitro and in vivo