

Charakterisierung eines Zellkultur-adaptierten Hepatitis-E-Virus-Stammes aus einem chronisch infizierten Patienten mittels Reverser Genetik

vorgelegt von

M. Sc.

Johannes Scholz

an der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Roland Lauster

Gutachter: Prof. Dr. Jens Kurreck

Gutachter: Prof. Dr. Reimar Johne

Gutachter: Prof. Dr. Claus-Thomas Bock

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 29. Juli 2021

Berlin 2021

Für unser kleines Geschöpf, das auf dem Weg ist.

Wir freuen uns schon sehr auf dich!

Für Anne und für die ganze Familie

Vielen Dank für die schier unendliche Unterstützung!

Zusammenfassung

Das Hepatitis-E-Virus (HEV) ist ein weltweit verbreitetes Virus, welches eine akute oder chronische Leberentzündung hervorrufen kann. Das ikosaedrische, sowohl unbehüllt als auch quasi-behüllt vorkommende Viruspartikel besitzt ein gecapptes, polyadenyliertes Plusstrang-RNA-Genom mit einer Länge von ca. 7.2 kb, das für drei offene Leserahmen (ORF1-3) kodiert. Insgesamt existieren acht Genotypen (GT) mit zahlreichen Subtypen, von denen GT 1-4 und GT7 humanpathogen sind. In Deutschland kommt hauptsächlich GT3 mit den Subtypen 3c, 3e und 3f vor. Dieser Genotyp ist in Wild- und Hausschweinen weit verbreitet und wird von diesen Tieren aus, meistens über den Verzehr unzureichend erhitzter Fleischprodukte, zoonotisch auf den Menschen übertragen. Infektionen von Transplantationspatienten mit GT3 resultieren oft in einer chronischen Hepatitis, die häufig zu einer lebensbedrohlichen Leberzirrhose führt.

Die Forschung an HEV wird derzeit dadurch erschwert, dass nur wenige robuste Reverse Genetische Systeme (RGS) existieren, mit denen gezielte Veränderungen in das HEV-Genom eingebracht werden können, um die Funktion von Virusproteinen und Genomregionen aufzuklären. Erstmals sollte deshalb in dieser Arbeit für den in Europa vorherrschenden HEV-Subtyp 3c ein RGS etabliert werden. Hierfür sollte der Stamm 47832c verwendet werden, der ursprünglich aus einem chronisch infizierten Patienten aus Deutschland isoliert wurde. Dieser Stamm besitzt wie einige andere HEV-Stämme aus chronisch infizierten Patienten auch eine spezifische Insertion im ORF1, welche für das effiziente Wachstum in der Zellkultur nötig zu sein scheint. Nach der Entwicklung des RGS sollte das System deshalb unter anderem zur Untersuchung dieser Insertion eingesetzt werden.

Im Ergebnis konnte ein neuartiges und robustes RGS entwickelt werden, das im Gegensatz zu vorherigen Systemen auf den aufwendigen *in vitro*-RNA-Synthese-Schritt verzichten kann. T7 Polymerase-exprimierende BSR-T7/5-Zellen wurden dazu mit dem genomischen cDNA-Plasmid und zwei Capping-Helferplasmiden co-transfiziert. Die entstandenen infektiösen Viren wurden anschließend auf hochempfindlichen A549/D3-Zellen passagiert. Die dadurch hergestellten Viren wurden mittels Immunfluoreszenz, RT-qPCR und Transmissionselektronenmikroskopie charakterisiert und zeigten ähnliche Eigenschaften wie der ursprüngliche Stamm 47832c. Eine stille Punktmutation, die eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle erzeugte, wurde erfolgreich in das HEV-Genom eingefügt. Durch Deletion und Substitution der spezifischen Insertion im ORF1 konnte gezeigt werden, dass deren Aminosäure-Sequenz, nicht aber die Nukleotidsequenz, eine entscheidende Rolle bei der Erhöhung der HEV-Replikationseffizienz in der Zellkultur spielt. Die Einfügung einer Glycin-zu-Arginin-Mutation, die bei einem anderen HEV-Stamm das Wachstum erhöhte, führte im

Stamm 47832c zu keinem replikationsfördernden Effekt. Eine ORF3-Deletionsmutante zeigte eine drastische Abnahme der Replikationsfähigkeit, was auf eine wichtige Bedeutung des ORF3-Produkts hinweist.

Zusammenfassend ist die Entwicklung eines robusten RGS für einen HEV-Subtyp 3c-Stamm erfolgreich gewesen. Erste Anwendungen zeigen, dass sich mit dem System die Funktionen von Genomregionen und Virusproteinen von HEV untersuchen lassen. Zukünftige Studien sollten die funktionellen Bereiche in der Genom-Insertion des Stammes 47832c und im ORF3 weiter eingrenzen, um die jeweiligen Wirkmechanismen aufzuklären. Ob die beobachteten Unterschiede auf eine Virusstamm- oder Zelltyp-Spezifität zurückzuführen sind, sollte mittels Austauschen der Genom-Insertionen und spezifischen Punktmutationen zwischen verschiedenen HEV-Stämmen sowie durch Versuche mit unterschiedlichen Zellkulturen aufgeklärt werden. Darüber hinaus sollte das RGS zukünftig weiter optimiert werden, um eine schnellere und effizientere Verwendung dieses Systems in der Anwendungs- und Grundlagenorientierten HEV-Forschung zu ermöglichen.

Abstract

The hepatitis E virus (HEV) is a worldwide distributed virus, which can cause acute and chronic liver inflammations. The icosahedral, non-enveloped or quasi-enveloped particle carries a capped and poly-adenylated single-stranded (+)-RNA genome, approximately 7.2 kb in length, coding for three open reading frames (ORF1-3). HEV consists of eight genotypes (GT) with many subtypes, of which GT 1-4 and GT 7 are human-pathogenic. In Germany, genotype 3, with the subtypes 3c, 3e and 3f, is predominant. This genotype is prevalent in wild boars and domestic pigs and mostly zoonotically transmitted by consumption of undercooked meat and meat products. Infections of organ transplantation recipients with GT3 often lead to chronic hepatitis with life-threatening liver cirrhosis.

Research on HEV is currently limited because only a few robust Reverse Genetics Systems (RGS) exist, which can be used to introduce targeted changes into the HEV genome in order to unravel the function of viral proteins and genome regions. Therefore, a RGS for the HEV subtype 3c, which is predominant in Europe, should be established for the first time in this project. The HEV strain 47832c, which was originally isolated from a chronically infected patient from Germany, should be used for the system. As also known for some other HEV strains from chronically infected patients, this strain carries a specific insertion within its ORF1, which is suspected to be essential for efficient cell culture growth. Therefore, after the development of the RGS, the system should be also used to analyze this insertion.

As a result, a novel and robust RGS could be established here, which – in contrast to former systems – does not need a laborious *in-vitro* RNA synthesis step. T7 polymerase-expressing BSR T7/5 cells were co-transfected with the genomic cDNA plasmid together with two capping helper plasmids. The resulting infectious viruses were subsequently passaged on highly susceptible A549/D3 cells. The generated viruses were characterized using immunofluorescence, RT-qPCR and transmission electron microscopy showing similar properties like the original strain 47832c. A silent point mutation, which led to an additional restriction enzyme cutting site, was successfully inserted into the HEV genome. Using deletions and substitutions of the specific insertion in ORF1 it was shown, that its amino acid sequence, but not the nucleotide sequence, is crucial for the increase of viral replication efficiency in cell culture. The introduction of a glycine-to-arginine mutation, which causes increasing viral cell culture growth in another HEV strain, did not lead to a significant growth advantage for strain 47832c. An ORF3 deletion mutant showed a dramatic decrease in cell culture replication, indicating an important role of the ORF3 product.

It can be summarized that the establishment of a robust RGS for an HEV subtype 3c strain was successful. First applications show, that this system can be used to study the function of genome regions and viral proteins of HEV. Future studies should focus on the functional regions of the genome insertion of strain 47832c and its ORF3 in order to unravel the distinct mechanisms of action. In order to decide if the observed differences are caused by virus strain specificity or cell type specificity, exchanges of genome regions and specific point mutations between strain 47832c and other strains, as well as testing of other cell lines should be done. In addition, the RGS should to be further optimized in future in order to enable its faster and more efficient use in basic and applied HEV research.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	II
Abstract	IV
Inhaltsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis.....	XIV
Einleitung:.....	1
1.1. Entdeckung und Geschichte des Hepatitis E-Virus	1
1.2. Taxonomie und Epidemiologie.....	2
1.3. Übertragungswege humanpathogener HEV und ihre globale Verbreitung	5
1.4. HEV-Struktur und Genom.....	8
1.5. Anheftung, Replikation und Freisetzung der Viruspartikel aus der Wirtszelle.....	11
1.6. HEV Prävalenzen im Menschen und in Tierreservoirien.....	13
1.7. Erkrankungsverlauf, Therapie und Impfung.....	13
1.8. Hepatitis-E-Virus in der Zellkultur, Reverse Genetische Systeme.....	16
1.9. Zielsetzung.....	20
2. Materialien	23
2.1. Geräte.....	23
2.2. Verbrauchsmaterial.....	24
2.3. Chemikalien.....	25
2.4. Puffer und Lösungen	26
2.5. Nährmedien, Zellkulturzusätze und Kulturmedien.....	26
2.6. Zelllinien	27
2.7. Bakterienstämme	27
2.8. Plasmide und Klonierungsintermediate.....	28
2.9. Virus und Virusmutanten	30
2.10. Enzyme	30
2.11. Reagenzien und Kits	31
2.12. Elektrophorese DNA-Standards	31
2.13. Antikörper	32

2.14.	Primer und Sonden.....	32
2.15.	Dienstleister für Sequenzierung und DNA-Synthese-Firmen.....	33
2.16.	Software	34
3.	Methoden:.....	35
3.1.	Chemische Transformation von kompetenten Bakterien.....	35
3.2.	Erstellung von Bakterienstocks	35
3.3.	Plasmidaufreinigung aus Bakterienkulturen	35
3.4.	Restriktionsverdau der Plasmide	35
3.5.	Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse von DNA.....	36
3.6.	DNA-Fragmentaufreinigung aus Agarosegelen.....	36
3.7.	TOPO®-TA Klonierung von synthetisierten gBlocks™ in Plasmid-Vektoren.....	37
3.8.	Plasmid-Vektor Dephosphorylierung	37
3.9.	Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmid-Vektoren	37
3.10.	Sequenzierung von DNA mittels Kettenabbruchmethode	37
3.11.	Illumina Next-Generation Sequenzierung.....	37
3.12.	Klonierung des funktionellen HEV-Volllänge-cDNA-Plasmids p47832mc.....	38
3.13.	Klonierung der p47832mc-Mutanten	40
3.14.	Umsetzen von Zellen	45
3.15.	<i>In-vitro</i> -RNA-Transkription und -Transfektion	45
3.16.	Transfektion des HEV-Volllänge-cDNA-Plasmids p47832mc und dessen Derivate in BSR-T7/5-Zellen	46
3.17.	Infektion von A539/D3-Zellen	47
3.18.	Virustitration zur Ermittlung infektiöser Titer im Zellkulturüberstand.....	47
3.19.	Erstellung von Virus-Wachstumskurven	48
3.20.	Etablierung von persistent infizierten Zelllinien	48
3.21.	Einfrieren von Zellkulturen in Flüssigstickstoff	49
3.22.	Auftauen von Zellen aus Flüssigstickstofflagerung	49
3.23.	Immunfluoreszenzanalysen	49
3.23.1.	Qualitativer Test in 6-Well Zellkulturplatten	49
3.23.2.	Quantitativer Test im 96-Well Zellkulturplatten.....	50
3.24.	Elektronenmikroskopie	50

3.25. RNA-Isolierung aus Zellkulturüberständen	50
3.26. DNase I-Verdau von RNA.....	51
3.27. Herstellung eines RNA Standards für die HEV-spezifische Reverse-Transkription quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)	51
3.28. RT-qPCR für die Ermittlung von HEV RNA-Konzentrationen.....	51
3.29. Erstellung von Wachstumskurven.....	52
3.30. <i>One-Step</i> RT-PCR	52
3.31. <i>Two-Step</i> RT-PCR	54
3.32. Statistik.....	55
4. Ergebnisse	56
4.1. Klonierung des funktionellen HEV-Volllänge-cDNA-Plasmids p47832mc.....	56
4.2. Generierung von infektiösen HEV-Partikeln durch Transfektion von p47832mc.....	58
4.3. Charakterisierung der mit p47832mc generierten Viren.....	63
4.4. Einfügen einer Punktmutation in das Virusgenom	67
4.5. Analyse der Insertion im Genom des HEV-Stammes 47832c durch Deletionen	69
4.6. Analyse der Insertion durch Substitution	72
4.7. Auswirkungen der Mutation G1634R auf die Replikation des HEV-Stamms 47832c ...	77
4.8. Etablierung einer ORF3-Deletionsmutante.....	80
4.9. Vergleichende Wachstums- und Infektiositätsstudien der replikationsfähigen p47832mc-Mutanten gegenüber dem ursprünglichen p47832mc Virus	82
5. Diskussion.....	84
5.1. Etablierung eines Reversen Genetischen Systems für den HEV-Stamm 47832c.....	84
5.2. Analyse der Insertion in der HVR	89
5.3. Analyse des Effekts der G1634R-Mutation	95
5.4. Analyse der Deletionsmutante p47832/ Δ ORF3	98
5.5. Schlussfolgerungen und Ausblick.....	100
Referenzen	XVI

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Im Text verwendete Abkürzungen

Amp	Ampicillin
ARCA	Anti-Reverse Cap Analoga
AS	Aminosäure
ASGPR	Asialoglykoprotein-Rezeptor
ATP	Adenosin-Triphosphat
ATPB5	ATP Synthetase Untereinheit β
bidest	zweifach-destilliert
c (in p47832c)	<i>cell culture</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTV	<i>Cutthroat Trout Virus</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddNTPs	Di-Desoxynukleosidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA, cDNA	Desoxyribonukleinsäure, komplementäre DNA
dsDNA	Doppelstrang-DNA
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ENANBH	enterische Non-A, Non-B Hepatitis
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FAM	6-Carboxyfluorescein
FBS	Fötales Kälberserum
FFU	<i>Foci-Forming-Units</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GRP78	78-kDa Glukose-regulierende Protein
GTP	Guanosin-Triphosphat
HEV	Hepatitis E-Virus
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykanen
HVR	Hypervariable Region
IAV	Influenza A-Virus
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
IFT	Immunfluoreszenztest
IgG, IgM	Immunglobulin G, Immunglobulin M
Ins	Insertion
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>

LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LiCl	Lithiumchlorid
LOD	<i>Limit of detection</i>
MAPK	Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen
mc (in p47832mc)	<i>molecular clone</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MeT	Methyltransferase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MVB	<i>multivesicular bodies</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
NLS	Kernlokalisierungssignal oder <i>Nuclear Localization Signal</i>
NTR	Nicht-translatierte Region
OD	Optische Dichte
ORF, pORF	offener Leserahmen, Protein aus ORF
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCP	Papain-ähnliche Cysteinprotease
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG- α INF	pegyliertes Interferon α
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
Poly-A	Poly-Adenosin-Sequenz
RBV	Ribavirin
RdRP	RNA-abhängige RNA Polymerase
RG	Reverse Genetik
RGS	Reverses Genetisches System
RNA, ssRNA	Ribonukleinsäure, Einzelstrang-RNA
RNA-Hel	RNA-Helikase
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT-PCR	Reverse-Transkription Polymerase-Kettenreaktion
RT-qPCR	Reverse-Transkription quantitative Polymerase-Kettenreaktion
SynCod	synonyme Codons
TAMRA	5-Carboxy-Tetramethylrhodamin
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TSG101	<i>Tumor Susceptibility Gene 101 Protein</i>
U	<i>Units</i>
UV	Ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der <i>Hepeviridae</i> (nach [16]).....	2
Abbildung 2: Taxonomische Einteilung der <i>Hepeviridae</i> (nach [34]).....	4
Abbildung 3: Weltweite Verbreitung von HEV 1 – 4 (nach [3])	6
Abbildung 4: Übertragungswege von zoonotischen HEV auf den Menschen in Deutschland [60]	7
Abbildung 5: Morphologie des HEV Partikels (nach [63]).....	8
Abbildung 6: Genomaufbau von HEV (nach [3]).	9
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Domänen des HEV ORF1.....	10
Abbildung 8: Vermehrungszyklus von HEV.	12
Abbildung 9: Übersicht über die gemeldeten Hepatitis-E-Erkrankungen in Deutschland [113]	13
Abbildung 10: Verlauf einer akuten HEV-Infektion mit einer Inkubationszeit von 3 Wochen	14
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Insertion in der HVR des Stamms 47832c (nach [76])	17
Abbildung 12: Übersicht über die RGS-Strategien (nach [141])	20
Abbildung 13: Klonierungsstrategie zur Generierung eines funktionellen HEV-Volllänge- cDNA-Plasmids p47832mc	39
Abbildung 14: Aufbau und Analyse des funktionellen HEV-Volllänge-cDNA-Plasmids p47832mc.....	58
Abbildung 15: Schematische Darstellung des Reversen Genetischen Systems für den HEV- Stamm 47832c.....	59
Abbildung 16: Immunfluoreszenztest (IFT) von BSR-T7/5-Zellen und A549/D3-Zellen, die mit 47832c aus Zellkulturüberstand infiziert wurden.....	60
Abbildung 17: Freisetzung von HEV aus transfizierten BSR-T7/5-Zellen	61
Abbildung 18: Nachweis von HEV in transfizierten BSR-T7/5-Zellen und anschließend infizierten A549/D3-Zellen der Passagen 1 und 2.....	62
Abbildung 19: Morphologische Analyse des mittels RGS generierten Virus durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	63
Abbildung 20: Charakterisierung des 3'-Endes des Virusgenoms von mittels RGS generiertem HEV p47832mc	64

Abbildung 21: Vergleich der Replikation des mittels RGS generierten Virus p47832mc mit dem originalen Virusstamm	65
Abbildung 22 (siehe vorherige Seite): Etablierung einer persistent infizierten Zelllinie auf der Basis des mittels RGS hergestellten HEV p47832mc und Vergleich mit der originalen, persistent mit dem HEV-Stamm 47832c infizierten Zelllinie	67
Abbildung 23 (siehe vorherige Seite): Einfügen einer stillen Punktmutation in das Virusgenom von HEV mittels des entwickelten RGS	69
Abbildung 24: Schematische Darstellung der Insertion im HVR-Bereich des ORF1 des Plasmids p47832mc und die per RGS veränderten Plasmidvarianten mit kompletter oder teilweiser Deletion der Insertion	69
Abbildung 25: IFT zur Analyse der Bildung infektiöser HEV-Partikel durch Plasmide mit Deletionen in der HVR.....	70
Abbildung 26: Analyse der HVR in persistent mit einer Deletionsmutante infizierten Zellen mittels RT-PCR.....	71
Abbildung 27: Sequenzalignment des mit p47832/ Δ Ins2 hergestellten Virus und Referenzsequenzen.....	72
Abbildung 28: Schematische Darstellung der Insertion in der HVR des HEV-Stamms 47832c, wie sie im Plasmid p47832mc und in den Substitutionsmutanten aufgebaut ist	73
Abbildung 29: Analyse der Bildung infektiöser HEV-Partikel durch Plasmide mit Substitutionen in der HVR mittels IFT und RT-qPCR.....	74
Abbildung 30: Etablierung einer persistent mit der Substitutionsmutante p47832/SynCod infizierten Zelllinie	76
Abbildung 31: Charakterisierung der G/R-Mutanten	78
Abbildung 32: Etablierung von persistent infizierten Zelllinien für die G/R-Mutanten.....	79
Abbildung 33: Schematische Darstellung des Genoms vom HEV-Stamms 47832c, wie sie im Plasmid p47832mc und in der ORF3-Deletionsmutante aufgebaut ist	80
Abbildung 34 (siehe vorherige Seite): Charakterisierung der ORF3-Deletionsmutante.....	82
Abbildung 35: Vergleichende Wachstumskinetik der p47832mc Mutanten mit p47832mc über 21 Tage auf A549/D3-Zellen.....	83
Abbildung 36: Übersicht über die verfügbaren RGS-Strategien für HEV (nach [141])	86
Abbildung 37: Ausschnitt aus den Plasmidsequenzen der Vollelänge-cDNA Klone der Stämme Kernow p6 und p47832mc	88

Abbildung 38: Aminosäuresequenz-Alignment eines Bereichs in der HVR, inkl. der Insertionen der HEV-Stämme Kernow-C1 p6 und 47832c	90
Abbildung 39: Vergleich funktioneller Aminosäuremotive in den HVRs des Stamms 47832c und des Stamms Kernow-C1 p6	93
Abbildung 40: Sequenzvergleich von Kernow-C1 p6, Kernow-C1 p6 G1634R, 47832c und p47832-GR-Mutanten auf Nukleotid- und Aminosäurebasis	96
Abbildung 41: Nukleotidalignment der HEV-Stämme Kernow-C1 p6, JE03-1760F, 47832c sowie der Mutante p47832/ Δ ORF3 im 5'-Bereich des ORF3	98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Im Text verwendete Abkürzungen	IX
Tabelle 2: Übersicht über Stämme, die häufig für die Konstruktion von cDNA-Klone verwendet wurden.	19
Tabelle 3: Geräte	23
Tabelle 4: Verbrauchsmaterial	24
Tabelle 5: Chemikalien	25
Tabelle 6: Puffer und Lösungen.....	26
Tabelle 7: Nährmedien und Zellkulturzusätze	26
Tabelle 8: Kulturmedien und Arbeitslösungen in der Zellkultur	27
Tabelle 9: Verwendete Zelllinien.....	27
Tabelle 10: Verwendete Bakterienstämme	27
Tabelle 11: Verwendete Plasmide und Klonierungsintermediate. Fett gedruckte Plasmide führten nach Transfektion zu replikationsfähigen und passagierbaren Viren.	28
Tabelle 12: Verwendete Viren und Virusmutanten	30
Tabelle 13: Enzyme.....	30
Tabelle 14: Reagenzien und Kits.....	31
Tabelle 15: Elektrophorese DNA-Standards.....	31
Tabelle 16: Antikörper.....	32
Tabelle 17: Verwendete Primer und Sonden	32
Tabelle 18: Sequenzierereinrichtungen.....	33
Tabelle 19: Software.....	34
Tabelle 20: Reaktionsansatz für einen Restriktionsverdau im 20 µl- bzw. 50 µl-Ansatz	36
Tabelle 21: Konzentration der Agarose im Gel bei zu erwartenden DNA-Bandengrößen	36
Tabelle 22: Klonierungsstrategien zur p47832mc <i>EcoRI</i> -Mutante	41
Tabelle 23: Klonierungsstrategien zur p47832mc Δ ORF3-Mutante	41
Tabelle 24: Klonierungsstrategien zu den p47832mc Deletions- und Teildeletionsmutanten	42
Tabelle 25: Klonierungsstrategien zu den p47832mc Insertion-Substitutionsmutanten.....	43
Tabelle 26: Klonierungsstrategien zu den p47832mc GR-Mutanten.....	44
Tabelle 27: Parameter zum Umsetzen der Zelllinien	45
Tabelle 28: Pipettierschema für die RT-qPCR zum HEV-Nachweis	52

Tabelle 29: Thermoprofil der RT-qPCR zum HEV-Nachweis	52
Tabelle 30: Pipettierschema für die <i>One-Step</i> RT-PCR.....	53
Tabelle 31: Thermoprofil 1 der <i>One-Step</i> RT-PCR.....	53
Tabelle 32: Thermoprofil 2 der <i>One-Step</i> RT-PCR zur Amplifikation von PCR-Produkten.....	54
Tabelle 33: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription in der <i>Two-Step</i> RT-PCR.....	54
Tabelle 34: Reaktionsansatz für die PCR in der <i>Two-Step</i> RT-PCR.....	55
Tabelle 35: Thermoprofil für die PCR in der <i>Two-Step</i> RT-PCR.....	55
Tabelle 36: Genomsequenzvergleich von HEV 47832, HEV 47832c und Vollelänge-cDNA-Klon pBR322-HEV47832c-Swal.....	57
Tabelle 37: Übersicht über die G/R-Mutanten und die Position der Mutation im HEV-ORF1	77

Einleitung:

1.1. Entdeckung und Geschichte des Hepatitis E-Virus

Das Hepatitis E-Virus wurde das erste Mal in den achtziger Jahren des 19. Jahrhunderts beschrieben. Der dort dokumentierte Ausbruch einer enterisch übertragenden Hepatitis-Epidemie, welcher im Nachhinein HEV zugeordnet wurde, fand in Delhi, Indien, im Jahr 1955-1956 statt [1]. Es konnte gezeigt werden, dass 68% der städtischen Bevölkerung infiziert waren und über 29.000 Menschen klinische Symptome in Form eines Ikterus ausbildeten. Bei der Suche nach dem ätiologischen Agens konnten keine Hepatitis-A- und nur wenige Hepatitis-B-Viren gefunden werden. Die Erkrankung wurde daraufhin zunächst als enterische Non-A, Non-B Hepatitis (ENANBH) bezeichnet [2]. In den darauffolgenden Jahren wurden regelmäßig örtlich begrenzte Ausbrüche von ENANBH berichtet, welche sich aber vor allem auf den asiatischen und afrikanischen Kontinent sowie Mexiko beschränkten [3]. 1983 konnte das ENANBH-Virus näher charakterisiert werden. Der russische Militärarzt Balayan infizierte sich selbst durch die Einnahme einer Stuhlprobe eines infizierten Soldaten in Indien. Nach seiner Rückkehr nach Russland isolierte er das Virus aus seinem Stuhl und untersuchte die Viren mittels Immun-Elektronenmikroskopie, serologischer Assays und Tierversuchen [4]. Zwischen 1990 und 1991 wurde die Sequenz des Virus entschlüsselt und partiell kloniert. Anhand dieser Daten wird das Virus seitdem als Hepatitis E-Virus bezeichnet [5, 6].

Anfangs wurde vermutet, dass HEV aufgrund der Übertragung durch schlechte hygienische Standards und durch verunreinigtes Trinkwasser nur in Entwicklungsländern vorkommt. In den neunziger Jahren des 19. Jahrhunderts häuften sich allerdings sporadische HEV-Erkrankungen in Industrieländern [7-10]. In den USA wurden HEV-Infektionen meistens mit Reisen in endemische Länder in Verbindung gebracht [11, 12].

Im Jahr 1997 wurde erstmals ein neuer HEV-Stamm in Hausschweinen in den USA gefunden. Durch Sequenzanalysen wurde herausgefunden, dass dieses neuartige HEV nah verwandt mit dem humanem HEV ist [13]. Im Jahr 1998 konnte durch weiterführende serologische, phylogenetische und Sequenzanalysen sowie Tierversuchen das zoonotische Potenzial des Schweine-HEV gezeigt werden [14].

Heute sind alle Hepatitis E-Viren der Virusfamilie *Hepeviridae* zugeordnet. Unterteilt werden sie in *Orthohepevirus A-D* sowie *Piscihepevirus*. Von den *Orthohepeviren* wurden einige bislang nur im Menschen gefunden (z. B. *Orthohepevirus A*, HEV-Genotyp 1 und 2), andere wurden bislang nur in Tieren entdeckt (z. B. *Orthohepevirus A*, HEV-Genotyp 5) und wieder andere sind

zoonotische Erreger, die die Tier-Mensch-Barriere überwinden können (z. B. *Orthohepevirus* A, HEV-Genotyp 3 und 4) [15].

1.2. Taxonomie und Epidemiologie

Das HEV wird in die Familie der *Hepeviridae* eingeordnet, welche aus den *Orthohepeviren* und den *Piscihepeviren* bestehen. Der Genus *Orthohepevirus* ist unterteilt in die Spezies A - D und in bislang noch nicht zugewiesene *Orthohepeviren* [15]. Die Abbildung 1 zeigt die phylogenetische Verwandtschaft der Spezies sowie deren Genotypen und Subgenotypen. Die Abbildung 2 illustriert die Taxonomie der Familie *Hepeviridae* im Zusammenhang mit den Wirtsspezies.

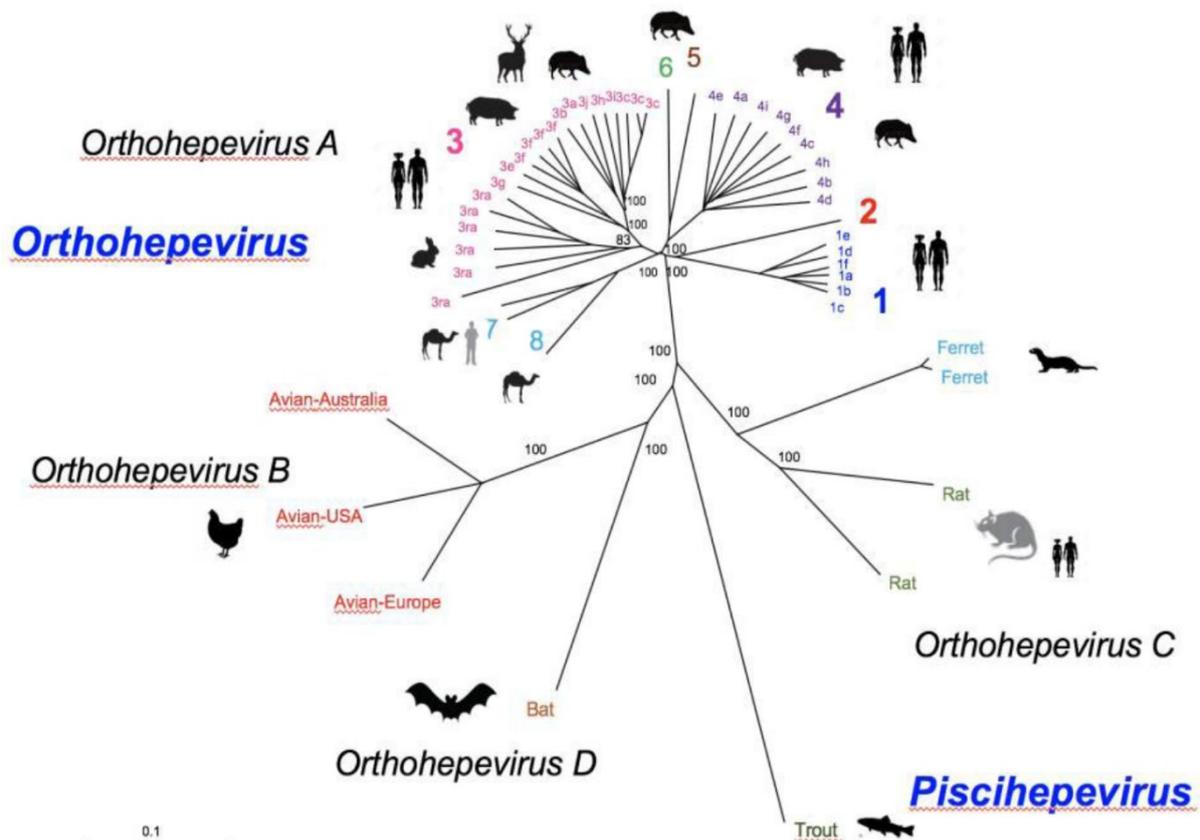


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der *Hepeviridae* (nach [16])

Die Spezies *Orthohepevirus* A beinhaltet die HEV Genotypen 1 - 8, wobei der Genotyp HEV-3 mit 14 Subgenotypen (3a – m und 3ra) am divergentesten ist [17]. Es folgt mit 9 Subgenotypen HEV-4 (4a – i) und mit 7 Genotypen HEV-1 (1a - g; Der Stammbaum zeigt nur 6 Genotypen. Inzwischen existieren 7 Genotypen [18]). Von HEV-2, HEV-5, HEV-6, HEV-7 und HEV-8 ist jeweils nur ein Subgenotyp beschrieben. Die Spezies *Orthohepevirus* B beinhaltet Genotypen, die aus Hühnern isoliert wurden. Zu den *Orthohepeviren* C gehören die Genotypen HEV-C1 und HEV-C2 aus Nagetieren und Karnivoren. *Orthohepevirus* D kommt in Fledermäusen vor. Die *Piscihepeviren* wurden in Forellen beschrieben [16].

Zum Genus *Orthohepevirus A* gehören die Genotypen HEV-1 bis HEV-8 [19]. HEV-1 (Subtypen 1a – 1g) und HEV-2 (Subtypen 2a und 2b) konnten bislang nur im Menschen detektiert werden. In endemischen Gebieten verursachen sie regelmäßig wiederkehrende, zum Teil große Erkrankungsausbrüche. Übertragen werden sie dabei fäkal-oral durch schlechte sanitäre Hygienebedingungen und kontaminiertes Trinkwasser. Laut der im Jahr 2010 erschienenen *Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study* (GBD 2010 Studie) waren im Jahr 2005 über 20 Millionen Menschen mit HEV-1 oder HEV-2 infiziert, mit ca. 3,4 Millionen klinischen Fällen, 70.000 Todesfällen und 3.000 Fehlgeburten [20]. Im Jahr 2020 veröffentlichte die Weltgesundheitsorganisation ähnliche Zahlen mit 3,3 Millionen symptomatischen Fällen und 44.000 Todesfällen [21].

HEV-3 (Subtypen 3a - 3m und 3ra), HEV-4 (Subtypen 4a - 4i) und HEV-7 (Subtyp 7a) sind zoonotische Erreger [22, 23]. HEV-3 und HEV-4 kommen vor allem in Industrieländern vor [24]. In Deutschland kommen vorrangig die Subgenotypen HEV-3c, HEV-3e und HEV-3f vor [25]. Als natürliches Reservoir der Subgenotypen 3a - 3m sowie 4a - 4i wurden Wild- und Hausschweine identifiziert. Weitere Tierwirte für HEV-3 sind Rehe, Hirsche und Mungos. Das natürliche Reservoir von HEV 3ra sind Kaninchen und Hasen [3, 22]. Für HEV-4 wurden als zusätzliche Tierwirte Kühe, Ziegen, Yaks und Rhesusaffen identifiziert [3]. Auch in Karnivoren wurde das Virus gefunden. Ob diese Tiere echte Reserviertiere sind oder ob es sich um eine „Spillover“-Infektion (z. B. durch Fressen infizierter Beutetiere) handelt, ist nicht abschließend geklärt [26]. Als natürliches Reservoir von HEV-7 wurden Dromedare identifiziert. In einem Fall konnte in Mittleren Osten nachgewiesen werden, dass der Konsum von Milch eines infizierten Kamels zur Ausbildung einer chronischen Infektion bei einem Lebertransplantierten Menschen geführt hat [23].

HEV-5, HEV-6 und HEV-8 wurden bislang nur in Tieren beschrieben. HEV-5 (Subtyp 5a) und HEV-6 (Subtyp 6a) kommen bis jetzt nur in Wildschweinen in Japan vor [27, 28]. HEV-8 (Subtyp 8a) wurde bislang nur in Trampeltieren beschrieben [29, 30]. Das Risiko einer zoonotischen Übertragung wird neben HEV-7 vor allem den Genotypen HEV-5 und HEV-8 zugeschrieben. Mittels Reverser Genetik konnten in experimentellen Studien in Japan Javaneraffen mit HEV-5 und HEV-7 [31, 32] infiziert werden. In China wurden Javaneraffen erfolgreich mit HEV-8 infiziert [29].

Vom Hepatitis E-Virus ist im Gegensatz zur hohen Diversität in den Genotypen bislang nur ein einzelner Serotyp bekannt [33].

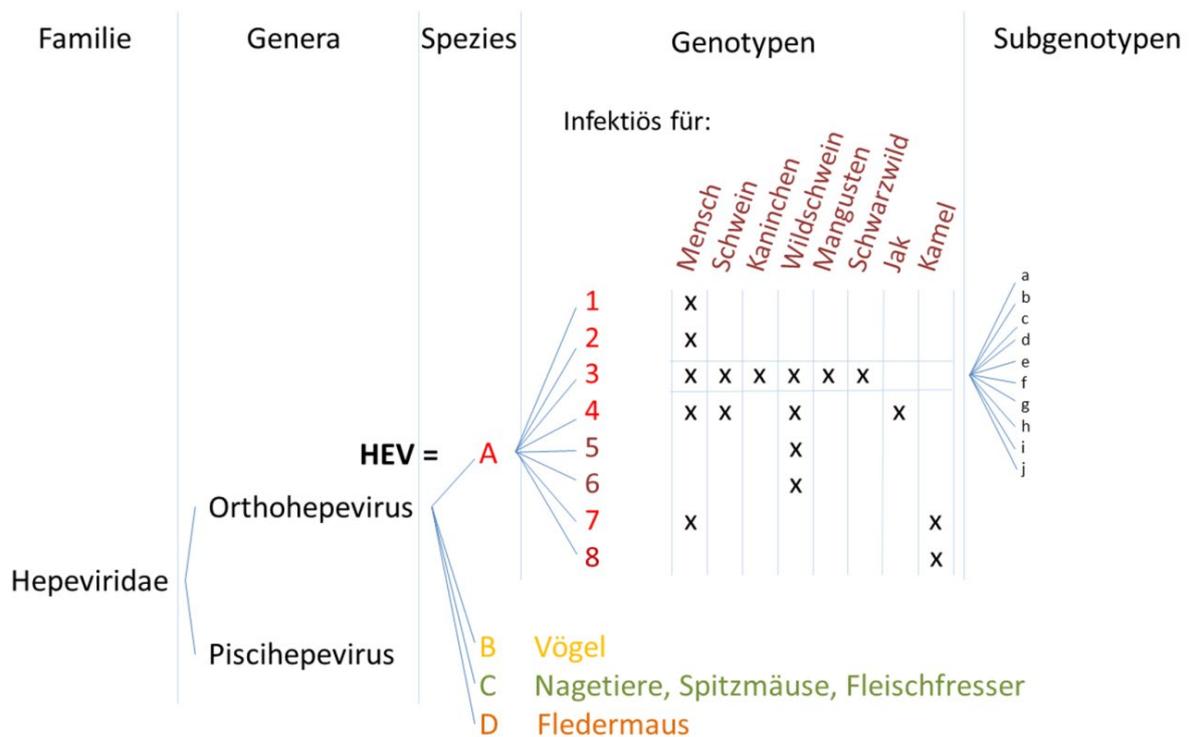


Abbildung 2: Taxonomische Einteilung der Hepeviridae (nach [34])

HEV gehört zur Spezies *Orthohepevirus A* und gliedert sich in insgesamt acht Genotypen auf. Die Wirte der jeweiligen Spezies und Genotypen sind im Text beschrieben. Die phylogenetische Verwandtschaft zwischen den Spezies ist in der Abbildung 1 dargestellt.

Orthohepevirus B wurde bislang nur in Hühnern gefunden. Entdeckt wurde es im Jahr 2001 in den USA. In einer Studie an Hühnern in Nordamerika, welche am Hepatitis-Splenomegalie-Syndrom litten, konnte das Virus mittels Elektronenmikroskopie, Sequenzierung und phylogenetischer Untersuchung identifiziert werden [35]. Zoonotisches Potenzial wurde bis heute nicht beschrieben.

Orthohepevirus C wird in die Genotypen C1 und C2 unterteilt. 1999 und 2000 wurden in zwei Prävalenzstudien in den USA erstmals antiHEV-Antikörper in Ratten gefunden [36, 37]. Im Jahr 2010 wurden die ersten Orthohepeviren des Genotyps HEV-C1 in Ratten in Deutschland entdeckt [38, 39]. Seitdem konnten die Viren weltweit in unterschiedlichen Rattenarten identifiziert werden [40]. Im Jahr 2012 wurden das erste Mal Antikörper gegen HEV-C1 bei deutschen Waldarbeitern festgestellt [41]. Seither wurden weitere vereinzelte, humane Fälle beschrieben, die mit HEV-C1 in Verbindung gebracht werden [40]. Dies lässt vermuten, dass auch diese Viren zoonotisches Potenzial besitzen [15]. In einer weiteren Studie konnte in einem Syrischen Braunbär in einem deutschen Zoo der Genotyp HEV-C1 nachgewiesen werden. Vermutet wird hier weniger ein weiteres natürliches Reservoir, als eher ein Fall einer

„Spillover“-Infektion [42]. In Karnivoren kommt vorrangig HEV-C2 vor. Betroffen davon sind Frettchen, Nerze, Füchse und Greifvögel wie z. B. Turmfalken [40, 43]. Zu den bereits bekannten Genotypen kommen noch weitere, neu entdeckte *Orthohepevirus* C-Stämme aus Wühlmäusen und weiteren Mäusen [15].

In einer global angelegten Studie konnten im Jahr 2012 mehrere neuartige Viren in Fledermäusen gefunden werden, die nach phylogenetischer Analyse sowie Genomcharakterisierung einer neuen Spezies innerhalb der *Hepeviridae*, dem *Orthohepevirus* D, zugeordnet wurden [44].

Bislang noch nicht eingruppierte Viren des Genus *Orthohepevirus* wurden bislang in Elchen und Seidenreihern gefunden [15].

Die Viren der Spezies *Piscihepevirus* A unterscheiden sich von den Säugetier-Hepeviren. Bereits seit dem Jahr 1988 war das *Cutthroat Trout Virus* (CTV) bekannt, nachdem es aus asymptomatischen Forellen isoliert und auf einer Zelllinie vermehrt worden war [45]. Im Jahr 2011 wurde CTV dann durch Elektronenmikroskopie und Sequenz-Untersuchungen in die Familie der *Hepeviridae* klassifiziert [46]. Ein zoonotisches Potenzial ist bislang noch nicht beschrieben worden.

1.3. Übertragungswege humanpathogener HEV und ihre globale Verbreitung

Die Genotypen HEV-1 und HEV-2 kommen vorwiegend in Entwicklungsländern im tropischen und subtropischen Raum vor. HEV-1 ist in Teilen Afrikas und Asiens, dem Nahen und Mittleren Osten sowie in Brasilien verbreitet. HEV-2 kommt in Teilen Westafrikas und in Mexiko vor. Bislang sind diese Viren nur im Menschen beschrieben worden. Oft gehen größere Ausbrüche mit lokalen Überschwemmungen einher. Die Viren werden dann aufgrund unzureichender Hygienestandards, unter anderem durch kontaminiertes Trinkwasser, fäkal-oral übertragen. Hauptverbreitungsgebiete sind große Teile Asiens, Afrikas (HEV-1, HEV-2) und in Mexiko (HEV-2) [47, 48].

Die Genotypen 3, 4 und 7 sind zoonotische Erreger. Der Genotyp HEV-3 erstreckt sich über weite Teile Nord- und Südamerikas, Europas, Australien/Neuseelands, Russlands und einiger asiatischer Länder. HEV-4 kommt in großen Teilen Asiens und in Frankreich vor. HEV-7 kommt in den Vereinigten Arabischen Emiraten vor.

Eine detaillierte Ansicht der globalen Verteilung der einzelnen *Orthohepeviren* A (HEV 1 – 4) ist in Abbildung 3 zu sehen.

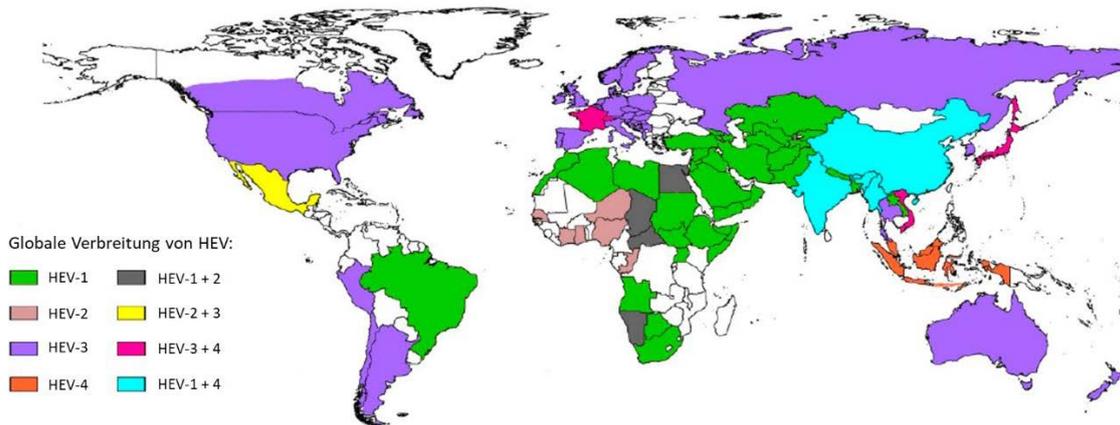


Abbildung 3: Weltweite Verbreitung von HEV 1 – 4 (nach [3])

HEV-1 und HEV 2 kommen vor allem in Entwicklungsländern in tropischen und subtropischen Regionen vor (z. B. Afrika, Teile von Asien). HEV-3 und HEV-4 kommen vorrangig in Industrienationen vor und sind in weiten Teilen Amerikas, Europas, Asiens und in Australien verbreitet [3].

Zoonotische HEV-Genotypen werden auf unterschiedlichen Wegen von Tieren auf den Menschen übertragen. Das Tierreservoir der Genotypen 3 und 4 sind Wild- und Hausschweine. In diesen Tieren zirkuliert das Virus, ohne klinische Symptome hervorzurufen. In anderen Wildwiederkäuern wurden Infektionen ohne Symptomatik ebenfalls beobachtet. Auch diese besitzen das Potenzial, das Virus zoonotisch auf den Menschen zu übertragen, wenngleich diese Tierarten weitaus seltener betroffen sind. Das Kamel ist das postulierte Reservoir des Genotyps 7 [49].

Der Hauptübertragungsweg ist der Verzehr von unzureichend gegartem Fleisch (z. B. Wildschweinleber oder Wursterzeugnisse mit Leberanteil) oder tierischen Erzeugnissen (z. B. Kamelmilch).

Ein Sonderfall bei der Übertragung von HEV stellen Muscheln und andere Weichtiere dar. Durch die Filtrationseigenschaften der Tiere wird vermutet, dass sie das Virus in sich akkumulieren. Im Jahr 2001 konnten dazu erste Indizien gesammelt werden. Seitdem kommt es immer wieder zu Berichten über HEV-Infektionen, die im Zusammenhang mit dem Verzehr von Weichtieren stehen sollen [50-53]. Der Report eines Krankheitsausbruchs auf einem Kreuzfahrtschiff beschreibt im Jahr 2009 neben Hepatitis-A-Infektionen auch Infektionen mit dem Hepatitis E-Virus. Ob hier Weichtiere die Quelle der Infektionen gewesen waren, konnte nicht hinreichend geklärt werden [54].

Ein erst seit Kurzem bekannter Weg der Übertragung ist die Verabreichung von kontaminierten Blutkonserven, weshalb seit 2019 gespendetes Blut vor Gabe an den Patienten getestet werden muss bzw. die Blutspender selbst auf HEV getestet werden [55, 56].

1.4. HEV-Struktur und Genom

Das Hepatitis-E-Virus ist ein ikosaedrisches Partikel mit einem Durchmesser von 27-34 nm (Abbildung 5) [61]. Obwohl man anfänglich nur unbehüllte Partikel kannte, sind inzwischen auch HEV-Partikel beschrieben worden, die eine Lipidhülle besitzen [62, 63]. Die unbehüllten Viren findet man vorrangig im Darmtrakt und im Stuhl, die behüllte Spezies kommt im Serum und im Zellkulturüberstand vor [62]. Es wird angenommen, dass durch den Kontakt mit Gallensalzen die Hülle in infizierten Organismen entfernt wird, sodass nur unbehülltes Virus ausgeschieden wird. Sowohl die behüllte als auch die unbehüllte Spezies sind infektiös [62, 63].

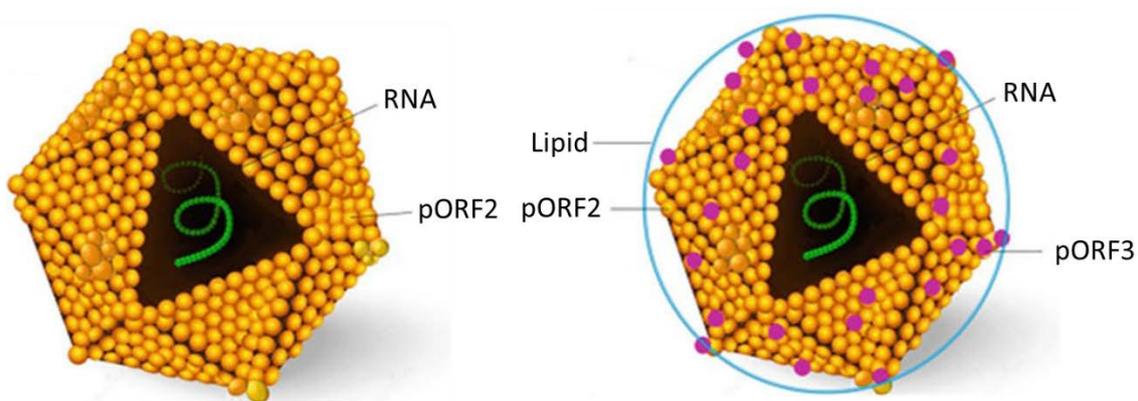


Abbildung 5: Morphologie des HEV Partikels (nach [63])

Die 27-34 nm großen HEV-Partikel kommen in zwei unterschiedlichen Formen vor. Die unbehüllte Form findet man nach der Gallengang-Passage im Darm und später im Stuhl, die behüllte Form im Serum und in Zellkulturüberstand. Die Kapsidproteine (pORF2) umschließen das einzelsträngige 7,2 kb lange Plusstrang-RNA Molekül. Das ORF3-Protein (pORF3) besitzt multiple Funktionen und ist wesentlich bei der Ausschleusung der Viruspartikel aus der Zelle beteiligt.

Das Virus beinhaltet eine ca. 7,2 kb lange, positiv orientierte Einzelstrang-RNA, welche am 5'-Ende eine Cap-ähnliche Struktur besitzt und am 3'-Ende polyadenyliert ist [6, 64]. Das Genom beginnt nach der Cap-Struktur und endet vor der 3'-Polyadenylierung mit einer kurzen nicht-translatierten Region (5'-NTR bzw. 3'-NTR). Die RNA kodiert in der Regel für drei offene Leserahmen (ORFs) (Abbildung 6) [65].



Abbildung 6: Genomaufbau von HEV (nach [3]).

Das Virusgenom besteht aus einer positiv orientierten (+) Einzelstrang-RNA. Nach der 5'-terminalen m⁷G Cap-Struktur folgt eine kurze nicht-translatierte Region, gefolgt vom ORF1 (ORF = *open reading frame*) und dem ORF2. Überlappend mit dem 3'-Ende des ORF1 und dem 5'-Anfang von ORF2 befindet sich der ORF3. Nach dem ORF2 folgt erneut eine kurze nicht-translatierte Region, bevor die RNA am 3'-Ende mit einer Poly-A-Sequenz endet.

Der ORF 1 (Abbildung 7) kodiert für das 186 kDa große Nicht-Strukturpolyprotein mit den funktionellen Domänen einer Methyltransferase (MeT), einer Papain-ähnlichen Cysteinprotease (PCP), einer RNA-Helikase (RNA-Hel) und einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP). Außerdem beinhaltet der ORF1 eine Y-Domäne (zwischen MeT und PCP), eine Prolin-reiche hypervariable Region (HVR) und eine nachfolgende X-Domäne (beide zwischen der PCP und der RNA-Hel) [66]. Die MeT-Aktivität initiiert das RNA-Capping, die RNA-Hel und RdRP sind essentielle Enzyme der viralen RNA-Replikation [67-72]. Die PCP sorgt vermutlich für die Prozessierung des Polyproteins in funktionelle Enzymeinheiten. Ob das Polyprotein allerdings tatsächlich prozessiert wird, ist noch nicht hinreichend geklärt. Die PCP soll zudem eine Deubiquitinationsfunktion für Wirtszellproteine besitzen [69]. Der hypervariablen Region (HVR) konnte bisher noch keine spezielle Funktion zugeordnet werden, jedoch besitzt sie eine hohe Diversität zwischen einzelnen Stämmen [73, 74]. Zusätzliche Diversität erlangt die HVR durch Insertionen humaner Genfragmente oder Duplikationen des eigenen Genoms, die vorrangig bei Virusvarianten in chronisch infizierten Patienten, aber zu einem geringeren Prozentsatz auch in akut infizierten Patienten zu finden sind. Bei Insertionen sind bislang nur humane Genfragmente beschrieben worden, welche im Bereich der HVR eingefügt wurden (z. B. Kernow-C1 p6: Segment des Gens für die humane S17 Ribosomenuntereinheit). Die beschriebenen HEV-genomeigene Duplikationen können sehr variabel sein (z. B. HEV-3c 47832c: eine Kombination aus zwei Teilen des eigenen ORF1) [73, 74]. Zudem ist bekannt, dass HEV-Stämme mit Insertionen in der HVR besonders gut in Zellkultursystemen replizieren können (Kernow-C1 p6: [75], 47832c: [76]). Über die Funktionen der X- und Y-Domäne ist bislang nur wenig bekannt [66]. Die X-Domäne (oder auch Makro-Domäne genannt) soll eine Rolle in der Deribosylierung von Wirtszellproteinen spielen [77].



Abbildung 7: Schematische Darstellung der Domänen des HEV ORF1.

Das Nichtstrukturprotein, welches durch den ORF1 kodiert ist, besteht aus vier funktionellen Domänen (MeT = Methyltransferase, PCP = Papain-ähnliche Cysteinprotease, RNA-Hel = RNA Helikase, RdRP = RNA-abhängige RNA-Polymerase) und drei weiteren Domänen mit unbekannter Funktion (HVR = Hypervariable Region, X- und Y-Domäne).

Der ORF 2 kodiert für das HEV Kapsidprotein. Dieses kommt in drei unterschiedlichen Formen vor. Eine glykosylierte Form mit einer Größe von 88-90 kDa und eine trunkierte Form mit 75-78 kDa scheint von der Wirtszelle sekretiert zu werden und Virus-ähnliche Partikel zu bilden. Bei der Zusammensetzung neuer Virionen scheinen diese Formen keine Rolle zu spielen. Die 80-82 kDa große Form des Kapsidproteins ist unglykosyliert und wird für das Assemblieren neuer Partikel verwendet. Ein N-terminales Signalpeptid sorgt für die Translokation der neu synthetisierten Kapsidproteine zum Endoplasmatischen Retikulum, wo die Proteine zu Kapsiden zusammengefügt und sekretiert werden. Das Kapsidprotein ist weiterhin das Ziel neutralisierender Antikörper während der Immunantwort [78-83].

Das ORF3 Protein ist ein ca. 13 kDa kleines Phosphoprotein (113 Aminosäuren (AS) beim Genotyp 3, 114 AS bei den Genotypen 1, 2 und 4 [3]) mit unterschiedlichen, z. T. aber noch unbekannt Funktionen. Das Protein besitzt zwei stark hydrophobe und zwei Prolin-reiche Domänen, die wesentlich für die Funktionalität des Proteins sind. Bisher ist bekannt, dass das ORF3-Protein eine Rolle spielt in der Freisetzung der Viruspartikel aus der Zelle, bei der Beeinflussung von intrazellulären Signalwegen, beim Escape vor der Wirtszellimmunantwort und dass es eine Palmylierungsfunktion besitzt [63, 84-93].

Neben dem Ratten-Hepatitis-E-Virus (*Orthohepevirus C*) wurden auch im humanen HEV-1 ein ORF4 gefunden, wobei die beiden ORF4 an unterschiedlichen Positionen im jeweiligen HEV-Genom organisiert sind. Das ORF4 der *Orthohepeviren C* befindet sich im 5'-terminalen Bereich des ORF1, scheint aber keine Rolle in der Virusreplikation zu spielen. Die *in-vivo* Funktion dieses Proteins ist bislang noch nicht geklärt [94]. Im HEV-1 liegt der ORF4 im 3'-terminalen Bereich des ORF1 und überlappt zudem mit dem ORF3. Beschrieben ist eine zusätzliche, regulatorische Rolle als Enhancer in der viralen Replikation. Die Translation des pORF4 erfolgt hierbei über eine IRES-ähnliche Struktur [95].

1.5. Anheftung, Replikation und Freisetzung der Viruspartikel aus der Wirtszelle

Viele Aspekte zum Replikationszyklus von HEV sind bisher nicht bekannt. Hauptsächlich ist dies auf das Fehlen effizienter Zellkultursysteme und einfacher Untersuchungsmethoden zur HEV-Replikation zurückzuführen.

HEV sind sowohl in der quasi-behüllten Form als auch als unbehüllte Partikel infektiös. Demzufolge scheint es auch bei der Anheftung an die Zelle unterschiedliche Mechanismen zu geben. Diese Mechanismen sind jedoch zurzeit nur unzureichend charakterisiert. Studien zeigten, dass etwa membranständige Wirtszellrezeptoren wie z. B. das 78-kDa-Glukose-regulierende Protein (GRP78), die ATP-Synthetase-Untereinheit β (ATPB5), Integrin $\alpha 3$ und der Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGPR) beim Eintritt der unbehüllten Viren eine Rolle spielen könnten [96-99]. Zudem scheinen die Partikel mit Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) zu interagieren, welche auf vielen Zelltypen exprimiert werden und Anheftungspunkte vieler weiterer unbehüllter und behüllter Viren sind [100]. Die behüllten HEV-Partikel scheinen mittels kleiner GTPasen, z. B. Rab5 und Rab7, in Kombination mit einer Ansäuerung des endosomalen Milieus und lysosomalem Lipidabbau in die Wirtszelle einzutreten [101].

Der Übergang in den intrazellulären Raum erfolgt sowohl für die unbehüllte als auch für die behüllte Form über Clathrin-/Dynamin-2-abhängige Endozytose, wobei Cholesterole eine entscheidende Rolle zu spielen scheint [102]. Im weiteren Verlauf muss die RNA ins Zytoplasma transferiert werden. Dieser Prozess ist bislang nicht ausreichend aufgeklärt. Es wird vermutet, dass pORF2 durch induzierte Konformationsänderung die RNA ins Zytoplasma freigibt, wie es bereits bei anderen Viren (z. B. Poliovirus) beschrieben ist [100].

Die gecappte genomische RNA wird mittels des eukaryotischen Translationinitiationsfaktor-4F-Komplexes, beginnend von der 5'-untranslatierten Region, abgelesen [103]. Das resultierende pORF1 beinhaltet alle funktionellen Proteine, welche für die Replikation notwendig sind (MeT, PCP, RNA-Hel, RdRP). Ob das Polyprotein durch die PCP oder durch Proteasen, wie Thrombin oder Faktor Xa, prozessiert wird, ist bislang noch nicht ausreichend geklärt [104, 105]. Neben der pORF1-Translation fungiert die genomische RNA auch als Template zur Herstellung einer Negativstrang-RNA, welche wiederum als Template für die Synthese genomischer und subgenomischer RNAs dient und über genomische cis-Elemente reguliert wird [106]. Aus der subgenomischen RNA wird pORF2 und pORF3 translatiert [100]. Die Replikation findet in Membran-assoziierten Replikationskomplexen (MVB = *multivesicular bodies*) statt, welche aus der viralen RNA, den viralen Proteinen und Wirtszellkomponenten bestehen [100].

Die Zusammenfügung der Virusbestandteile erfolgt in den gleichen Replikationskomplexen. Hier wird die virale RNA in das Kapsid verpackt [100]. pORF3 spielt bei der Assemblierung

zunächst keine Rolle. Beim *Budding* und der Sekretion infektiöser Partikel besitzt pORF3 andererseits essentielle Funktionen. Beim *Budding* verschmelzen die MVBs mit der Wirtszellmembran und geben die Viruspartikel in die extrazelluläre Matrix ab [90]. Abgegeben werden die Viruspartikel zunächst behüllt. Im Blut zirkulieren die Partikel weiterhin behüllt, wohingegen sie beim Durchgang durch den Gallengang die Lipidhülle verlieren und im Darm unbehüllt vorliegen [100]. Der Wirtszellzyklus ist in Abbildung 8 schematisch zusammengefasst.

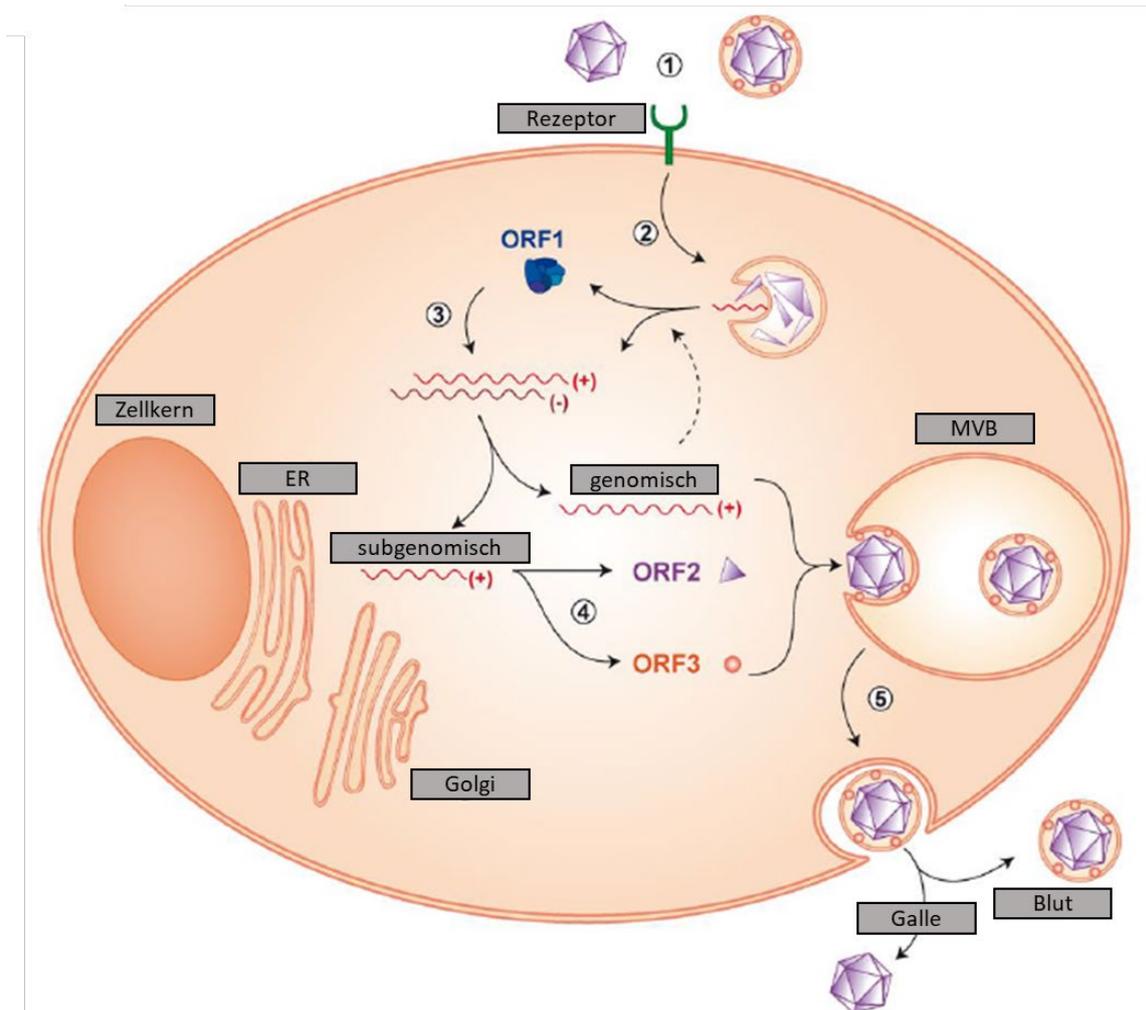


Abbildung 8: Vermehrungszyklus von HEV.

1) Der Eintritt in die Zelle ist bislang noch nicht abschließend geklärt. Es gibt Indizien, dass für behüllte und unbehüllte Partikel unterschiedliche Rezeptoren eine Rolle spielen. 2) Der Durchgang durch die Zellmembran erfolgt über Endozytose. Anschließend wird die RNA aus dem Kapsid freigesetzt. 3) Die genomische RNA wird zum einen in das pORF1 translatiert und zum anderen in eine Negativstrang-RNA übersetzt, welche dann als Template für die virale genomische und subgenomische RNA dient. 4) Aus der subgenomischen RNA werden pORF2 und pORF3 translatiert. Die Genomreplikation und später die Assemblierung der Partikel erfolgen in Membran-assoziierten Replikationskomplexen (MVB = *multivesicular bodies*). 5) Beim *Budding* und bei der Freisetzung der Partikel spielt pORF3 eine essentielle Rolle. Viruspartikel zirkulieren als behüllte Form im Blut und nach dem Durchgang durch die Galle als unbehüllte Form im Darmtrakt [100].

1.6. HEV Prävalenzen im Menschen und in Tierreservoiren

Humane HEV-Seroprävalenzstudien basieren vorrangig auf untersuchtem Blut von Blutspendern. In Industrieländern sind die Seroprävalenzen sehr unterschiedlich [107]. Sie reichen von 4,2 % (Neuseeland [108]) über 12,3% (USA [109]) und 17 % (Deutschland [110]) bis zu 52,5 % in Teilen Frankreichs [111].

Bei Wildschweinen lag die Seroprävalenz in Deutschland im Jahr 2013 bei 41 % [110]. Die Seroprävalenz in Hausschweinen lag im gleichen Jahr zwischen 43,6 % und 65,5 %, abhängig von der Region in Deutschland [112].

Die Zahl der gemeldeten HEV-3-Erkrankungen in Deutschland steigt seit einigen Jahren kontinuierlich an und erreichte im Jahr 2019 den Stand von 3.706 Fällen (Abbildung 9) [113]. Dieser Anstieg ist aber vermutlich nicht assoziiert mit einer tatsächlich steigenden Infektionsrate, sondern könnte seinen Ursprung in einer erhöhten Sensibilisierung und Aufklärung der Ärzteschaft, gezielterer Diagnostik bei Verdacht und sensitiveren Diagnostikmethoden haben.

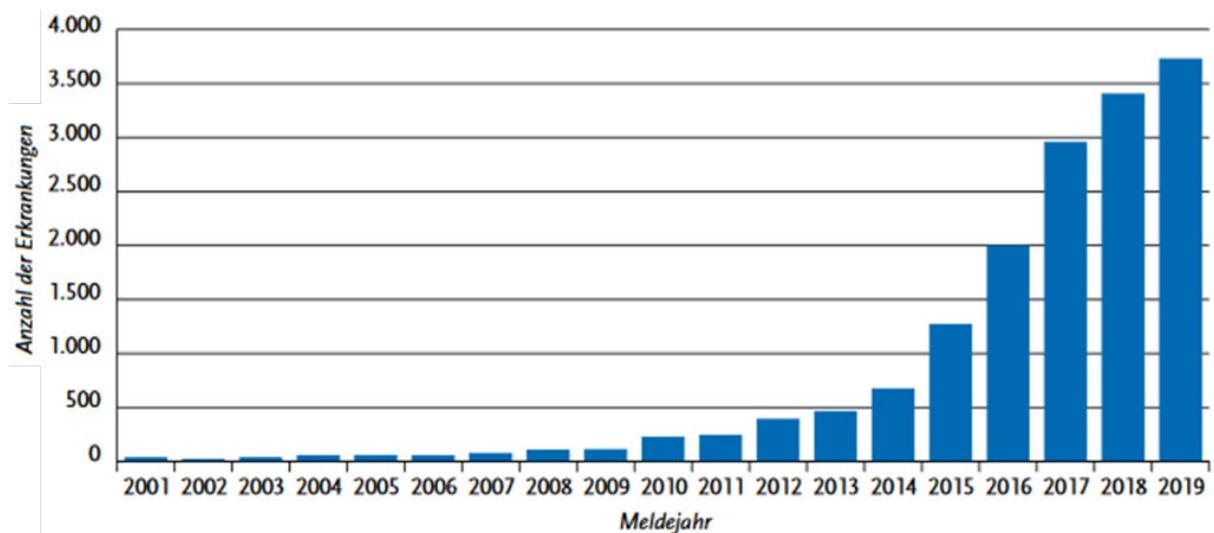


Abbildung 9: Übersicht über die gemeldeten Hepatitis-E-Erkrankungen in Deutschland [113]

Im Zeitraum von 2009 bis 2019 hat sich die Zahl der gemeldeten HEV-GT3-Infektionen in Deutschland von 109 auf 3.706 Fälle erhöht.

1.7. Erkrankungsverlauf, Therapie und Impfung

Nach oraler Infektion mit HEV beträgt die Inkubationszeit 2-10 Wochen [114]. In dieser Zeit und in der frühen akuten Phase der Erkrankung kann HEV-RNA im Stuhl und antiHEV-Immunglobulin M (IgM) im Serum nachgewiesen werden. Erhöhte Alanin-Aminotransferase (ALT)-Werte im Blut während der klinischen Phase sind ein Indiz für eine akute

Leberentzündung. In der späten akuten Phase und in der Rekonvaleszenz können ansteigende antiHEV-Immunglobulin G (IgG)-Titer eine überstandene HEV-Infektion nachweisen (Abbildung 10). Der IgG-Titer kann über einige Jahre nachgewiesen werden [115].

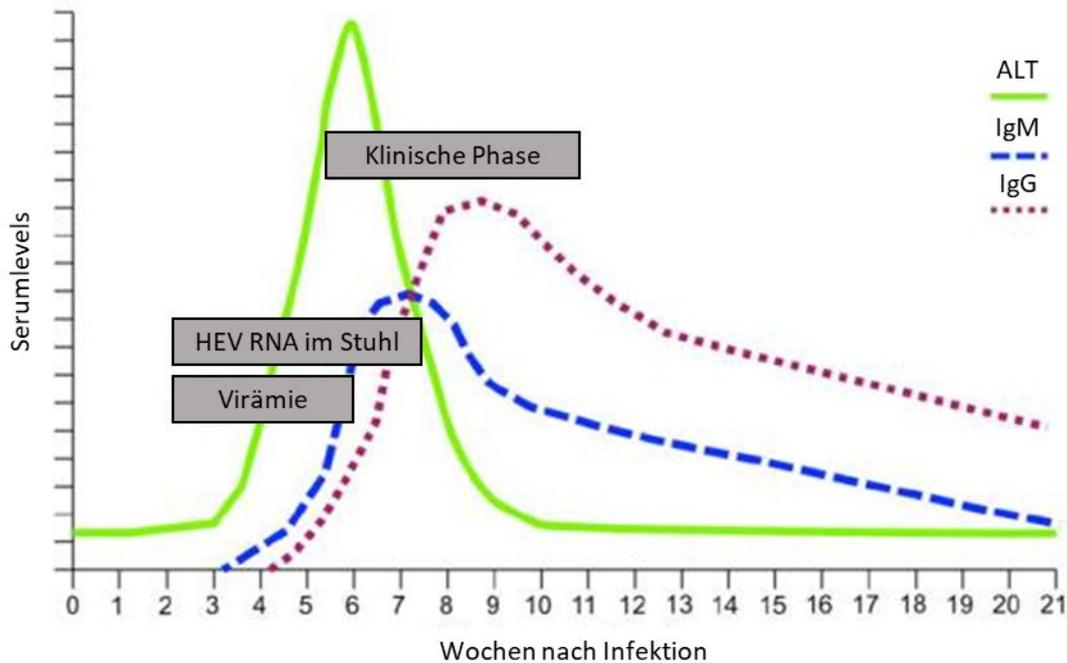


Abbildung 10: Verlauf einer akuten HEV-Infektion mit einer Inkubationszeit von 3 Wochen

Während der Inkubationszeit und in der frühen akuten Phase kann HEV-RNA im Stuhl und im Blut nachgewiesen werden. Kurz vor dem Beginn der ersten klinischen Symptome erhöht sich der Alanin-Aminotransferase (ALT)-Spiegel im Blut, was auf eine Schädigung der Leberzellen hindeutet. Gleichzeitig steigt der IgM-Titer an. Kurz darauf kann auch IgG im Blut nachgewiesen werden. Nach der Clearance der Viren nimmt der IgM-Titer kontinuierlich ab. Die klinische Phase dauert ca. 4-6 Wochen. IgG kann auch nach Jahren noch im Blut nachgewiesen werden [114].

In vielen Fällen verläuft eine Infektion asymptomatisch oder hat nur einen milden Verlauf [116]. Bei einem akuten symptomatischen Verlauf kommt es zunächst zu unspezifischen, Grippe-ähnlichen Symptomen, wie Fieber und Kopfschmerzen. Es folgen typische Hepatitis-Symptome wie Oberbauchschmerzen, dunkel gefärbter Urin und Ikterus [117]. In den meisten Fällen kommt es zu einer vollständigen Genesung ohne bleibende Schäden nach ca. 4-6 Wochen [114]. Die Mortalitätsrate liegt bei 0,2-4 % [118].

In seltenen Fällen kann es zu fulminanten Krankheitsverläufen kommen. Zu den Risikogruppen gehören zum einen Schwangere: bei Frauen, die im dritten Trimester mit HEV-1 infiziert sind, kommt es in 33 % der Fälle zu einem akuten Leberversagen, ca. 25 % der infizierten Frauen sterben an den Folgen der Infektion [119, 120]. 33 % der ungeborenen Kinder sterben im Mutterleib, 8 % der Kinder sterben als Neugeborene [119].

Eine weitere Risikogruppe stellen immungeschwächte Menschen und Patienten mit Leber-Vorerkrankungen dar, welche mit HEV-3 infiziert sind [121]. Dazu gehören Organtransplantationspatienten, an Krebs erkrankte Patienten, welche Chemotherapie erhalten, HIV-Patienten und Menschen, die an Rheuma leiden und deshalb mit Immunsuppressiva behandelt werden. Sie haben ein erhöhtes Risiko, an einer chronischen Hepatitis-E-Virus Infektion mit Leberzirrhose zu erkranken [122-124]. Eine chronische HEV-Infektion ist definiert als die Persistenz von HEV im Patienten für mindestens sechs Monate [125]. Bezogen auf den vorrangigen HEV-Genotypen, welchen man bei chronisch infizierten Patienten findet, sind nur wenige Ausnahmen bekannt. So litt z. B. ein chinesischer Junge mit akuter lymphatischer Leukämie an einer persistenten HEV-4 Infektion [126].

Im Zusammenhang mit einer HEV-Infektion sind auch extrahepatische Symptome beschrieben worden. So kann es zu neurologischen Manifestationen kommen. Guillain-Barré-Syndrom, akute Meningoenzephalitis, Myelitis, Vestibuläre Neuritis (Schwindel), periphere Neuropathie oder Idiopathische Fazialisparese sind beschrieben [127]. Beim blutbildenden System kann es zur Thrombozytopenie, aplastischen Anämie oder Hämolyse kommen. Andere Organe oder Körperregionen, die betroffen sein können, sind die Bauchspeicheldrüse (akute Pankreatitis), die Nieren (Nephritis), das Herz (Myokarditis), das Skelettsystem (Polyarthrit), die Schilddrüse (akute oder autoimmune Schilddrüsenentzündung) oder das Blutgefäßsystem (Henoch-Schönlein-Purpura) [127].

Zur Therapie einer HEV-Infektion stehen nur sehr wenige Medikamente zur Verfügung. Da eine akute HEV-Infektion meist selbstlimitierend ist, ist demzufolge auch meist keine spezielle Behandlung notwendig [116]. Dennoch kann eine medikamentöse Behandlung nötig sein, wenn eine akute HEV-Infektion in einen schweren Hepatitisverlauf mit akutem Leberversagen übergeht oder eine chronische HEV-Infektion behandelt werden muss. Hierbei wird häufig Ribavirin verwendet [128]. Vor allem bei Immunsupprimierten mit chronischen Verläufen kann aber auch eine Reduktion der Immunsuppressiva bereits helfen, das Virus zu beseitigen [129]. Durch die Gabe von Ribavirin wird HEV einem Selektionsdruck ausgesetzt, welches die Entstehung Ribavirin-resistenter Virusvarianten begünstigt. Bestimmte Aminosäure-Mutationen, wie G1634R oder Y1320H im ORF1, scheinen dabei eine wesentliche Rolle zu spielen [130, 131]. Die Behandlung von infizierten, schwangeren Frauen mit Ribavirin ist zudem aufgrund der vermuteten teratogenen Wirkung kontraindiziert [116]. Alternativ können Lebertransplantationspatienten mit pegyliertem Interferon Alpha (PEG- α INF-2a und -2b) behandelt werden [132, 133]. Kontraindiziert ist diese Monotherapie allerdings bei Nieren-, Pankreas-, Herz- und Lungentransplantationspatienten aufgrund übersteigerter Immunantwort und einem erhöhten Risiko, dass das transplantierte Organ abgestoßen wird [134]. Eine Kombination aus Ribavirin und PEG- α INF ist beschrieben für Nicht-

Transplantationspatienten mit chronischen HEV-Infektionen [116]. Sofosbuvir ist ein bereits bei der Behandlung von Hepatitis C eingesetztes Medikament [135]. In Studien konnte gezeigt werden, dass es eine antivirale Wirkung sowohl als Monotherapie als auch in der Kombination mit Ribavirin bei der Behandlung chronischer HEV-Infektionen besitzt [136]. Weitere, z. T. noch experimentelle Behandlungsmöglichkeiten sind 2'-C-Methylguanosin, Zink, Silvestrol oder NITD008 bzw. GPC-N114 [116].

Die Möglichkeit einer Impfung besteht zurzeit nur in China. Im Jahr 2013 wurde dort eine Vakzine zugelassen, welche auf Virus-ähnlichen Partikeln des pORF2 des HEV-1 basiert und nachgewiesen gegen HEV-1- und HEV-4 Infektionen Schutz bietet [137]. Dieser Impfstoff (HEV-293, Hecolin®) wurde daraufhin in weiteren Studien getestet [138]. Er wurde inzwischen in die WHO-Impfstoffaufliste aufgenommen, wodurch sie zukünftig, nach weiteren Bewertungen, auch in Ländern, in denen vorrangig HEV-3 vorkommt, zugelassen werden könnte [137].

1.8. Hepatitis-E-Virus in der Zellkultur, Reverse Genetische Systeme

Viele Details über die Biologie von HEV und zu dessen Bekämpfung sind bisher noch ungeklärt. Ein Grund dafür ist, dass es bislang nur vereinzelt robuste und universell anwendbare Zellkultursysteme gibt, mit denen sich das Virus detaillierter untersuchen lässt. Die ersten Versuche, Zellen mit HEV zu infizieren, gehen zurück auf das Jahr 1987. Stuhlproben von französischen und afrikanischen Patienten, welche an einer ENANB-Hepatitis litten, wurden zur Inokulation von Leberzelllinien und für die Infektion von Affen genutzt. Mittels ELISA und Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Leberzellen das Virus in den Überstand abgaben [139]. Ende der achtziger, Anfang der neunziger Jahre des 19. Jahrhunderts wurden weitere HEV-Stämme entdeckt und in den folgenden Jahren für Zellkulturversuche genutzt, darunter vor allem HEV-1 (z. B. Sar55, Pakistan) und HEV-2 (MEX-14, Mexiko) [140]. HEV kann viele Zellen mit unterschiedlichem Ursprung infizieren, wobei humane Leber- und Lungenzelllinien am häufigsten verwendet werden [140]. Am Anfang waren diese Zellkultursysteme ineffizient in Hinblick auf die Vermehrung der Viren und die erhaltenen Virustiter [141]. Mit der Entdeckung von Virusvarianten aus chronisch infizierten Patienten, welche spezielle Insertionen in ihrer HVR trugen, verbesserte sich diese Situation. Speziell der HEV-3a-Stamm Kernow-C1, der eine Insertion aus dem humanen ribosomalen Gen S17 trägt, replizierte deutlich besser als andere HEV-Isolate und wurde deshalb häufig für Studien eingesetzt [142]. Auch der später isolierte Stamm 47832c, welcher Duplikationen von viralen Genomabschnitten des eigenen ORF1 in der HVR trägt, replizierte effizient und wurde ebenfalls in vielen Studien verwendet [76]. Der Mechanismus, über den die Insertionen die effizientere Zellkulturreplikation begünstigen, ist bislang nicht bekannt. In den folgenden

Jahren konnten durch Variation der Zellkulturzusätze (z. B. MgCl₂, Amphotericin B, Verwendung von FBS mit geringem IgG-Konzentration) die Zellkultursysteme weiter optimiert werden [143, 144]. Allerdings benötigen auch die besten HEV-Zellkultursysteme immer noch 1-2 Wochen für eine effiziente Virusvermehrung.

Der Stamm HEV 47832 ist ein Beispiel für einen in Mitteleuropa typischen HEV-3c-Genotyp [25, 76]. Isoliert aus einem chronisch infizierten Patienten, wurde das Virus auf A549-Zellen passagiert und konnte gut auf dieser Zelllinie, noch besser auf dem Subklon A549/D3, replizieren [145]. Nach der Zellkulturpassagierung wurde das Virus neu in 47832c umbenannt. Das Virus trägt eine Insertion in der HVR. Diese Insertion ist 186 bp lang und besteht aus zwei Teilen, welche sich *downstream* im eigenen ORF1 wiederholen. Der erste Teil, 114 bp lang, wiederholt sich unmittelbar nach dem 3'-Ende der Insertion. Der zweite, 72 bp lange Teil, wiederholt sich im RdRP-Gen vom ORF1 (Abbildung 11) [76]. Das Virus wurde bereits in einigen Studien zur Untersuchung der Stabilität des Virus oder für Untersuchungen von antivirale Substanzen verwendet [146-148].

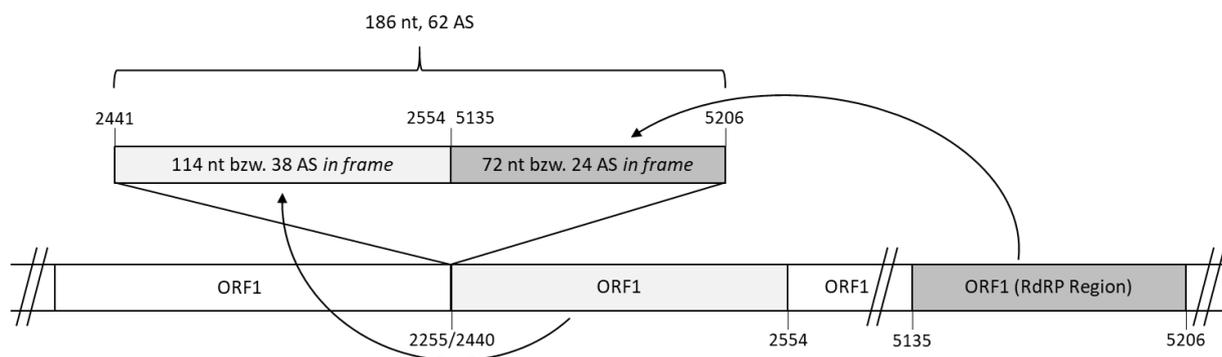


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Insertion in der HVR des Stamms 47832c (nach [76])

Die 186 nt lange Insertion besteht aus zwei Genom-eigenen Repetitionen aus dem ORF1. Die ersten 114 nt wiederholen sich unmittelbar hinter der Insertion, die restlichen 72 nt haben ihren Ursprung im RdRP-Gen [76].

Für die gezielte Veränderung des Virusgenoms werden Reverse Genetische Systeme (RGS) benötigt. Bei der Reversen Genetik wird das Gen zunächst gezielt verändert. Im Anschluss wird das veränderte Gen in den Organismus gebracht. Über die Expression bzw. die Veränderung der Expression des mutierten Gens und ggf. durch einen veränderten Phänotyp des Organismus kann dann auf die Funktion des Gens geschlussfolgert werden [141]. In der Virusforschung findet die Reverse Genetik bereits bei vielen Viren Anwendung (z. B. diverse Flaviviridae [149], Coronaviren [150]). Das RGS ist dabei ein gut geeignetes Werkzeug, um gezielt Veränderungen in Virusgenome einzufügen und darüber Funktionen von einzelnen viralen Proteinen besser verstehen zu können [141]. Für HEV sind ebenfalls einige RGS

beschrieben. Die Strategie, über die aus dem Volllänge-cDNA-Klon infektiöses Virus generiert wird, ist für alle HEV-Stämme sehr ähnlich. Zunächst wird die Plasmid-DNA mittels Restriktionsendonukleasen linearisiert und in *in-vitro* RNA umgeschrieben. Es folgt ein Capping des 5'-Endes und optional eine Polyadenylierung am 3'-Ende, wenn die Polyadenylierungssequenz nicht schon im Volllänge-cDNA-Klon enthalten ist. Die gecappte und polyadenylierte *in-vitro* RNA wird dann entweder in Zielzellen transfiziert (Elektroporation oder Lipofektion), oder mittels intrahepatischer Inokulation direkt in Tierversuchen eingesetzt. Die Zellen produzieren daraufhin die infektiösen Viren. [141].

Für HEV-1 wurde bereits im Jahr 2000 auf Basis des klonierten Volllänge-Genoms eines indischen Stamms *in-vitro* transkribierte RNA in HepG2 Zellen transfiziert. Analysen zeigten, dass die Zellen Viruspartikel produzierten und auch Rhesusaffen, welche mit dem Zellkulturüberstand infiziert wurden, HEV-Infektionszeichen aufwiesen [151]. Ein Jahr später wurde ein weiteres HEV-1-RGS publiziert, bei dem der Stamm Sar-55 verwendet wurde [152]. In den folgenden Jahren zeigte sich, dass dieser cDNA-Klon sehr effizient infektiöses Virus generierte, weshalb er der am häufigsten genutzte cDNA-Klon bei HEV-1 wurde [141]. Für HEV-2 ist bislang kein RGS bekannt, welches auf einem Volllänge-cDNA-Klon basiert. Das erste System, basierend auf gecappter und *in-vitro* transkribierter RNA eines HEV-3-Stamms (Ursprung: Schwein, USA, isoliert 1997), welche in Huh-7-Zellen transfiziert wurde, wurde im Jahr 2005 beschrieben [153]. Im Jahr 2009 wurde ein weiteres HEV-3-RGS beschrieben, welches auf dem japanischen HEV-3b-Stamm JE03-1760F basiert. Dieses System wies effizientere Eigenschaften in der PLC/PRF/5-Zellkultur auf und wurde deshalb in weiterführenden Studien häufiger verwendet [141]. Im Jahr 2012 konnte durch die Isolation des Kernow-C1-Stamms ein weiteres System etabliert werden, das auf einem Volllänge-cDNA-Klon der sechsten Passage (p6) basiert [75]. Auch dieses System wurde in vielen weiteren Studien verwendet [141]. Für HEV-4 wurde das erste RGS im Jahr 2012 beschrieben, basierend auf dem humanen Stamms TW6196E [154]. Ein RGS, basierend auf dem Schweine-HEV-Stamms SAAS-FX17 wurde im Jahr 2013 publiziert [155]. Für andere Genotypen und die HEV-Spezies *Orthohepeviren* B und C wurden inzwischen ebenfalls RGS beschrieben. Eine Übersicht über Stämme, die häufig zur Konstruktion von cDNA-Klone verwendet wurden, ist in Tabelle 2 zu finden, eine Übersicht über die bisher üblichen RGS-Strategien sind in der Abbildung 12 zu finden.

Tabelle 2: Übersicht über Stämme, die häufig für die Konstruktion von cDNA-Klone verwendet wurden.

Spezies	Genotyp (GT)	Stamm	Referenz
Orthohepevirus A	GT1	Hyderabad	[151]
		Sar-55	[152]
		HEV-H	[156]
	GT3	Meng	[153]
		JE03-1760F	[157]
		Kernow-C1	[75]
		HEV-83-2-27	[158]
		47832c	[159]
	GT4	TW6196E	[154]
		SAAS-FX17	[155]
		KM01	[160]
	GT5	JBOAR135-Shiz09	[32]
	GT7	180C	[31]
Orthohepevirus B	Hühner-HEV	Prototyp	[161]
		VA	[162]
		HH-F9	[163]
Orthohepevirus C	Ratten-HEV	R63/DEU/2009	[164]
		LA-B350	[165]
		ratELOMB-131L	[94]

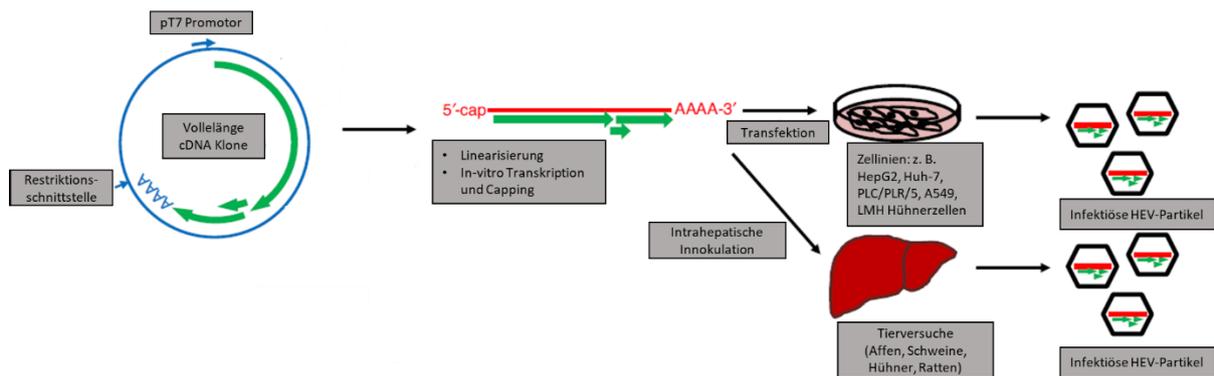


Abbildung 12: Übersicht über die RGS-Strategien (nach [141])

Das Schema beschreibt die Standardstrategie bei der Generierung von HEV-Partikeln. Der zirkuläre Volllänge-cDNA-Klon wird linearisiert und per *in-vitro* Transkription in RNA umgeschrieben, gecappt und ggf. polyadenyliert. Anschließend erfolgt die Transfektion in diverse Zelllinien oder die intrahepatische Inokulation im Tierversuch. Sowohl in der Zellkultur als auch in der Leber werden dann infektiöse Partikel gebildet [141].

Neben dem Volllänge-cDNA-RGS existieren noch zahlreiche Replikonsysteme. Meist wird hierbei das ORF2 durch Reportergene für GFP oder Luziferase ersetzt. Nach der Transfektion der gecappten und *in-vitro* transkribierten RNA wird das pORF1 gebildet und das Reportergene exprimiert, jedoch keine infektiösen Partikel generiert. Anwendung fanden dieses Replikonsysteme bereits in der Charakterisierung von pORF1 und bei Studien zu antiviralen Substanzen [141]. Ein kürzlich erschienenes Review gibt einen Überblick über die aktuellen Replikon- und Volllänge-cDNA-Klon-Systeme [141].

1.9. Zielsetzung

Die *in-vitro*-Forschung zum Verhalten von Hepatitis-E-Viren ist bisher stark eingeschränkt, da das Virus nur sehr ineffizient in Zellkultur repliziert. Nur ein paar HEV-Stämme konnten bislang isoliert werden, welche in Zellkultur replizieren können und auf deren Basis Reverse Genetische Systeme (RGS) existieren, sodass detailliertere Untersuchungen am Virus möglich sind (Tabelle 2). Von den Viren, die in der Tabelle 2 aufgezählt werden, sind der Stamm Sar55 aus Pakistan (HEV-1), der Stamm Kernow-C1 aus den USA (HEV-3a) und der japanische Stamm JE03-1760F (HEV-3b) die wohl am genauesten untersuchten Hepatitis-E-Viren inklusive gut funktionierender RGS. Diese Systeme ermöglichen es dabei, die Stämme genetisch zu verändern und dadurch ihr Verhalten, die Virusproteine oder Virus-Wirt-Interaktionen detaillierter studieren und charakterisieren zu können.

In Deutschland ist HEV-3c der prädominante Genotyp. Im Jahr 2012 konnte am BfR mit dem Stamm 47832c aus dem Serum eines chronisch infizierten Patienten ein HEV-3c-Stamm isoliert und erfolgreich auf A549-Zellen vermehrt werden. Nähere Untersuchungen zu diesem Stamm waren bislang jedoch nicht möglich, da für diesen Stamm kein RGS existierte, mit dem Studien auf Genombasis möglich gewesen wären. So war es z. B. bislang nicht möglich, die Funktion der 47832c-spezifischen Insertion in der HVR näher zu charakterisieren.

Folgende Teilziele sollten erreicht werden:

- 1) Zunächst sollte ein RGS für den HEV-3c-Stamm 47832c etabliert werden.
 - a. Dazu sollte zunächst ein funktionelles Volllänge-cDNA-Plasmid generiert werden, welches das gesamte Genom des Stamms 47832c in sich trägt.
 - b. Zur Überprüfung der Funktionalität des Plasmids sollte das HEV-Genom in Zellen transfiziert und die erfolgreiche Generierung von Viruspartikeln nachgewiesen werden.
 - c. Die Funktionalität des RGS sollte dann durch gezieltes Einfügen einer stillen Mutation und einer anschließenden Restriktionsanalyse erfolgen.
 - d. Die Eigenschaften des mittels RGS generierten Virus p47832mc sollten mit denen des Wildtyp-Virus 47832c verglichen werden

- 2) Das funktionelle RGS sollte dann verwendet werden, um spezifische Fragestellungen zur Vermehrung des Stamms 47832c zu beantworten.
 - a. Hier sollte als Erstes die Funktion der 47832c-spezifischen Insertion in der HVR untersucht werden. Die Insertion sollte dazu entfernt oder gegen spezifische andere Sequenzen ersetzt werden. Es sollte herausgefunden werden, welche Eigenschaft der Insertion maßgeblich verantwortlich ist für die Adaptation an die Zellkultur.
 - b. Als zweites sollte der replikationsfördernde Effekt einer G/R-Mutation, die aus dem HEV-3a-Stamm Kernow-C1 p6 bekannt ist, auf den Stamm 47832c angewendet werden. Die entsprechende Mutation sollte dafür an der respektiven Stelle im RdRP-Gen und aufgrund der Duplikation des RdRP-

Fragments in der Insertion auch an der entsprechenden Stelle in der HVR sowie in Kombination getestet werden.

- c. Zur zukünftigen Charakterisierung der Rolle des ORF3-Proteins des Stamms 47832c sollte eine ORF3-Deletionsmutante erstellt werden, indem das funktionelle Startcodon des ORF3 mutiert werden sollte.
- d. Die replikationsfähigen Virusmutanten sollten hinsichtlich ihres Wachstums mit dem ursprünglich durch RGS hergestellten Virus p47832mc verglichen werden.

Durch die Etablierung des RGS für den Stamm 47832c soll das erste RGS für einen in Europa und Deutschland typischen HEV-3c-Genotyp erstellt werden. Mit Hilfe dieses RGS und gezielter Mutagenese soll es in Zukunft möglich sein, das Virus besser verstehen zu können. Replikations- und Titer-erhöhende Mutationen könnten eingefügt werden, um das Zellkultur-System zu optimieren. Des Weiteren könnte die Funktion von HEV-Genominsertionen und ihre Bedeutung für chronische Infektionen weiter aufgeschlüsselt werden. Das RGS könnte zudem genutzt werden, um Resistenzen gegen antivirale Substanzen zu identifizieren, was letztendlich auch der Behandlung von Patienten zugutekommen würde.

2. Materialien

2.1. Geräte

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Name/Bezeichnung	Hersteller	
		Name	Ort
Bakterieninkubator	Trockeninkubator	WTB Binder	Tuttlingen, Deutschland
Einfrierhilfe	„Mr. Frosty“	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Elektrophoresekammer	Horizon® 58	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axio Observer Z1	Carl Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Geldokumentationsstation	Gene Flash	Syngene Bio Imaging	Cambridge, Großbritannien
Heizrührer	MH15 Rotilab® Magnetic Stirrer with Heater	CARL ROTH	Karlsruhe, Deutschland
Kühlzentrifuge für Eppendorf-Gefäße	5402	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge für Falcon-Röhrchen, Bakterienkulturen	Multifuge 1 S-R	Heraeus	Hanau, Deutschland
Kühlzentrifuge für Falcon-Röhrchen, Zellkulturen	Megafuge 40R	Heraeus	Hanau, Deutschland
Labor-pH-Meter	pH Meter 761 calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG	Berlin, Deutschland
Lichtmikroskop und Quecksilberlampe	Axiowert 25 HBO-50/AC	Carl Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Mechanische Zählhilfe	counter	Upgreen Corporation	Taichung, Taiwan
OD-Messgerät	Nanodrop 1000	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
PCR Thermozykler	2720 Thermal Zyklus	Applied Biosystems	Foster City, Kalifornien, USA
Plattenzentrifuge	5804	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
<i>Real-time</i> PCR Maschine	7500	Applied Biosystems	Foster City, Kalifornien, USA
RNA-Isolierroboter	Nuclisens® easyMAG®	bioMérieux	Nürtingen, Deutschland
Schüttelinkubator	MAX Q 4450	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA

Sequenziergerät NGS	NextSeq	Illumina	San Diego, Kalifornien, USA
PCR-Kabinett	Safe 2020	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Sicherheitswerkbank	HERAsafe	Heraeus Instruments	Hanau, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	DW-41 Mikrozentrifuge, Qualitron INC.	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Transmissions- elektronenmikroskop (TEM)	JEM-1400 Plus	Joel GmbH	Joel, Japan
Vortex-Gerät	VF2	Janke & Kunkel IKA® Labortechnik	Staufen, Deutschland
Wasserbad	Thermostatic Water Bath	Fried Electric	Haifa, Israel
Zellkulturinkubator	Stericult CO ₂ Inkubator, HEPA Class 106	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge	5415C	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

2.2. Verbrauchsmaterial

Tabelle 4: Verbrauchsmaterial

Material	Bezeichnung/Details	Hersteller	
		Name	Ort
Einwegpipetten, serologisch	5 ml, 10 ml, 25 ml	VWR International GmbH,	Darmstadt, Deutschland
Einweg-Skapell	PARAGON®	GIMA KB Medizintechnik GmbH	Biel-Benken, Schweiz
Eppendorfreaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Safelook Tubes	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Handschuhe	Semperguard® Latex oder Nitril, puderfrei	Semperit	Singapur, Singapur
Kryogefäße	1 ml	TENAK	Lohmar, Deutschland
Parafilm	Laboratory Film „M“	Pechiney Plastic Packaging	Düsseldorf, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml, 8er- Strips und 8er-Caps	MicroAMP® optical 8- Tube Strips und -Caps	Applied Biosystems	Foster City, Kalifornien, USA
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml, 96- Well-Platte	MicroAMP® optical 96 well reaction plates	Applied Biosystems	Foster City, Kalifornien, USA
Pipettenspitzen, gestopft, 1.250 µl	Filter Tip One®	Starlab	Hamburg, Deutschland

Pipettenspitzen, gestopft, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 300 µl	Ultrapoint graduated Filter Tip One®	Starlab	Hamburg, Deutschland
Reagenzreservoir	50 ml	VWR International GmbH,	Darmstadt, Deutschland
TEM-Gitterträger	Karbon-Formvar-beschichtet, 400 Mesh	Plano GmbH	Wetzlar, Deutschland
Zellkulturflaschen	25 m ² und 75 m ² , surface treated, vented cap	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Zellkulturplatten	6-Well, 24-Well und 96-Well	TPP	Trasadingen, Schweiz
Zell-Zählkammer	C-Chip DHC-N01	NanoEntek	Seoul, Südkorea
Zentrifugenröhrchen	Falcons 15 ml	VWR International GmbH,	Darmstadt, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Falcons 50 ml	TPP	Trasadingen, Schweiz

2.3. Chemikalien

Tabelle 5: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	
	Name	Ort
25 % Glutaraldehyd Lösung	TAAB Laboratory and Microscopy	Aldermaston, England
2-Propanol	CARL ROTH	Karlsruhe, Deutschland
Aceton	CARL ROTH	Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Serva	Heidelberg, Deutschland
Borsäure	CARL ROTH	Karlsruhe, Deutschland
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	Fluka™ Chemie AG BioChemika	Neu-Ulm, Deutschland
Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)	PanReac AppliChem ITW Reagents	Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	CARL ROTH	Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid (EtBr)-Lösung, 1 %, 10 mg/ml	CARL ROTH	Karlsruhe, Deutschland
Etylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaG	Darmstadt, Deutschland
Fugaten® Spray Flächendesinfektion	Lysoform® Dr. Hans Rosemann GmbH	Berlin, Deutschland
Glycerin	Merck KGaG	Darmstadt, Deutschland
Methanol	CARL ROTH	Karlsruhe, Deutschland
NaOH (Plätzchen)	Merck KGaG	Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat (3 M, pH 5,2)	PanReac AppliChem ITW Reagents	Darmstadt, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	Qiagen	Hilden, Deutschland
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	CARL ROTH	Karlsruhe, Deutschland
ROTI®Fair PBS 7.4 Tabletten	CARL ROTH	Karlsruhe, Deutschland

Tris Pufferano®	CARL ROTH	Karlsruhe, Deutschland
Uranylacetat	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA

2.4. Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
10 x TBE Stocklösung	54 g Tris Pufferano® 27,5 g Borsäure 2,9 g EDTA auf 500 ml mit Aqua _{dest}
1 x PBS Lösung	1x Tablette ROTI®Fair PBS 7.4 Auf 500 ml mit Aqua _{dest}
5 M NaOH Lösung	20 g NaOH Plätzchen auf 100 ml mit Aqua _{dest}
0,5 M EDTA-Lösung	9,31 g EDTA in 20 ml Aqua _{dest} aufnehmen mit 5 M NaOH Lösung auf pH 8,0 einstellen auf 50 ml mit Aqua _{dest}

2.5. Nährmedien, Zellkulturzusätze und Kulturmedien

Tabelle 7: Nährmedien und Zellkulturzusätze

Bezeichnung	Hersteller	
	Name	Ort
DMEM	PAN Biotech	Aidenbach, Deutschland
DPBS	PAN Biotech	Aidenbach, Deutschland
Fötales Kälberserum	PAN Biotech	Aidenbach, Deutschland
Geneticindisulfat 50 mg/ml (G418) Lösung	Biochrom	Berlin, Deutschland
Gentamicinsulfat 10 mg/ml	PAN Biotech	Aidenbach, Deutschland
Gibco OptiMEM®	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
LB Agar/Amp	InvivoGEN	San Diego, Kalifornien, USA
LB Medium/Amp	InvivoGEN	San Diego, Kalifornien, USA
L-Glutamin, 200 mM	PAN Biotech	Aidenbach, Deutschland
MEM	PAN Biotech	Aidenbach, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren, 100 x	PAN Biotech	Aidenbach, Deutschland
S.O.C. Medium	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Trypsin/EDTA 10x (0,5 %/ 0,2 %)	PAN Biotech	Aidenbach, Deutschland

Tabelle 8: Kulturmedien und Arbeitslösungen in der Zellkultur

Name	Zusammensetzung
DMEM-A	DMEM Basismedium zzgl. 10 % fötales Kälberserum (FKS), 1 % Gentamicinsulfat, 1 % L-Glutamin, 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)
DMEM-B	DMEM Basismedium zzgl. 2 % fötales Kälberserum (FKS), 1 % Gentamicinsulfat, 1 % L-Glutamin, 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)
MEM-A	MEM Basismedium zzgl. 10 % fötales Kälberserum (FKS), 1 % Gentamicinsulfat, 1 % L-Glutamin, 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)
MEM-B	MEM Basismedium zzgl. 5 % fötales Kälberserum (FKS), 1 % Gentamicinsulfat, 1 % L-Glutamin, 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)
Einfriermedium	FKS mit 10 % DMSO
Trypsin/EDTA-Lösung	10x Trypsin/EDTA (0,5 %/0,2 %)-Lösung im Verhältnis 1:1 mit DPBS verdünnt

2.6. Zelllinien

Tabelle 9: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Erklärung	Hersteller	Referenz
A549/D3	Subklon der humanen Lungenkarzinom-Zelllinie A549 mit höherer Empfänglichkeit für HEV-Infektionen	Hergestellt durch Prof. Dr. Reimar Johne, BfR Berlin	[145]
A549/N5	Mit HEV 47832c persistent infizierte humanen Lungenkarzinom-Zelllinie A549, Generierung von infektiöses HEV-Referenzmaterial	Hergestellt durch Prof. Dr. Reimar Johne, BfR Berlin	[76]
BSR-T7/5	Hamster-Nieren-Zelllinie, Expression von T7-Polymerase	Zur Verfügung gestellt durch Dr. Karsten Tischer, FU Berlin	[166]

2.7. Bakterienstämme

Tabelle 10: Verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Erklärung	Hersteller
<i>One-Shot™</i> TOP 10 <i>Escherichia Coli</i>	Chemisch kompetente Bakterien für Transformation	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts, USA

2.8. Plasmide und Klonierungsintermediate

Tabelle 11: Verwendete Plasmide und Klonierungsintermediate. Fett gedruckte Plasmide führten nach Transfektion zu replikationsfähigen und passagierbaren Viren.

Name	BfR-Plasmid-nummer	Größe [bp]	Erklärung	Resistenz	Hersteller/Herkunft
pBR322-HEV47832c-Swal	V284	9.284	HEV 47832c Vollelänge-cDNA-Klon, Ausgangsplasmid für Klonierungen	Amp	Zur Verfügung gestellt durch Dr. Christina Bächlein, Institut für Virologie, Abteilung für Infektionskrankheiten, Tiermedizinische Hochschule, Hannover, Deutschland
p47832fc1	V300	5.902	pUCIDT-Plasmid mit 2333 bp langem <i>HindIII/MreI</i> HEV-ORF1-Fragment	Amp	Integrated DNA Technologies (IDT), Newark, USA
p47832fc2	V301	4.863	pUCIDT-Plasmid mit 2106 bp langem <i>PciI/SwaI</i> HEV-ORF2/ORF3/3'-NTR-Fragment	Amp	IDT, Newark, USA
pT7-VP1SA11	V288	6.376	Rotavirus SA11 VP1 Expressionsplasmid	Amp	Addgene (Plasmid # 89162)
p47832xc1	-	7.674	pT7-VP1SA11 mit 1546 bp langem <i>NheI/HindIII</i> -Fragment von pBR322-HEV47832c-Swal	Amp	Kloniert durch Dr. Alexander Falkenhagen, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland
p47832xc2	-	6.166	p47832fc1 mit 1470 bp langem <i>MreI/PciI</i> -Fragment von pBR322-HEV47832c-Swal	Amp	Kloniert durch Dr. Alexander Falkenhagen, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland
p47832xc3	-	7.693	p47832xc1 mit 3803 bp langem <i>HindIII/PciI</i> -Fragment von p47832xc2	Amp	Kloniert durch Dr. Alexander Falkenhagen, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland
p47832mc	V306	10.193	p47832xc3 mit 2500 bp langem <i>PciI/PciI</i>-Fragment von p47832fc2	Amp	Kloniert durch Dr. Alexander Falkenhagen, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland, GenBank-Accession Number: MN756606
pCAG-D1R	V286	8.248	Expression der Cappingenzym-Untereinheit D1R vom <i>Vaccinia</i> -Virus	Amp	Addgene (Plasmid # 89160)
pCAG-D12L	V287	6.577	Expression der Cappingenzym-Untereinheit D12L vom <i>Vaccinia</i> -Virus	Amp	Addgene (Plasmid # 89161)
p47832/EcoRI	V347	10.193	p47832mc Mutante mit eingefügter <i>EcoRI</i>-Restriktionsschnittstelle nt 2270-G AATTC-2275	Amp	diese Arbeit, GenBank-Accession Number: MN756607

p47832/ Δ Ins 1+2	V348	10.007	p47832mc Mutante mit vollständige Deletion der 47832c-Insertions-sequenz	Amp	diese Arbeit, GenBank-Accession Number: MW573944
p47832/ Δ Ins1	V362	10.079	p47832mc Mutante mit Teildeletion der N-terminalen 114 bp der 47832c-Insertions-sequenz	Amp	diese Arbeit, GenBank-Accession Number: MW573945
p47832/ Δ Ins2	V362	10.121	p47832mc Mutante mit Teildeletion der C-terminalen 72 bp der 47832c-Insertionssequenz	Amp	diese Arbeit, GenBank-Accession Number: MW573946
p47832/GFP-186bp	V364	10.193	p47832mc Mutante mit substituierter 47832c-Insertionssequenz (GFP-Sequenz)	Amp	diese Arbeit, GenBank-Accession Number: MW573949
p47832/SynCod	V365	10.193	p47832mc Mutante mit substituierter 47832c-Insertionssequenz (Verwendung synonymer Codons)	Amp	diese Arbeit, GenBank-Accession Number: MW573955
p47832/S17-174bp	V366	10.178	p47832mc Mutante mit substituierter 47832c-Insertionssequenz (humane ribosomale S17 Untereinheit)	Amp	diese Arbeit, GenBank-Accession Number: MW573954
p47832/Frameshift	V367	10.193	p47832mc Mutante mit substituierter 47832c-Insertionssequenz (veränderte Aminosäuresequenz)	Amp	diese Arbeit, GenBank-Accession Number: MW573948
p47832/Ins-Change	V368	10.193	p47832mc Mutante mit substituierter 47832c-Insertionssequenz (veränderte Reihenfolge der Teilinsertionen)	Amp	diese Arbeit, GenBank-Accession Number: MW573953
p47832/GR-Ins	V343	10.193	p47832mc Mutante mit G2375A Nukleotidsubstitution (=Aminosäureaustausch G784R)	Amp	diese Arbeit, GenBank-Accession Number: MW573950
p47832/GR-RdRP	V344	10.193	p47832mc Mutante mit G5116A Nukleotidsubstitution (=Aminosäureaustausch G1706R)	Amp	diese Arbeit, GenBank-Accession Number: MW573952
p47832/GR-Ins+RdRP	V345	10.193	p47832mc Mutante mit G2375A und G5116A Nukleotidsubstitutionen (=Aminosäureaustausche G784R und G1706R)	Amp	diese Arbeit, GenBank-Accession Number: MW573951
p47832/ Δ ORF3	V346	10.193	p47832mc Mutante mit ORF3 Deletion (Substitution des Codons 5347-ATG-5349 zu 5347-GCA-5349)	Amp	diese Arbeit, GenBank-Accession Number: MW573947
pCR TM 4/HEV-ORF2/ORF3	V62	4.360	pCR TM 4 Klonierungsvektor mit HEV-Genomfragment nt 5310 bis 5555	Amp	[167]

2.9. Virus und Virusmutanten

Tabelle 12: Verwendete Viren und Virusmutanten

Bezeichnung	Ursprung	Referenz/Herkunft
HEV 47832c	HEV-3c, isoliert aus einem chronisch Infizierten Lebertransplantationspatienten aus Deutschland	[76]
HEV p47832mc	Replikationsfähiger molekularer cDNA-Klon des Wildtyp-Virus HEV 47832c	diese Arbeit
HEV p47832/ <i>EcoRI</i>	Replikationsfähige Mutante auf Basis des molekularen cDNA-Klons HEV p47832mc, eingefügter <i>EcoRI</i> -Restriktionsschnittstelle nt 2270-G AATTC-2275	diese Arbeit
HEV p47832/SynCod	Replikationsfähige Mutante auf Basis des molekularen cDNA-Klons HEV p47832mc, Verwendung synonymmer Codons für Insertionssequenz	diese Arbeit
HEV p47832/GR-Ins	Teilweise replikationsfähige Mutante auf Basis des molekularen cDNA-Klons HEV p47832mc, G/R-Mutation in der Insertion (HVR, HEV-ORF1)	diese Arbeit
HEV p47832/GR-RdRP	Replikationsfähige Mutante auf Basis des molekularen cDNA-Klons HEV p47832mc, G/R-Mutation im RdRP-Gen (HEV-ORF1)	diese Arbeit
HEV p47832/GR-Ins+RdRP	Teilweise replikationsfähige Mutante auf Basis des molekularen cDNA-Klons HEV p47832mc, G/R-Mutation in der Insertion (HVR, HEV-ORF1) und dem RdRP-Gen (HEV-ORF1)	diese Arbeit
HEV p47832/ Δ ORF3	Teilweise replikationsfähige Mutante auf Basis des molekularen cDNA-Klons HEV p47832mc, HEV-ORF3 Defizienz (Mutation des 3. Startcodons)	diese Arbeit

2.10. Enzyme

Tabelle 13: Enzyme

Bezeichnung	Hersteller	
	Name	Ort
Restriktionsenzyme <i>BglII</i> , <i>BsrGI</i> , <i>Clal</i> , <i>HpaI</i> , <i>KpnI</i> , <i>SwaI</i> und <i>XhoI</i>	New England Biolabs (NEB)	Schwalbach, Deutschland
Restriktionsenzyme <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> , <i>MreI</i> , <i>NheI</i> und <i>PciI</i>	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
DNase I	Roche	Basel, Schweiz
FastAP thermosensitive alkalische Phosphatase	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
RNase A	Qiagen	Hilden, Deutschland
T4 DNA Ligase	NEB	Schwalbach, Deutschland

2.11. Reagenzien und Kits

Tabelle 14: Reagenzien und Kits

Bezeichnung	Hersteller	
	Name	Ort
5x DNA-Ladepuffer, blau	Bioline GmbH/Meridian Bioscience	Luckenwalde, Deutschland
esayMAG Kit (Puffer und Silica)	bioMérieux	Nürtingen, Deutschland
HighScribe T7 ARCA mRNA Kit (with tailing)	NEB	Schwalbach, Deutschland
LongRange 2-Step PCR Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
Monarch Gel-Extraktionskit	NEB	Schwalbach, Deutschland
Monarch PCR- & DNA Cleanup Kit	NEB	Schwalbach, Deutschland
Nextera DNA Flex Kit	Illumina	San Diego, Kalifornien, USA
<i>One-step</i> RT-PCR Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
Plasmid Midi Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
Plasmid Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
QuantiTect Probe RT-PCR Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
Roti®-Mount Fluor Care DAPI Lösung	CARL ROTH,	Karlsruhe, Deutschland
TOPO™-TA Cloning™ Kit for Sequencing, with One-Shot™ TOP10 Chemically competent E. coli	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
TransIT® LT-1 Transfektionsreagenz	Mirus Bio	Madison, Wisconsin, USA
TransIT® mRNA Transfektionskit	Mirus Bio	Madison, Wisconsin, USA

2.12. Elektrophorese DNA-Standards

Tabelle 15: Elektrophorese DNA-Standards

Bezeichnung	Hersteller	
	Name	Ort
Quick-Load® 2-Log DNA Ladder (0.1 - 10.0 kb)	NEB	Schwalbach, Deutschland
Hyperladder™ 50 bp (50 bp - 2.000 bp)	Bioline GmbH/Meridian Bioscience	Luckenwalde, Deutschland
Hyperladder IV (100 bp - 1.000 bp)	Bioline GmbH/Meridian Bioscience	Luckenwalde, Deutschland

2.13. Antikörper

Tabelle 16: Antikörper

Bezeichnung	Erklärung	Herkunftstierart	Target	Hersteller/Herkunft
0791/8282	antiHEV-ORF2 Hyperimmunserum	Kaninchen	HEV-3- Kapsidprotein	AG Rainer Ulrich, Friedrich-Löffler Institut, Greifswald/Insel Riems, Deutschland
antiRabbit IgG (whole molecule) FITC- antibody produced in goat	Sekundärantikörper gegen Kaninchen- Primärantikörper, konjugiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Ziege	Kaninchen- IgG	SIGMA-Aldrich/ Merck, Darmstadt, Deutschland

2.14. Primer und Sonden

Alle Primer wurden von der Firma IDT synthetisiert und mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 100 µM (Konzentration der Stammlösung) eingestellt. Die Sonde wurde von TibMolBiol (Berlin, Deutschland) hergestellt und ebenfalls auf 100 µM (Konzentration der Stammlösung) eingestellt.

Tabelle 17: Verwendete Primer und Sonden

Primer	Sequenz (5' → 3')	Zweck
Sense A, B, C	ACTTTTGATGATTTCTGCCCG	Forwardprimer für Validierung des HEV 3'-Genomendes in Kombination mit Antisense A, B oder C
Antisense A	GGAGCGCGAAACGCAGA	Reverseprimer, Validierung HEV- Genom <i>upstream</i> vom 3' Ende
Antisense B	CCGAATCCCGGGATCC	Reverseprimer, Validierung der Poly- A-Sequenz
Antisense C	ATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGC	Reverseprimer, Amplifikation von Plasmidresten <i>downstream</i> der Poly- A-Sequenz
p1A	CCGAATCCCGGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTT	Reverse Transkription über Poly-A- Sequenz
2603-F	TGTACACCCGGACATGGTCA	Forwardprimer, Amplifikation des HEV-Genoms um die eingefügte <i>EcoRI</i> -Restriktionsschnittstelle
3099-R	CCCTACATACACCTTTGCCCC	Reverseprimer, Amplifikation des HEV-Genoms um die eingefügte <i>EcoRI</i> -Restriktionsschnittstelle
2004-F	AGCTTATGAAGGCTCTGAGGTTGA	PCR-Amplikon für nachfolgende Sequenzierung des Bereichs um 47832c spezifische Insertion, Detektion von Mutanten

3215-R	GTTGGGTGGAAAGACTCGGG	PCR-Amplikon für nachfolgende Sequenzierung des Bereichs um 47832c spezifische Insertion, Detektion von Mutanten
5144-F	TCGAGTGTGTAGTCATGGAGGAA	PCR-Amplikon für nachfolgende Sequenzierung eines Bereichs in HEV ORF1/ORF2/ORF3, Detektion von Mutanten
6049-R	CCCGGATTGCGGTACGACATC	PCR-Amplikon für nachfolgende Sequenzierung eines Bereichs in HEV ORF1/ORF2/ORF3, Detektion von Mutanten
5383-F	GTCCTCTGTAGCGACTACC	PCR-Amplikon für nachfolgende Sequenzierung eines Bereichs in HEV ORF1, Detektion von G/R-Mutanten
5711-R	AACATGCCAATAAGGTTATGTACC	PCR-Amplikon für nachfolgende Sequenzierung eines Bereichs in HEV ORF1, Detektion von G/R-Mutanten
JHEV-F	G*GTGGTTTCTGGGGTGAC	Erstellung von Replikationskinetiken
JHEV-R	AGGGGTTGGTTGGATGAA	Erstellung von Replikationskinetiken
JHEV-Sonde	6-FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-TAMRA	Erstellung von Replikationskinetiken
Standard-F	AGCGTCTAGAATGAATAACATGTYTGTGC	Erstellung eines RNA-Standards für die HEV-spezifische RT-qPCR [167]
Standard-R	GACATCTAGATCAACGGCGCAGCCCCAGCT	Erstellung eines RNA-Standards für die HEV-spezifische RT-qPCR [167]

* Die Base Guanosin ist im HEV 47832c Genom ein Adenosin.

2.15. Dienstleister für Sequenzierung und DNA-Synthese-Firmen

Tabelle 18: Sequenzierereinrichtungen

Aufgabe	Unternehmen	Ort
Sequenzierung von DNA Fragmenten	Eurofins Genomics Germany GmbH	Ebersberg, Deutschland
Plasmid-Volllänge Sequenzierung	Abteilung 4 SZ (Studienzentrum für Genomsequenzierung und -analyse), Bundesinstituts für Risikobewertung	Berlin, Deutschland
DNA-Synthese als DNA-Fragment oder im Plasmid-Vektor	Integrated DNA Technologies (IDT)	Newark, USA
DNA-Synthese als DNA-Fragment oder im Plasmid-Vektor	GenScript Biotech (Netherlands) B.V.	Leiden, Niederlande

2.16. Software

Tabelle 19: Software

Bezeichnung	Quelle
ITEM	Olympus Soft Imaging Solutions
Lasergene 17	DNASTar Lasergene Software
PubMed	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/
Genbank	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
Klonierungshilfe	NEBCloner (NEB) Double Digest Calculator (Thermo Fisher Scientific)
BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Primervalidierung	Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific)
<i>Real-Time</i> PCR Software	7500 Fast Software, Version 2.3 (Applied Biosystems)
RNA-Kopien Kalkulator	http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr
Shovill V. 1.0.4 mit Algorithmus Spades V. 3.12.1	https://bio.tools/shovill
Statistische Analysen	Excel 2019 (Microsoft)
NES-Vorhersage	http://ehubio.ehu.eus/wregex/search.xhtml
NLS-Vorhersage	http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/index.html
Vorhersage Ubiquitinierungsstellen	http://bdmpub.biocuckoo.org/prediction.php
Vorhersage Acetylierungsstellen	http://bdmpub.biocuckoo.org/prediction.php
Vorhersage Glykosylierungsstellen	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/
Phosphorylierung an Serin, Threonin, Tyrosin	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/
Sequenzzusammensetzung	https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepstats/
Vorhersage Proteaseschnittstelle	https://web.expasy.org/peptide_cutter/

3. Methoden:

3.1. Chemische Transformation von kompetenten Bakterien

Für die Transformation mit Plasmiden wurden ONE-SHOT™ TOP10 *Escherichia coli* verwendet. Vorgegangen wurde nach Herstellerangaben mit folgenden Ausnahmen: Die erste Inkubation nach Zugabe des Plasmids zur Bakterienlösung erfolgte für zwei Stunden auf Eis, der Hitzeschock dauerte 20 Sekunden. 200 µl der transformierten Bakterien wurden auf Ampicillin-haltigen Agarplatten (100 µg/ml) mit Hilfe eines Drigalskispatels ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es wurden Einzelkolonien abgenommen, in Ampicillin-haltiges LB-Medium (100 µg/ml) überführt und schüttelnd (220 rpm) über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2. Erstellung von Bakterienstocks

Von den Bakterienkulturen wurden 830 µl entnommen mit 170 µl Glycerin gemischt. Die Lagerung erfolgte bei - 80 °C.

3.3. Plasmidaufreinigung aus Bakterienkulturen

5 µl einer Bakterienkultur wurden abgenommen und in 50 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium (100 µg/ml) gegeben. Die Inkubation erfolgte schüttelnd (220 rpm) bei 37 °C über Nacht.

Für die Plasmidisolierung aus den Bakterienkulturen wurde das Plasmid Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Folgende Abweichungen vom Standardprotokoll gab es: Die Zentrifugation nach Präzipitation erfolgte für zwei Stunden und das an der Luft getrocknete DNA-Pellet wurde in 200 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Die Konzentration wurde mit einem Nanodrop 1000 gemessen.

3.4. Restriktionsverdau der Plasmide

Plasmide wurden zur Verifizierung und für Klonierungen mittels Restriktionsenzymen geschnitten. Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in der Tabelle 13 dargestellt. Je nach geplanter Weiterverwendung der geschnittenen DNA wurden 1-5 µg DNA pro Reaktion eingesetzt. Die Menge an eingesetztem Enzym variierte bezogen auf die eingesetzte DNA-Menge zwischen 10 U und 25 U. Das Reaktionsvolumen betrug entweder 20 µl oder 50 µl. Die Inkubation variierte ebenfalls abhängig von der DNA-Menge zwischen einer Stunde und 16 Stunden. Die Inkubation erfolgte immer bei 37 °C. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Reaktionsansatz für einen Restriktionsverdau im 20 µl- bzw. 50 µl-Ansatz

Komponente	20 µl-Ansatz	50 µl-Ansatz
Nuklease-freies Wasser	Auf 20 µl	Auf 50 µl
10x Puffer (abhängig vom Enzym)	2 µl	5 µl
Enzym (10 U/ml)	1 – 2,5 µl	1 – 2,5 µl
DNA (1 – 5 µg)	x µl	x µl
Σ Reaktionsansatz	20 µl	50 µl

3.5. Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse von DNA

Die Gelelektrophorese trennt DNA-Fragmente nach ihrer Länge auf. Für das Gel wurde Agarosepulver mit 1 x konzentriertem Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer gemischt und solange erhitzt, bis sich das Pulver vollständig aufgelöst hatte. Die Konzentration der Agarose im Gel war abhängig von der Größe der erwarteten DNA-Banden und ist zusammenfassend in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Konzentration der Agarose im Gel bei zu erwartenden DNA-Bandengrößen

Agarosekonzentration im Gel	Erwartete DNA-Banden
0,5 %	≥ 4.000 bp, lineare oder zirkuläre Plasmide
0,8 %	2.000 – 4000 bp
1,0 %	500 – 2.000 bp
2 %	≤ 500 bp

Der Lösung wurde der DNA-Farbstoff 1 %-Ethidiumbromid (EtBr, 10 mg/ml) in einem Verhältnis von 1:10.000 zugesetzt. Nach der Polymerisation der Agarose wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 5 x DNA-Ladepuffer versetzt (Endkonzentration: 1 x) und in die Geltaschen geladen. Abhängig von der Größe der DNA-Fragmente wurden als Größenstandard 1 kb-, 2 kb- oder 10 kb-DNA-Marker eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für eine Stunde. Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel in einer Geldokumentationsstation unter UV-Licht ausgewertet.

3.6. DNA-Fragmentaufreinigung aus Agarosegelen

Die entsprechende DNA-Bande wurde unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und gewogen. Für die Aufreinigung wurde das Monarch Gel Extraktionskit nach Herstellerangaben verwendet. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte mit 20 µl Nuklease-freiem Wasser. Die Konzentration wurde mit einem Nanodrop 1000 gemessen.

3.7. TOPO®-TA Klonierung von synthetisierten gBlocks™ in Plasmid-Vektoren

Die synthetisierten, lyophilisierten Genfragmente von Integrated DNA Technologies (IDT) wurden zunächst in 10 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. 100 ng der Genfragmente wurden dann ohne vorherige Phosphorylierung mit Hilfe des TOPO® TA-Cloning® nach Herstellervorgaben in den im Kit enthaltenen pCR™4-Vektor kloniert. Die erhaltenen bakteriellen Klone wurden mittels Restriktionsverdau charakterisiert.

3.8. Plasmid-Vektor Dephosphorylierung

Die nach Restriktionsverdau linearisierten Vektor-DNA-Fragmente wurden vor der Ligation mit 1 U FastAP thermosensitiver alkalischer Phosphatase und 1 x FastAP Reaktionspuffer für 30 min bei 37 °C dephosphoryliert. Die Inaktivierung erfolgte für 20 min bei 65 °C. Abschließend wurden die Fragmente mit Hilfe des Monarch PCR- & DNA Cleanup Kits (NEB) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.9. Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmid-Vektoren

Für die Ligation wurde T4-DNA-Ligase nach Herstellerangaben verwendet. Die dephosphorylierte Vektor-DNA und das Insert DNA-Fragment wurden im Volumenverhältnis von 1:3 in der Reaktion eingesetzt. Die Ligation erfolgte im 10 µl-Ansatz über Nacht bei 4 °C. 5 µl des Reaktionsansatzes wurden danach direkt für die Transformation chemisch kompetenter Zellen verwendet.

3.10. Sequenzierung von DNA mittels Kettenabbruchmethode

Zu Verifizierung der Korrektheit von Plasmid-Fragmenten oder zur Überprüfung von eingebauten Mutationen wurde die DNA mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert.

Jeweils 1 µl der gereinigten Plasmide oder bis zu 5 µl aufgereinigtes PCR-Produkt wurden mit 50 pmol Primer gemischt und zur Sequenzierung zu Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg, Deutschland) gesendet. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Software-Pakets DNA Star Lasergene 15 analysiert.

3.11. Illumina Next-Generation Sequenzierung

Zur Sequenzierung von ganzen Plasmiden wurde die Illumina-Sequenzierung verwendet. Für die Sequenzierung wurde das Studienzentrum für Genomsequenzierung und -analyse des BfR beauftragt. Unter Verwendung des Nextera DNA Flex Kits (Illumina) wurde dort eine Plasmid-

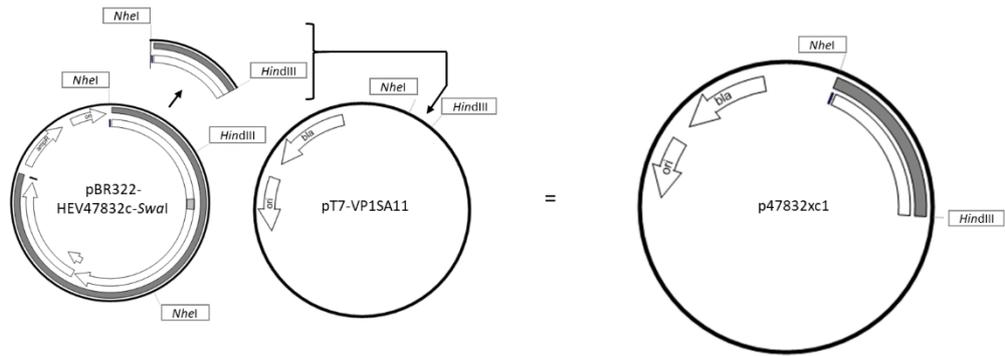
Bibliothek erstellt. Nach Beendigung des Laufs im NextSeq Sequenziergerät (Illumina) wurden durch das Studienzentrum die Reads mittels shovill v. 1.0.4 unter Verwendung des Algorithmus Spades v. 3.12.1 assembliert. Die erhaltenen Plasmid-Sequenzen wurden mit Hilfe des Software-Pakets DNA Star Lasergene 15 analysiert.

3.12. Klonierung des funktionellen HEV-Volllänge-cDNA-Plasmids p47832mc

Das durch Frau Dr. Ch. Bächlein (TiHo Hannover) bereitgestellte Volllänge-cDNA-Plasmid des Stamms 47832c zeigte verschiedene Punktmutationen, die eine Bildung infektiöser Viren verhinderte. Zur Generierung eines funktionellen HEV-Volllänge-cDNA-Plasmids p47832mc wurde das HEV-Genom zunächst aus diesem Plasmid (pBR322-HEV47832c-Swal) mittels vier aufeinanderfolgender Klonierungen in das Plasmid pT7-VP1SA11 überführt. Diese Klonierungsarbeiten wurden durch Dr. Alexander Falkenhagen (Fachgruppe 46, BfR) durchgeführt.

Es wurden zwei Plasmide p47832fc1 und p47832fc2 synthetisiert, welche korrigierte HEV Nukleotidsequenz-Fragmente beinhalten. Im ersten Schritt wurde das 1546 bp lange *NheI*-bis-*HindIII*-Fragment aus pBR322-HEV47832c-Swal ins pT7-VP1SA11 inseriert. Es entstand das Plasmid p47832xc1 (1. Klonierung in Abbildung 13). Im zweiten Schritt wurde pBR322-HEV47832c-Swal mit *MreI* und *PciI* erneut verdaut. Das resultierende 1470 bp lange Fragment wurde in das Plasmid p47832xc1 eingefügt. Es entstand das Plasmid p47832xc2 (2. Klonierung in Abbildung 13). Im dritten Schritt wurde das 3803 bp lange *HindIII*-bis-*PciI*-Fragment von p47832xc2 in das Plasmid p47832xc1 ligiert. Es entstand das Plasmid p47832xc3 (3. Klonierung in Abbildung 13). Zum Schluss wurde das 2500 bp lange *PciI*-bis-*PciI*-Fragment von p47832fc2 genutzt und in p47832xc3 inseriert, wodurch der funktionelle HEV-Volllänge-cDNA-Klon p47832mc entstand (4. Klonierung in Abbildung 13).

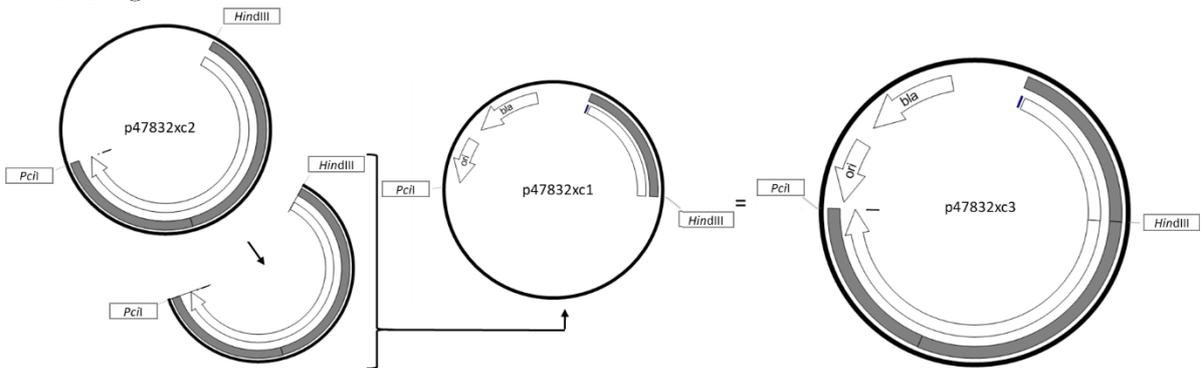
1. Klonierung



2. Klonierung



3. Klonierung



4. Klonierung

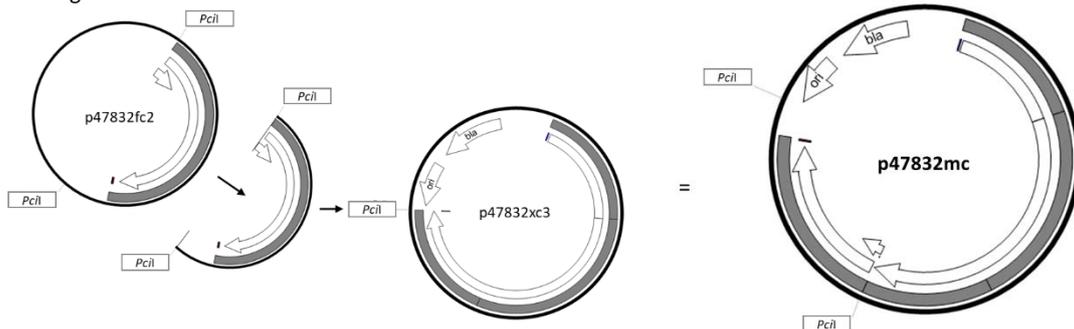


Abbildung 13: Klonierungsstrategie zur Generierung eines funktionellen HEV-Volllänge-cDNA-Plasmids p47832mc

Als Ausgangsplasmid diente das Volllänge-cDNA-Plasmid pBR322-HEV47832c-Swal. Durch vier einzelne Klonierungsschritte wurde das HEV-47832c-Genom in das Vektorplasmid pT7-VP1SA11 überführt. Das funktionelle HEV-Volllänge-cDNA-Plasmid wurde als p47832mc benannt.

3.13. Klonierung der p47832mc-Mutanten

Die Klonierungsstrategien für die Herstellung der Mutanten werden anhand des Einbaus einer *EcoRI*-Schnittstelle in die HVR erläutert. Für die Klonierung wurde ein DNA-Fragment synthetisiert, bestehend aus den Nukleotiden 2118 - 2388 des HEV-47832c-Genoms. Das DNA-Fragment trägt weiterhin einen Nukleotidaustausch, der zur Implementierung einer *EcoRI*-Schnittstelle führt (5'-2270-G|AATTC-2275-3', unterstrichene Base zeigt den Nukleotidaustausch T2275C).

Die Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde der 255 bp lange gBlock mittels *BsrGI* und *HpaI* aus dem pCR™4-Vektor geschnitten und gegen das entsprechende Fragment im p47832fc1 ersetzt. Es entstand p47832fc1/*EcoRI* (Tabelle 22). Im zweiten Schritt wurde p47832fc1/*EcoRI* mit *HindIII* und *MreI* geschnitten. Das resultierende, 2333 bp lange Fragment wurde an der korrespondierenden Stelle im HEV-Volllänge-cDNA-Plasmids p47832mc eingesetzt, wodurch das Plasmid p47832/*EcoRI* entstand (Tabelle 22). Alle weiteren Klonierungsstrategien, welche zur Herstellung von Deletions- und Insertionsmutanten, für die Einfügung von Punktmutationen oder zur Generierung einer ORF3-Deletionsmutante genutzt wurden, sind in den Tabellen 21-24 zusammengefasst.

Tabelle 22: Klonierungsstrategien zur p47832mc *EcoRI*-Mutante

Die angegebenen Nukleotidpositionen (nt) beziehen sich auf HEV 47832c, GenBank Acc.-No.: KC618403.1

Name	Beschreibung	Ausgangskonstrukt	1. Klonierung		2. Klonierung	
			Insert	Vektor	Insert	Vektor
p47832/ <i>EcoRI</i>	Einfügung einer <i>EcoRI</i> -Restriktionsschnittstelle nt 2270-G AATTC-2275 in die HVR	pCR4-TOPO-Plasmid mit synthetisiertem HEV-Genomfragment nt 2118 - 2388 und nt-Substitution T2275C	255 bp <i>BsrGI/HpaI</i> Fragment des Ausgangskonstrukts	4837 bp <i>BsrGI/HpaI</i> Fragment vom pUCIDT-Plasmid p47832fc1	2333 bp <i>HindIII/MreI</i> Fragment vom Produkt der 1. Klonierung	7860 bp <i>HindIII/MreI</i> -Fragment aus p47832mc

Tabelle 23: Klonierungsstrategien zur p47832mc Δ ORF3-Mutante

Die angegebenen Nukleotidpositionen (nt) beziehen sich auf HEV 47832c, GenBank Acc.-No.: KC618403.1

Name	Beschreibung	Ausgangskonstrukt	1. Klonierung		2. Klonierung	
			Insert	Vektor	Insert	Vektor
p47832/ Δ ORF3	HEV ORF3 Deletionsmutante (Substitution des Codons 5347-ATG-5349 zu 5347-GCA-5349)	pCR4-TOPO Plasmid mit synthetisiertem DNA-Fragment nt 414 - 633 des Plasmids p47832fc2 und Codon-Substitution ATG -> GCA von nt 503 – 505 (entspricht nt 5347 – 5349 im Genom 47832c)	198 bp <i>Clal/KpnI</i> Fragment des Ausgangskonstrukts	4665 bp <i>Clal/KpnI</i> Fragment des Plasmids p47832fc2	2500 bp langes <i>PciI/PciI</i> Fragment vom Produkt der 1. Klonierung	7693 bp <i>HindIII/MreI</i> Fragment aus p47832mc

Tabelle 24: Klonierungsstrategien zu den p47832mc Deletions- und Teildeletionsmutanten

Die angegebenen Nukleotidpositionen (nt) beziehen sich auf HEV 47832c, GenBank Acc.-No.: KC618403.1

Name	Beschreibung	Ausgangskonstrukt	1. Klonierung		2. Klonierung	
			Insert	Vektor	Insert	Vektor
p47832/ Δ Ins 1+2	vollständige Deletion der 47832c-spezifischen Insertionssequenz	pCR4-TOPO-Plasmid mit synthetisiertem HEV-Genomfragment nt 2118 - 2887 und Deletion der nt 2255 bis 2440	570 bp <i>BsrGI/KpnI</i> Fragment des Ausgangskonstrukts	4336 bp <i>BsrGI/KpnI</i> Fragment vom Plasmid p47832fc1	2147 bp <i>HindIII/MreI</i> Fragment vom Produkt der 1. Klonierung	7860 bp <i>HindIII/MreI</i> Fragment aus p47832mc
p47832/ Δ Ins1	Teildeletion der 5'-terminalen 114 bp der 47832c-spezifischen Insertionssequenz	pCR4-TOPO Plasmid mit synthetisiertem HEV-Genomfragment nt 2118 - 2887 und Deletion der nt 2255 bis 2368	642 bp <i>BsrGI/KpnI</i> Fragment des Ausgangskonstrukts	4336 bp <i>BsrGI/KpnI</i> Fragment vom Plasmid p47832fc1	2219 bp <i>HindIII/MreI</i> Fragment vom Produkt der 1. Klonierung	7860 bp <i>HindIII/MreI</i> Fragment aus p47832mc
p47832/ Δ Ins2	Teildeletion der 3'-terminalen 72 bp der 47832c-spezifischen Insertionssequenz	Plasmid pUC57 mit HEV-Genomfragment nt 2118 - 2887 und Deletion der nt 2369 bis 2440	684 bp <i>BsrGI/KpnI</i> Fragment des Ausgangskonstrukts	4336 bp <i>BsrGI/KpnI</i> Fragment vom Plasmid p47832fc1	2261 bp <i>HindIII/MreI</i> Fragment vom Produkt der 1. Klonierung	7860 bp <i>HindIII/MreI</i> Fragment aus p47832mc

Tabelle 25: Klonierungsstrategien zu den p47832mc Insertion-Substitutionsmutanten

Die angegebenen Nukleotidpositionen (nt) beziehen sich auf HEV 47832c, GenBank Acc.-No.: KC618403.1

Name	Beschreibung	Ausgangskonstrukt	Klonierung	
			Insert	Vektor
p47832/GFP-186bp	Substitution der 47832c-spezifischen Insertion durch eine gleich lange partielle Sequenz aus einem GFP-Gen	pCR4-TOPO Plasmid mit synthetisiertem HEV-Genomfragment nt 2120 - 3867 und partieller 186 bp langer GFP-Sequenz anstelle der 47832c-spezifischen Insertion	1733 bp <i>BsrGI/Mrel</i> Fragment des Ausgangskonstrukts	8460 bp <i>BsrGI/Mrel</i> Fragment aus p47832mc
p47832/SynCod	Substitution der 47832c-spezifischen Insertion durch eine Sequenz mit synonymen Codons	pCR4-TOPO Plasmid mit synthetisiertem HEV-Genomfragment nt 2120 - 3867 und eine Insertionssequenz mit synonymen Codons	1733 bp <i>BsrGI/Mrel</i> Fragment des Ausgangskonstrukts	8460 bp <i>BsrGI/Mrel</i> Fragment aus p47832mc
p47832/S17-174bp	Substitution der 47832c-spezifischen Insertion durch die 174 bp lange S17 ribosomal Insertionssequenz des Stamms Kernow-C1 p6 [142]	pCR4-TOPO Plasmid mit synthetisiertem HEV-Genomfragment nt 2120 - 3867 und einer humanen 174 bp lange S17 ribosomale Insertionssequenz	1718 bp langes <i>BsrGI/Mrel</i> Fragment des Ausgangskonstrukts	8460 bp <i>BsrGI/Mrel</i> Fragment aus p47832mc
p47832/Frameshift	Substitution der 47832c-spezifischen Insertion durch eine gleich lange Sequenz, wo das 5'-terminale C an den 3'-Terminus der Insertion verrückt wurde	Plasmid pUC57 mit HEV-Genomfragment nt 2120 - 3867 und einer durch Frameshift eines Cytidins veränderten 47832c-spezifischen Insertion	1733 bp <i>BsrGI/Mrel</i> Fragment des Ausgangskonstrukts	8460 bp <i>BsrGI/Mrel</i> Fragment aus p47832mc
p47832/Ins-Vertausch	Substitution der 47832c-spezifischen Insertion durch eine gleich lange Sequenz, wo die 5'-terminale 114 bp lange und die 3'-terminale 72 bp lange Teilinsertion miteinander vertauscht wurden	Plasmid pUC57 mit HEV-Genomfragment nt 2120 - 3867 und der 47832c-spezifischen Insertion, wobei die beiden Teilinsertionen miteinander vertauscht wurden	1733 bp <i>BsrGI/Mrel</i> Fragment des Ausgangskonstrukts	8460 bp <i>BsrGI/Mrel</i> Fragment aus p47832mc

Tabelle 26: Klonierungsstrategien zu den p47832mc GR-Mutanten

Die angegebenen Nukleotidpositionen (nt) beziehen sich auf HEV 47832c, GenBank Acc.-No.: KC618403.1

Name	Beschreibung	Ausgangskonstrukt	1. Klonierung		2. Klonierung	
			Insert	Vektor	Insert	Vektor
p47832/GR-Ins	Einfügen des Nukleotidaustauschs G2375A (führt zu Aminosäureaustausch G784R in der Insertion der HVR)	pCR4-TOPO Plasmid mit synthetisiertem HEV-Genomfragment nt 2118 - 2388 und nt-Substitution G2375A	255 bp <i>BsrGI/HpaI</i> Fragment des Ausgangskonstrukts	4837 bp <i>BsrGI/HpaI</i> Fragment vom pUCIDT-Plasmid p47832fc1 mit HEV-Genomfragment nt 1525 - 3857	2333 bp <i>HindIII/MreI</i> Fragment vom Produkt der 1. Klonierung	7860 bp <i>HindIII/MreI</i> Fragment aus p47832mc
p47832/GR-RdRP	Einfügen des Nukleotidaustauschs G5116A (führt zu Aminosäureaustausch G1706R im RdRP-Gen)	pCR4-TOPO Plasmid mit synthetisiertem HEV-Genomfragment nt 4660 - 6659 und nt-Substitution G5141A	1986 bp <i>XhoI/BglII</i> Fragment des Ausgangskonstrukts	8207 bp <i>HindIII/MreI</i> Fragment aus p47832mc	entfällt	
p47832/GR-Ins+RdRP	Einfügen des Nukleotidaustauschs G2375A und G5116A (führt zu Aminosäureaustausch G784R und G1706R in der Insertion und in der RdRP)	p47832/GR-Ins	2333 bp <i>HindIII/MreI</i> Fragment des Ausgangskonstrukts	7860 bp <i>HindIII/MreI</i> Fragment aus p47832/GR-RdRP	entfällt	

3.14. Umsetzen von Zellen

Zellkulturen wurden in T25-Zellkulturflaschen inkubiert. Bei vollständiger Konfluenz wurden die Zellen umgesetzt. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit 5 ml steriler Dulbecco's phosphathaltiger Pufferlösung (DPBS) gewaschen. 1 ml Trypsin/EDTA Lösung wurde auf die Zellen gegeben, geschwenkt und wieder abgenommen. Die Zellen wurden bei 37 °C so lange inkubiert, bis sich der Zellrasen von selbst vom Flaschenboden löste. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Vollmedium (je nach Zellart DMEM-A oder MEM-A, siehe Tabelle 27) und je nach Zelltyp unterschiedlich dicht (siehe Tabelle 27) in frische T25-Zellkulturflaschen ausgesät.

BSR-T7/5-Zellen besitzen ein T7-Polymerase-Gen, welches gekoppelt ist an eine Antibiotikaresistenz. Zur Selektion dieser Zellen wurde dem Medium nach dem Umsetzen 20 µl/ml des Antibiotikums G418 (= Geneticindisulfat, 50 mg/ml) zugesetzt, sodass eine finale Konzentration von 1 mg/ml erreicht wurde.

Tabelle 27: Parameter zum Umsetzen der Zelllinien

Zelltyp	Vollmedium	Verdünnung	Umsetzen/Woche
A549/D3	MEM-A	1:10	1 x
BSR-T7/5	DMEM-A	1:4 - 1:8	3 x

3.15. *In-vitro*-RNA-Transkription und -Transfektion

5 µg des Plasmids pBR322-HEV47832c-Swal wurde mit 10 U des Restriktionsenzym *Swa*I, wie im Methodenkapitel 3.4 (Seite 35) beschrieben, in einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl über Nacht bei 25 °C linearisiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit Nukleasefreiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt und 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1) gemischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Gemisch für 10 min bei 4 °C mit 14.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1) gemischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Gemisch für 10 min bei 4 °C mit 14.000 rpm zentrifugiert und anschließend erneut die obere wässrige Phase abgenommen. Es wurden 2 Vol. Ethanol absolut und 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) dazugegeben, gemischt und für zwei Stunden bei - 20 °C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für eine Stunde bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 500 µl 70 %-Ethanol (eiskalt) auf das Pellet gegeben. Anschließend wurde erneut für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen,

das Pellet luftgetrocknet, in 50 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert und die Konzentration mittels Nanodrop 1000 gemessen. Die linearisierte Plasmid-DNA wurde bei - 20 °C gelagert.

Für die *in-vitro*-RNA-Transkription wurde mittels HighScribe™ T7 ARCA mRNA Kit (with tailing) 1 µg linearisiertes Plasmid nach Herstellerangaben in *in-vitro*-RNA umgeschrieben. Nach *in-vitro*-Transkription (16 h, 37 °C), DNase-I-Verdau (30 min, 37 °C) und Poly-Adenylierung (30 min, 37 °C) erfolgte die Aufreinigung der RNA mittels im Kit enthaltender LiCl-Lösung ebenfalls nach Herstellerangaben. Die Konzentration der gecappten und polyadenylierten *in-vitro*-RNA wurde mittels Nanodrop 1000 bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei - 80 °C.

24 h vor Transfektion wurden 2 x 10⁵ A549/D3 Zellen im 24-Well Format ausgesät und mit 1 ml MEM-A Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die ca. zu 80 % konfluenten Zellen wurden mit Hilfe des Mirus TransIT® mRNA Transfektionskits nach Herstellerangaben mit 0,5 µg gecappter und polyadenylierter *in-vitro*-RNA transfiziert und für weitere 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Temperaturwechsel zu 34,5 °C. Nach weiteren sechs Tagen erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel zu MEM-B Medium. Insgesamt zwei Wochen nach Transfektion wurde die Inkubation gestoppt. Die Zellkulturüberstände wurden abgenommen und für die Infektion neuer A549/D3-Zellen verwendet (siehe Methodenkapitel 3.17, Seite 47) bzw. bei - 20 °C gelagert. Die transfizierten Zellen wurden mittels Immunfluoreszenztest (IFT; siehe Methodenkapitel 3.23.1, Seite 4949) analysiert.

3.16. Transfektion des HEV-Volllänge-cDNA-Plasmids p47832mc und dessen Derivate in BSR-T7/5-Zellen

24 Stunden vor der Transfektion wurden 8 x 10⁵ BSR-T7/5-Zellen pro Well in 6-WellPlatten ausgesät und mit insgesamt 2 ml/Well DMEM-A Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

In einem 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 250 µl OptiMEM und 8 µg HEV-Plasmid zusammen mit jeweils 1 µg pCAG D1R und 1 µg pCAG D12L gemischt. Anschließend wurden 30 µl TransIT®-LT1 Transfektionreagenz dazugegeben und bei Raumtemperatur für 25 min inkubiert. Danach wurde der DNA-Lipokomplex tröpfchenweise direkt auf den Überstand der BSR-T7/5-Zellen gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel zu DMEM-B und ein Temperaturwechsel zu 34,5 °C.

Nach insgesamt sieben Tagen wurde die Inkubation gestoppt und die Zellen in den Platten dreimal eingefroren (- 80 °C) und wieder aufgetaut (37 °C). Anschließend wurde der gesamte Wellinhalt in 2 ml-Eppendorf-Gefäße überführt und für 10 min bei 6.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Infektion von frischen A549/D3-Zellen verwendet, das Pellet wurde verworfen. Die Lagerung der BSR-T7/5-Transfektionsüberstände erfolgte bei - 20 °C.

3.17. Infektion von A539/D3-Zellen

Für die Infektion wurden konfluente A549/D3 Zellen in 6-Well Platten verwendet. Dazu wurden 14 Tage vorher $1,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät und mit insgesamt 2 ml MEM-A Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Ein vollständiger Mediumwechsel erfolgte sieben Tage nach Aussaat. Für die Infektion der ersten Passage wurden die Zellen zweimal mit 2 ml DPBS gewaschen. Die Infektion erfolgte mit 1 ml-Transfektionsüberstand für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Überstände gegen frisches DMEM-A Medium ersetzt und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 14 Tage inkubiert. Ein vollständiger Mediumwechsel erfolgte sieben Tage nach Infektion. Nach 14 Tagen wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und bei -20 °C gelagert, die Zellen wurden im IFT (siehe Methodenkapitel 3.23.1, Seite 49) analysiert.

Die Infektion von frischen A549/D3-Zellen für eine zweite Passage wurde vergleichbar mit dem Prozedere der Infektion der ersten Passage durchgeführt, jedoch mit dem Unterschied, dass für die Infektion die A549/D3-Zellkulturüberstände vom Ende der ersten Passage genutzt wurden.

3.18. Virustitration zur Ermittlung infektiöser Titer im Zellkulturüberstand

Zur Ermittlung der infektiösen Titer wurden die Zellkulturüberstände der ersten Passage titriert. Zwei Wochen vor der Titration wurden A549/D3-Zellen in 96-Well Platten ausgesät und in 200 µl MEM-A Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (vollständiger Mediumwechsel sieben Tage nach Aussaat). Die konfluenten Zellen wurden vor Infektion zweimal mit 200 µl/Well DPBS gewaschen. Zur Erstellung der 1:5-Verdünnungsreihe wurden zunächst 100 µl der virushaltigen Zellkulturüberstände in Reihe A der 96-Well Platte gegeben. Die Bestimmung der Titer in den Zellkulturüberständen erfolgte immer in Doppelbestimmung. In den verbliebenen Wells wurden 80 µl DMEM-Basismedium (ohne Zusätze) vorgelegt. Aus der Reihe A wurden dann 20 µl des unverdünnten Zellkulturüberstands in Reihe B überführt, gemischt und erneut 20 µl entnommen und in Reihe C überführt. So wurde weiter verfahren bis zur Reihe G, wobei ein Spitzenwechsel nicht erforderlich war. Die Reihe H wurde in die Verdünnungsreihe nicht mit einbezogen, sondern fungierte als Negativkontrolle. Die so vorbereiteten Verdünnungsreihen in der 96-Well Platte wurden dann auf die gewaschenen Zellen übertragen. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde. Anschließend wurden die Überstände wieder abgenommen und frisches DMEM-A Medium auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ für 14 Tage mit einem kompletten Mediumwechsel nach sieben Tagen. Die Zellen wurden mittels IFT (siehe Methodenkapitel 3.23.2, Seite 50) analysiert, in dem HEV-Foci pro Well ausgezählt wurden. Ein Fokus ist dabei

definiert als mindestens drei nebeneinanderliegende, infizierte Zellen. In dem Well mit der Verdünnung, in dem noch infizierte Zellen zu sehen waren, wurden die Foci ausgezählt, der Mittelwert aus der Doppelbestimmung gebildet und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Man erhielt daraufhin zunächst FFU (*Focus-Forming-Units*) pro 100 µl eingesetztes Material. Eine Multiplikation um den Faktor 10 ergab dann den infektiösen Titer als FFU/ml (Detektionslimit: 10 FFU/ml). Die Verdünnung der Zellkulturüberstände auf gleiche infektiöse Titer erfolgte mit DMEM Basismedium.

3.19. Erstellung von Virus-Wachstumskurven

Für die Infektion wurden konfluente A549/D3-Zellen in 6-Well Platten verwendet. Dazu wurden 14 Tage vorher $1,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät und mit insgesamt 2 ml MEM-A Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Ein vollständiger Mediumwechsel erfolgte sieben Tage nach Aussaat. Für die Infektion der ersten Passage wurden die Zellen zweimal mit 2 ml DPBS gewaschen. Die Infektion erfolgte mit 1 ml der eingestellten Überstände für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Überstände wieder abgenommen, die Zellen erneut zweimal mit DPBS gewaschen und frisches DMEM-A zugegeben. Die Überstände wurden wieder bei - 20 °C gelagert. Die Inkubation der infizierten Zellen erfolgte für 21 Tage mit einem kompletten Mediumwechsel alle 3 - 4 Tage. Zu diesen Zeitpunkten wurden 1 ml-Aliquots abgenommen, RNA isoliert und mittels RT-qPCR analysiert. Die Auswertung der C_t-Werte sowie die Erstellung der Standardgeraden erfolgte mittels 7500 Fast Software, Version 2.3. Die Erstellung der Wachstumskurven erfolgte mittels der Software Microsoft Excel 2016.

3.20. Etablierung von persistent infizierten Zelllinien

Persistent infizierte Zelllinien auf Basis von A549/D3-Zellen wurden in T25-Zellkulturflaschen etabliert. Das Prozedere war sowohl für das Virus p47832mc als auch für die daraus hervorgegangenen Virusmutanten gleich.

Zwei Wochen vor Infektion wurden A549/D3-Zellen in T25-Flaschen mit 5 ml MEM-A Medium ausgesät. Nach einer Woche erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel. Vor der Infektion wurden die Zellen zweimal mit jeweils 5 ml DPBS gewaschen. Die Infektion der Zellen erfolgte mit 1 ml des virushaltigen Transfektionsüberstandes (siehe Methodenkapitel 3.16, Seite 45). Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde. Die Überstände wurde abgenommen und 5 ml frisches DMEM-A Medium zugegeben. Die Inkubation erfolgte über 14 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂. Alle 3 - 4 Tagen erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel. Danach wurden die Zellen wöchentlich im Verhältnis 1:2 umgesetzt. Am Ende der zweiten und

vierten Zellpassage wurden jeweils 200 µl Zellen im 6-Well Format ausgesät und bei vollständiger Konfluenz im IFT analysiert (siehe Methodenkapitel 3.23.1, Seite 49) analysiert. Positiv getestete Zellkulturen wurden bis zur sechsten Passage weitergeführt und dann in Flüssigstickstoff eingefroren. Negativ getestete Zellkulturen wurden nach der vierten Passage verworfen.

3.21. Einfrieren von Zellkulturen in Flüssigstickstoff

Die Zellkulturen wurden nach den beschriebenen Maßgaben zum Umsetzen von Zelllinien bearbeitet (siehe Methodenkapitel 3.14, Seite 45). Die dreifache Menge an Zellen wurde dann in T75-Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Die Zellen wurden mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden gelöst, in 10 ml DPBS aufgenommen, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 1.000 rpm für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 3 ml Einfriermedium aufgenommen. 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Kryogefäß überführt, in die Mr. Frosty™ Einfrierhilfe überführt und für 24 Stunden bei - 80 °C gelagert. Diese Einfrierhilfe sorgt mit einer Temperaturreduzierung von ca. - 1 °C/min für einen langsamen Einfrierprozess, der die Zellen schont. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zur weiteren Lagerung in Flüssigstickstoff überführt.

3.22. Auftauen von Zellen aus Flüssigstickstofflagerung

Die Kryogefäße mit den Zellkulturen wurden direkt in ein 37 °C-warmes Wasserbad gegeben, aufgetaut, 5 ml Vollmedium (je nach Zellen DMEM-A oder MEM-A, siehe Tabelle 27) zugegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein kompletter Mediumwechsel, gefolgt von einer weiteren Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂. Bei vollständiger Konfluenz wurden die Zellen umgesetzt (siehe Methodenkapitel 3.14, Seite 45).

3.23. Immunfluoreszenzanalysen

3.23.1. Qualitativer Test in 6-Well Zellkulturplatten

Von den infizierten Zellen wurden die Überstände abgenommen und die Zellen für 30 min durch Zugabe von 2 ml eines Aceton/Methanol-Gemisch (Verhältnis 1:1) bei 4 °C fixiert. Die Fixierlösung wurde abgenommen und die Zellen einmal mit 2 ml 1x phosphathaltiger Pufferlösung (PBS) gewaschen. Freie Bindestellen wurden mit 2 ml 1 %-FKS-Lösung in PBS für eine Stunde bei 37 °C geblockt. Im Anschluss wurde die Lösung abgenommen und 800 µl Primärantikörper (antiHEV-ORF2 Hyperimmunserum 0791/8282) 1:500 in 1 %-FKS-Lösung in PBS für eine Stunde bei 37 °C auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde die

Primärantikörper-Lösung abgenommen und die Zellen dreimal mit 2 ml PBS gewaschen. 800 µl FITC-konjugiertes antiRabbit-IgG (1:1000 in 1 % FKS-Lösung in PBS) wurde auf die Zellen gegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde danach abgenommen und die Zellen erneut zweimal mit 2 ml PBS und einmal mit H₂O_{bidest} gewaschen. Zur Anfärbung des Zellkerns wurde wässrige Roti®-Mount Fluor Care DAPI Lösung auf die Zellen gegeben. Die Analyse erfolgte am inversen Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 mit der Software Zen 3.1 lite (blue edition).

3.23.2. Quantitativer Test im 96-Well Zellkulturplatten

Die Virustitration im 96-Well Format war von der Abfolge her vergleichbar mit dem qualitativen Test. Pro Well wurden 200 µl Aceton/Methanol-Lösung zur Fixierung, 200 µl 1 %-FKS-Lösung in PBS zum Blocken bzw. 200 µl PBS zum Waschen verwendet. Es wurden pro Well 50 µl Antikörperlösungen eingesetzt. Die Auswertung erfolgte wie im Methodenkapitel 3.18 (Seite 47) beschrieben.

3.24. **Elektronenmikroskopie**

Die Elektronenmikroskopie wurde durch Herrn Dr. Ashish K. Gadicherla und Frau Maria-Margarida Vargas Gonc. De Freitas (BfR, FGr. 46) durchgeführt. Zur Analyse wurden 10 µl des Zellkulturüberstands an einen Karbon-Formvar-beschichteten TEM-Gitterträger für 5 min adsorbiert und anschließend für 1 min mit 25 %-Glutaraldehyd inaktiviert. Überschüssige Flüssigkeit wurde mittels Filterpapier abgenommen. Zur Kontrastierung wurden die Proben mit 2 %-Uranylacetat für 1 min inkubiert. Anschließend wurde erneut überschüssige Flüssigkeit mittels Filterpapier abgezogen. Nach der Trocknung wurden die Proben mit Hilfe des Transmissionelektronenmikroskops JEM 1400 Plus analysiert. Zur Bildgebung wurde eine Olympus Veleta G2 Kamera verwendet. Die Partikel wurden mittels ITEM Software ausgemessen.

3.25. **RNA-Isolierung aus Zellkulturüberständen**

Es wurden 500 µl Aliquots der Zellkulturüberstände abgenommen und die RNA mittels NucliSens® EasyMag® System isoliert. Das System basiert auf der Verwendung von magnetischen Silica-Beads, die die RNA binden. Durch Anlegen eines magnetischen Feldes werden die RNA-haltigen Beads herausgefiltert. Abschließend wird die RNA von den Beads isoliert.

Die Überstände wurden zunächst für 10 min in 3 ml EasyMag® Lysepuffer inkubiert. Die Silica-Beads wurden 1:1 mit Nuklease-freiem Wasser gemischt. 100 µl der Silica-Bead-Lösung wurde

dann pro Probe in die Reaktionsgefäße pipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend in den NucliSens® EasyMag® Roboter überführt. Die Isolation der RNA erfolgte vollautomatisch. Die Elution der RNA erfolgte mit 60 µl EasyMag® Elutionspuffer. Die Lagerung erfolgte bei - 80 °C.

3.26. DNase I-Verdau von RNA

Zu 20 µl RNA wurden 6 µl Nuklease-freies Wasser, 3 µl 10 x Inkubationspuffer und 10 U DNase-I (1 µl) gegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei 37 °C. Die DNase-I-Inaktivierung erfolgte für 5 min bei 75 °C. Die Lagerung der RNA erfolgte bei - 80 °C.

3.27. Herstellung eines RNA Standards für die HEV-spezifische Reverse-Transkription quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Ein 246 bp langes HEV-Genomfragment im überlappenden Bereich von HEV ORF2/ORF3 wurde mit den Primern Standard-F und Standard-R (siehe Tabelle 17) mittels RT-PCR amplifiziert und in einen TOPO® pCR™4-Vektor kloniert. Es entstand das Plasmid pCR™4/HEV-ORF2/ORF3. Dieses Plasmid wurde mittels Plasmid Midi Kit nach Herstellerangaben isoliert (siehe Methodenkapitel 3.3, Seite 35). 4 µg des Plasmids wurden mittels *Pst*I linearisiert sowie über ein Agarosegel (0,5 %) aufgereinigt. Die *in-vitro*-RNA-Transkription und die anschließende LiCl-Aufreinigung wurden, wie im Methodenkapitel 3.15 (siehe Seite 45) beschrieben, durchgeführt. Zur Überprüfung der Reaktionsprozesse wurden zu spezifischen Zeitpunkten 1 µl Probe aus der Reaktion entnommen und im Agarosegel (1 %, 1 h, 100 V) analysiert (Daten nicht gezeigt). Das Resultat war eine ca. 350 bp lange, gecappte und polyadenylierte *in-vitro*-RNA. Die Konzentration der reinen RNA wurde am Nanodrop 1000 gemessen und die RNA-Kopienzahl mittels des Online-Tools von SciencePrimer.com berechnet. Daraus wurde eine 1:10-Verdünnungsreihe mit Nuklease-freiem Wasser von 10⁷ Kopien/µl bis 10⁰ Kopien/µl erstellt, welche in der Form zur Quantifizierung der Virus-RNA-Kopien in den Zellkulturüberständen eingesetzt wurde. Die Lagerung des RNA-Standards erfolgte bei - 80 °C.

3.28. RT-qPCR für die Ermittlung von HEV RNA-Konzentrationen

Die isolierte RNA aus Zellkulturüberständen wurde zur Ermittlung der HEV RNA-Konzentrationen in der RT-qPCR nach Jothikumar et al. (2006) eingesetzt [168]. Hierfür wurde das QuantiTect® Probe RT-PCR Kit verwendet. Die Zusammensetzung des Mastermixes pro Reaktion ist in Tabelle 28 ersichtlich.

Tabelle 28: Pipettierschema für die RT-qPCR zum HEV-Nachweis

QuantiTect® Probe RT-PCR Kit, c_{stock} bezieht sich auf die Konzentration der Kit-Komponenten, c_{final} bezieht sich auf die finale Konzentration inkl. Template-RNA. Angaben pro Ansatz.

Komponente	c_{stock}	Volumen	c_{final}
Nuklease-freies Wasser	-	3,7 μl	-
QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	2 x	10,0 μl	1 x
Primer JHEV-F	10 μM	0,5 μl	0,25 μM
Primer JHEV-R	10 μM	0,5 μl	0,25 μM
JHEV-Sonde	2 μM	0,1 μl	0,01 μM
QuantiTect RT Mix	-	0,2 μl	-
Finales Volumen vom Mastermix:		15 μl	

Pro Reaktion wurden 5 μl unbekannte RNA-Probe zugegeben. Das finale Reaktionsvolumen betrug 20 μl . Als RNA-Standard diente eine Verdünnungsreihe von *in-vitro* transkribierter RNA (siehe Methodenkapitel 3.27, Seite 51). Das Thermoprofil der RT-qPCR ist in der Tabelle 29 dargestellt.

Tabelle 29: Thermoprofil der RT-qPCR zum HEV-Nachweis

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Reverse Transkription	50 °C	30 min	1
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
Zyklus-Denaturierung	94 °C	10 sec	45
Zyklus-Annealing	55 °C	20 sec	
Zyklus-Extension	72 °C	60 sec	

Der Lauf wurde im 7500 Real Time PCR System durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der 7500 Fast Software, Version 2.3, wodurch neben der Standardkurve auch die HEV-RNA-Kopienzahlen in den unbekanntenen Proben ermittelt wurden.

3.29. Erstellung von Wachstumskurven

Die mittels RT-qPCR ermittelten RNA-Kopien wurden pro Proben-Set mit Hilfe von Microsoft Excel 2016 als Punktdiagramm mit geraden Verbindungslinien und Datenpunkten dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde die Standardabweichung von einer Grundgesamtheit (Funktion: STABW.N) genutzt.

3.30. One-Step RT-PCR

Die *One-Step* RT-PCR wurde verwendet, um virale RNA für die Verifizierung des HEV-3'-Genomendes, für den Bereich um die eingefügte *EcoRI*-Schnittstelle und für spätere

Sequenzierungen zu amplifizieren. Die virale RNA wurde wie beschrieben isoliert (siehe Methodenkapitel 3.25, Seite 50). Für die Amplifikation wurde das *One-Step* RT-PCR Kit eingesetzt. Die Zusammensetzung des Mastermixes pro Reaktion ist in Tabelle 30 dargestellt.

Tabelle 30: Pipettierschema für die *One-Step* RT-PCR

One-Step RT-PCR Kit, C_{stock} bezieht sich auf die Konzentration der Kit-Komponenten, C_{final} bezieht sich auf die finale Konzentration inkl. Template-RNA. Angaben pro Ansatz.

Komponente	C_{stock}	Volumen	C_{final}
Nuklease-freies Wasser	-		-
<i>One-Step</i> RT-PCR Puffer	5 x	5 μl	1 x
dNTPs-Mix (jeweils 10 mM)	40 mM	1,0 μl	1,6 mM (jeweils 0,4 mM)
Forward Primer	50 μM	1,0 μl	2 μM
Reverse Primer	50 μM	1,0 μl	2 μM
Rnase Inhibitor	4 U/ μl	0,25 μl	1 U
Q-Solution	5 x	5 μl	1 x
<i>One-Step</i> RT-PCR Enzyme Mix	-	1 μl	-
Finales Volumen vom Mastermix:		20 μl	

Pro Reaktion wurden 5 μl unbekannte RNA-Probe zugegeben. Das finale Reaktionsvolumen betrug 25 μl . Für die Reaktion wurde der 2720 Thermal Zykler verwendet. Zur Amplifikation von PCR-Produkten für Sequenzierungen wurde das Thermoprofil 1 (Tabelle 31) verwendet. Das Thermoprofil 2 (Tabelle 32) wurde für die Amplifikation des HEV-Genoms im Bereich der eingefügten *EcoRI* Schnittstelle und zur Verifizierung des HEV-3'-Genomendes benutzt.

Tabelle 31: Thermoprofil 1 der *One-Step* RT-PCR

Thermoprofil zur Amplifikation von PCR-Produkten, welche sequenziert werden sollten.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Reverse Transkription	50 °C	30 min	1
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	1
Zyklus-Denaturierung	94 °C	30 sec	40
Zyklus-Annealing	56 °C	30 sec	
Zyklus-Extension	72 °C	1 sec	
Finale Extension	72 °C	10 min	1
Gehalten bei:	4 °C	∞	

Tabelle 32: Thermoprofil 2 der One-Step RT-PCR zur Amplifikation von PCR-Produkten

Angewendet wurde dieses Profil für die Darstellung des Bereichs um die *EcoRI*-Schnittstelle im HEV-Genom bzw. für die Verifizierung des HEV-3'-Genomendes.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Reverse Transkription	42 °C	30 min	1
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	1
Zyklus-Denaturierung	94 °C	30 sec	40
Zyklus-Annealing	60 °C	30 sec	
Zyklus-Extension	74 °C	40 sec	
Finale Extension	74 °C	5 min	1
Gehalten bei:	4 °C		∞

Die PCR-Produkte wurden im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Methodenkapitel 3.5, Seite 36) analysiert und aufgereinigt. PCR-Produkte wurden bei - 20 °C gelagert.

3.31. Two-Step RT-PCR

Die *Two-Step* RT-PCR wurde verwendet, um die Polyadenylierungssequenz des HEV-3'-Genomendes darzustellen. Für die PCR wurde das LongRange-2Step PCR Kit nach Herstellerangaben verwendet. Der Reaktionsmix der reversen Transkription wurde, wie in Tabelle 33 dargestellt, angesetzt.

Tabelle 33: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription in der Two-Step RT-PCR

LongRange-2Step PCR Kit, C_{stock} bezieht sich auf die Konzentration der Kit-Komponenten, C_{final} bezieht sich auf die finale Konzentration inkl. Template-RNA.

Komponente	C_{stock}	Volumen	C_{final}
Nuklease-freies Wasser	-	1 µl	-
LongRange RT Puffer	5 x	5 µl	1 x
dNTPs-Mix (jeweils 10 mM)	40 mM	2,0 µl	4 mM (jeweils 1 mM)
Primer p1A	20 µM	0,8 µl	1 µM
LongRange RNase Inhibitor	4 U/µl	0,2 µl	0,04 U/µl
LongRange Reverse Transkriptase	-	1 µl	1 x
Finales Volumen vom Mastermix:		10 µl	

Zu dem Mastermix wurden 10 µl RNA gegeben und gemischt. Die Inkubation erfolgte für 105 min bei 42 °C, gefolgt von einer Inaktivierung für 5 min bei 85 °C. Von der generierten cDNA wurden danach 10 µl in der PCR eingesetzt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 34 dargestellt.

Tabelle 34: Reaktionsansatz für die PCR in der *Two-Step* RT-PCR

C_{Stock} bezieht sich auf die Konzentration der Kit-Komponenten, C_{final} bezieht sich auf die finale Konzentration inkl. Template-RNA.

Komponente	C_{Stock}	Volumen	C_{final}
Nuklease-freies Wasser	-	29,5 μl	-
LongRange PCR Puffer	10 x	5 μl	1 x, 2.5 mM Mg^{2+}
dNTPs-Mix (jeweils 10 mM)	40 mM	2,5 μl	2 mM (jeweils 0,5 mM)
Primer Sense A, B, C	20 μM	1 μl	0,4 μM
Primer Antisense B	20 μM	1 μl	0,4 μM
LongRange Reverse Transkriptase	-	1 μl	2 U
	+ RNA		10 μl
Finales Reaktionsvolumen:			50 μl

Der Ansatz wurde gemischt und in den 2720 Thermal Cycler überführt. Das Thermoprofil für die PCR ist in Tabelle 35 zu sehen.

Tabelle 35: Thermoprofil für die PCR in der *Two-Step* RT-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	93 °C	5 Min.	1
Zyklus-Denaturierung	93 °C	15 sec.	40
Zyklus-Annealing	56 °C	30 sec.	
Zyklus-Extension	68 °C	60 sec.	
Finale Extension	72 °C	10 min	1
Gehalten bei:	4 °C		∞

Nach Abschluss der PCR wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen und analysiert (siehe Methodenkapitel 3.5, Seite 36).

3.32. Statistik

Zur Ermittlung statistischer Signifikanzen wurde mit Hilfe der Software Excel 2016 ein ungepaarter, heteroskedastischer, studentischer T-Test durchgeführt. Vergleichene experimentell ermittelte Werte, deren T-Test einen p-Wert ergaben, welche kleiner als 0,05 war ($p < 0,05$), wurden als signifikant unterschiedlich angesehen. Ergab der errechnete p-Wert ein Ergebnis größer gleich 0,05 ($p \geq 0,05$), so waren die verglichenen experimentell ermittelten Werte statistisch nicht signifikant unterschiedlich.

4. Ergebnisse

4.1. Klonierung des funktionellen HEV–Vollelänge-cDNA-Plasmids p47832mc

Das ursprüngliche HEV-Vollelänge-Klon-Plasmid pBR322-HEV47832c-Swal wurde freundlicherweise von Frau Dr. Christine Bächlein (Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt. Überlappende HEV-Genomfragmente waren mittels RT-PCR amplifiziert und in einen pBR322-ähnlichen Plasmidvektor kloniert worden. Am 5'-Ende des HEV-Genoms war eine T7-RNA-Polymerase-Promotersequenz, am 3'-Ende des Genoms eine Poly-A-Sequenz eingefügt worden.

Unter Verwendung dieses Plasmids wurde zunächst mittels *in-vitro*-RNA-Transfektion von A549/D3-Zellen und Passagierung auf A549/D3-Zellen versucht, infektiöses Virus zu generieren (siehe Methodenkapitel 3.15, Seite 45). Als Nachweis wurden die transfizierten, später die infizierten Zellen jeweils mittels IFT analysiert (siehe Methodenkapitel 3.23.1, Seite 49). In keinem Fall konnten zunächst positiv transfizierte bzw. infizierte Zellen nachgewiesen werden.

Es folgte ein Sequenzvergleich des HEV-Vollelänge-cDNA-Plasmids mit einer Sequenz, welche vom Serum des chronisch HEV-infizierten Patienten (Stamm 47832, GenBank Acc.-No.: KC618402.1) sowie mit einer Sequenz, die aus einer niedrigen Passagenzahl des durch Inokulation mit dem Patientenserum hervorgegangenen Zellkulturvirus (Stamm 47832c, GenBank Acc.-No.: KC618403.1) stammte. Insgesamt wurden hierdurch 24 Nukleotidsubstitutionen festgestellt. Aus diesen Substitutionen resultierten 12 Aminosäuren-Austausche, die weder in der Sequenz aus dem Patientenserum noch im Zellkulturvirus der niedrigen Passage vorhanden waren (Tabelle 36).

Tabelle 36: Genomsequenzvergleich von HEV 47832, HEV 47832c und Vollelänge-cDNA-Klon pBR322-HEV47832c-Swal

Bestimmte Nukleotidmutationen resultieren nicht in einen Aminosäureaustausch (still), andere führen zur Änderung der Aminosäuresequenz. Die im finalen Plasmid korrigierten Nukleotide sind fett gedruckt.

Nukleotid- position	Patienten- serum (47832)	Zellkulturvirus 47832c (2. Passage)	cDNA-Klon pBR322- HEV47832c- Swal	Aminosäureaustausch	Plasmid p47832mc
37	C	C	T	still	T
589	T	C	T	still	T
1081	T	T	C	still	C
2072	T	T	C	S683P (ORF1)	T
2144	A	A	G	T707A (ORF1)	A
2409	T	T	C	V795A (ORF1)	T
2833	C	C	A	still (ORF1)	C
2850	C	C	T	A942V (ORF1)	C
2926	C	C	T	still (ORF1)	C
2966	G	G	A	G981E (ORF1)	G
3234	G	G	A	R1070Q (ORF1)	G
3372	A	A	G	Q1116R (ORF1)	A
4261	C	C	T	still (ORF1)	T
4918	C	T	C	still (ORF1)	C
5574	G	A	G	R73G (ORF2)	A
				still (ORF3)	
5637	C	C	T	P94S (ORF2)	C
				still (ORF3)	
5855	T	T	C	still (ORF2)	C
6176	T	C	T	still (ORF2)	T
6263	C	C	T	still (ORF2)	C
6337	C	C	T	A327V (ORF2)	C
6417	C	C	G	H354D (ORF2)	C
6960	A	A	G	T535A (ORF2)	A
7065	C	T	C	still (ORF2)	C
7315	A	A	G	K653R (ORF2)	A

Nukleotidaustausche, die zu Aminosäuresubstitutionen führten, sowie stille Nukleotidaustausche, die nur in p47832c, aber nicht in den beiden anderen Sequenzen vorkamen, sollten korrigiert werden.

Zur Korrektur der Mutationen wurden Genom-Fragmente synthetisiert und diese mit den vorhandenen Abschnitten im Ausgangsplasmid ausgetauscht. Die gesamte Klonierungsstrategie ist in Abbildung 13 dargestellt und wurde durch Dr. Alexander Falkenhagen (FGr. 46, BfR) durchgeführt. Das resultierende korrigierte Vollelänge-cDNA-Plasmid wurde als p47832mc bezeichnet. Sein Aufbau ist schematisch in Abbildung 14A

dargestellt. Zur Verifizierung wurde das Plasmid mit Hilfe verschiedener Restriktionsenzyme analysiert, was in Banden der vorhergesagten Länge resultierte (Abbildung 14B). Die korrekte Sequenz wurde zusätzlich mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt.

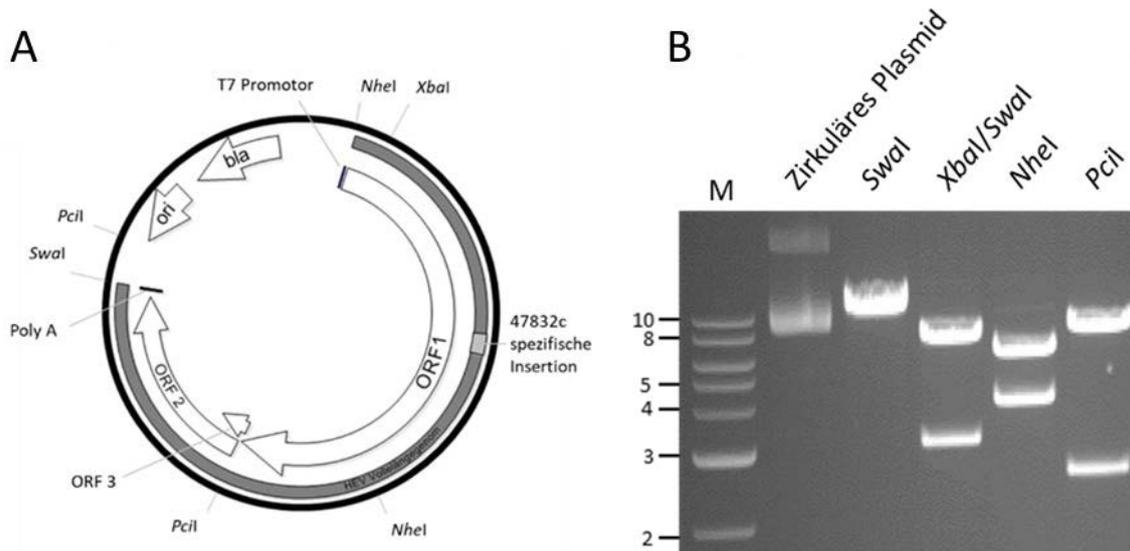


Abbildung 14: Aufbau und Analyse des funktionellen HEV-Volllänge-cDNA-Plasmids p47832mc

A: Schematische Darstellung des Plasmids p47832mc. Das HEV-Volllänge-cDNA Plasmid enthält ORF1, welcher für das Nicht-Strukturprotein kodiert, ORF2 (Kapsidprotein) und ORF3 (Phosphoprotein). Das Genom steht unter der Kontrolle eines T7-RNA-Polymerase-Promoters (T7-Promoter). Am 3'-Ende des HEV-Genoms befindet sich eine Poly-A-Sequenz (Poly A). Im Plasmidrückgrat befindet sich neben dem *Origin of Replication* (ori) noch ein β -Laktamasegen (bla) für die Antibiotikaresistenz; für die Analyse wichtige Restriktionsschnittstellen sind *NheI*, *XbaI*, *PciI* und *SwaI*. Im Bereich der hypervariablen Region im ORF1 trägt das Plasmid die 47832c-spezifische 186 bp lange Insertion. B: Restriktionsanalyse des Plasmids p47832mc. Die in der Abbildung oben genannten Restriktionsenzyme wurden verwendet. Die Auftrennung erfolgte mittels 1 %-Agarose-Gelelektrophorese, als Standard (M) wurde die *Quick-Load® 2-Log DNA Ladder* verwendet (Angaben in kb).

4.2. Generierung von infektiösen HEV-Partikeln durch Transfektion von p47832mc

Das Plasmid p47832mc wurde ohne vorherige Linearisierung und ohne *in-vitro*-Transkription direkt in der Transfektion eingesetzt. Das System orientiert sich an einem Protokoll, das für die Generierung von infektiösen Rotaviren aus Plasmiden veröffentlicht wurde [169]. Für den HEV-Stamm 47832c wurde das Plasmid zusammen mit zwei Helferplasmiden (pCAG-D1R und pCAG-D12L), die für die Untereinheiten des Cappingenzym des Vacciniavirus kodieren, in kontinuierlich T7-RNA-Polymerase-exprimierende Babyhamster-Nierenzellen (Zelllinie BSR-T7/5) transfiziert. Die T7-RNA-Polymerase transkribiert vom Plasmid p47832mc genomische HEV-RNA, welche dann vom Vacciniavirus-Cappingenzym am 5'-Ende gecappt wird. Die zelluläre Biosynthese-Maschinerie translatiert anschließend die Virus-RNA, was zur Bildung

infektiöser Viren führt, die in den Zellkulturüberstand der BSR-T7/5-Zellen abgegeben werden und welcher dann im Anschluss auf A549/D3-Zellen passagiert werden (Abbildung 15).

Zu Beginn wurden unterschiedliche Transfektionsreagenzien, Zellkulturmedien, Inkubationszeiten und -temperaturen zur Optimierung des Systems getestet. Das optimierte Protokoll ist im Methodenkapitel 3.16 (Seite 46) detailliert beschrieben.

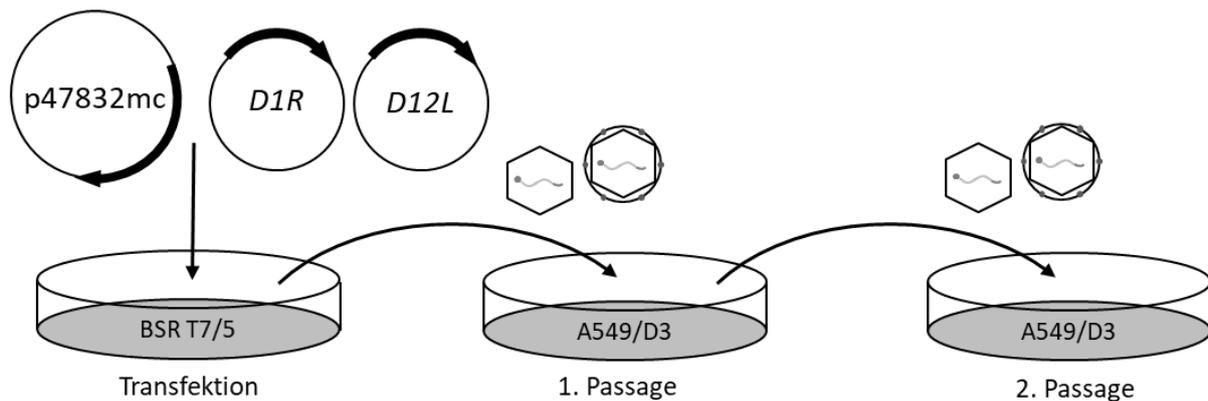


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Reversen Genetischen Systems für den HEV-Stamm 47832c

Das Plasmid p47832mc wurde zusammen mit den beiden Vacciniavirus-Helferplasmiden pCAG-D1R und pCAG-D12L in T7-RNA Polymerase-exprimierende Zelllinie BSR-T7/5 transfiziert. Nach sieben Tagen wurden die Zellen dreimal eingefroren und wieder aufgetaut, ehe der Zellkulturüberstand für die Infektion von A549/D3-Zellen verwendet wurde (1. Passage). Nach 14-tägiger Inkubation wurde deren Zellkulturüberstand genutzt, um frische A549/D3-Zellen zu infizieren (2. Passage). Am Ende der jeweiligen Passagen erfolgte ein Immunfluoreszenztest zur Detektion virusinfizierter Zellen.

Zunächst wurde untersucht, ob die BSR-T7/5-Zellen empfänglich für eine Infektion mit den HEV-Stamm 47832c sind. Ermittelt wurde dies durch Infektionsversuche mit 47832c-haltigen Zellkulturüberständen. Nach einer dreitägigen Inkubation und anschließendem Immunfluoreszenztest (IFT) konnten keine HEV-typischen Foci in den BSR-T7/5-Zellen detektiert werden (Abbildung 16). Infizierte A549/D3-Zellen dienen als Positivkontrolle. Hier wurden entsprechende Foci detektiert. Die Ergebnisse zeigen, dass BSR-T7/5-Zellen nicht in der Lage sind, einen vollständigen Replikationszyklus des HEV-Stamms 47832c zu unterstützen.

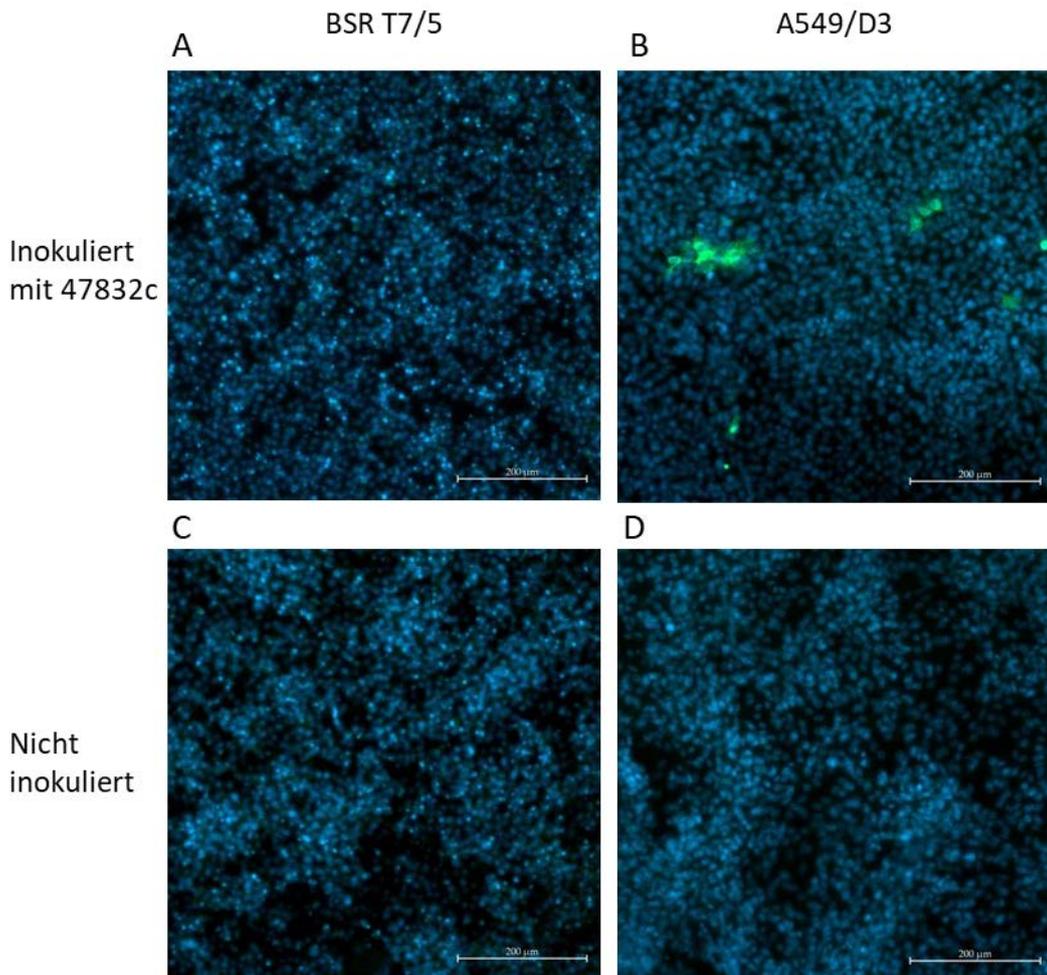


Abbildung 16: Immunfluoreszenztest (IFT) von BSR-T7/5-Zellen und A549/D3-Zellen, die mit 47832c aus Zellkulturüberstand infiziert wurden.

Zum Nachweis einer HEV-Infektion wurden die Zellen mit einem antiHEV-ORF2-Hyperimmunsereum und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und in DAPI-haltigem Medium konserviert. Grün: HEV-spezifisches Antigen, Blau: Zellkern. A: Mit HEV 47832c inokulierte BSR-T7/5-Zellen nach dreitägiger Infektion im 6-Well Format. Es konnten keine HEV-infizierte Zellen detektiert werden. B: Mit HEV 47832c inokulierte A549/D3-Zellen dienten als Positivkontrolle und wurden wie die BSR-Zellen bearbeitet. Foci wurden in allen Wells gefunden. C: Nicht-inokulierte BSR-T7/5-Zellen und D: nicht-inokulierte A549/D3-Zellen dienten als Negativkontrolle. Maßstab: 200 µm.

Als Nächstes musste herausgefunden werden, wieviel Zeit die BSR-T7/5-Zellen benötigen, um ausreichende Menge an Virus zu generieren, um neue Zellen infizieren zu können. Um zu ermitteln, ab welchem Tag nach Transfektion die BSR-T7/5-Zellen genügend Viren in den Überstand abgegeben hatten, wurden über acht Tage Aliquots aus dem Zellkulturüberstand von transfizierten BSR-T7/5-Zellen genommen und diese auf suszeptiblen A549/D3-Zellen titriert. Es zeigte sich, dass die BSR-T7/5-Zellen nach vier Tagen anfangen, infektiöse HEV-Partikel in den Überstand abzugeben. Ab dem sechsten Tag stellte sich eine Plateauphase ein (Abbildung 17). Ab dem achten Tag zeigten die BSR-T7/5-Zellen mikroskopisch einen zunehmend schlechten Habitus (Daten nicht gezeigt), weshalb die Inkubation im

Standardprotokoll am siebenten Tag gestoppt wurde. Zur erhöhten Freisetzung der Viren aus den Zellen wurden die Zellen anschließend dreimal eingefroren und wieder aufgetaut. Dies führte zu einer signifikanten Erhöhung des Virustiters um ungefähr 0,5 \log_{10} -Stufen (Abbildung 17).

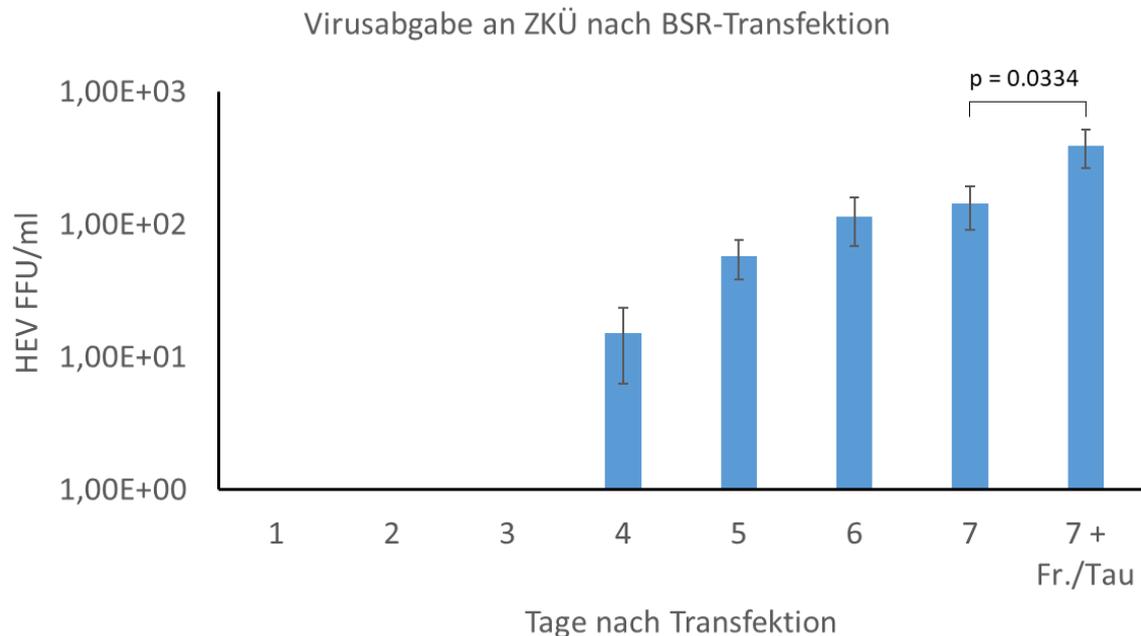


Abbildung 17: Freisetzung von HEV aus transfizierten BSR-T7/5-Zellen

BSR-T7/5-Zellen wurden mit dem Plasmid p47832mc und den Helferplasmiden kotransfiziert. Ab dem ersten Tag nach Transfektion wurden Aliquots der Zellkulturüberstände genommen und auf A549/D3-Zellen titriert (Darstellung in *Focus-Forming-Units* (FFU)/ml). Ab dem vierten Tag konnten Foci detektiert werden. Ab dem sechsten Tag stellte sich eine Plateauphase ein. Zusätzliches dreimaliges Einfrieren und Wiederauftauen am siebenten Tag führte zu einer signifikanten Erhöhung der Virustiter (ungepaarter, heteroskedastischer, studentischer T-Test, $p < 0.05$). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten.

Das Experiment zeigt, dass die transfizierten BSR-T7/5-Zellen infektiöses HEV generieren können. Die signifikant höchste Ausbeute (ungepaarter, heteroskedastischer, studentischer T-Test = 0,0334 < 0,05) erhält man, wenn die transfizierten Zellen nach sieben Tagen dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden, was im optimierten Standardprotokoll dann auch so umgesetzt wurde.

Im nächsten Schritt wurden die BSR-Zellkulturüberstände eingesetzt, um das generierte Virus auf A549/D3-Zellen zu vermehren. Hierzu wurden zwei Viruspassagen durchgeführt. Zum Nachweis infektiöser Viruspartikel erfolgte nach 14 Tagen (= erste Passage) ein IFT. Die Zellkulturüberstände der ersten Passage wurden dann für die Infektion einer zweiten Passage genutzt. Nach weiteren 14 Tagen erfolgte erneut ein IFT. Sowohl nach der 7-tägigen

Inkubation der BSR-Zellen, als auch nach der ersten und der zweiten Passage konnten Virusantigen-positive Zellen detektiert werden (Abbildung 18).

Der Versuch zeigt, dass das optimierte RGS in der Lage ist, aus dem Plasmid 47832mc infektiöses HEV zu generieren, das in A549/D3-Zellen weiter passagiert werden kann.

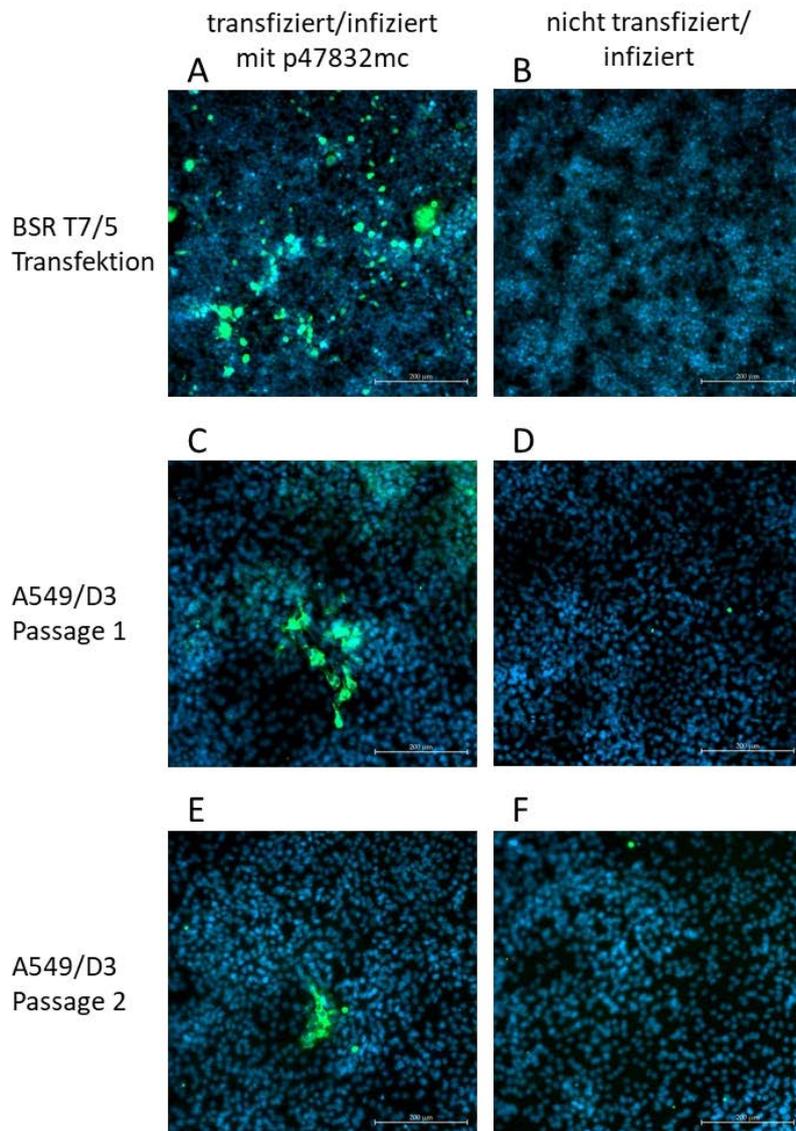


Abbildung 18: Nachweis von HEV in transfizierten BSR-T7/5-Zellen und anschließend infizierten A549/D3-Zellen der Passagen 1 und 2

BSR-T7/5 Zellen wurden mit p47832mc und den Helferplasmiden transfiziert und der Überstand für die Infektion von A549/D3-Zellen genutzt (= erste Passage). Der Überstand wurde anschließend nochmal auf A549/D3-Zellen passagiert (= zweite Passage). Alle Zellen wurden mit einem antiHEV-ORF2-Hyperimmunserum und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und in DAPI-haltigem Medium konserviert. Grün: HEV-spezifisches Antigen, Blau: Zellkern. A: Einzelne, positiv transfizierte BSR-T7/5-Zellen, B: Nicht-transfizierte BSR-T7/5-Zellen als Negativkontrolle, C: Infizierte A549/D3-Zellen der ersten Passage, erkennbar an den typisch ausgeprägten Foci im Zellrasen, D: Nicht-infizierte A549/D3-Zellen als Negativkontrolle, E: Infizierte A549/D3-Zellen der zweiten Passage, erkennbar an den typisch ausgeprägten Foci im Zellrasen, F: Nicht-infizierte A549/D3-Zellen als Negativkontrolle. Maßstab: 200 µm.

4.3. Charakterisierung der mit p47832mc generierten Viren

Das generierte Virus wurde bezüglich Partikel-Morphologie, Genomaufbau und Replikationsverhalten näher charakterisiert.

Mittels Elektronenmikroskopie wurden die Zellkulturüberstände der fünften Passage auf A549/D3-Zellen mit dem originalen HEV-Stamm 47832c aus persistent infizierten A549-Zellen verglichen. Die Aufnahmen zeigten vorrangig die Morphologie quasi-behüllter Viren (Abbildung 19). Es konnten keine Unterschiede in der Morphologie zwischen dem mittels RGS hergestellten Virus (Abbildung 19A) und den originalen Virusstamm (Abbildung 19B) festgestellt werden.

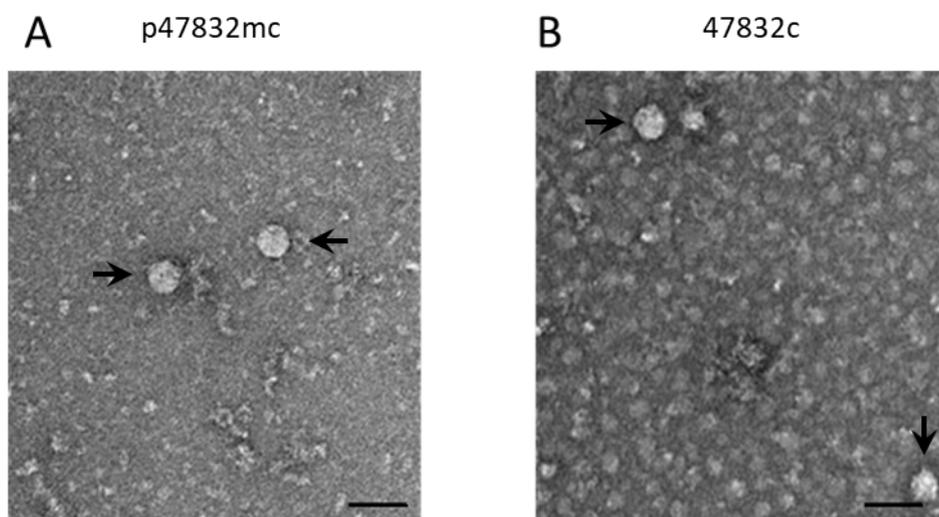


Abbildung 19: Morphologische Analyse des mittels RGS generierten Virus durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zellkulturüberstand der Passage in A549/D3-Zellen nach Transfektion des Plasmids p47832mc (A) und des originalen Virusstamms 47832c aus persistent infizierten A549-Zellen (B), Negativkontrastierung mit Uranylacetat, die Pfeile zeigen jeweils einzelne HEV-Partikel. Maßstab: 50 nm.

Einen weiteren Fokus der Analysen wurde auf das 3'-Genomende des Virus gelegt. Da zirkuläres Plasmid zum Transfizieren verwendet wurde, musste überprüft werden, ob das 3'-Ende regulär mit der Polyadenylierungssequenz (Poly-A-Sequenz) endet oder ob noch Plasmidsequenzreste im Virusgenom *downstream* des 3'-Endes enthalten sind. Dafür wurden RT-PCRs mit einer Kombination aus unterschiedlichen Primern (Tabelle 17) durchgeführt, welche den Bereich unmittelbar vor der Poly-A-Sequenz im Virusgenom, die Poly-A-Sequenz selber und den Bereich im Plasmidvektor unmittelbar hinter der Poly-A-Sequenz amplifizieren (Abbildung 20A). Als Probe wurde RNA des durch RGS generierten Virus p47832mc verwendet, die aus Zellkulturüberständen der ersten Passage auf A549/D3-Zellen isoliert wurde. Die

isolierte RNA wurde zusätzlich mit DNase-I behandelt, um noch vorhandene Plasmid-DNA zu entfernen. Als Kontrolle diente p47832mc-Plasmid-DNA. Wie erwartet, wurden PCR-Produkte sowohl für die Virus-RNA als auch für die Plasmid-DNA generiert, wenn der Sense-Primer A, B, C in Kombination mit den Antisense-Primern A bzw. B eingesetzt wurde, welche einen Bereich vor oder unmittelbar am Anfang der Poly-A-Sequenz amplifizieren. Im Gegensatz dazu wurde aber nur ein PCR-Produkt bei der Plasmidkontrolle und nicht bei der HEV-RNA detektiert, wenn der Sense-Primer A, B, C in Kombination mit dem Antisense-Primer C verwendet wurde, welcher auf einer Plasmidsequenz unmittelbar hinter der Poly-A-Sequenz bindet (Abbildung 20B). Damit wurde gezeigt, dass das Virus-3'-Genomende regulär mit der Poly-A-Sequenz endet.

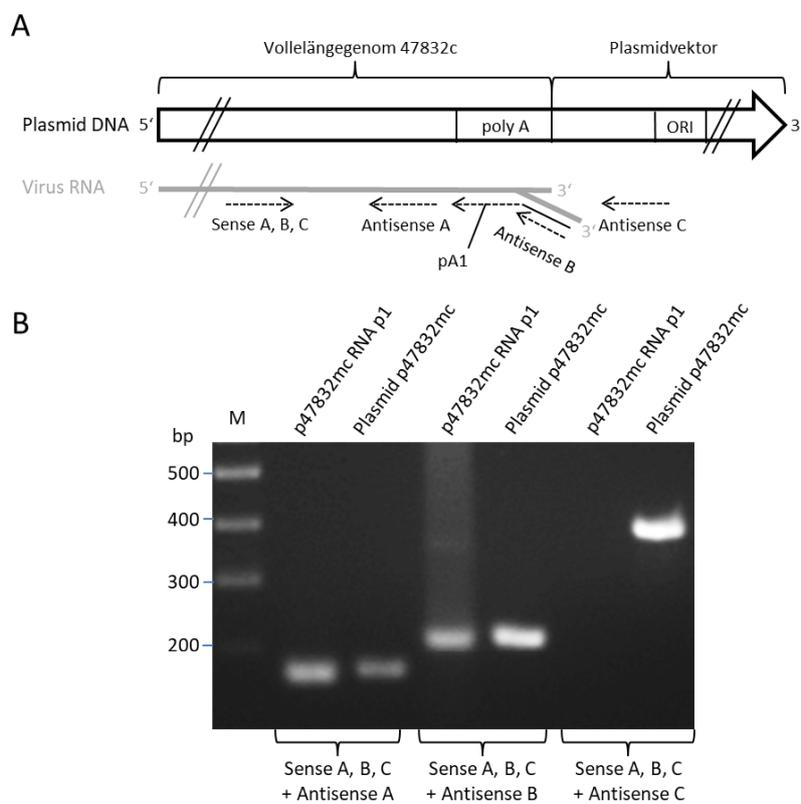


Abbildung 20: Charakterisierung des 3'-Endes des Virusgenoms von mittels RGS generiertem HEV p47832mc

A: Schematische Darstellung des PCR-Systems mit dem Sense-Primer A, B, C und den Antisense-Primern A, B (in Kombination mit Primer p1A, siehe Methodenkapitel 3.31 und Tabelle 17) oder C und deren Bindungsstellen auf dem Plasmid p47832mc und der Virus-RNA. B: Das RT-PCR-System mit der Kombination aus Sense-Primer A, B, C und Antisense-Primer A resultiert in einem PCR-Produkt von ca. 185 bp. In einer Elektrophorese mit einem 2 % Agarosegels konnten sowohl für die Virus-RNA aus der ersten Passage (p1) als auch für das Kontrollplasmid entsprechende Banden detektiert werden. Die Kombination von Sense-Primer A, B, C mit dem Antisense-Primerset B und p1A zeigt im gleichen Gel ein ca. 220 bp großes PCR-Produkt, welches ebenfalls sowohl für die Virus-RNA (p1) als auch für das Kontrollplasmid zu sehen ist. Die Kombination aus Sense-Primer A, B, C und Antisense-Primer C resultiert nur beim Kontrollplasmid in einem ca. 390 bp großem PCR-Produkt. M = DNA-Standard Hyperladder IV.

Um das Replikationsverhalten des durch RGS hergestellten Virus mit dem originalen HEV-Stamm aus persistent infizierten A549-Zellen zu vergleichen, wurden die Zellkulturüberstände beider Viren auf $2,75 \cdot 10^2$ FFU/ml eingestellt. Nach erfolgter Infektion von A549/D3-Zellen wurde alle 3 - 4 Tage ein Aliquot vom Zellkulturüberstand genommen, die RNA isoliert und mittels RT-qPCR analysiert. Es zeigte sich, dass das durch das RGS hergestellte Virus über einen Zeitraum von 24 Tagen ein vergleichbares Replikationsverhalten aufweist wie der originale HEV-Stamm (alle p-Werte des ungepaarten, heteroskedastischen, studentischen T-Tests $> 0,05$ (Daten nicht gezeigt); Abbildung 21).

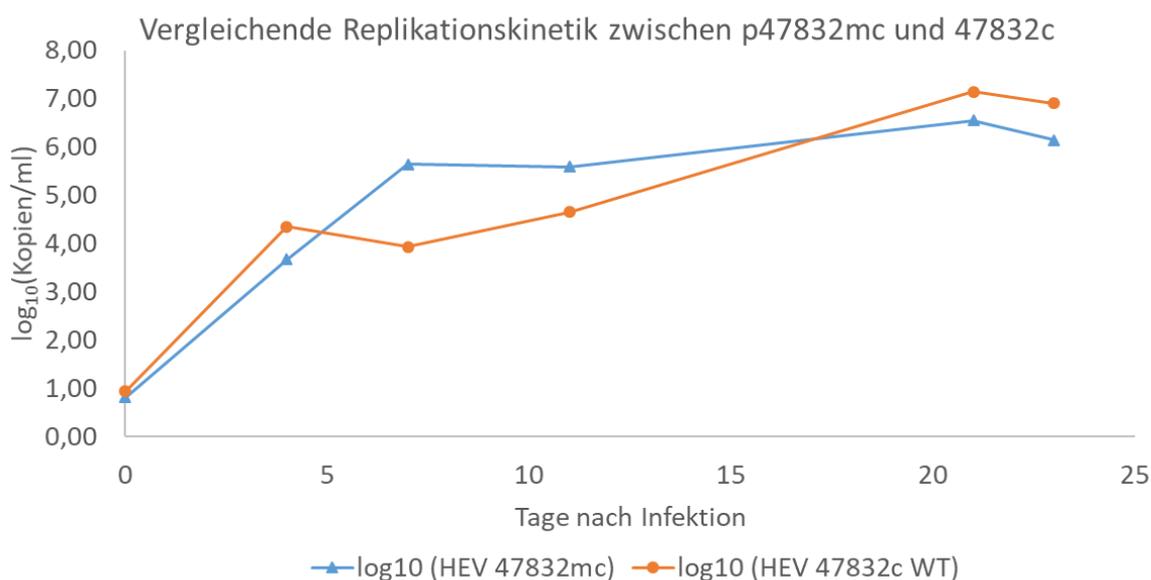


Abbildung 21: Vergleich der Replikation des mittels RGS generierten Virus p47832mc mit dem originalen Virusstamm

A549/D3-Zellen wurden mit gleicher Menge infektiöser Viren infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben der Zellkulturüberstände genommen und mittels RT-qPCR auf HEV-RNA untersucht. Die einzelnen Messpunkte stellen Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten dar.

Johne *et al.* haben im Jahr 2013 eine persistent infizierte A549-Zelllinie beschrieben, welche das Virus 47832c kontinuierlich in den Überstand abgibt und welche in den vorangegangenen Versuchen schon als Kontrollen eingesetzt wurden [76]. In einem weiterführenden Schritt wurde versucht, eine ähnliche persistent infizierte Zelllinie aus A549/D3-Zellen mit Hilfe des durch RGS generierten Virus p47832mc zu etablieren und mit der vorherigen Zelllinie zu vergleichen.

Die konfluenten A549/D3-Zellen wurden mit 1 ml Transfektionsüberstand der mit p47832mc transfizierten BSR-T7/5-Zellen bzw. mit 1 ml Zellkulturüberstand der mit dem originalen HEV-Stamm persistent infizierten A549-Zellen infiziert und zwei Wochen inkubiert. Anschließend

wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 umgesetzt. Weitere Umsetzungen erfolgten dann im einwöchigen Turnus immer 1:2. Eine Analyse der Zellen erfolgte nach der zweiten und nach der vierten Zellpassage mittels IFT. Es zeigte sich, dass das durch das RGS hergestellte Virus eine ähnliche Dichte infizierter Zellen im Zellrasen aufwies wie der originale Virusstamm (Abbildung 22A).

Weiterhin wurden zu den Zeitpunkten des Umsetzens Aliquots des Zellkulturüberstands genommen und mittels RT-qPCR analysiert. Es zeigte sich, dass die neue Zelllinie zunächst niedrigere HEV-RNA-Mengen produzierte. Ab Tag 35 (entspricht der fünften Zellpassage) waren aber keine Unterschiede mehr feststellbar (p-Werte des ungepaarten, heteroskedastischen, studentischen T-Tests > 0,05 (Daten nicht gezeigt); Abbildung 22B).

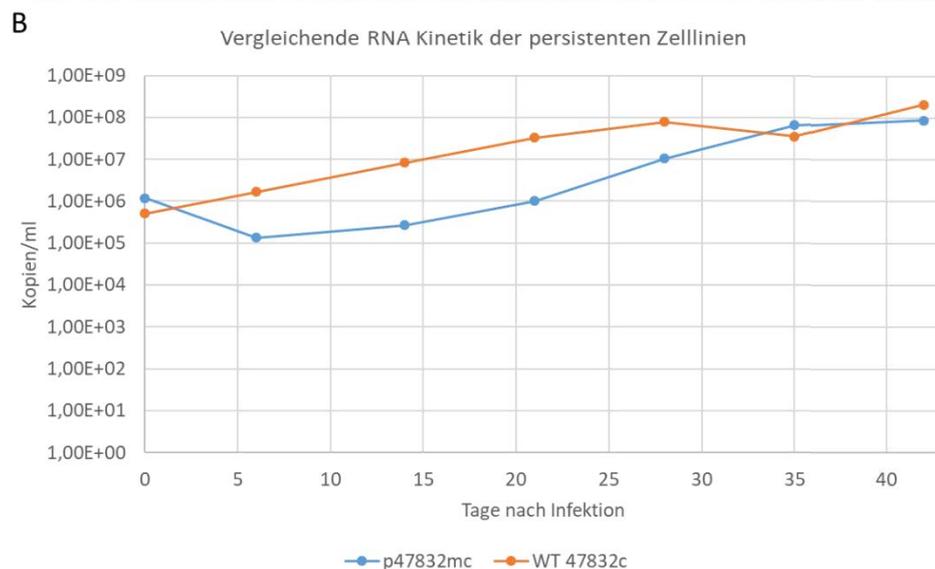
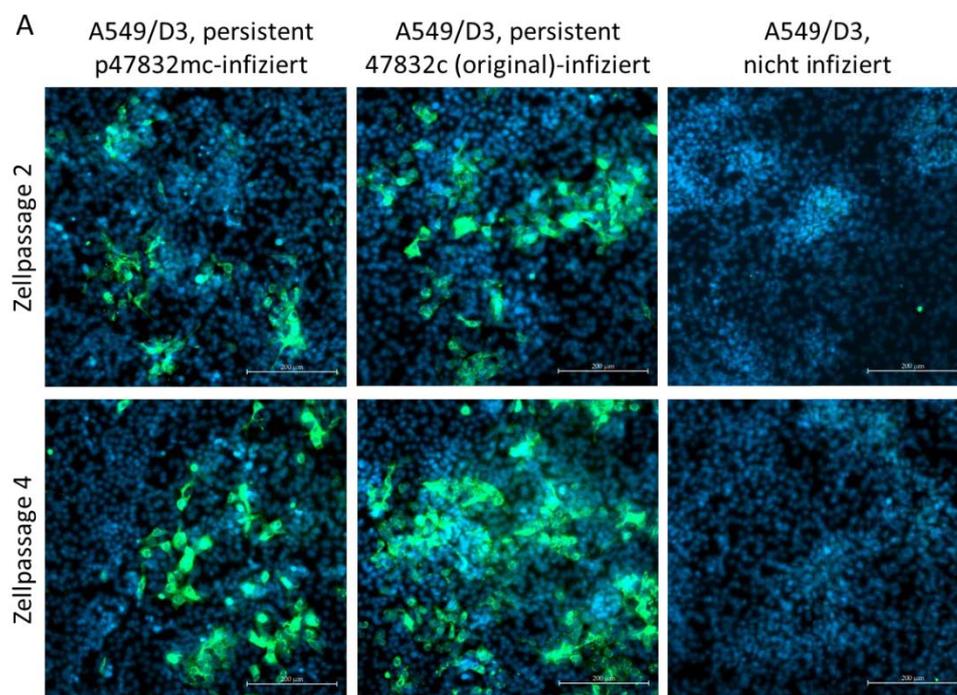


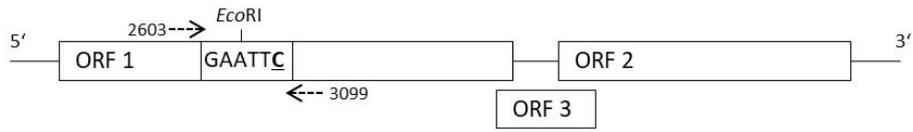
Abbildung 22 (siehe vorherige Seite): Etablierung einer persistent infizierten Zelllinie auf der Basis des mittels RGS hergestellten HEV p47832mc und Vergleich mit der originalen, persistent mit dem HEV-Stamm 47832c infizierten Zelllinie

A: IFT-Analysen mit Zellen der zweiten und vierten Passage. Alle Zellen wurden mit einem anti-HEV-ORF2-Hyperimmunserum und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und in DAPI-haltigem Medium konserviert. Grün: HEV-spezifisches Antigen, Blau: Zellkern. Maßstab: 200 µm. B: RT-qPCR-Analysen von Zellkulturpassagen verschiedener Zellpassagen. Gezeigt sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente.

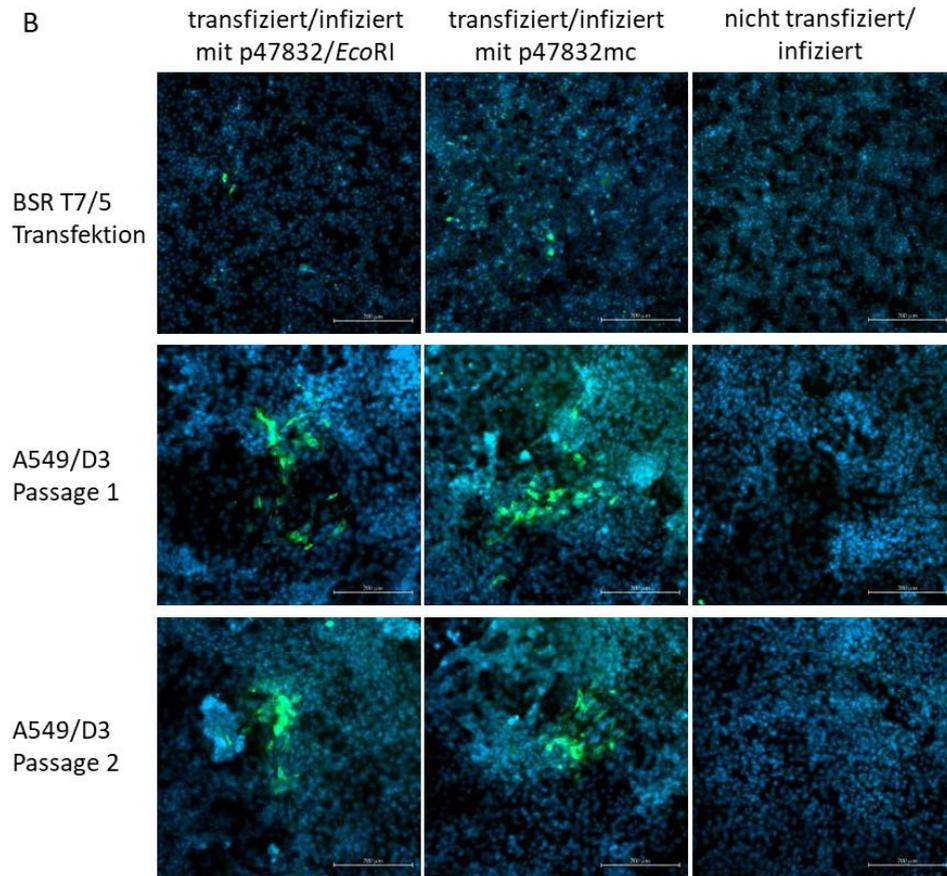
4.4. Einfügen einer Punktmutation in das Virusgenom

Um die Eignung des etablierten RGS zur zielgerichteten Mutagenese zu demonstrieren, wurde im Bereich der Insertion die stille Nukleotidmutation T2754C (Aminosäure F918F im ORF1) eingefügt, wodurch eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym *EcoRI* generiert werden sollte (Abbildung 23A). Das angewendete Klonierungsschema ist im Methodenkapitel 3.13 (Seite 40) beschrieben. Das daraus resultierende Plasmid p47832/*EcoRI* wurde anschließend vergleichend zum Plasmid p47832mc in BSR-T7/5-Zellen transfiziert und anschließend zweimal auf A549/D3-Zellen passagiert. IFTs der BSR-T7/5- und A549/D3-Zellen zeigten positiv transfizierte bzw. infizierte Zellen, wodurch nachgewiesen wurde, dass auch das Plasmid p47832/*EcoRI* infektiöse Viruspartikel generieren kann (Abbildung 23B). Die Analyse des Genoms des genetisch veränderten Virus durch RNA-Isolation vom Zellkulturüberstand der ersten Passage, RT-PCR und anschließender *EcoRI*-Restriktion zeigt das Vorhandensein der eingefügten Restriktionsschnittstelle (Abbildung 23C). Hierdurch konnte nachgewiesen werden, dass das entwickelte RGS erfolgreich zur gezielten Mutagenese verwendet werden kann.

A



B



C

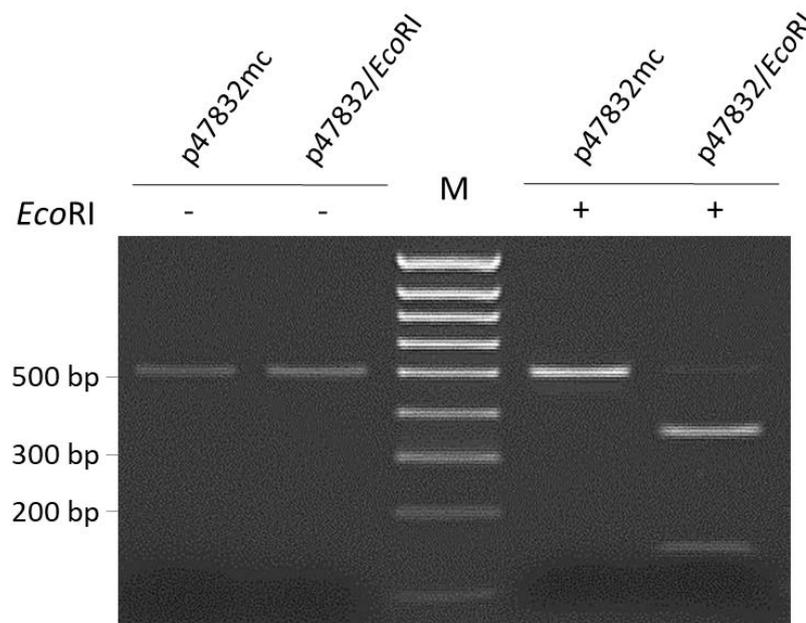


Abbildung 23 (siehe vorherige Seite): Einfügen einer stillen Punktmutation in das Virusgenom von HEV mittels des entwickelten RGS

A: Schematische Darstellung der Position der stillen Mutation T2754C im Plasmid p47832/*EcoRI*, welche zur Generierung einer *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle *EcoRI* führt. Die Bindestellen der Primer 2603-F und 3099-R, welche für die Amplifikation der Virus-RNA in der RT-PCR verwendet wurden, sind ebenfalls dargestellt. B: IFTs mit transfizierten BSR-T7/5-Zellen bzw. infizierten A549/D3-Zellen der ersten und zweiten Passagen. Alle Zellen wurden mit einem anti-HEV-ORF2-Hyperimmenserum und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und in DAPI-haltigem Medium konserviert. Grün: HEV-spezifisches Antigen, Blau: Zellkern. Bei den BSR T7/5-Zellen konnten sowohl beim Virus p47832mc als auch bei der *EcoRI*-Mutante p47832/*EcoRI* vereinzelte, positiv transfizierte Zellen detektiert werden. In der ersten und zweiten Passage der Zellkulturüberstände auf A549/D3-Zellen zeigten sich sowohl bei p47832mc als auch bei der *EcoRI*-Mutante p47832/*EcoRI* typisch ausgeprägte HEV-Foci im Zellrasen. Maßstab: 200 µm. C: *EcoRI*-Restriktionsanalyse von RT-PCR-Produkten, welche mit den Primern 2603-F und 3099-R aus Virus-RNA der ersten Passage auf A549/D3-Zellen amplifiziert wurden. Die mittels RGS hergestellten Viren p47832mc und p47832/*EcoRI* wurden miteinander verglichen. M = DNA-Standard *Hyperladder IV*.

4.5. Analyse der Insertion im Genom des HEV-Stammes 47832c durch Deletionen

Für den HEV-Stamm 47832c ist beschrieben, dass im Bereich der hypervariablen Region (HVR) eine charakteristische, 186 bp lange Insertion existiert [76]. Diese Insertion setzt sich zusammen aus zwei Teilbereichen, die Duplikationen jeweils verschiedener HEV-Genomteile darstellte (siehe auch Abbildung 11). Insertionen in der HVR von HEV werden oft für eine verbesserte Replikation in Zellkultursystemen verantwortlich gemacht. Um diese Hypothese für den Stamm 47832c zu überprüfen, wurde mit Hilfe des RGS die Insertion komplett oder teilweise deletiert. Der Leserahmen blieb dabei aber unverändert (Abbildung 24).

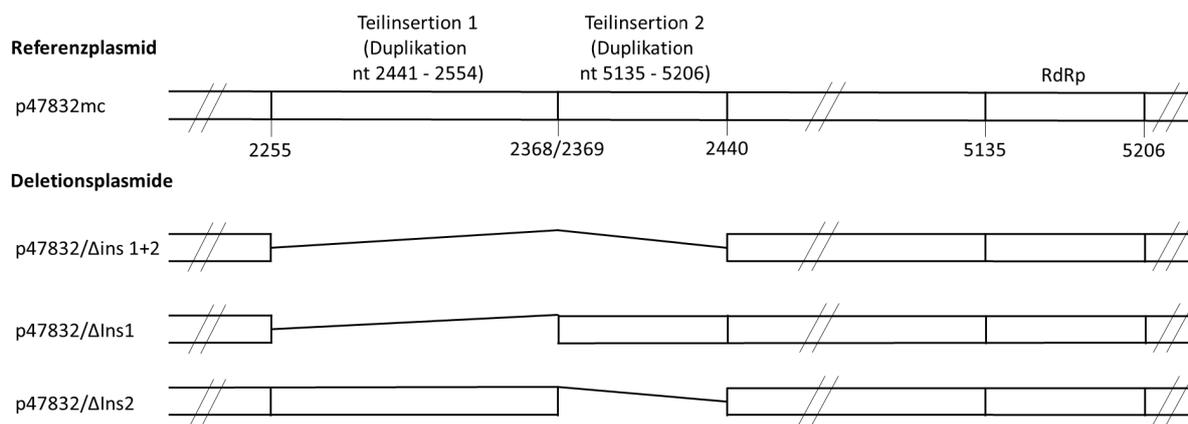


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Insertion im HVR-Bereich des ORF1 des Plasmids p47832mc und die per RGS veränderten Plasmidvarianten mit kompletter oder teilweiser Deletion der Insertion

Das ursprüngliche Plasmid p47832mc beinhaltet die vollständige Insertion mit dem vorderen 114 bp und dem dahinter folgenden 72 bp langen Teilstück der insgesamt 186 bp langen Sequenz in der HVR des ORF1. Beim Plasmid p47832/ΔIns 1+2 wurde die 186 bp lange Sequenz vollständig deletiert. Im Plasmid p47832/ΔIns1 ist das vordere Teilstück mit 114 bp deletiert. Die hinteren 72 bp der Insertion verbleiben im Plasmid. Im Plasmid p47832/ΔIns2 ist das hintere Teilstück mit 72 bp deletiert. Die vorderen 114 bp der Insertion verbleiben im Plasmid.

Die hergestellten Deletionsplasmide wurden nach dem optimierten Protokoll in BSR-T7/5-Zellen transfiziert und danach auf A549/D3-Zellen passagiert. Im IFT konnten für die Deletionsmutanten weder nach der ersten noch nach der zweiten Passage auf A549/D3-Zellen typische HEV-Foci detektiert werden (Abbildung 25). Auch eine RT-qPCR zeigte keine Vermehrung von Virus-RNA während der Passagen (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Vorhandensein beider Teilstücke der Insertion für eine effiziente Virusvermehrung nötig ist.

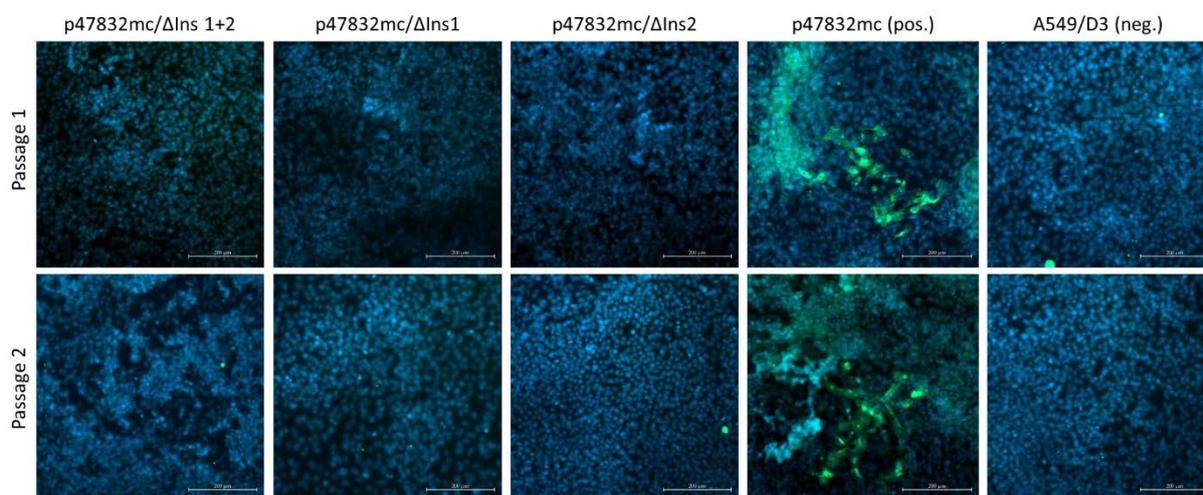


Abbildung 25: IFT zur Analyse der Bildung infektiöser HEV-Partikel durch Plasmide mit Deletionen in der HVR

IFT von A549/D3-Zellen, welche mit Transfektionsüberständen (= erste Passage) bzw. den Zellkulturüberständen der Passage 1 (= zweite Passage) infiziert wurden. Alle Zellen wurden mit einem anti-HEV-ORF2-Hyperimmenserum und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und in DAPI-haltigem Medium konserviert. Grün: HEV-spezifisches Antigen, Blau: Zellkern. Weder in der ersten noch in der zweiten Passage konnten bei den Zellen, die mit den Deletionsmutanten infiziert wurden, typische HEV-Foci detektiert werden. Als Positivkontrolle (pos.) wurden A549/D3-Zellen mit p47832mc-virushaltigen Zellkulturüberständen infiziert. Als Negativkontrolle dienten nicht-infizierte A549/D3-Zellen. Maßstab: 200 µm.

Für das p47832mc-Virus konnte in einem vorherigen Versuch (siehe Ergebniskapitel 4.3, ab Seite 63) erfolgreich eine persistent infizierte Zelllinie etabliert werden. Analog dazu sollte in einem identischen Ansatz auch für die Deletionsmutanten versucht werden, persistent infizierte Zelllinien zu etablieren.

Im Falle der Mutanten p47832/ΔIns 1+2 und p47832/ΔIns1 konnten sowohl nach der zweiten als auch nach der vierten Passage keine Foci im IFT detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich konnten bereits am Ende der ersten Passage keine HEV-Genomkopien mehr mittels

RT-qPCR detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden die Etablierungen dieser persistenten Zelllinien erfolglos eingestellt.

Demgegenüber konnte bei der Mutante p47832/ Δ Ins2 über sechs Passagen hinweg kontinuierlich geringe Mengen an RNA (ca. 10^4 - 10^5 Kopien/ml) in der RT-qPCR detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Zur Überprüfung, ob es sich um die p47832/ Δ Ins2-Deletionsmutante handelte, wurde zunächst mit isolierter RNA aus dem Zellkulturüberstand der vierten Passage eine RT-PCR zur Amplifikation der HVR durchgeführt und die Banden im Agarosegel analysiert (Abbildung 26).

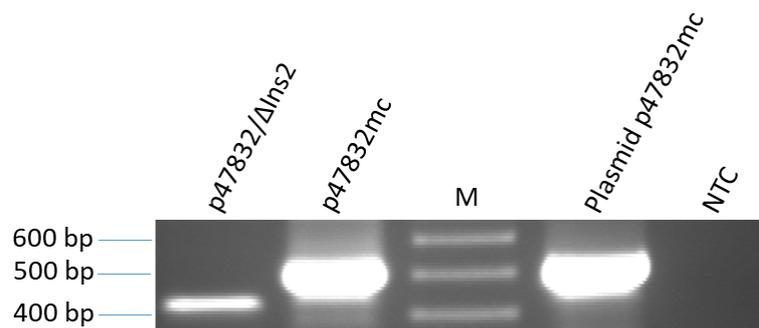


Abbildung 26: Analyse der HVR in persistent mit einer Deletionsmutante infizierten Zellen mittels RT-PCR

Es wurde isolierte RNA aus Zellkulturüberständen der vierten Zellpassage genutzt, welche entweder mit der p47832/ Δ Ins2-Deletionsmutante oder mit dem ursprünglichen Virus p47832mc persistent infiziert waren. Das Amplikon der p47832/ Δ Ins2-Deletionsmutante ist deutlich kürzer (Sollgröße: 433 bp) als das von 47832mc (Sollgröße: 505 bp). Rechts ist eine PCR-Kontrolle mit DNA vom Plasmid p47832mc sowie eine Negativkontrolle dargestellt. M = DNA-Standard *Hyperladder II*.

Das PCR-Produkt, welches aus der isolierten RNA der mit p47832/ Δ Ins2 generierten Deletionsmutante amplifiziert wurde, war deutlich kürzer als das aus der RNA vom Virus p47832mc. Daraus konnte abgeleitet werden, dass es sich vermutlich um die p47832/ Δ Ins2-Deletionsmutante handelt, bei der der N-terminale Teil der Insertion fehlt. Zur weiteren Verifizierung wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert. Die Sequenzierungsergebnisse zeigten, dass bei dem mit p47832/ Δ Ins2 hergestellten Virus wie erwartet der N-terminale Bereich der Insertion fehlt (Abbildung 27).

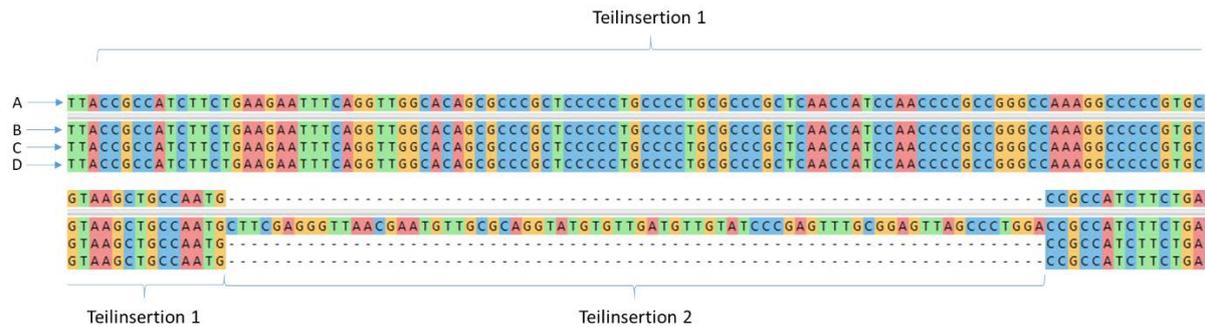


Abbildung 27: Sequenzalignment des mit p47832/ΔIns2 hergestellten Virus und Referenzsequenzen
 A: Konsensus-Sequenz, B: Referenzsequenz p47832mc, C: Referenzsequenz p47832/Δ2Ins, D: Sequenz der aus der vierten Zellpassage isolierten RNA von p47832/Δ2Ins. Die Insertion im hergestellten Virus ist wie erwartet nur noch 114 bp lang. Der 72 bp lange N-terminale Bereich, welcher sich im RdRP-Gen des Ursprungstamms 47832mc wiederholt, fehlt vollständig.

Um herauszufinden, ob es innerhalb der einwöchigen Inkubation der persistent infizierten Zellen zu einer Zunahme der HEV-RNA-Menge im Zellkulturüberstand kommen würde, wurde innerhalb der fünften Passage an den Tagen 0, 4 und 7 ein Aliquot vom Zellkulturüberstand entnommen und mittels RT-qPCR analysiert. Es zeigte sich, dass die HEV-RNA-Menge im Überstand von 8×10^2 Kopien/ml am Tag 0 um ungefähr 1,6 \log_{10} -Stufen auf 4×10^4 Kopien/ml am Tag 7 anstieg. Im gleichen Zeitraum stieg die HEV-RNA-Menge im Überstand der Zelllinie, die mit dem ursprünglichen Virus p47832mc infiziert wurde, um etwa das Vierfache stärker an (Daten nicht gezeigt).

Nimmt man die Ergebnisse aus RT-PCR, Sequenzierung und RT-qPCR zusammen, kann man schlussfolgern, dass eine persistent infizierte Zelllinie etabliert wurde, welche langsam, aber kontinuierlich HEV-RNA in den Zellkulturüberstand abgibt, welche nur noch den C-terminalen Teil der 47832c-spezifischen Insertion trägt. Da auch im IFT HEV-typische Foci dieser Deletionsmutante zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden konnten, scheint die Virusreplikation und die Herstellung von Antigen äußerst langsam vonstatten zu gehen. Bei den anderen Deletionsmutanten konnte keinerlei Zeichen einer Replikation festgestellt werden, was auf eine essentielle Funktion dieses getesteten Insertionsteils hindeutet.

4.6. Analyse der Insertion durch Substitution

Die 186 bp lange Insertion wurde weiter charakterisiert, indem die Sequenz gegen gleich bzw. ähnlich lange Sequenzen ausgetauscht wurde. Im Plasmid p47832/SynCod wurde bis auf ein Methionin-Codon jeder Aminosäure der Insertion ein synonymes Codon zugeordnet. Hierdurch bleibt die transkribierte Aminosäure-Sequenz der Insertion erhalten, während die RNA-Sequenz deutlich verändert ist. Beim Plasmid p47832/Frameshift wurde das N-terminale Cytosin an den C-Terminus der Insertion verschoben, wodurch sich die Aminosäuresequenz

der Insertion vollständig veränderte, während die RNA-Sequenz fast identisch war. Der offene Leserahmen blieb aber bestehen (keine Stopp-Codons). Im Plasmid p47832/Ins-Vertausch wurden die N-terminale Teilinsertion 1 und die C-terminale Teilinsertion 2 miteinander vertauscht, ohne den Leserahmen zu verändern. Im Plasmid p47832/S17-174bp wurde anstelle der 186 bp Insertion die 174 bp lange, humane ribosomale S17-Untereinheit eingesetzt. Diese Insertion entspricht einer Insertion, die im HEV-Stamm Kernow-C1 enthalten ist und auf die dessen effizientes Zellkulturwachstum zurückgeführt wird [75]. Beim Plasmid p47832/GFP-186 bp wurde die 186 bp lange Sequenz gegen eine gleich lange, aber nicht verwandte Sequenz (hier: N-terminales Teilfragment eines GFP-Gen) ausgetauscht, um herauszufinden, ob die Länge der Insertion allein für die effiziente Replikation verantwortlich ist (schematische Darstellung aller Substitutionsplasmide: Abbildung 28).

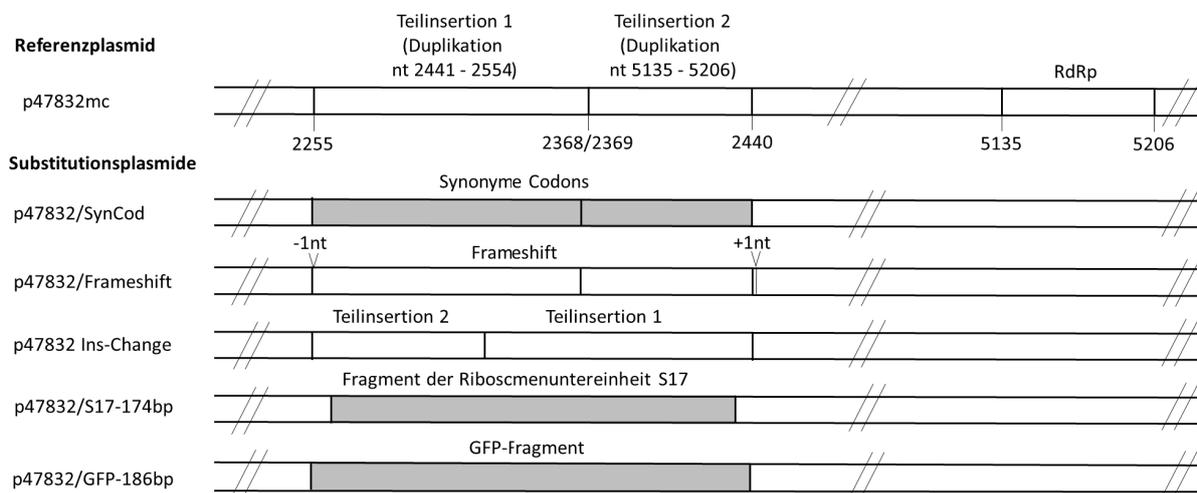


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Insertion in der HVR des HEV-Stamms 47832c, wie sie im Plasmid p47832mc und in den Substitutionsmutanten aufgebaut ist

Das ursprüngliche Plasmid p47832mc beinhaltet die vollständige Insertion mit dem vorderen 114 bp und dem dahinter folgenden 72 bp langen Teilstück der insgesamt 186 bp langen Sequenz in der HVR des ORF1. Bei den Mutanten wurden entweder die Nukleotidsequenz (p47832/SynCod) oder die Aminosäuresequenz (p47832/Frameshift) verändert, die beiden Insertionsteile miteinander vertauscht (p47832/Ins-Vertausch) oder eine nicht verwandte Sequenz eingefügt (p47832/GFP-186bp, p47832/S17-174bp).

Alle Substitutionsplasmide wurden nach dem optimierten Protokoll in BSR-T7/5-Zellen transfiziert und danach auf A549/D3-Zellen passagiert. Es wurde erneut am Ende der zweiten und vierten Passage mit IFT und RT-qPCR getestet.

Bei der Mutante p47832mc/SynCod konnten sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Passage typische HEV-Foci im IFT detektiert werden. Alle anderen Substitutionsmutanten blieben im IFT negativ bis zum Ende der zweiten Passage (Abbildung

29A). Für die Analyse mittels RT-qPCR wurden von beiden Passagen jeweils an den Tagen 0, 7 und 14 Proben vom Zellkulturüberstand entnommen und die RNA isoliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutante p47832/SynCod vergleichbar über zwei Passagen replizierte wie das ursprüngliche Virus p47832mc. Alle anderen Substitutionsmutanten zeigten keine ansteigenden RNA-Mengen und waren spätestens am Ende der zweiten Passage nicht mehr detektierbar (Abbildung 29B).

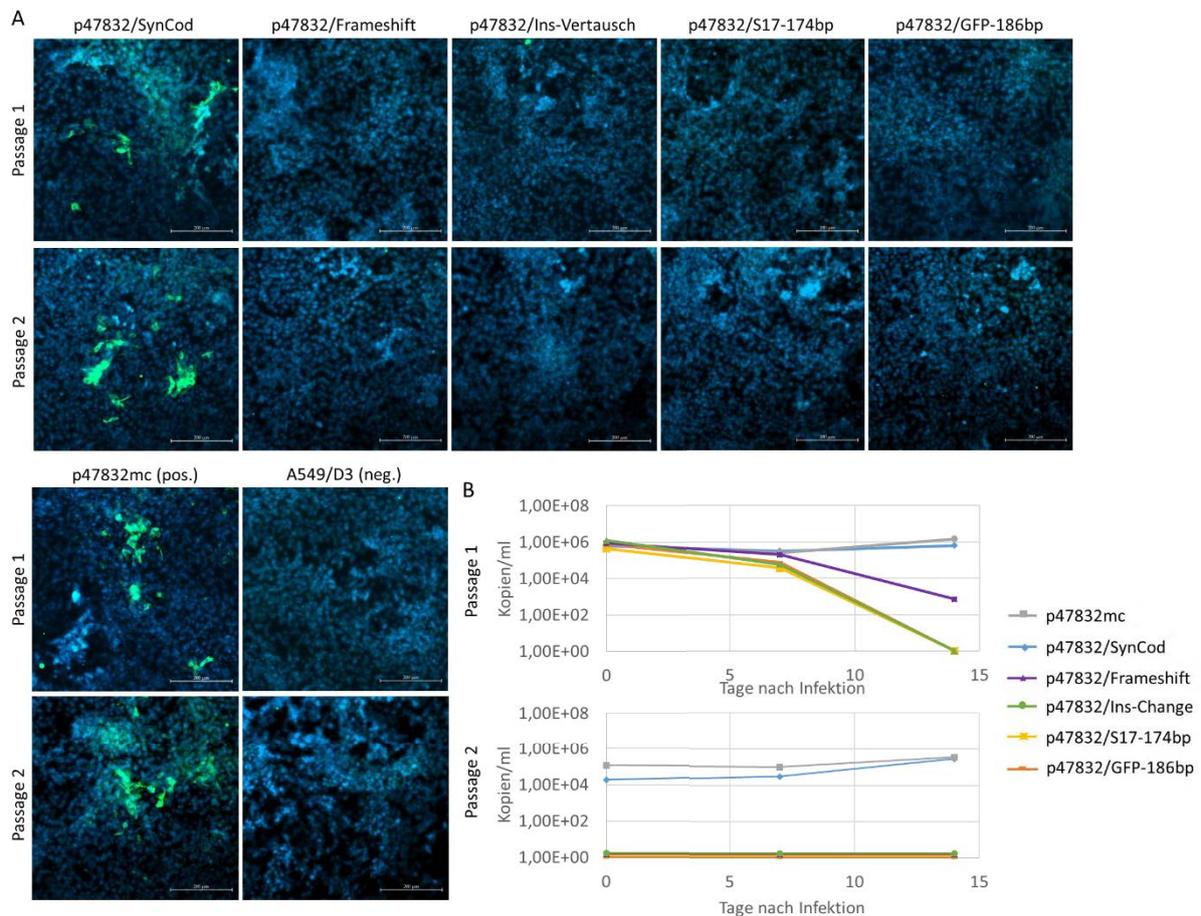


Abbildung 29: Analyse der Bildung infektiöser HEV-Partikel durch Plasmide mit Substitutionen in der HVR mittels IFT und RT-qPCR

A: IFT von A549/D3-Zellen, welche mit Transfektionsüberständen (= erste Passage) bzw. den Zellkulturüberständen der ersten Passage (= zweite Passage) infiziert wurden. Alle Zellen wurden mit einem antiHEV-ORF2-Hyperimmunserum und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und in DAPI-haltigem Medium konserviert. Grün: HEV-spezifisches Antigen, Blau: Zellkern. Die Zellen, die mit Überständen infiziert wurden, welche die p47832/SynCod-Mutante enthielten, zeigten sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Passage charakteristische HEV-Foci. Bei den übrigen Substitutionsmutanten konnten keine solcher typischen HEV-Foci detektiert werden. Maßstab: 200 µm. B: RT-qPCR von Zellkulturüberständen der Substitutionsmutanten und des ursprünglichen Virus p47832mc (Darstellung von Mittelwerten zweier unabhängiger Experimentreihen).

Auch für die Substitutionsmutanten wurde versucht, persistent infizierte Zelllinien zu entwickeln. Bis auf die Mutante p47832/SynCod konnte bei keiner der anderen Mutanten nach der zweiten oder vierten Passage Foci im IFT detektiert werden. Die Etablierung der entsprechenden Zelllinien für diese im IFT negativen Mutanten wurde daraufhin erfolglos eingestellt (Daten nicht gezeigt). Im Fall der Mutante p47832/SynCod konnten nach der vierten Zellpassage vergleichbar viele HEV-typische Foci im IFT detektiert werden wie beim Virus p47832mc (Abbildung 30A). Die RNA dieser Passage wurde isoliert, mittels RT-PCR die HVR amplifiziert und das entsprechende PCR-Produkt sequenziert. Es zeigte sich, dass die isolierte RNA der Mutante p47832/SynCod alle erwarteten Codonaustausche in der Insertionssequenz besitzt (Abbildung 30B).

Insgesamt zeigten die Experimente, dass nur Mutanten mit unveränderter Aminosäure-Sequenz der Insertion effizient replizierende Viren bilden. Andere Aminosäure-Sequenzen führten selbst bei ansonsten identischen RNA-Sequenzen nicht zu replikationsfähigen Viren.

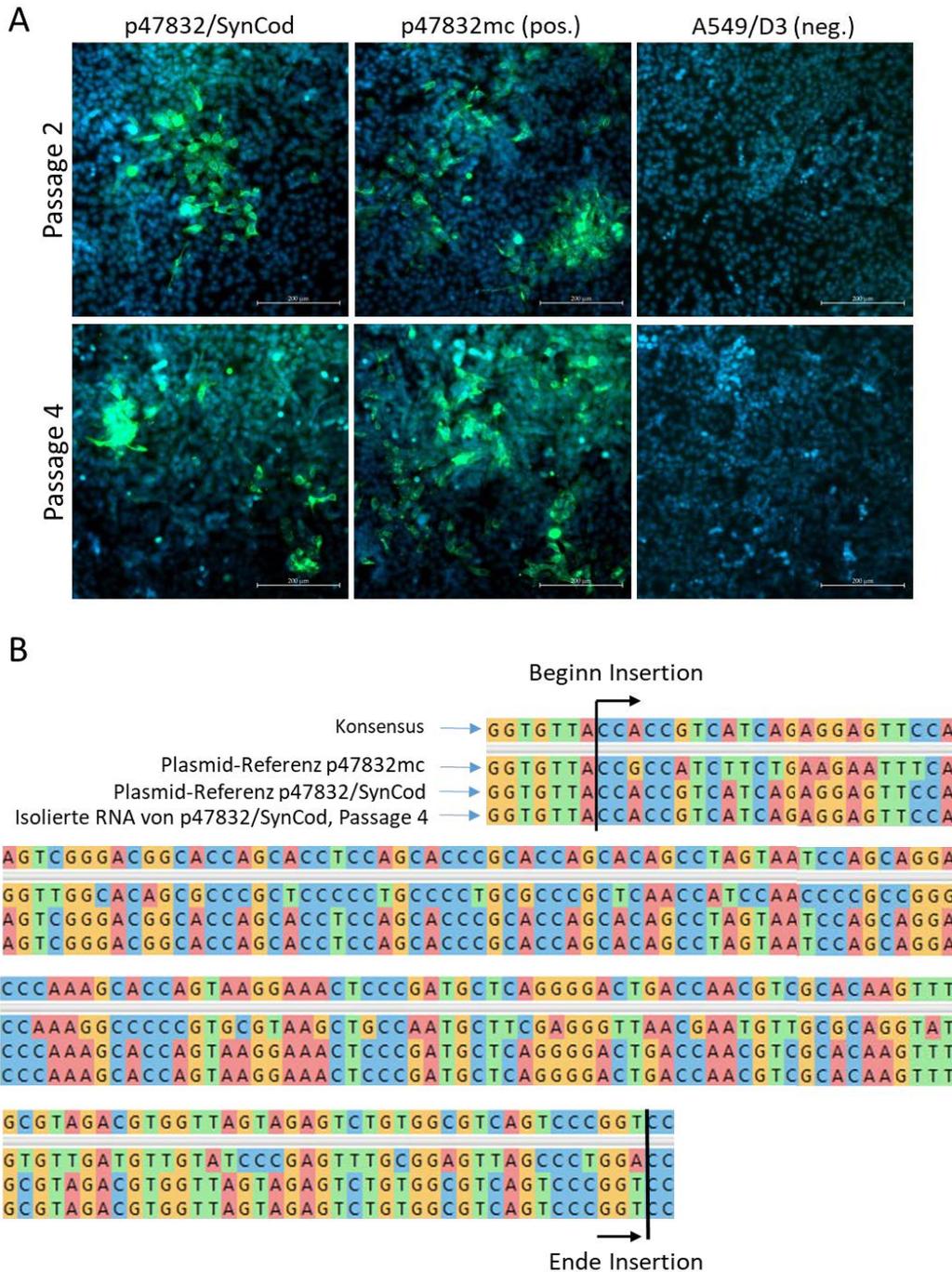


Abbildung 30: Etablierung einer persistent mit der Substitutionsmutante p47832/SynCod infizierten Zelllinie

A: Ein IFT wurde sowohl am Ende der zweiten als auch am Ende der vierten Passage durchgeführt. Alle Zellen wurden mit einem anti-HEV-ORF2-Hyperimmunsereum und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und in DAPI-haltigem Medium konserviert. Grün: HEV-spezifisches Antigen, Blau: Zellkern. Die Dichte der infizierten Zellen in der Zelllinie, die mit der p47832/SynCod-Mutante hergestellt wurde, war sowohl in der zweiten als auch in der vierten Passage vergleichbar mit der Dichte infizierter Zellen in der Zelllinie, welche mit dem Virus p47832mc hergestellt worden war. Maßstab: 200 μ m. B: Am Ende der vierten Passage wurde RNA isoliert, mittels RT-PCR die HVR amplifiziert und die PCR-Produkte sequenziert. Das Sequenzialignment zeigt, dass die RNA der Substitutionsmutante p47832/SynCod die erwartete Codon-modifizierte Insertion trägt.

4.7. Auswirkungen der Mutation G1634R auf die Replikation des HEV-Stamms 47832c

Debing *et al.* beschrieben im Jahr 2014 die Aminosäuremutation G1634R im Stamm Kernow-C1 p6, welche zu einer verbesserten Replikationseffizienz des Virus in Zellkulturen führte [130]. Um zu überprüfen, ob diese Aminosäuresubstitution einen ähnlichen Effekt beim Stamm 47832c zeigen würde, wurde die Mutation mittels RGS an die korrespondierenden Stellen im Genom eingefügt. Während beim Stamm Kernow-C1 p6 die Mutation nur in der RdRP-Domäne vorkommt, hatte der Stamm 47832c aufgrund dessen Insertion mit einer Duplikation des RdRP-Segments in der HVR die entsprechende Stelle zweimal. Daraus resultierten drei mögliche G/R-Mutanten, die die Mutation entweder in der Insertion der HVR, im RdRP-Gen oder kombiniert an beiden Stellen aufwiesen (Tabelle 37).

Tabelle 37: Übersicht über die G/R-Mutanten und die Position der Mutation im HEV-ORF1

Name der Mutante	Aminosäureposition im HEV-ORF1
p47832/GR-Ins	G784R
p47832/GR-RdRP	G1706R
p47832/GR-Ins+RdRP	G784R und G1706R

Die entsprechenden Plasmide wurden nach dem optimierten Protokoll in BSR-T7/5-Zellen transfiziert und danach auf A549/D3-Zellen passagiert. Die IFTs zeigten nach der ersten Passage bei allen Mutanten HEV-typische Foci, wobei bei der p47832/GR-RdRP-Mutante deutlich mehr Foci detektiert werden konnten als bei den beiden anderen G/R-Mutanten. Am Ende der zweiten Passage konnte nur noch im Falle der p47832/GR-RdRP-Mutante HEV-typische Foci detektiert werden. Die IFTs der beiden anderen Mutanten waren negativ (Abbildung 31A).

In der RT-qPCR wurde sowohl in der ersten als auch in der zweiten Passage nur bei der p47832/GR-RdRP-Mutante eine zum unveränderten Virus p47832mc vergleichbare RNA-Replikation detektiert (jeweils bis ca. 10^6 Kopien/ml). Die RNA-Konzentrationen der Mutanten p47832/GR-Ins und p47832/GR-Ins+RdRP waren mit ca. 5×10^4 Kopien/ml am Ende der ersten Passage um ca. $1,5 \log_{10}$ niedriger. Am Ende der zweiten Passage waren die RNA-Konzentrationen der Mutanten p47832/GR-Ins und p47832/GR-Ins+RdRP mit durchschnittlich $10^2 - 10^3$ Kopien/ml noch geringer und auch nicht in jeder Teilprobe zu detektieren (Abbildung 31B).

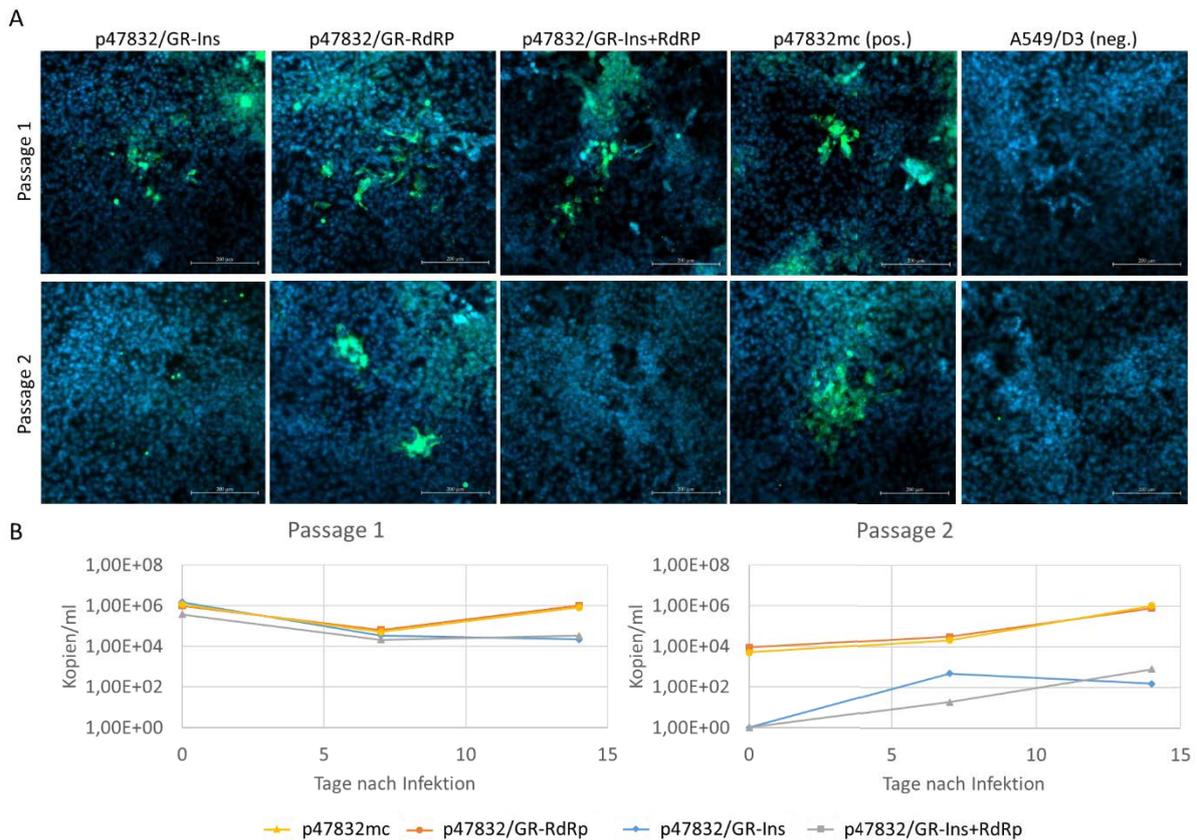


Abbildung 31: Charakterisierung der G/R-Mutanten

A: IFT von A549/D3-Zellen, welche mit Transfektionsüberständen (= erste Passage) bzw. den Zellkulturüberständen der ersten Passage (= zweite Passage) infiziert wurden. Alle Zellen wurden mit einem antiHEV-ORF2-Hyperimmenserum und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und in DAPI-haltigem Medium konserviert. Grün: HEV-spezifisches Antigen, Blau: Zellkern. Die Zellen, die mit p47832/GR-RdRp Mutante infiziert wurden, zeigten sowohl am Ende der ersten als auch am Ende der zweiten Passage HEV-typische Foci. Die p47832/GR-Ins- und die p47832/GR-Ins+RdRp Mutanten zeigten nur nach der ersten Passage sehr wenige Foci und waren am Ende der zweiten Passage negativ. Maßstab: 200 μm . B: RT-qPCR von Zellkulturüberständen der G/R-Mutanten und des ursprünglichen Virus p47832mc (Darstellung von Mittelwerten zweier unabhängiger Experimentreihen).

Auch für die G/R-Mutanten sollte untersucht werden, ob sich entsprechende persistent infizierte Zelllinien herstellen lassen würden. Das Vorgehen war identisch mit den vorherigen Versuchen.

In allen Fällen konnten sowohl nach der zweiten als auch nach der vierten Zellpassage HEV-typische Foci in den D3p-Zelllinien detektiert werden (Abbildung 32A). Eine Sequenzanalyse der RNAs nach der vierten Passage ergab, dass alle G/R-Mutanten die erwarteten Mutationen trugen (Abbildung 32B).

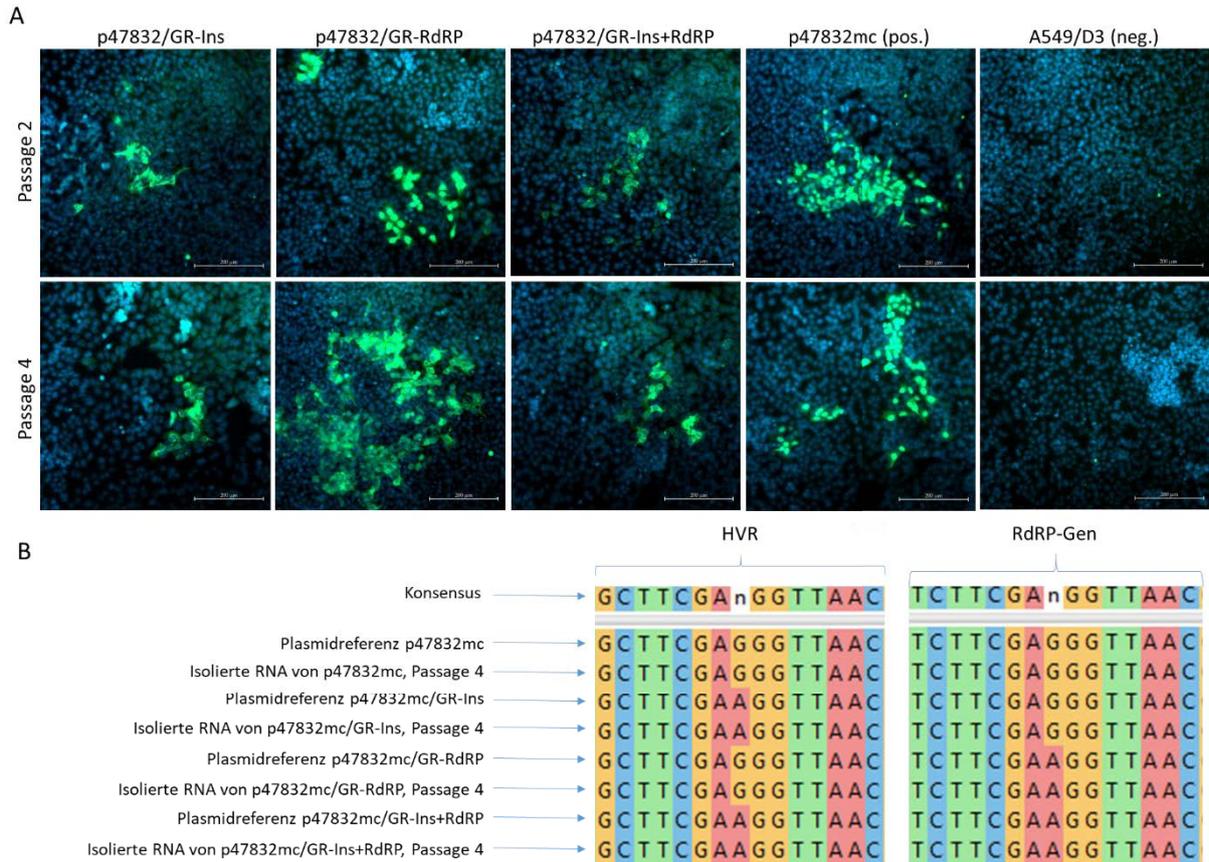


Abbildung 32: Etablierung von persistent infizierten Zelllinien für die G/R-Mutanten

A: Ein IFT wurde sowohl am Ende der zweiten als auch Ende der vierten Zellpassage durchgeführt. Alle Zellen wurden mit einem antiHEV-ORF2-Hyperimmenserum und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und in DAPI-haltigem Medium konserviert. Grün: HEV-spezifisches Antigen, Blau: Zellkern. In alle Fällen konnten sowohl nach der zweiten als auch nach der vierten Passage Foci detektiert werden. Maßstab: 200 µm. B: Am Ende der vierten Passage wurde RNA isoliert, mittels RT-PCR amplifiziert und die PCR-Produkte sequenziert. Das Sequenzalignment zeigt, dass die PCR-Produkte der Überstände die erwarteten Mutationen aufwiesen.

Aus den Versuchen kann geschlussfolgert werden, dass nur die Mutante p47832/GR-RdRP zu effizient replizierendem Virus geführt hat. Die anderen beiden Mutanten bildeten Viren, die sich nur langsam vermehrten und deren Titer durch Passagieren der Zellkulturüberstände deutlich abnahmen. Persistent infizierte Zelllinien konnten aber für diese Mutanten generiert werden, was darauf hinweist, dass die G/R-Mutation in der HVR die Replikationseffizienz deutlich herabsetzt, jedoch nicht vollkommen verhindert.

4.8. Etablierung einer ORF3-Deletionsmutante

Yamada *et al.* etablierten im Jahr 2009 eine ORF3-Deletionsmutante des HEV-Stamms JE03-1760F, indem das dritte ORF3-Startcodon von 3'-ATG-5' zu 3'-GCA-5' mutiert wurde. Die JE03-1760F/ Δ ORF3-Mutante war infektiös- und replikationsfähig und konnte im IFT detektiert werden [170].

Mit Hilfe des RGS sollte überprüft werden, ob eine äquivalente Mutation des ORF3-Startcodons im Stamm 47832c ebenfalls zu vermehrungsfähigen Viren führen und wie ggf. die Mutante im Vergleich zum Wildtypstamm replizieren würde. Mittels eines Alignments wurde überprüft, welches Startcodon das äquivalente ist (siehe auch Abbildung 41). In das Plasmid wurden dann die entsprechenden Mutationen eingefügt, wodurch das Plasmid p47832/ Δ ORF3 entstand.

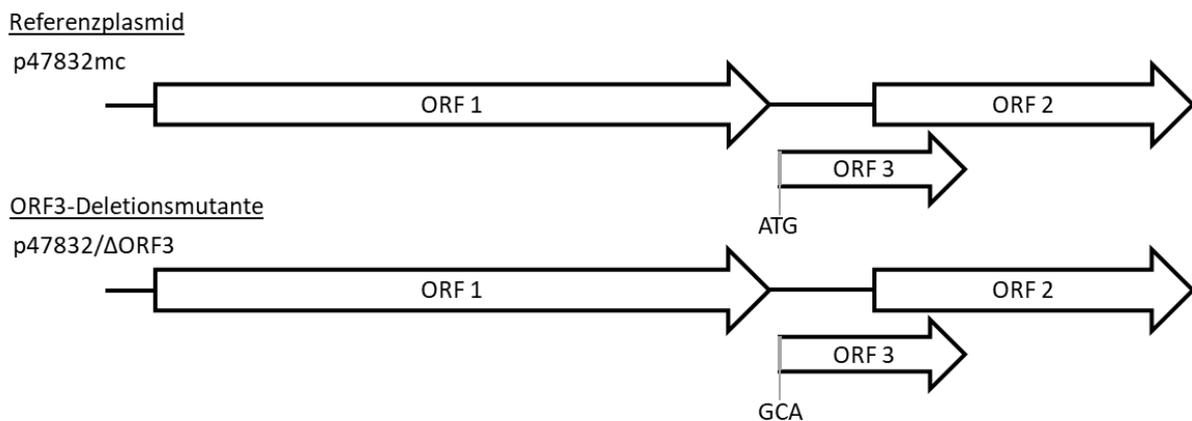


Abbildung 33: Schematische Darstellung des Genoms vom HEV-Stamms 47832c, wie sie im Plasmid p47832mc und in der ORF3-Deletionsmutante aufgebaut ist

Das ursprüngliche Plasmid p47832mc besitzt ein funktionelles ORF3. Bei der ORF3-Deletionsmutanten wurde das funktionelle Startcodon von ATG zu GCA mutiert, wodurch das ORF3 nicht mehr translatiert werden kann.

Der Test der Mutante erfolgte wie beschrieben über Transfektion in BSR-T7/5-Zellen und zwei Passagen auf A549/D3-Zellen. Nach der ersten Passage konnten einige wenige Foci im IFT detektiert werden. Am Ende der zweiten Passage war der IFT für die Mutante p47832/ Δ ORF3 negativ (Abbildung 33A). Für die RT-qPCR wurde in den beiden Passagen wieder jeweils an den Tagen 0, 7 und 14 Proben der Zellkulturüberstände entnommen und die RNA isoliert. Es konnte gezeigt werden, dass die RNA-Menge im Zellkulturüberstand der Mutante p47832/ Δ ORF3 kontinuierlich abnahm und in der zweiten Passage nicht mehr detektierbar war (Abbildung 33B).

Es wurde außerdem versucht, eine persistent infizierte Zelllinie mit p47832/ Δ ORF3 zu etablieren. Es zeigte sich hierbei, dass über einen Zeitraum von 42 Tagen die RNA-Menge im

Überstand der infizierten Zellen kontinuierlich abnahm und spätestens nach diesem Zeitpunkt nicht mehr detektierbar war (Abbildung 33C). Der Versuch der Etablierung einer entsprechenden Zelllinie wurde deswegen eingestellt.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die Mutation des ORF3-Startcodons beim Stamm 47832c zu einem sehr ineffizient replizierenden Virus führte. Die Replikation dieses Virus konnte auch in persistent infizierten Zellen nicht dauerhaft aufrechterhalten werden.

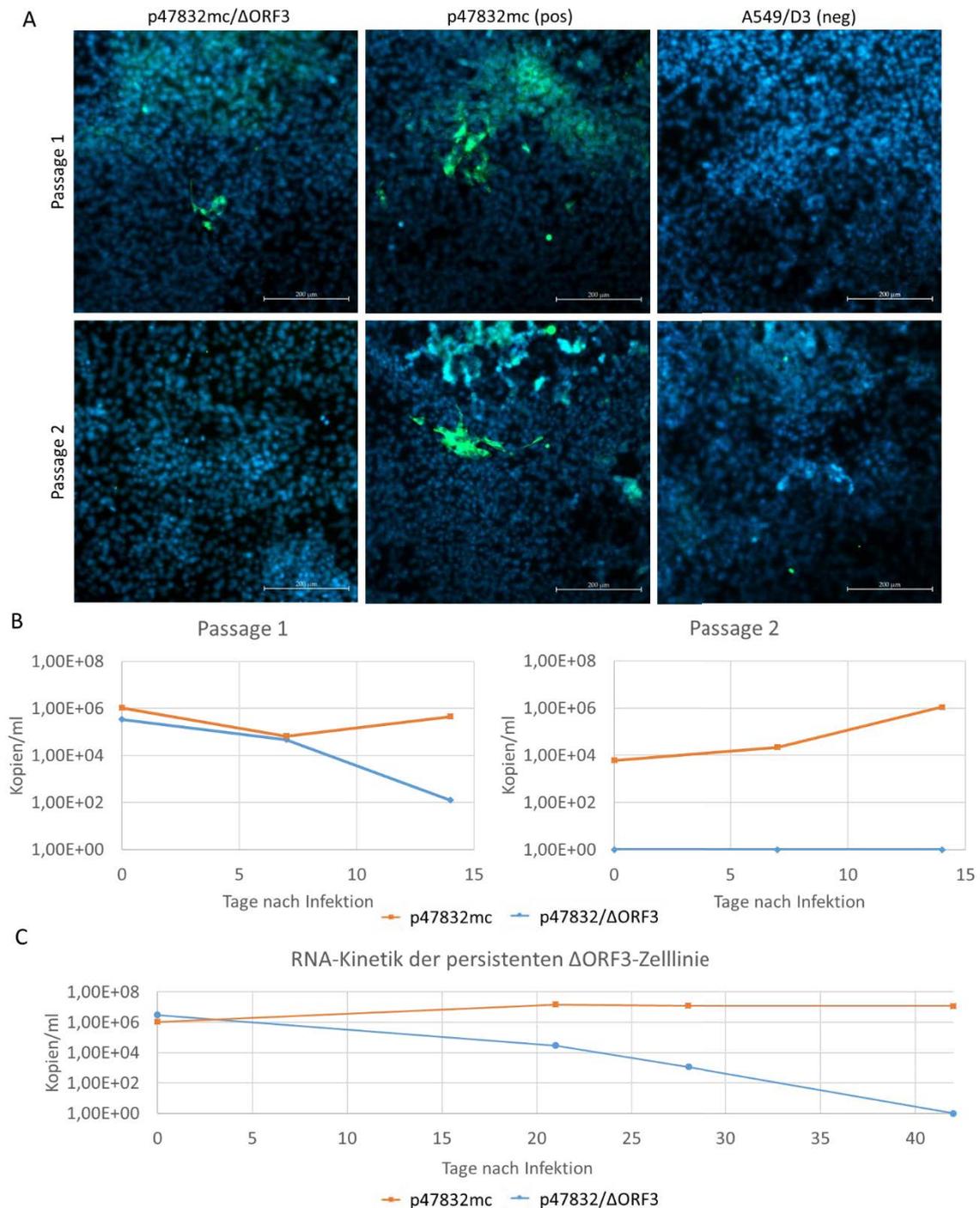


Abbildung 34 (siehe vorherige Seite): Charakterisierung der ORF3-Deletionsmutante

A: IFT von A549/D3-Zellen, welche mit Transfektionsüberständen (= erste Passage) bzw. den Zellkulturüberständen der ersten Passage (= zweite Passage) infiziert wurden. Alle Zellen wurden mit einem antiHEV-ORF2-Hyperimmunserum und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und in DAPI-haltigem Medium konserviert. Grün: HEV-spezifisches Antigen, Blau: Zellkern. HEV-typische Foci konnten für die p47832mc/ Δ ORF3-Mutante nur nach der ersten Passage, aber nicht nach der zweiten Passage detektiert werden. Maßstab: 200 μ m. B: RT-qPCR von Zellkulturüberstand-Proben der ersten und zweiten Passage zur Erstellung einer Replikationskinetik über die ersten beiden Passagen nach Transfektion (Darstellung von Mittelwerten zweier unabhängiger Experimentreihen). C: RT-qPCR Analyse von Zellkulturüberständen einer mit p47832mc/ Δ ORF3 infizierten Zelllinie zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion (Darstellung von Mittelwerten zweier unabhängiger Experimentreihen).

4.9. Vergleichende Wachstums- und Infektiösitätsstudien der replikationsfähigen p47832mc-Mutanten gegenüber dem ursprünglichen p47832mc Virus

Die Mutanten, die in den vorherigen Versuchsreihen als funktional identifiziert wurden waren, wurden herangezogen, um ihre Mutationen im Kontext einer verbesserten, schlechteren oder vergleichbaren Replikation in A549/D3-Zellen gegenüber des Virus p47832mc einzuschätzen. Dazu wurden die Zellkulturüberstände der ersten und zweiten Passage jeweils mittels Virustitration auf gleiche Titer (70 FFU/ml) eingestellt und damit frische A549/D3-Zellen in 6-Well-Platten infiziert. Die Inkubation erfolgte jeweils über 21 Tage, alle 3 - 4 Tage wurden Aliquots der Zellkulturüberstände entnommen, die RNA isoliert und mittels RT-qPCR analysiert (Abbildung 35). Nach 21 Tagen, am Ende der Inkubation, erfolgte außerdem ein IFT. In allen Wells mit Ausnahme der Negativkontrolle konnten HEV-typische Foci gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Die Resultate der RT-qPCR zeigten, dass die beiden Mutanten p47832/GR-RdRP und p47832/SynCod, verglichen mit p47832mc, keine signifikanten Unterschiede (alle p-Werte des ungepaarten, heteroskedastischen, studentischen T-Tests > 0,05 (Daten nicht gezeigt)) im Wachstumsverhalten zeigten (Abbildung 35).

Aus diesem Versuch lässt sich zum einen schlussfolgern, dass die Veränderung der RNA-Sequenz in der Insertion ohne Veränderung der Aminosäuresequenz keinen Einfluss auf das Replikationsverhalten des Virus hat. Zum anderen zeigt sich auch, dass die G/R-Mutation im RdRP-Gen zu keiner Verbesserung der Replikationseffizienz führt.

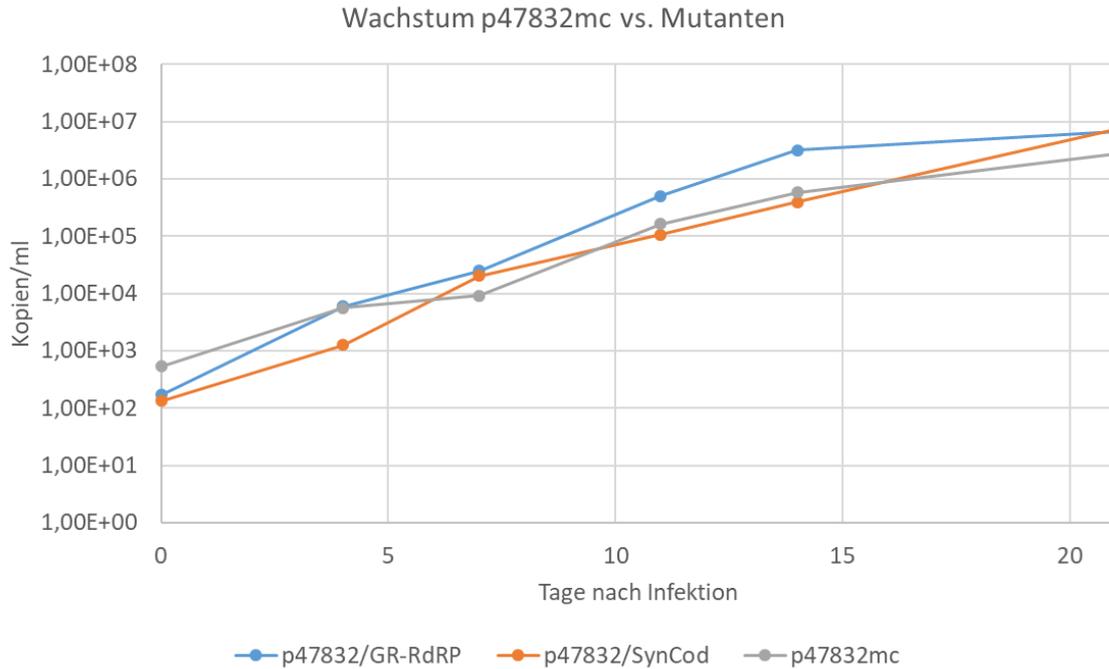


Abbildung 35: Vergleichende Wachstumskinetik der p47832mc Mutanten mit p47832mc über 21 Tage auf A549/D3-Zellen

Alle 3 - 4 Tage wurde ein Aliquot des Zellkulturüberstandes genommen, RNA isoliert und mittels RT-qPCR analysiert. Es zeigte sich, dass die Mutanten p47832/GR-RdRP und p47832/SynCod ähnliche Replikationskinetiken aufweisen wie p47832mc (Darstellung von Mittelwerten zweier unabhängiger Experimentreihen).

5. Diskussion

5.1. Etablierung eines Reversen Genetischen Systems für den HEV-Stamm 47832c

Hepatitis E ist eine weltweit verbreitete Lebererkrankung, hervorgerufen durch das Hepatitis-E-Virus (HEV). Da das Virus erst vor vergleichbar kurzer Zeit entdeckt wurde, sind viele Funktionen der Virusproteine und viralen Genomregionen noch unbekannt. Zusätzlich ist das Virus bis auf wenige Ausnahmen nur sehr schwer in Zellkultur vermehrungsfähig und repliziert dann auch nur relativ langsam.

Reverse Genetische Systeme (RGS) sind effektive Werkzeuge zum Studium von Genfunktionen in zahlreichen Organismen. Durch die Möglichkeit, Gene gezielt zu verändern, können Funktionen von Genen sehr effektiv aufgeschlüsselt werden. Andere Mutagenese-Methoden, wie hochenergetische Bestrahlung oder das Verwenden von mutagenen Substanzen, führen in der Regel nur zu ungerichteten Mutationen, welche im Nachhinein erst aufwendig identifiziert werden müssen.

Zu den in der Zellkultur am häufigsten eingesetzten HEV-3-Stämmen gehören die Stämme Kernow-C1 (HEV-3a, USA) und JE03-1760F (HEV-3b, Japan). Zu beiden Stämmen existieren Reverse Genetische Systeme, mit deren Hilfe die Viren auch genetisch verändert werden können [75, 157]. In Deutschland ist der vorherrschende Genotyp jedoch HEV-3c [25]. Zu diesem Genotyp existiert bislang nur der Stamm 47832c, welcher in Zellkultur vermehrungsfähig ist. Isoliert aus einem chronisch infizierten Patienten aus Deutschland, konnte dieser Stamm auf der humanen Lungenkarzinomzelllinie A549 replizieren [76]. Studien zur Stabilität des Virus konnten bereits durchgeführt werden [147, 148]. Gezielte Veränderungen am Genom waren jedoch bis zur Etablierung des in dieser Arbeit beschriebenen RGS nicht möglich.

Für die Konstruktion eines RGS wird der cDNA-Klon vorrangig unter die Kontrolle eines T7-Promoters gestellt. T7-Promotoren sind für gewöhnlich etwas „schwächer“ in ihrer Transkriptionsaktivierung als z. B. CMV-Promotoren, welche mehr Proteine der Transkriptionsmaschinerie rekrutieren können. Dennoch werden T7-Promotoren eingesetzt, da der Transkriptionsstart des kontrollierten Gens unmittelbar hinter der Promotersequenz beginnt und somit eine exakte 5'-Sequenz garantiert. Im Gegensatz dazu beginnt die Transkriptionsmaschinerie bei CMV-Promotoren erst einige Nukleotide *downstream* des Endes der Erkennungssequenz mit der Transkription, was dazu führen könnte, dass der 5'-Bereich eines Virusgenoms nicht vollständig abgelesen wird.

Als Standard in der HEV-basierten Reversen Genetik galt bislang die Linearisierung und *in-vitro*-RNA-Transkription des Volllänge-cDNA-Plasmids, Capping des 5'-Endes und ggf. Polyadenylierung des 3'-Endes der *in-vitro*-RNA und anschließende Transfektion in die Zielzellen bzw. direkte Inokulation in Lebergewebe (Abbildung 36, Pfad 1). Vorteile dieser Methode sind, dass die transfizierten Zellen das Virus generieren und dass das Verhalten des Virus in der Zielzelle oder im Tierversuch direkt studiert werden kann. Zudem können aufgrund der physikalisch-chemischen Eigenschaften von ssRNA im Vergleich zu dsDNA pro Mikrogramm deutlich mehr Genomäquivalente zur Transfektion der Zellen eingesetzt werden, welche entsprechend eine höhere Anzahl an Zellen transfizieren können. Nachteilig ist, dass die umfangreichen Arbeitsschritte im Labor viel Zeit in Anspruch nehmen. Des Weiteren geht bei jedem Schritt vom zirkulären Plasmid bis hin zur gecappten und polyadenylierten *in-vitro*-RNA immer Material verloren. Die Stabilität von ssRNA ist zudem auch deutlich geringer als die von dsDNA, bedingt durch ubiquitär vorkommende RNasen.

Das hier etablierte Protokoll verzichtet gänzlich auf alle *in-vitro* Transkriptions- und Modifikationsschritte (Abbildung 36, Pfad 2). Das zirkuläre Plasmid wird direkt mit zwei Plasmiden, die für das Cappingenzym des Vacciniavirus kodieren, in eine Produktionszelllinie transfiziert (hier: BSR-T7/5-Zellen). Als Vorbild wurde das RGS für Rotaviren aus dem Jahr 2017 verwendet [169]. Die BSR-T7/5-Zellen produzieren die RNA und anschließend das Virus. Nach sieben Tagen können die generierten Viren für Infektionsversuche verwendet werden. Vorteil dieser Methode ist die Zeit- und Materialersparnis vor der Transfektion. Zudem ist Plasmid-DNA deutlich unempfindlicher gegenüber Nukleasen als RNA und kann somit länger gelagert werden. Nachteilig ist die noch sehr begrenzte Virus-Ausbeute nach Transfektion. Nach 7 Tagen Inkubation und zusätzlichem Frieren/Tauen konnte bislang im Mittel nur ein Titer von ca. 5×10^2 FFU/ml beim durch RGS generierten Virus p47832mc erreicht werden. Dieser Nachteil wird vermutlich auch dadurch verstärkt, dass die BSR-T7/5-Zellen selber nicht vollständig empfänglich für das Virus sind, sodass sich die generierten Viruspartikel durch Infektion neuer BSR-T7/5-Zellen nicht zusätzlich vermehren können. Ob bereits das Anheften der Viren an die BSR-T7/5-Zellen nicht klappt oder ob der Eintritt in die Zellen zwar gelingt, das Entpacken oder andere primäre Schritte vor der Initiation der Virusgenomreplikation nicht funktionieren, kann an dieser Stelle aber nicht gesagt werden. Neben der nicht vollständigen Empfänglichkeit der BSR-T7/5-Zellen sind vermutlich auch die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Plasmid-DNA für die geringere Ausbeute verantwortlich, da dsDNA-Moleküle größer sind als RNA-Moleküle und somit pro Mikrogramm im Verhältnis zur ssRNA weniger Moleküle für die Transfektion zur Verfügung stehen. Für die Vermehrung der Viruspartikel müssen die generierten Viren auf einer voll empfänglichen Zelllinie, in unserem Fall auf A549/D3 Zellen, weiterpassagiert werden. Die nachfolgenden Infektionsstudien

zeigten aber, dass die Menge an Virus, welche nach der Transfektion gebildet wurde, ausreichte, um A549/D3-Zellen stabil zu infizieren. Ob das generierte Virus auch zur Vermehrung in Tieren oder Menschen fähig ist, wurde in dieser Arbeit nicht überprüft. Eventuell wird zukünftig auch eine Zelllinie identifiziert bzw. generiert, welche voll empfänglich für eine HEV-Infektion ist und die T7-Polymerase exprimiert. Dies könnte die Effizienz bei der Generierung von Viren mit Hilfe dieses Plasmid-basierten RGS deutlich erhöhen.

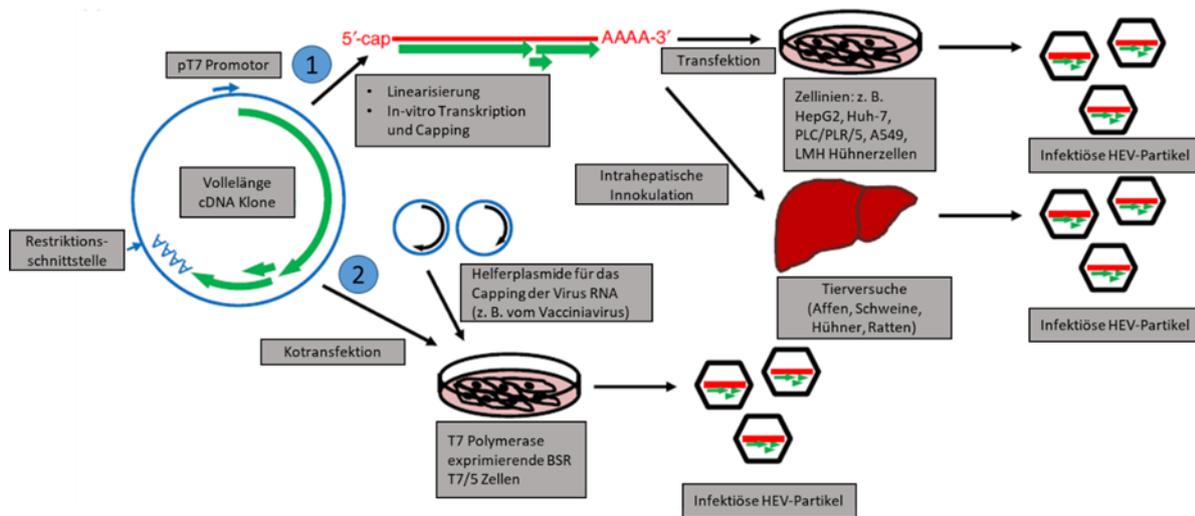


Abbildung 36: Übersicht über die verfügbaren RGS-Strategien für HEV (nach [141])

Der Pfad 1 beschreibt die Standardstrategie bei der Generierung von HEV Partikeln. Das zirkuläre Vollelänge cDNA Plasmid wird linearisiert und per *in-vitro* Transkription in RNA umgeschrieben. Diese *in-vitro* RNA kann für die Transfektion von diversen Zelllinien verwendet werden oder direkt mittels intrahepatischer Inokulation im Tierversuch eingesetzt werden. Sowohl in der Zellkultur als auch in der Leber werden dann infektiöse Partikel gebildet. Der Pfad 2 ist bislang nur für den Stamm 47832c beschrieben. Die zirkuläre Plasmid-DNA wird direkt zusammen mit zwei Helferplasmide für das Capping der viralen RNA in T7-Polymerase-exprimierende BSR-T7/5-Zellen transfiziert. Die Zellen produzieren infektiöses Virus, welches dann zur Infektion weiterer Zellen (z. B. A549) genutzt werden können

Bereits bei der Amplifikation des HEV-Genoms zur Erstellung des Vollelänge-cDNA-Plasmids kann es während der PCR zum unabsichtlichen Auftreten von Mutationen kommen. Um solche Mutationen rückgängig zu machen, mussten bereits in der Vergangenheit mehrere durch PCR generierte Vollelänge-cDNA-Plasmide für unterschiedliche HEV-Stämme korrigiert werden [153, 161]. Auch das hier anfänglich erstellte Plasmid hatte diverse Mutationen, von denen 12 Mutationen zu Aminosäuresubstitutionen geführt hatten, welche einen unbekanntem Einfluss auf die Virusreplikation hatten. Nach Transfektion dieses anfänglichen Plasmids konnten keine Viruspartikel detektiert werden. Das lässt vermuten, dass eine oder mehrere dieser Mutationen einen negativen Einfluss auf die Replikationsfähigkeit des Virus hatten. Alle Aminosäuresubstitutionen wurden daraufhin auf Grundlage der Sequenz vom HEV-

Zellkulturvirus 47832c, Passage 2, korrigiert. Als Basis wurde deshalb die Sequenz von Zellkulturvirus 47832c genutzt, da von diesem Virus bekannt ist, dass es effektiv in Zellkultur replizieren kann. Alle stillen Mutationen, also diejenigen, die zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz führten, wurden nicht korrigiert. Nach Korrektur der Plasmidsequenz konnten nach Transfektion Viren detektiert werden. Welche der 12 Aminosäuremutationen letztendlich für den Replikationsdefekt gesorgt hat, wurde nicht untersucht. Um das herauszufinden, müssten die identifizierten Mutationen schrittweise wieder eingefügt und das Replikationsvermögen der Virusmutanten durch Transfektion und Passagierung überprüft werden.

Wie bereits beschrieben, wurde bei allen HEV-RGS bislang mit *in-vitro* transkribierter RNA gearbeitet. Dass es nun auch gelingt, mit zirkulärer Plasmid-DNA-Viren zu generieren, ist in der HEV-Forschung eine Neuerung. Nach der Einschleusung der DNA mittels Lipofektion zusammen mit den beiden Plasmiden, welche für Untereinheiten des *Vaccinia*-Cappingenzym kodieren, wird, beginnend am T7-Promoter, die DNA abgelesen und in RNA umgeschrieben. Wie weit diese erste Plusstrang-orientierte RNA abgelesen wird, ist nicht bekannt, da hinter der Polyadenylierungssequenz keine Terminatorsequenz existiert. Es gibt in der Sequenz z. B. keine besonders GC-reiche palindromische Sequenz, die die Translation in dem Bereich durch Bildung von Schleifenstrukturen beenden könnte. Weiterhin wurde das Plasmid weder linearisiert, noch wurde die RNA über Ribozyme geschnitten. Möglich ist es deshalb, dass es zunächst zur Generierung unterschiedlich langer Erst-Transkripte kommt. Durch spezifische Primer, die im Detail das 3'-Ende des HEV-Genoms abbilden, konnte dennoch bewiesen werden, dass sich im generierten Virus hinter der Polyadenylierungssequenz keine Plasmidreste befinden. Vermutlich sorgt hier der Virus-eigene Replikationsapparat durch eine noch unbekannt Funktion, die exakte Prozessierung der Virus-RNA zu gewährleisten.

Um zu überprüfen, ob das RGS für Studien zum Virus 47832c genutzt werden kann, mussten die Eigenschaften des generierten Virus p47832mc mit denen des WT-Virus 47832c verglichen werden. Eine Wachstumsanalyse zwischen beiden Viren zeigte ein ähnliches Wachstum. Dennoch war eine etwas langsamere, jedoch nicht signifikante Replikationskinetik bei p47832mc zu sehen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich das benutzte WT-Virus 47832c durch kontinuierliche Mutation aufgrund von vielen vorherigen Passagen bereits besser an die Zellkultur adaptiert hat. Das durch RGS generierte Virus basiert hingegen wie beschrieben auf der Sequenz des Passage-2-Zellkulturvirus, von dem leider keine Proben mehr vorhanden sind. Im Fall des Stamms Kernow-C1 waren ebenfalls mit Passagierung (von p1 bis p6 über mehrere Wochen) einhergehende Mutationen dafür verantwortlich (unter anderem Einfügen der S17-Insertion [75]), dass sich der Stamm effizient in Zellkultur vermehren konnte. Es ist deshalb

nicht ausgeschlossen, dass sich der WT-Stamm 47832c über die Passagen weiter adaptiert hat und deshalb etwas besser wächst als das durch RGS generierte Virus p47832mc. Eine Genomsequenzierung des Stamms 47832c aus einer aktuellen, hohen Passage, könnte Aufschluss über neue und ggf. replikationsfördernde Mutationen geben. Mittels des RGS könnten diese Mutationen dann auf ihren Effekt überprüft werden.

Mit Hilfe von Immunfluoreszenz sollten die durch das Virus p47832mc entstandenen Foci hinsichtlich der horizontalen Virusausbreitung in Zellkultur untersucht werden. Hier zeigten sich keinerlei Unterschiede zu den Foci, die durch das WT-Virus 47832c verursacht wurden. Mittels TEM wurde die Morphologie der Viruspartikel betrachtet. Auch diese Untersuchung brachte keine Unterschiede hervor.

Nimmt man diese Ergebnisse zusammen, lässt sich sagen, dass das in dieser Arbeit etablierte RGS sehr gut geeignet ist, um den HEV-3c-Stamm 47832c zu charakterisieren. Potenziell notwendige Optimierungen, um die Effizienz der Transfektion und Zellkultur zu steigern, könnten in zukünftigen Studien angewendet werden, um die Titer zu erhöhen [140, 143]. Eine mögliche Optimierung auf Genombasis könnte den Bereich des T7-Promoters betreffen. Bezogen auf die Transkriptionseffizienz wurde erst kürzlich erneut über die Wichtigkeit eines oder mehrerer zusätzlicher Guanosine an erster Stelle hinter dem Ende der T7-Promotersequenz berichtet [171]. Der Promoter des RGS, basierend z. B. auf dem HEV-3-Kernow-C1-Stamm, besitzt insgesamt drei zusätzliche Guanosine. Es ist erwiesen, dass dieses Kernow-RGS sehr effizient ist [75]. Das hier etablierte RGS für den Stamm 47832c verzichtet hingegen darauf (Abbildung 37). Möglicherweise ließe sich die Virusausbeute durch eine verbesserte Transkription der transfizierten Plasmid-DNA noch erhöhen, indem solche zusätzlichen Nukleotide eingefügt würden.

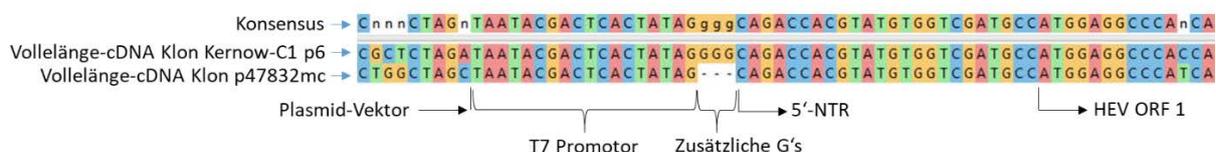


Abbildung 37: Ausschnitt aus den Plasmidsequenzen der Vollelänge-cDNA Klone der Stämme Kernow p6 und p47832mc

Unmittelbar hinter der T7-Promotersequenz folgen im Kernow-C1-Vollelänge-cDNA-Klon drei Guanosine *in-frame*. Im Vollelänge-cDNA-Klon p47832mc fehlen diese. Ein Einfügen der Nukleotide könnte zu einer effizienteren Transkription in den BSR-T7/5-Zellen führen.

Die Funktionalität des RGS zur Durchführung reverser genetischer Studien konnte mittels einer einfachen Punktmutation bestätigt werden. Das hergestellte Virus zeigte innerhalb der HVR im Bereich der ersten 47832c-spezifischen Teilinsertion eine Abfolge von sechs

Nukleotiden (5'-GAA TTT-3'), welche durch die stille Mutation des sechsten Thymidins zu Cytidin zu einer *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle (5'-GAA TTC-3') wurde. Nach erfolgreicher Überprüfung der Funktionalität der Plasmidmutante mittels Transfektion, Passagierung und IFT wurde die RNA der ersten Zellkulturpassage isoliert, die HVR mittels RT-PCR amplifiziert und die erhaltenen PCR-Produkt mittels *EcoRI* geschnitten. Das PCR-Produkt der Mutante p47832/*EcoRI* wurde dabei geschnitten, wohingegen das PCR-Produkt des Virus p47832mc nicht verdaut wurde. Es kann somit geschlussfolgert werden, dass das RGS erfolgreich angewendet werden kann, um replizierende Viren mit gezielten Mutationen im Genom herzustellen.

5.2. Analyse der Insertion in der HVR

Insertionen im HEV-Genom scheinen im viralen Zyklus eine entscheidende Rolle zu spielen. Neben der Tatsache, dass der überwiegende Teil solcher Virusvarianten mit Insertion bislang in chronisch infizierten Patienten gefunden wurden, sind die Insertionssequenzen wahrscheinlich wichtig bei der Adaptation an (neue) Wirte [172]. Insertionen sind aber nicht nur für HEV bekannt. Identifiziert wurden solche Insertionen auch schon beim Hepatitis-C-Virus, humanen Polyomavirus 2, humanen Zytomegalievirus, Porzinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus, Japanischen Enzephalitisvirus oder Respiratorischen Synzytialvirus. Gemein ist allen, dass sie replikationsfördernde Eigenschaften besitzen und zu einem schwereren Krankheitsverlauf bei Infizierten führen [74, 173].

Im weiteren Verlauf dieser Diskussion wird der Stamm Kernow-C1 p6 hauptsächlich zum Vergleich mit dem Stamm 47832c herangezogen, da zu diesem Stamm am meisten publizierte Daten vorliegen. Das Besondere am Stamm Kernow-C1 ist die spezifische Insertion in dessen HVR. Während der Passagierung in der Zellkultur konnte ab der sechsten Passage eine prädominante Spezies mit dieser 174 nt langen Insertion in der HVR detektiert werden, welche nach Sequenzanalysen als Teil des Gens für die humane Ribosomenuntereinheit S17 identifiziert wurde [142]. Der hier untersuchte Stamm 47832c besitzt eine ähnlich lange Insertion in der HVR. Der wesentliche Unterschied ist, dass die 186 bp lange Insertion des Stamms 47832c aus zwei genomeigenen ORF1-Fragmenten besteht. So wiederholen sich die ersten 114 nt der Insertion direkt nachdem die vollständige Insertion endet. Der zweite, 72 nt lange Teil der Insertion hat seinen Ursprung im RdRP-Gen (siehe auch Abbildung 11).

Insertionen in der HVR von HEV werden häufig bei chronisch infizierten Patienten gefunden. So wurde der Kernow-C1 Stamm aus einem 48-jährigen, chronisch infizierten HIV-Patienten mit einer akuten Leberzirrhose in den USA isoliert [75]. Diese Pionierstudie zeigte, dass bereits in der ersten Virus-Passage auf HepG2-Zellen ein geringer Prozentsatz an Viren existierte,

welche die typische S17-Insertion trugen. Konträr dazu ist, dass in der Stuhlprobe, welche als Inokulum benutzt wurde, die Spezies mit der S17-Insertion nicht oder in nicht-detektionsfähigen Mengen enthalten war. Ab der zweiten und allen folgenden Passagen war die Spezies mit der S17-Insertion die am häufigsten vorkommende Spezies. Ein weiteres Virus mit einer ähnlichen Insertion in der HVR wie beim Kernow-C1 ist der HEV-Stamm LBPR000379 [174]. Dieser Stamm wurde aus einem chronisch infizierten Patient, ebenfalls aus den USA, isoliert und trägt ein etwas kürzeres Sequenzfragment des Gens der humanen S19-Ribosomenuntereinheit in dessen HVR, welches nach Sequenzierung auch bereits im Serum detektiert werden konnte. Nach Passagierung wurde die Virusvariante mit der S19-Insertion zur Hauptspezies in der Zellkultur.

Der Stamm 47832, aus dem der Zellkulturstamm 47832c hervorging, wurde aus einem 51-jährigen, immunsupprimierten Mann isoliert, welcher nach einer Nierentransplantation an einer chronischen HEV-Infektion litt [76]. Im Zuge dieser Studie wurde versucht, HEV aus Seren von akut und chronisch infizierten Patienten in der Zellkultur zu vermehren. Nur das Serum des o. g. Patienten war dabei erfolgreich. Das HEV-Genom aus dem Serum wurde sequenziert und die 186 nt lange Insertion war, anders als beim Kernow-C1 Stamm, bereits hier vorhanden. Nach zwei Zellkulturpassagen wurde das HEV-Genom erneut sequenziert. Neben einigen Punktmutationen wurde auch die Insertion wiedergefunden [76].

Vergleicht man die Aminosäure-(AS)-Sequenzen der Insertionen der Stämme Kernow-C1 und 47832c, so zeigt sich eine hohe Diversität beider Sequenzen (Abbildung 38). Dennoch haben beide Insertionen einen ähnlichen replikationsfördernden Effekt.

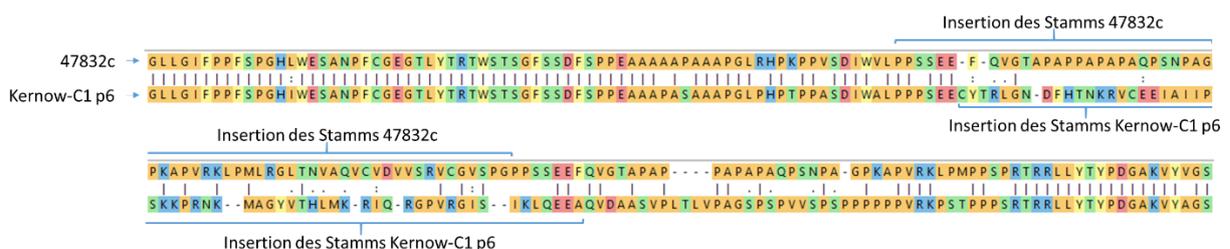


Abbildung 38: Aminosäuresequenz-Alignment eines Bereichs in der HVR, inkl. der Insertionen der HEV-Stämme Kernow-C1 p6 und 47832c

Der Stamm 47832c hat eine 62 AS lange Sequenz bestehend aus zwei Fragmenten des Genom-eigenen ORF1. Die Insertion vom Stamm Kernow-C1 p6 hat eine 58 AS lange Sequenz aus der humanen Ribosomenuntereinheit S17. Die Sequenzen der HVRs der beiden Stämme weisen eine hohe Diversität auf.

In der Studie von Shulka et al. konnte gezeigt werden, dass die Deletion der Insertion beim Stamm Kernow-C1 zur Replikationsdefizienz führt [75]. Eine vergleichbare Studie konnte mit

Etablierung des RGS für 47832c nun auch für diesen Stamm durchgeführt werden. Es zeigte sich, dass auch die Deletion der 47832c-spezifischen Insertion die Replikation des Virus verhindert, was die essentielle Rolle der Insertionen stark unterstreicht. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Deletion der einzelnen Teile der Insertion ebenfalls dazu führen, dass keine infektiösen Viren gebildet werden können, wenn die Passagierung mit den Zellkulturüberständen erfolgte. Nur in einem Fall konnte mittels einer persistent infizierten Zelllinie ein Virus generiert werden, welchem nur der hintere Teil der Insertion fehlte, was darauf schließen lassen könnte, dass die ersten 114 nt bzw. die ersten 38 AS eine größere Rolle spielen als die folgenden 72 nt bzw. 24 AS. Detektiert werden konnte diese Mutante aber nur in der RT-qPCR. Ob auch Kapsidproteine gebildet wurden, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da zu keinem Zeitpunkt Viren mittels IFT detektiert werden konnten, was mindestens auf eine sehr ineffektive Replikation des generierten Virus schlussfolgern lässt. Jedoch weist es darauf hin, dass es nicht unmöglich sein könnte, ein Virus mit einer partiellen Deletion zu erzeugen. Auch wenn es in dem erwähnten Fall nur ein einziges Mal funktioniert hat, könnten auch andere Deletionsmutanten replikationsfähige Viren generieren, die so schwach replizieren, dass sie nicht oder nur sehr selten detektiert werden können. Ob dann noch zusätzliche, spontane Mutationen verantwortlich dafür sind, dass diese Deletionsmutanten erfolgreich, wenn auch deutlich ineffizienter als der WT-Stamm, replizieren können, müssten dann weitere Sequenzanalysen zeigen. Letztendlich müssten alle Versuche aber in mehreren Wiederholungen statistisch belegt werden, was aufgrund der langen Zeit der Etablierung solcher persistent infizierten Zelllinien jedoch sehr aufwendig wäre.

Die Rolle der Länge der 47832c-spezifischen Insertion, dessen Nukleotid- und AS-Sequenz wurde in dieser Arbeit ebenfalls untersucht. Es zeigte sich, dass die AS-Sequenz in der richtigen Abfolge und Länge essentiell wichtig für die Replikation der Viren in der Zellkultur ist, denn nur, wenn die AS-Sequenz nicht verändert wurde und die Länge der Insertion gleich blieb, konnten später auch Viren detektiert werden. Der Austausch der Sequenz gegen ein nicht näher verwandtes Fragment (hier: GFP), die Veränderung der AS-Sequenz durch Veränderung des Insertions-eigenen Leserahmens und auch die Veränderung der Anordnung der beiden Teilinsertionen führten nicht zur Detektion von Viren. Um den Effekt der Insertion des Kernow-C1 p6-Stamms im Virus 47832c zu untersuchen, wurde die S17-Insertion an die korrespondierende Stelle in die HVR vom Stamm 47832c eingefügt und die 47832c-spezifische Insertion dafür entfernt. Auch hier konnten keine Viren detektiert werden. Das zeigt, dass die Wirkung der Insertion des Stamms 47832c sehr spezifisch ist und eine Insertion mit gleicher replikationsfördernder Eigenschaft bei einer anderen Virusspezies nicht denselben Effekt beim Virus 47832c hat. In einem zukünftigen Schritt müsste überprüft werden, ob im

Umkehrschluss die 47832c-spezifische Insertion einen replikationsfördernden Effekt auf den Stamm Kernow-C1 p6 hat oder ob auch hier die Virusreplikation verhindert wird. Interessanterweise zeigt sich bei einem ähnlichen Experiment mit dem GT1-Stamm Sar55, dass das Einfügen der S17-Insertion zwar zu replikationsfähigen Viren bei diesem GT1-Stamm führt, es jedoch nicht zu einer Verbesserung der Replikation kommt [175], was die hohe Stammspezifität von unterschiedlichen Insertionen zu unterstreichen scheint. Allerdings wurde bei dem Stamm Sar55 die S17-Insertion zusätzlich eingefügt, ohne dass dem Virus ein entsprechendes RNA-Fragment an Stelle dessen entfernt wurde. Hier wäre es interessant zu sehen, ob das Einfügen der 47832c-spezifischen Insertion in den GT-1-Stamm auch zu vermehrungsfähigen Viren führt.

Grundsätzlich könnten die beobachteten Effekte auch Zelltyp-abhängig sein. Experimente mit dem Kernow-Stamm scheinen in der beschriebenen Effizienz nur auf der Leber-Subzelllinie HepG2/C3A gut zu funktionieren. Schlechter wächst Kernow-C1 p6 in A549-Zellen [142]. Der Stamm 47832c wächst dem gegenüber am besten auf der humanen Lungenkarzinom-Subzelllinie A549/D3, aber deutlich schlechter auf HepG2-Zellen [145]. Möglich ist, dass die Inokulation der Mutante p47832/S17-174bp auf HepG2-Zellen zu einer Virusvermehrung führen würde, obwohl sie auf A549/D3-Zellen keine Viren erzeugte. Auch das müsste in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

Die Insertionen der unterschiedlichen HEV-Stämme sorgen, wie nun auch für den Stamm 47832c gezeigt, für eine verbesserte Adaptation an Zellkultursysteme. Wieso sich die Virusvarianten mit Insertionen bei chronisch Infizierten über die Zeit zur prädominanten Spezies selektieren und welche Vorteile diese Varianten aus klinischer Sicht bei der chronischen Infektion haben, ist bislang allerdings unbekannt.

Wie bereits oben beschrieben, unterscheiden sich die Insertionssequenzen sowie die HVR vom Stamm Kernow-C1 p6 und 47832c sehr stark (Abbildung 38), nicht zuletzt durch den grundlegend unterschiedlichen Ursprung der Insertionssequenz. Laut der Studien von Lhomme et al. von 2016 [74] und Munoz-Chimero et al. von 2020 [173] werden die physikalischen Eigenschaften der AS-Sequenzen der HVR bei Insertionen und Duplikationen verändert. In allen Fällen wird die Nettoladung der AS-Sequenz erhöht. Durch Insertion eines nicht-verwandten Gensegments in die HVR kommt es durch zusätzliche, positiv geladene AS zur Erhöhung der Nettoladung, wohingegen durch Einbau von Genom-eigenen Duplikationen die Anzahl negativ-geladener AS in der HVR prozentual verringert wird und dadurch die Nettoladung steigt [74]. So trägt die Insertion des Stamms Kernow-C1 zusätzliche 14 positiv geladene Aminosäuren (8 positiv geladene AS ohne S17-Insertion, 22 mit Insertion). Dies führt in der HVR zu einem Wechsel von einer schwach negativ geladenen AS-Sequenz (Nettoladung = -0,1) zu einer positiv geladenen AS-Sequenz (Nettoladung = 7,5). So groß ist der

Unterschied in der HVR des Stamms 47832c nicht. Durch die Duplikation kommt es aber zu einer Erhöhung der Nettoladung von 3,5 auf 5,5. Welchen Effekt die Erhöhung der Nettoladung der AS-Sequenz in Bezug auf die verbesserte Adaptation an die Zellkultur hat, ist unbekannt. Erwähnenswert ist an dieser Stelle, dass es bei der Mutante p47832/Ins-Change zu keiner erneuten Veränderung der Nettoladung in der HVR kommt, da die beiden Teilinsertionen lediglich vertauscht wurden. Dennoch kann durch diese Mutante kein infektiöses Virus generiert werden. Das lässt vermuten, dass die veränderte Nettoladung keinen größeren Einfluss auf die Replikationsfähigkeit beim Stamm 47832c hat.

Vergleicht man putative funktionelle Eigenschaften der Aminosäuresequenzen, so zeigen sich einige Gemeinsamkeiten (Abbildung 39).

Insertion HEV 47832c



Insertion HEV Kernow-C1 p6



Legende:	↳ = Beginn HVR	TLYTRTW = konservierter HVR N-Terminus	YTS = Phosphorylierung
	→ = Ende HVR	RRLLYTPDG = konservierter HVR C-Terminus	P = Prolin
	┌ = Stamm-spezifische Insertion	~~~~ = NLS	R = Arginin-Methylierung
		~~~~ = NES	<b>K</b> = Lysin-Acetylierung + -Ubiquitinierung
			<b>K</b> = nur Lysin-Acetylierung
			<b>G</b> = G/R-Mutationsstelle (nur 47832c)

### Abbildung 39: Vergleich funktioneller Aminosäuremotive in den HVRs des Stamms 47832c und des Stamms Kernow-C1 p6

Der divergente AS-Sequenzbereich der HVRs wird flankiert durch konservierte Bereiche [173]. Die HVR des Stamms 47832c ist eine Duplikation aus zwei genomeigenen ORF1-Fragmenten, die Insertion des Kernow-Stamms stammt von der humanen S17-Ribosomenuntereinheit.

Als N- und C-terminale Grenzen wurden die konservierten Bereiche im N- und C-Terminus der HVR gewählt, wobei dieser hohe Konservierungsgrad durchaus auf eine Funktion des dazwischenliegenden Bereichs schließen lassen könnte [173]. Die Vorhersage der funktionellen Bereiche wurde mittels verschiedener Online-Tools durchgeführt (siehe Tabelle 19). Da die HVR als Polyprolin-Region bekannt ist, war zu erwarten, dass die Aminosäure Prolin sehr häufig zu finden sein würde (Kernow: 30x, 47832c: 36 x). Bemerkenswert ist, dass im

Stamm 47832c 13 Prolinreste im Bereich der Duplikation liegen, im Kernow-Stamm befinden sich im Bereich der S17-Insertion hingegen nur drei (Abbildung 39). Mögliche Phosphorylierungsstellen sind auch sehr häufig vertreten. Phosphorylierungen sind die wichtigsten posttranslationalen Modulationen und regulieren über Kinasen die Funktion von Proteinen durch das reversible Anhängen einer Phosphatgruppe an solche Aminosäuren, welche eine freie Hydroxylgruppe (-OH) tragen (Serin, Threonin, Tyrosin) [176]. Im Kernow-Stamm finden sich insgesamt 34 solcher phosphorylierungsfähigen Aminosäuren, im Stamm 47832c gibt es 26 (Abbildung 39). Glykosylierungen sind vor allem posttranslationale Modifikationen von Sekret- und Membranproteinen. Wie bei Lhomme et al. 2020 beschrieben, finden sich weder im Stamm 47832c noch im Kernow-Stamm Glykosylierungsmotive im Bereich der HVR [74]. Methylierungen von stickstoffhaltigen Aminosäuren sind insgesamt noch nicht so intensiv beschrieben worden wie Phosphorylierungen. Nichtsdestotrotz spielen vor allem Arginin-Methylierungen von Proteinen unter anderem bei der RNA-Prozessierung, Transkriptionsregulierung und Signaltransduktion eine wichtige Rolle [177]. In der HVR des Stamms 47832c befinden sich neun vorhergesagte Arginin-Methylierungsstellen, im Kernow-Stamm sind es acht (Abbildung 39). Eine weitere Form der posttranslationalen Regulation von Proteinen ist die Ubiquitinierung und Acetylierung. Acetylierungen wurden lange Zeit nur mit eukaryotischen Histon-Modifikationen in Verbindung gesetzt. Inzwischen hat man aber unter anderem auch in Salmonellen Acetylmodifikationen an Lysinresten gefunden [178]. Posttranslational polyubiquitinierte Proteine werden durch das Proteasom abgebaut [179]. Somit stellt auch die Ubiquitinierung von Lysinresten eine wichtige Modifikation von Proteinen dar. Interessanterweise werden in der HVR des Stamms 47832c alle fünf Lysinreste als Ubiquitinierungsstellen und gleichzeitig auch als Acetylierungsstellen identifiziert, wohingegen das im Kernow-Stamm nur für drei der fünf Lysinreste zutrifft (Abbildung 39). Zwei Lysine, beide innerhalb der S17-Insertion, werden als alleinige Acetylierungsmotive erkannt. Ein Virus, welches im Replikationszyklus viel auf posttranslationale Modifikationen, sowohl von Wirts- als auch von Virusproteinen, angewiesen ist, ist das Influenza-A-Virus (IAV) [180]. So helfen Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen unter anderem beim Eintritt in die Zelle, Acetylierungen unter anderem bei der Regulation der Polymerase-Aktivität. Die einzige Modulation, die für IAV bislang noch nicht beschrieben wurde, ist die Methylierung. Für die HVRs der erwähnten HEV-Stämmen ist die Auswirkung von posttranslationalen Modifikationen der HVR und deren Effekt auf den viralen Replikationszyklus bisher unbekannt. Dazu könnte man mittels RGS zukünftig jedes einzelne Motiv mutieren und das Verhalten der Viren in der Zellkultur nachfolgend analysieren.

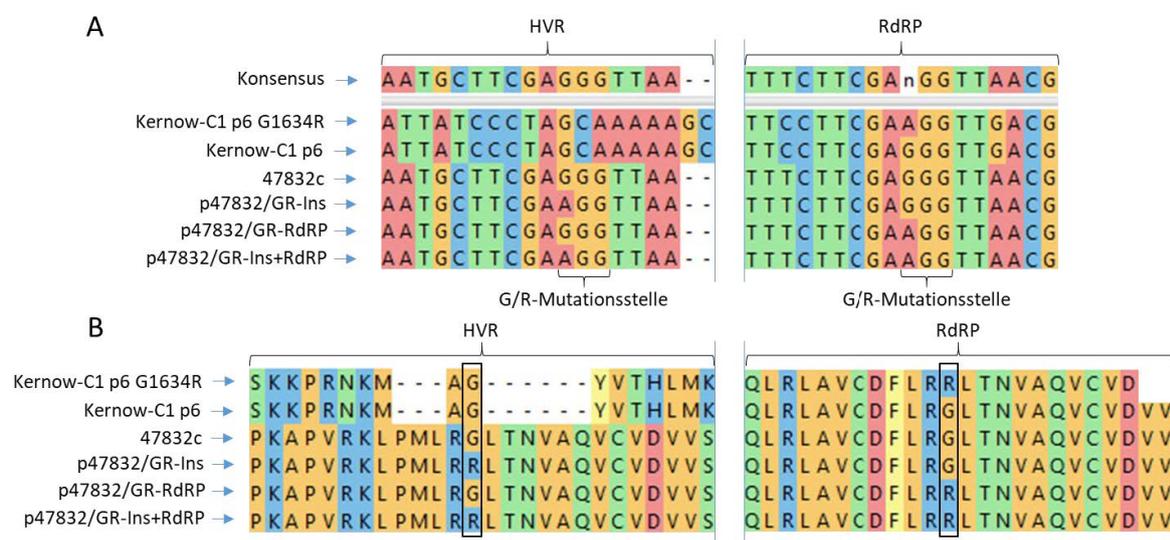
In der 47832c-spezifischen Insertion konnte genauso wie in der Insertion des Kernow-Stamms ein Kernlokalisierungssignal (*Nuclear-Localization-Signal* = NLS) gefunden werden, das dazu führen könnte, dass das Peptid, welches aus der Insertionssequenz gebildet wird, in den Kern transloziert wird [181] (Abbildung 39). Interessanterweise befinden sich die jeweiligen NLS im Bereich der Duplikation (47832c) bzw. Insertion (Kernow). Erwähnenswert ist hier auch, dass beim Stamm 47832c die NLS erst zustande kommt, wenn beide Teilinsertionen vorhanden sind, da das entsprechende Motiv genau über die Grenze der ersten und zweiten Teilinsertion verläuft. Im Gegensatz zu den NLS konnte nur in der Insertion vom Kernow-Stamm ein *Nuklear-Export-Signal* (NES) gefunden werden (Abbildung 39). Bedeutende Funktion hat das NES im Porzinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus [182]. Ob und welche Funktion diese Motive bei HEV haben, ist unbekannt. Mittels RGS könnte man aber auch hier versuchen, die NLS- bzw. NES-Motive entweder zu entfernen oder gegen andere NLS bzw. NES zu ersetzen und die Auswirkung in der Zellkultur zu studieren. Die Analyse der AS-Sequenz der HVRs vom Stamm 47832c und Kernow-C1 ergab zudem, dass beide HVR sehr viele putative Protease-Schnittstellen besitzen. In der HVR vom Stamm 47832c sind es 227 Stellen, beim Stamm Kernow sind es sogar 278 (Daten nicht gezeigt). Posttranslationale Prozessierung im Bereich der HVR könnte somit auch hier eine Rolle spielen. Eventuell fungieren unterschiedlich kleine und große Polypeptide nach Prozessierung als Regulatoren bei der Steuerung der Wirtszelle oder in der viralen Replikationsmaschinerie. Eine proteolytische Spaltung des ORF1, wozu die HVR gehört, ist allerdings bislang aber noch nicht abschließend geklärt, sodass auch über die Beteiligung der putativen Protease-Schnittstellen in der HVR gestritten werden kann.

### 5.3. Analyse des Effekts der G1634R-Mutation

Auch die Analyse des Effekts der G1634R-Mutation auf das Replikationsverhalten des Stammes 47832c wurde auf Basis des Stammes Kernow-C1 p6 durchgeführt. Debing et al. zeigten in einer ersten Studie im Jahr 2014, dass die Mutation G1634R im Stamm Kernow-C1 p6 zu einer erhöhten Fitness der Viren in der Zellkultur führt [130]. In dieser Studie wurden anfangs 15 Patienten untersucht, deren chronische Hepatitis-E-Virusinfektion mittels Ribavirin (RBV) behandelt werden sollte. Bei 13 Patienten war die Therapie erfolgreich. Die anderen beiden Patienten sprachen nicht auf die Behandlung an, einer dieser beiden Patienten verstarb. Die Genomanalyse der Viren in diesen beiden Patienten zeigte in beiden Fällen die einheitliche Mutation G1634R in der RdRP des ORF1, welche nach Sequenzvergleichen mit anderen Stämmen in nur 22 % der Genotyp 3-Virusvarianten vorkommt. Die entsprechende Mutation wurden mittels RGS in das Kernow-C1-p6-Volllänge-cDNA-Plasmid eingefügt. Nach Transfektion in Huh-7-Zellen replizierten die generierten Viren mit der Aminosäure Arginin

sowohl ohne als auch mit dosisabhängiger RBV-Zugabe stets zu höheren Titern als die WT-Variante mit Glycin [130].

Da der Stamm 47832c bislang nur moderate Titer generierte, sollte die G/R-Mutation an die korrespondierende Stelle im Genom eingebaut werden. Erhofft wurde ein ähnlicher replikationserhöhender Effekt wie beim Stamm Kernow-C1 p6. Interessanterweise ist der zweite Teil der Insertion in der HVR des Stamms 47832c eine Duplikation eines Teils des RdRP-Gen, in dem sich die entsprechende G/R-Position befindet (Abbildung 40). Somit konnten insgesamt drei Mutanten generiert werden, die entweder die Mutation nur im RdRP-Gen (p47832/GR-RdRP), nur in der Insertion (p47832/GR-Ins) oder in Kombination zeigten (p47832/GR-Ins+RdRP) (Abbildung 40).



**Abbildung 40: Sequenzvergleich von Kernow-C1 p6, Kernow-C1 p6 G1634R, 47832c und p47832-GR-Mutanten auf Nukleotid- und Aminosäurebasis**

A: Nukleotidalignment: In der HVR existiert aufgrund der Duplikation eines Sequenzfragments aus der RdRP die G/R-Mutationsstelle (GGG = Glycin) nur im Virus 47832c und den entsprechenden Mutanten (p47832/GR-Ins und p47832/GR-Ins+RdRP). Im RdRP-Gen zeigen der Stamm Kernow-C1 p6 G1634R sowie die Mutanten p47832/GR-RdRP und p47832/GR-Ins+RdRP das mutierte Codon AGG (= Arginin). Alle anderen Viren besitzen dort das Codon für Glycin. B: Aminosäurealignment. In der HVR zeigt der Stamm 47832c und die Mutante p47832/GR-RdRP die Aminosäure Glycin, die Mutanten p47832/GR-Ins und p47832/GR-Ins+RdRP besitzen an der Stelle ein Arginin. In den Kernow-Stämmen existiert eine entsprechende Stelle nicht. Im RdRP-Gen tragen der Stamm Kernow-C1 p6 G1634R und die 47832c-Mutanten p47832/GR-RdRP und p47832/GR-Ins+RdRP die Aminosäure Arginin, die Stämme Kernow-C1 p6 und 47832c sowie die Mutante p47832/GR-Ins zeigen an derselben Stelle jeweils die Aminosäure Glycin.

Die Experimente dieser Arbeit zeigen, dass nur die Mutante p47832/GR-RdRP eine stabile Virusvermehrung ermöglichte. Die beiden anderen Mutanten zeigten hingegen eine deutlich schlechtere Replikationseffizienz und konnten nur nach der ersten Passage der Transfektionsüberstände auf A549/D3-Zellen detektiert werden. Offensichtlich reicht also ein

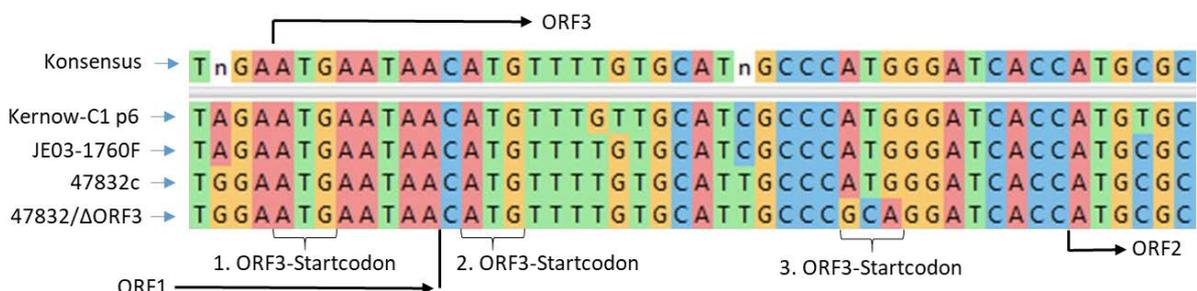
einzigster Aminosäureaustausch in der Insertion aus, um die Replikationseffizienz drastisch zu reduzieren. Möglich ist, dass der Bereich um die G/R-Mutationsstelle eine bisher noch unbekannte Funktion in der Insertion hat. Eventuell sorgt die Veränderung der Aminosäureposition vom kleinen, aliphatischen und unpolaren Glycin hin zum hydrophilen und positiv geladenen Arginin für eine negative Beeinflussung dieser Funktion, welche dann zu einer deutlich verminderten Fitness der Viruspartikel führt. Andererseits könnte auch eine zusätzliche Methylierungsstelle durch das zusätzliche Arginin im Bereich der HVR entstanden sein, die einen negativen Einfluss auf die Replikation hatte. Interessanterweise liegt der G/R-Aminosäureaustausch innerhalb der identifizierten NLS im Stamm 47832c (Abbildung 39). Eine Veränderung der Aminosäure von Glycin zu Arginin zerstört die NLS allerdings nicht (Daten nicht gezeigt), dennoch vermindert sich die virale Fitness der Mutanten p47832/GR-Ins und p47832/GR-Ins+RdRP stark. Dies zeigt, dass die verminderte Replikationseffizienz vermutlich eine andere Ursache hat und die NLS hier keine primäre Rolle spielt.

Konträr dazu scheint der Aminosäureaustausch im RdRP-Gen keinen negativen Effekt zu haben. Hier zeigt sich, dass die Mutante p47832/GR-RdRP mindestens eine vergleichbare, eventuell auch eine leicht (aber nicht signifikant) bessere Replikationseffizienz als das ursprünglich durch RGS hergestellte Virus p47832mc hat. Dies lässt vermuten, dass der Effekt der G/R-Mutation im RdRP-Gen ein anderer ist als in der Insertion. Dennoch zeigte die vergleichende Wachstumskinetik keinen signifikanten Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen Mutante und Wildtyp. In der Wachstumskinetik von Debing et al. ist zu einem ähnlichen Endzeitpunkt jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtypstamm Kernow-C1 p6 und dem mutierten Stamm Kernow-C1 p6 G1634R zu sehen [130]. Wie bereits für die Insertionssubstitutionsmutanten vermutet, könnte der Effekt der G/R-Mutation Zelltyp- und/oder Virusstamm-abhängig sein. In den Versuchen von Debing et al. wurden Huh-7-Zellen verwendet. Diese Zelllinie ist eine Leberkarzinomzelllinie. Eventuell beeinflusst die G/R-Mutation auf noch unbekanntem Weg die Virus-Wirt-Interaktion in solchen Leberzellen positiver als in anderen Zellen, wie z. B. den in dieser Arbeit verwendeten Lungenkarzinomzellen A549/D3. Des Weiteren gehört der Kernow-C1-Stamm zum Genotyp HEV-3a. Der Stamm 47832c ist aber ein Genotyp HEV-3c. Die beiden Stämme sind sich zwar ähnlich, unterscheiden sich aber möglicherweise in der *in-vitro*-Ausprägung von Mutationseffekten. Möglich wäre darüber hinaus auch, dass der Effekt der G/R-Mutation nur in Verbindung mit weiteren Mutationen richtig zur Geltung kommt. So wurden in Patienten, die an einer chronischen HEV-Infektion litten und bei denen eine RBV-Therapie fehlschlug, neben der dominierenden G/R-Mutation noch weitere simultane Aminosäuresubstitutionen, wie K1383N und Y1587F, gefunden [183]. Auch wenn diese Beispiele von *in-vivo* Daten aus Patienten stammen, könnte es dennoch möglich sein, dass

diese auch in der Zellkultur zu einem replikationsfördernden Effekt führen. Solche Mutationen müssten in zukünftigen Arbeiten identifiziert und mittels reverser Genetik im Stamm 47832c überprüft werden. Des Weiteren wäre es sinnvoll, alle G/R-Mutanten des Stamms 47832c auf weiteren Zelllinien, wie HepG2, Huh-7 oder PLC/PRF/5, zu testen, sowie eine vergleichende Wachstumskinetik des Stamms Kernow-C1 p6 mit entsprechenden G/R-Mutanten auf A549/D3-Zellen durchzuführen, um die Zelltypspezifität zu untersuchen. Zusätzlich könnte man den Effekt der G/R-Mutation im Stamm 47832c unter RBV-Gabe untersuchen um herauszufinden, ob sich der Effekt dieser Mutation zwischen Mutante und Wildtyp unter derartigen Bedingungen verändert.

#### 5.4. Analyse der Deletionsmutante p47832/ $\Delta$ ORF3

Die Identifizierung der Funktion von viralen Proteinen stellt neben der Analyse von funktionellen Domänen und Mutationen einen essentiellen Teil der Entschlüsselung viraler Replikationsmechanismen, Virus-Wirt-Interaktionen und weiterer Bestandteile im Vermehrungszyklus eines Virus dar. Die generellen Funktionen der ORFs von HEV sind relativ gut bekannt. So weiß man, dass das ORF1 für die Proteine MeT, PCP, RNA-Hel und RNA-RdRP kodiert und das Kapsidprotein vom ORF2 abgelesen wird [66, 78]. Das ORF3 kodiert für ein 13 kDa großes Phosphoprotein und besitzt drei putative Startcodons (3'-ATG-5') (Abbildung 41). Obwohl auch hier einige Funktionen bereits bekannt sind, sind andere wiederum noch ungeklärt. ORF3 spielt beispielsweise eine essentielle Rolle bei der Partikel-Freisetzung und ist im Serum oder Zellkulturüberstand in der Lipidhülle des Virus lokalisiert [3, 85, 86, 90, 91]. Über welchen Rezeptor die behüllte Form, möglicherweise durch Interaktion mit dem ORF3, wieder neue Wirtszellen infiziert, ist hingegen nicht hinreichend geklärt. Um die Funktion des ORF3 weiter charakterisieren zu können, sollte in dieser Arbeit zunächst eine ORF3-Deletionsmutante hergestellt werden, mit der in der Zukunft weitergehende Analysen möglich sein sollen.



**Abbildung 41: Nukleotidalignment der HEV-Stämme Kernow-C1 p6, JE03-1760F, 47832c sowie der Mutante p47832/ $\Delta$ ORF3 im 5'-Bereich des ORF3**

Insgesamt besitzt das ORF3 konserviert über alle HEV-Stämme drei Startcodons, von denen aber nur das dritte für den Translationsstart zuständig ist.

Als Basis für die Generierung der  $\Delta$ ORF3-Deletionsmutante diente die Publikation von Yamada et al. aus dem Jahr 2009 [170]. In dieser Studie wurde gezeigt, dass das dritte Startcodon des ORF3 wesentlich ist für die erfolgreiche Expression des ORF3. Dafür wurde im japanischen HEV-3b Stamm JE03-1760F das dritte Startcodon von ATG zu GCA mutiert. Als Kontrolle wurde außerdem eine Mutante erzeugt, bei der durch ein zusätzliches Thymidin zwischen dem zweiten und dritten Startcodon der Leserahmen verschoben wurde [170]. Die Mutante mit dem verschobenen Leserahmen konnte im Gegensatz zu der Mutante mit dem mutierten dritten Startcodon genauso effizient auf PLC/PRF/5- und A549-Zellen replizieren wie der WT-Stamm. Die  $\Delta$ ORF3-Deletionsmutante mit dem mutierten dritten Startcodon zeigte eine deutlich geringere Replikationseffizienz auf PLC/PRF/5- und A549-Zellen, replizierte aber dennoch stabil in Zellkultur [170]. PLC/PRF/5-Zellen besitzen pro Zelle vier Genomäquivalente des Hepatitis-B-Virus. Die Nutzung dieser Zelllinie in der HEV-Forschung ist deshalb problematisch, da in den Resultaten der potenzielle Einfluss des Hepatitis-B-Virus mit einbezogen werden müsste.

Mittels eines Sequenzvergleichs mit den Stämmen Kernow-C1 p6 und JE03-1760F wurde das entsprechende Startcodon, welches in der Publikation von Yamada et al. mutiert wurde, im Stamm 47832c identifiziert. In den Transfektions-/ Infektionsversuchen zeigte sich, dass die  $\Delta$ ORF3-Deletionsmutante nach der ersten Passage der Transfektionsüberstände auf A549/D3-Zellen im IFT noch detektierbar war, in den folgenden Passagen aber nicht mehr. Die Analyse der RNA-Levels im Ansatz einer persistent infizierten Zelllinie zeigte eine kontinuierliche Reduktion der Virus-Genomkopien über einen Zeitraum von 42 Tagen. Danach konnte keine Virus-RNA mehr im Überstand detektiert werden. Auch hier könnte dieser Effekt der Mutation Zelltyp- und/oder Stamm-spezifisch sein. So wurde in der Studie von Yamada et al. ein Genotyp-3b-Stamm verwendet, der vermutlich andere Replikations- und Adaptationseigenschaften in der Zellkultur aufweist als ein HEV-3c-Stamm. Ebenfalls wurde der Fokus stärker auf PLC/PRF/5-Zellen als auf A549-Zellen gelegt. In zukünftigen Studien sollte die p47832/ $\Delta$ ORF3-Mutante deshalb auf anderen Zelllinien getestet werden. Weiterhin könnten auch die nach der ersten Passage detektierten Viren mit der  $\Delta$ ORF3-Deletion mittels Elektronenmikroskopie auf das Vorhandensein einer Lipidhülle untersucht werden, um zu überprüfen, ob diese Mutation eine Auswirkung auf die Ausbildung der Lipidhülle hat.

## 5.5. Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorgelegten Arbeit wurde die erfolgreiche Etablierung eines robusten Plasmid-basierten RGS für den HEV-Stamm 47832c beschrieben. Nach Transfektion des korrigierten Ausgangsplasmids in BSR-T7/5-Zellen wurden infektiöse Viren generiert, welche dann für die Infektion von A549/D3-Zellen verwendet werden konnten. Die Anwendbarkeit des RGS wurde bewiesen, indem eine einzelne *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle in das Plasmid eingefügt und im generierten Virus nachgewiesen wurde. Das System wurde verwendet, um erste Fragestellungen für die Charakterisierung des HEV-3c-Stamms 47832c zu beantworten.

Die Transfektion von Plasmid-DNA ist bei Rotaviren ein sehr effizient funktionierendes System und das, obwohl Rotaviren insgesamt 11 doppelsträngige RNA-Segmente besitzen und jedes Segment in ein einzelnes Plasmid eingefügt werden muss [169]. In der HEV-Forschung ist der Einsatz von Plasmid-DNA zur Transfektion ein Novum, obwohl nur ein Plasmid mit dem Genom transfiziert werden muss. Bisher wurde als Standard das HEV-Genom aufwendig vom Plasmid in *in-vitro*-RNA umgeschrieben, gecappt, ggf. noch polyadenyliert und anschließend transfiziert. Ob sich ein Plasmid-basiertes RGS in der HEV-Forschung durchsetzen kann, müsste eine vergleichende Analyse der beiden Methoden darlegen. Welches der beiden Systeme (Transfektion von *in-vitro*-RNA oder Transfektion von Plasmid-DNA) das effizientere System ist, müssten Titeranalysen der generierten Viren zeigen.

Obwohl das Plasmid-basierte RGS reproduzierbar konstante Ergebnisse generiert, sollte das System noch weiter optimiert werden. So könnten Zellkulturzusätze wie z. B. Amphotericin-B, die eine verbesserte HEV-Vermehrung bewirken können, ausprobiert werden [143]. Auch der Einsatz von FKS mit reduzierten IgG-Titern soll einen positiven Effekt auf das Replikationsverhalten von HEV haben [144]. Zudem ist die Inkubationszeit mit zwei Wochen nach Infektion immer noch sehr lang. Eine neue, noch nicht publizierte A549-Zelllinie mit einem RIG-I-Knockout soll dazu führen, dass HEV schneller in Zellkultur wächst, wenn auch nicht zu höheren Titern [D. Harms, RKI, persönliche Mitteilung].

Auch die Wahl der Zellen spielt eine wesentliche Rolle. Der Stamm 47832c wächst am besten auf A549/D3-Zellen. Diese Zellen sind humane Lungenkarzinomzellen und eigentlich keine Zellen, in denen Hepatitisviren *in-vivo* primär replizieren. Dennoch wächst der Stamm 47832c deutlich besser auf diesen Zellen als auf Leberzellen, wie z. B. HepG2 [145]. Der Grund dafür ist noch unbekannt. So könnte das RGS auf alternativen Zelllinien getestet werden, welche eventuell zu höheren Titern führen. Ebenso könnte man neben den Helferplasmiden für das Capping auch ein weiteres Plasmid, welches für eine T7-Polymerase kodiert, zusätzlich mit co-transfizieren. Somit könnte man von Beginn an vollständig empfängliche Zelllinien transfizieren und wäre unabhängig von den BSR T7/5-Zellen.

Die Stabilität der Sequenz ist ein wichtiger Parameter, wenn man RNA-Viren analysiert. Durch die fehlende *Proof-Reading*-Funktion der RdRP baut das Virus während des Replikationszyklus der RNA kontinuierlich Mutationen ins Genom ein. Der Großteil dieser Mutationen hat vermutlich keinen oder einen negativen Effekt auf das Virus, sodass sich das Verhalten dieser Virusspezies nicht ändert oder aber die Varianten replikationsdeffizient werden. In einigen Fällen haben solche Mutationen aber auch einen positiven Effekt. Die G/R-Mutation im Stamm Kernow-C1 p6 sorgt beispielsweise für eine effizientere Replikation in Zellkultur und für eine Resistenz gegenüber Ribavirin. Die Effekte zahlreicher anderer, zufälliger Mutationen sind hingegen noch nicht bekannt. Eine regelmäßige Sequenzierung der in Zellkultur propagierten Hepatitis-E-Viren kann die Mutationsfrequenzen überwachen und potenziell replikationsfördernde Mutationen früh identifizieren, welche dann mittels RGS überprüft werden könnten.

Nachdem herausgefunden wurde, dass die Insertion in der HVR des Virus 47832c, insbesondere dessen Aminosäuresequenz, eine essentielle Rolle für die effiziente Virusreplikation spielt, sollte nun untersucht werden, ob es funktionelle Regionen innerhalb der 186 bp langen Insertionssequenz gibt und wenn ja, wo diese lokalisiert sind. Putativ funktionelle Motive in der HVR sollten hierfür mittels RGS näher untersucht werden. Möglicherweise ließe sich auf diesem Weg mehr über die spezifischen Effekte der posttranslationalen Modifikationen in der HVR im HEV-Zyklus erfahren. Alle generierten Virusmutanten sollten auch auf anderen Zellen, vor allem Leberzelllinien, untersucht werden. Es ist nicht auszuschließen, dass sich die Viren und deren Varianten auf diesen Zellen unterschiedlich verhalten. Um die Funktion der 47832c-spezifischen Insertion auf Genomebene weiter zu studieren, ist es auch ratsam, diese Insertion in andere Viren unterschiedlicher Genotypen und mit oder ohne Insertionen (Kernow-C1 p6, LBPR000379, Sar55) einzusetzen und zu untersuchen, welchen Effekt die Insertion auf diese Virusstämme hat.

Die Insertionen wurden vor allem in Viren von chronisch infizierten Patienten gefunden. Welchen Einfluss diese Virusvarianten auf den Verlauf einer HEV-Infektion haben und warum diese Spezies vor allem bei chronischen Verläufen auftreten, ist noch nicht bekannt. Es könnte auch versucht werden, das Polypeptid, welches aus der Insertionssequenz translatiert wird, in Zellen zu exprimieren. Im Anschluss könnte man z. B. mit Hilfe von Pulldown-Experimenten versuchen, mögliche Wirtszell- oder ggf. auch Virus-spezifische Interaktionspartner zu identifizieren. Es ist denkbar, dass über die Identifikation von interagierenden Wirtszellproteinen Mechanismen entdeckt werden, durch die die Virusvarianten mit den Insertionen die Immunantwort derart manipulieren könnten, dass sich ein chronischer Verlauf manifestiert.

Die erfolgreiche Entwicklung eines Plasmid-basierten RGS kann die Reverse Genetik im Bereich der HEV-Forschung sicherlich sinnvoll ergänzen. Die ersten hier gezeigten Anwendungen des RGS zeigen seine gute Nutzbarkeit und Anwendbarkeit in der Grundlagenforschung. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Funktion der Insertion in der HVR und zu den spezifischen G/R-Mutationen stellen einen sehr guten Ausgangspunkt zur weiterführenden Charakterisierung dieser funktionell wichtigen Bereiche dar. Auch die hergestellte  $\Delta$ ORF3-Mutante kann in weiteren Experimenten zur Aufklärung der Funktion des ORF3-Proteins verwendet werden. Weitere Optimierungen des RGS sollten zukünftig helfen, das System noch leichter und schneller anwendbar zu machen, um weitergehende Untersuchungen zu grundlegenden und angewandten Aspekten der HEV-Forschung zu ermöglichen.

## Referenzen

1. Viswanathan, R., *A review of the literature on the epidemiology of infectious hepatitis*. Indian J Med Res, 1957. **45**(Suppl.): p. 145-55.
2. Wong, D.C., et al., *Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology*. Lancet, 1980. **2**(8200): p. 876-9.
3. Pallerla, S.R., et al., *Hepatitis E Virus Infection: Circulation, Molecular Epidemiology, and Impact on Global Health*. Pathogens, 2020. **9**(10): p. 1-21.
4. Balayan, M.S., et al., *Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route*. Intervirology, 1983. **20**(1): p. 23-31.
5. Reyes, G.R., et al., *Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis*. Science, 1990. **247**(4948): p. 1335-9.
6. Tam, A.W., et al., *Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome*. Virology, 1991. **185**(1): p. 120-31.
7. Coursaget, P., et al., *Hepatitis type E in a French population: detection of anti-HEV by a synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay*. Res Virol, 1994. **145**(1): p. 51-7.
8. Tassopoulos, N.C., et al., *Case report: role of hepatitis E virus in the etiology of community-acquired non-A, non-B hepatitis in Greece*. J Med Virol, 1994. **42**(2): p. 124-8.
9. Zanetti, A.R. and G.J. Dawson, *Hepatitis type E in Italy: a seroepidemiological survey. Study Group of Hepatitis E*. J Med Virol, 1994. **42**(3): p. 318-20.
10. Heath, T.C., et al., *Locally acquired hepatitis E in the Northern Territory of Australia*. Med J Aust, 1995. **162**(6): p. 318-9.
11. De Cock, K.M., et al., *Epidemic non-A, non-B hepatitis in patients from Pakistan*. Ann Intern Med, 1987. **106**(2): p. 227-30.
12. Prevention, C.f.D.C.a., *Hepatitis E Among U.S. Travelers, 1989-1992* MMWR Morb Mortal Weekly Report, 1993. **42**: p. 1 - 4.
13. Meng, X.J., et al., *A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(18): p. 9860-5.
14. Meng, X.J., et al., *Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 9714-21.
15. Reuter, G., A. Boros, and P. Pankovics, *Review of Hepatitis E Virus in Rats: Evident Risk of Species Orthohepevirus C to Human Zoonotic Infection and Disease*. Viruses, 2020. **12**(10): p. 1-17.
16. Larrue, H., F. Abravanel, and J.M. Peron, *Hepatitis E, what's the real issue?* Liver Int, 2020. **40** p. 43-47.
17. Primadharsini, P.P., S. Nagashima, and H. Okamoto, *Genetic Variability and Evolution of Hepatitis E Virus*. Viruses, 2019. **11**(5): p. 1-28.
18. Tsatsralt-Od, B., et al., *Distinct changing profiles of hepatitis A and E virus infection among patients with acute hepatitis in Mongolia: The first report of the full genome sequence of a novel genotype 1 hepatitis E virus strain*. J Med Virol, 2018. **90**(1): p. 84-92.
19. Smith, D.B., et al., *Update: proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species Orthohepevirus A)*. J Gen Virol, 2020. **101**(7): p. 692-698.
20. Rein, D.B., et al., *The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005*. Hepatology, 2012. **55**(4): p. 988-97.

21. WHO, *Hepatitis E - Fact Sheet*. online verfügbar: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>, 2020.
22. Kamar, N., et al., *Hepatitis E virus infection*. Clin Microbiol Rev, 2014. **27**(1): p. 116-38.
23. Lee, G.H., et al., *Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk*. Gastroenterology, 2016. **150**(2): p. 355-7 e3.
24. Lu, L., C. Li, and C.H. Hagedorn, *Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis*. Rev Med Virol, 2006. **16**(1): p. 5-36.
25. Adlhoch, C., et al., *Hepatitis E virus: Assessment of the epidemiological situation in humans in Europe, 2014/15*. J Clin Virol, 2016. **82**: p. 9-16.
26. Johne, R., et al., *Hepeviridae: an expanding family of vertebrate viruses*. Infect Genet Evol, 2014. **27**: p. 212-29.
27. Takahashi, M., et al., *Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype*. J Gen Virol, 2011. **92**(Pt 4): p. 902-8.
28. Takahashi, M., et al., *Prevalence and genotype/subtype distribution of hepatitis E virus (HEV) among wild boars in Japan: Identification of a genotype 5 HEV strain*. Virus Res, 2020. **287**: p. 198106.
29. Wang, L., et al., *Transmission of a Novel Genotype of Hepatitis E Virus from Bactrian Camels to Cynomolgus Macaques*. J Virol, 2019. **93**(7): p. 1-12.
30. Woo, P.C., et al., *New Hepatitis E Virus Genotype in Bactrian Camels, Xinjiang, China, 2013*. Emerg Infect Dis, 2016. **22**(12): p. 2219-2221.
31. Li, T.C., et al., *Production of infectious dromedary camel hepatitis E virus by a reverse genetic system: Potential for zoonotic infection*. J Hepatol, 2016. **65**(6): p. 1104-1111.
32. Li, T.C., et al., *Genotype 5 Hepatitis E Virus Produced by a Reverse Genetics System Has the Potential for Zoonotic Infection*. Hepatol Commun, 2019. **3**(1): p. 160-172.
33. Purdy, M.A. and Y.E. Khudyakov, *Evolutionary history and population dynamics of hepatitis E virus*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e14376.
34. Smith, D.B., et al., *Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes*. J Gen Virol, 2016. **97**(3): p. 537-542.
35. Haqshenas, G., et al., *Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 10): p. 2449-2462.
36. Kabrane-Lazizi, Y., et al., *Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States*. Am J Trop Med Hyg, 1999. **61**(2): p. 331-5.
37. Favorov, M.O., et al., *Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States*. J Infect Dis, 2000. **181**(2): p. 449-55.
38. Johne, R., et al., *Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany*. Emerg Infect Dis, 2010. **16**(9): p. 1452-5.
39. Johne, R., et al., *Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 3): p. 750-8.
40. Wang, B., et al., *Orthohepevirus C: An Expanding Species of Emerging Hepatitis E Virus Variants*. Pathogens, 2020. **9**(3): p. 1-23.
41. Dremsek, P., et al., *Seroprevalence study in forestry workers from eastern Germany using novel genotype 3- and rat hepatitis E virus-specific immunoglobulin G ELISAs*. Med Microbiol Immunol, 2012. **201**(2): p. 189-200.

42. Spahr, C., et al., *Serological evidence of hepatitis E virus infection in zoo animals and identification of a rodent-borne strain in a Syrian brown bear*. *Vet Microbiol*, 2017. **212**: p. 87-92.
43. Eiden, M., et al., *Spatial-Temporal Dynamics of Hepatitis E Virus Infection in Foxes (*Vulpes vulpes*) in Federal State of Brandenburg, Germany, 1993-2012*. *Front Microbiol*, 2020. **11**: p. 115.
44. Drexler, J.F., et al., *Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae*. *J Virol*, 2012. **86**(17): p. 9134-47.
45. Hedrick, R.P., S. Yun, and W.H. Wingfield, *A Small RNA Virus Isolated from Salmonid Fishes in California, USA*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1991. **48**(1): p. 99-104.
46. Batts, W., et al., *A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*)*. *Virus Res*, 2011. **158**(1-2): p. 116-23.
47. Khuroo, M.S., M.S. Khuroo, and N.S. Khuroo, *Transmission of Hepatitis E Virus in Developing Countries*. *Viruses*, 2016. **8**(9): p. 1-20.
48. Maila, H.T., S.M. Bowyer, and R. Swanepoel, *Identification of a new strain of hepatitis E virus from an outbreak in Namibia in 1995*. *J Gen Virol*, 2004. **85**(Pt 1): p. 89-95.
49. Woo, P.C., et al., *New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East*. *Emerg Infect Dis*, 2014. **20**(6): p. 1044-8.
50. Bosch, A., et al., *Human enteric viruses in Coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak*. *Water Sci Technol*, 2001. **43**(12): p. 61-5.
51. Crossan, C., et al., *Hepatitis E virus genotype 3 in shellfish, United Kingdom*. *Emerg Infect Dis*, 2012. **18**(12): p. 2085-7.
52. Grodzki, M., et al., *Bioaccumulation efficiency, tissue distribution, and environmental occurrence of hepatitis E virus in bivalve shellfish from France*. *Appl Environ Microbiol*, 2014. **80**(14): p. 4269-76.
53. Gao, S., et al., *Development and evaluation of a RT-LAMP assay for rapid detection of hepatitis E virus from shellfish*. *Int J Food Microbiol*, 2016. **220**: p. 1-5.
54. Said, B., et al., *Hepatitis E outbreak on cruise ship*. *Emerg Infect Dis*, 2009. **15**(11): p. 1738-44.
55. Kamp, C., et al., *Impact of hepatitis E virus testing on the safety of blood components in Germany - results of a simulation study*. *Vox Sang*, 2018. **113**(8): p. 811-813.
56. PEI, *Abwehr von Arzneimittelrisiken; Stufenplan Stufe 2: Anordnung der Testung von Blutspendern zur Verhinderung einer Übertragung von Hepatitis-E-Virus durch Blutkomponenten zur Transfusion und Stammzellzubereitungen zur hämatopoetischen Rekonstitution*. *Bundesanzeiger*, 2019(Amtlicher Teil): p. 1-6.
57. Syed, S.F., et al., *Past, present and future of hepatitis E virus infection: Zoonotic perspectives*. *Microb Pathog*, 2018. **119**: p. 103-108.
58. Nicolini, L.A.P., et al., *Travel-related hepatitis E: a two-decade GeoSentinel analysis*. *J Travel Med*, 2020. **27**(7): p. 1-6.
59. Sharma, S., et al., *Risk factors for vertical transmission of hepatitis E virus infection*. *J Viral Hepat*, 2017. **24**(11): p. 1067-1075.
60. Johne, R., Kästner B., Trojnar E., *Hepatitis E-Viren in Wildtieren - generelle Bedeutung und Untersuchungen beim Gehegewild*. *Landwirtschaftliche Wildhaltung*, 2019. **4**: p. 5 - 11.
61. Bradley, D., et al., *Aetiological agent of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis*. *J Gen Virol*, 1988. **69** ( Pt 3): p. 731-8.
62. Nagashima, S., et al., *Characterization of the Quasi-Enveloped Hepatitis E Virus Particles Released by the Cellular Exosomal Pathway*. *J Virol*, 2017. **91**(22): p. 1-16.

63. Wang, Y.Z., Ch.; Qi, Y.; Geng, Y., *Hepatitis E Virus*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2016. **948**(Springer): p. 11-13.
64. Kabrane-Lazizi, Y., et al., *Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped*. J Virol, 1999. **73**(10): p. 8848-50.
65. Graff, J., et al., *A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus*. J Virol, 2006. **80**(12): p. 5919-26.
66. Koonin, E.V., et al., *Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(17): p. 8259-63.
67. Agrawal, S., D. Gupta, and S.K. Panda, *The 3' end of hepatitis E virus (HEV) genome binds specifically to the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)*. Virology, 2001. **282**(1): p. 87-101.
68. Karpe, Y.A. and K.S. Lole, *RNA 5'-triphosphatase activity of the hepatitis E virus helicase domain*. J Virol, 2010. **84**(18): p. 9637-41.
69. Karpe, Y.A. and K.S. Lole, *Deubiquitination activity associated with hepatitis E virus putative papain-like cysteine protease*. J Gen Virol, 2011. **92**(Pt 9): p. 2088-2092.
70. Magden, J., et al., *Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus*. J Virol, 2001. **75**(14): p. 6249-55.
71. Parvez, M.K., *Molecular characterization of hepatitis E virus ORF1 gene supports a papain-like cysteine protease (PCP)-domain activity*. Virus Res, 2013. **178**(2): p. 553-6.
72. Parvez, M.K. and A.A. Khan, *Molecular modeling and analysis of hepatitis E virus (HEV) papain-like cysteine protease*. Virus Res, 2014. **179**: p. 220-4.
73. Smith, D.B., et al., *Evolution of the hepatitis E virus hypervariable region*. J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 11): p. 2408-2418.
74. Lhomme, S., et al., *Insertions and Duplications in the Polyproline Region of the Hepatitis E Virus*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 1-10.
75. Shukla, P., et al., *Adaptation of a genotype 3 hepatitis E virus to efficient growth in cell culture depends on an inserted human gene segment acquired by recombination*. J Virol, 2012. **86**(10): p. 5697-707.
76. Johne, R., et al., *An ORF1-rearranged hepatitis E virus derived from a chronically infected patient efficiently replicates in cell culture*. J Viral Hepat, 2014. **21**(6): p. 447-56.
77. Li, C., et al., *Viral Macro Domains Reverse Protein ADP-Ribosylation*. J Virol, 2016. **90**(19): p. 8478-86.
78. Jameel, S., et al., *Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins*. J Virol, 1996. **70**(1): p. 207-16.
79. Montpellier, C., et al., *Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein*. Gastroenterology, 2018. **154**(1): p. 211-223 e8.
80. Torresi, J., et al., *Only the non-glycosylated fraction of hepatitis E virus capsid (open reading frame 2) protein is stable in mammalian cells*. J Gen Virol, 1999. **80** ( Pt 5): p. 1185-1188.
81. Yin, X., et al., *Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(18): p. 4773-4778.
82. Zafrullah, M., et al., *Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein*. J Virol, 1999. **73**(5): p. 4074-82.
83. Zhou, Y.H., R.H. Purcell, and S.U. Emerson, *A truncated ORF2 protein contains the most immunogenic site on ORF2: antibody responses to non-vaccine sequences following challenge of vaccinated and non-vaccinated macaques with hepatitis E virus*. Vaccine, 2005. **23**(24): p. 3157-65.

84. Chandra, V., et al., *The hepatitis E virus ORF3 protein modulates epidermal growth factor receptor trafficking, STAT3 translocation, and the acute-phase response.* J Virol, 2008. **82**(14): p. 7100-10.
85. Ding, Q., et al., *Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(5): p. 1147-1152.
86. Gouttenoire, J., et al., *Palmitoylation mediates membrane association of hepatitis E virus ORF3 protein and is required for infectious particle secretion.* PLoS Pathog, 2018. **14**(12): p. e1007471.
87. He, M., et al., *The ORF3 Protein of Genotype 1 Hepatitis E Virus Suppresses TLR3-induced NF-kappaB Signaling via TRADD and RIP1.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 27597.
88. Kannan, H., et al., *The hepatitis E virus open reading frame 3 product interacts with microtubules and interferes with their dynamics.* J Virol, 2009. **83**(13): p. 6375-82.
89. Kar-Roy, A., et al., *The hepatitis E virus open reading frame 3 protein activates ERK through binding and inhibition of the MAPK phosphatase.* J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 28345-57.
90. Nagashima, S., et al., *Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies.* J Gen Virol, 2014. **95**(Pt 10): p. 2166-2175.
91. Nagashima, S., et al., *A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells.* J Gen Virol, 2011. **92**(Pt 2): p. 269-78.
92. Nagashima, S., et al., *Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions.* J Gen Virol, 2011. **92**(Pt 12): p. 2838-2848.
93. Xu, J., et al., *Open reading frame 3 of genotype 1 hepatitis E virus inhibits nuclear factor-kappaB signaling induced by tumor necrosis factor-alpha in human A549 lung epithelial cells.* PLoS One, 2014. **9**(6): p. e100787.
94. Tanggis, et al., *An analysis of two open reading frames (ORF3 and ORF4) of rat hepatitis E virus genome using its infectious cDNA clones with mutations in ORF3 or ORF4.* Virus Res, 2018. **249**: p. 16-30.
95. Nair, V.P., et al., *Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus.* PLoS Pathog, 2016. **12**(4): p. e1005521.
96. Ahmed, Z.H., P.; Ahmad, I.; Jameel, S., *The ATP synthase subunit (ATP5B) is an entry factor for the hepatitis E virus.* bioRxiv, 2016(new results - preprint): p. 1-39.
97. Yu, H., et al., *Homology model and potential virus-capsid binding site of a putative HEV receptor Grp78.* J Mol Model, 2011. **17**(5): p. 987-95.
98. Zhang, L., et al., *Asialoglycoprotein receptor facilitates infection of PLC/PRF/5 cells by HEV through interaction with ORF2.* J Med Virol, 2016. **88**(12): p. 2186-2195.
99. Shiota, T., et al., *Integrin alpha3 is involved in non-enveloped hepatitis E virus infection.* Virology, 2019. **536**: p. 119-124.
100. Oechslin, N., D. Moradpour, and J. Gouttenoire, *On the Host Side of the Hepatitis E Virus Life Cycle.* Cells, 2020. **9**(5): p. 1-14.
101. Yin, X., et al., *Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses.* J Virol, 2016. **90**(8): p. 4232-4242.
102. Holla, P., et al., *Hepatitis E virus enters liver cells through a dynamin-2, clathrin and membrane cholesterol-dependent pathway.* Traffic, 2015. **16**(4): p. 398-416.
103. Montero, H., G. Perez-Gil, and C.L. Sampieri, *Eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) during viral infections.* Virus Genes, 2019. **55**(3): p. 267-273.
104. LeDesma, R., I. Nimgaonkar, and A. Ploss, *Hepatitis E Virus Replication.* Viruses, 2019. **11**(8): p. 1-17.

105. Kanade, G.D., K.D. Pingale, and Y.A. Karpe, *Activities of Thrombin and Factor Xa Are Essential for Replication of Hepatitis E Virus and Are Possibly Implicated in ORF1 Polyprotein Processing*. J Virol, 2018. **92**(6): p. e01853-17.
106. Ding, Q., et al., *Identification of the Intragenomic Promoter Controlling Hepatitis E Virus Subgenomic RNA Transcription*. mBio, 2018. **9**(3): p. e00769-18.
107. Capai, L., A. Falchi, and R. Charrel, *Meta-Analysis of Human IgG anti-HEV Seroprevalence in Industrialized Countries and a Review of Literature*. Viruses, 2019. **11**(1): p. 1-16.
108. Dalton, H.R., et al., *Hepatitis E in new zealand*. J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22**(8): p. 1236-40.
109. Zafrullah, M., et al., *Disparities in detection of antibodies against hepatitis E virus in US blood donor samples using commercial assays*. Transfusion, 2018. **58**(5): p. 1254-1263.
110. Schielke, A., et al., *Hepatitis E virus antibody prevalence in hunters from a district in Central Germany, 2013: a cross-sectional study providing evidence for the benefit of protective gloves during disembowelling of wild boars*. BMC Infect Dis, 2015. **15**(440): p. 1-8.
111. Mansuy, J.M., et al., *Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(12): p. 2309-12.
112. Krumbholz, A., et al., *Age-related and regional differences in the prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in pigs in Germany*. Vet Microbiol, 2013. **167**(3-4): p. 394-402.
113. RKI, *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2019*. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch, 2020. **6**(25): p. 126-128.
114. Webb, G.W., S. Kelly, and H.R. Dalton, *Hepatitis A and Hepatitis E: Clinical and Epidemiological Features, Diagnosis, Treatment, and Prevention*. Clin Microbiol Newsl, 2020. **42**(21): p. 171-179.
115. Huang, S., et al., *Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13560.
116. Aslan, A.T. and H.Y. Balaban, *Hepatitis E virus: Epidemiology, diagnosis, clinical manifestations, and treatment*. World J Gastroenterol, 2020. **26**(37): p. 5543-5560.
117. Lhomme, S., et al., *Clinical Manifestations, Pathogenesis and Treatment of Hepatitis E Virus Infections*. J Clin Med, 2020. **9**(2): p. 1-25.
118. Kamar, N., et al., *Hepatitis E*. Lancet, 2012. **379**(9835): p. 2477-2488.
119. Berglov, A., S. Hallager, and N. Weis, *Hepatitis E during pregnancy: Maternal and foetal case-fatality rates and adverse outcomes-A systematic review*. J Viral Hepat, 2019. **26**(11): p. 1240-1248.
120. Kumar, A., et al., *Hepatitis E in pregnancy*. Int J Gynaecol Obstet, 2004. **85**(3): p. 240-4.
121. Goel, A. and R. Aggarwal, *Hepatitis E: Epidemiology, Clinical Course, Prevention, and Treatment*. Gastroenterol Clin North Am, 2020. **49**(2): p. 315-330.
122. Gerolami, R., V. Moal, and P. Colson, *Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient*. N Engl J Med, 2008. **358**(8): p. 859-60.
123. Kamar, N., et al., *Hepatitis E virus-related cirrhosis in kidney- and kidney-pancreas-transplant recipients*. Am J Transplant, 2008. **8**(8): p. 1744-8.
124. Kamar, N., et al., *Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients*. N Engl J Med, 2008. **358**(8): p. 811-7.
125. European Association for the Study of the Liver. Electronic address, e.e.e. and L. European Association for the Study of the, *EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection*. J Hepatol, 2018. **68**(6): p. 1256-1271.

126. Geng, Y., et al., *Persistent hepatitis e virus genotype 4 infection in a child with acute lymphoblastic leukemia*. *Hepat Mon*, 2014. **14**(1): p. e15618.
127. Fousekis, F.S., I.V. Mitselos, and D.K. Christodoulou, *Extrahepatic manifestations of hepatitis E virus: An overview*. *Clin Mol Hepatol*, 2020. **26**(1): p. 16-23.
128. Pischke, S., et al., *Ribavirin treatment of acute and chronic hepatitis E: a single-centre experience*. *Liver Int*, 2013. **33**(5): p. 722-6.
129. Kamar, N., et al., *Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants*. *Gastroenterology*, 2011. **140**(5): p. 1481-9.
130. Debing, Y., et al., *A mutation in the hepatitis E virus RNA polymerase promotes its replication and associates with ribavirin treatment failure in organ transplant recipients*. *Gastroenterology*, 2014. **147**(5): p. e15-6.
131. Debing, Y., et al., *Hepatitis E virus mutations associated with ribavirin treatment failure result in altered viral fitness and ribavirin sensitivity*. *J Hepatol*, 2016. **65**(3): p. 499-508.
132. Haagsma, E.B., et al., *Treatment of chronic hepatitis E in liver transplant recipients with pegylated interferon alpha-2b*. *Liver Transpl*, 2010. **16**(4): p. 474-7.
133. Kamar, N., et al., *Pegylated interferon-alpha for treating chronic hepatitis E virus infection after liver transplantation*. *Clin Infect Dis*, 2010. **50**(5): p. e30-3.
134. Rostaing, L., et al., *Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alpha in kidney transplant recipients*. *Transplantation*, 1995. **59**(10): p. 1426-31.
135. Heo, Y.A. and E.D. Deeks, *Sofosbuvir/Velpatasvir/Voxilaprevir: A Review in Chronic Hepatitis C*. *Drugs*, 2018. **78**(5): p. 577-587.
136. Dao Thi, V.L., et al., *Sofosbuvir Inhibits Hepatitis E Virus Replication In Vitro and Results in an Additive Effect When Combined With Ribavirin*. *Gastroenterology*, 2016. **150**(1): p. 82-85 e4.
137. Wu, X., et al., *Hepatitis E virus: Current epidemiology and vaccine*. *Hum Vaccin Immunother*, 2016. **12**(10): p. 2603-2610.
138. Zhang, J., J.W. Shih, and N.S. Xia, *Long-term efficacy of a hepatitis E vaccine*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(23): p. 2265-6.
139. Pillot, J., Sharma, M.D., Lazizi, Y., Budkowska, A., Dauguet, C., Galimand, M., Sarthou, J.L., *Immunological characterization of a viral agent involved in epidemic and sporadic non-A, non-B hepatitis*. *Ann.Inst.Pasteur/Viral.*, 1987. **138**: p. 145 - 158.
140. Meister, T.L., et al., *Cell culture systems for the study of hepatitis E virus*. *Antiviral Res*, 2019. **163**: p. 34-49.
141. Scholz, J., et al., *Reverse genetics approaches for hepatitis E virus and related viruses*. *Curr Opin Virol*, 2020. **44**: p. 121-128.
142. Shukla, P., et al., *Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(6): p. 2438-43.
143. Schemmerer, M., et al., *Isolation of Subtype 3c, 3e and 3f-Like Hepatitis E Virus Strains Stably Replicating to High Viral Loads in an Optimized Cell Culture System*. *Viruses*, 2019. **11**(6): p. 1-17.
144. Todt, D., et al., *Robust hepatitis E virus infection and transcriptional response in human hepatocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020. **117**(3): p. 1731-1741.
145. Schemmerer, M., et al., *Enhanced Replication of Hepatitis E Virus Strain 47832c in an A549-Derived Subclonal Cell Line*. *Viruses*, 2016. **8**(10): p. 1-11.
146. Glitscher, M., et al., *Inhibition of Hepatitis E Virus Spread by the Natural Compound Silvestrol*. *Viruses*, 2018. **10**(6): p. 1-19.

147. Wolff, A., et al., *Effect of Sodium Chloride, Sodium Nitrite and Sodium Nitrate on the Infectivity of Hepatitis E Virus*. Food Environ Virol, 2020. **12**(4): p. 350-354.
148. Wolff, A., et al., *Stability of hepatitis E virus at different pH values*. Int J Food Microbiol, 2020. **325**: p. 108625.
149. Aubry, F., et al., *Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: a historical perspective*. Antiviral Res, 2015. **114**: p. 67-85.
150. Almazan, F., et al., *Reprint of: Coronavirus reverse genetic systems: infectious clones and replicons*. Virus Res, 2014. **194**: p. 67-75.
151. Panda, S.K., et al., *The in vitro-synthesized RNA from a cDNA clone of hepatitis E virus is infectious*. J Virol, 2000. **74**(5): p. 2430-7.
152. Emerson, S.U., et al., *Recombinant hepatitis E virus genomes infectious for primates: importance of capping and discovery of a cis-reactive element*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15270-5.
153. Huang, Y.W., et al., *Capped RNA transcripts of full-length cDNA clones of swine hepatitis E virus are replication competent when transfected into Huh7 cells and infectious when intrahepatically inoculated into pigs*. J Virol, 2005. **79**(3): p. 1552-8.
154. Cordoba, L., et al., *Rescue of a genotype 4 human hepatitis E virus from cloned cDNA and characterization of intergenotypic chimeric viruses in cultured human liver cells and in pigs*. J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 10): p. 2183-2194.
155. Zhu, Y., et al., *Infectivity of a genotype 4 hepatitis E virus cDNA clone by intrahepatic inoculation of laboratory rats*. Vet Microbiol, 2013. **166**(3-4): p. 405-11.
156. Varma, S.P., et al., *Hepatitis E virus replication involves alternating negative- and positive-sense RNA synthesis*. J Gen Virol, 2011. **92**(Pt 3): p. 572-81.
157. Yamada, K., et al., *Construction of an infectious cDNA clone of hepatitis E virus strain JE03-1760F that can propagate efficiently in cultured cells*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 2): p. 457-462.
158. Shiota, T., et al., *The hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life cycle: implication for viral genome encapsidation and particle stabilization*. J Virol, 2013. **87**(10): p. 6031-6.
159. Scholz, J., et al., *Establishment of a Plasmid-Based Reverse Genetics System for the Cell Culture-Adapted Hepatitis E Virus Genotype 3c Strain 47832c*. Pathogens, 2020. **9**(3): p. 1-15.
160. Yu, W., et al., *Successful infection of BALB/c mice by a swine hepatitis E virus clone constructed with reverse genetics*. BMC Infect Dis, 2018. **18**(1): p. 1-10.
161. Huang, F.F., et al., *Construction and characterization of infectious cDNA clones of a chicken strain of hepatitis E virus (HEV), avian HEV*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 9): p. 2585-2593.
162. Kwon, H.M., et al., *Construction of an infectious cDNA clone of avian hepatitis E virus (avian HEV) recovered from a clinically healthy chicken in the United States and characterization of its pathogenicity in specific-pathogen-free chickens*. Vet Microbiol, 2011. **147**(3-4): p. 310-9.
163. Park, S.J., et al., *Construction of an infectious cDNA clone of genotype 1 avian hepatitis E virus: characterization of its pathogenicity in broiler breeders and demonstration of its utility in studying the role of the hypervariable region in virus replication*. J Gen Virol, 2015. **96**(Pt 5): p. 1015-1026.
164. Li, T.C., et al., *Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus*. J Gen Virol, 2015. **96**(Pt 6): p. 1320-1327.
165. Debing, Y., et al., *A rat model for hepatitis E virus*. Dis Model Mech, 2016. **9**(10): p. 1203-1210.
166. Buchholz, U.J., S. Finke, and K.K. Conzelmann, *Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the*

- human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter.* J Virol, 1999. **73**(1): p. 251-9.
167. Schielke, A., et al., *Thermal stability of hepatitis E virus assessed by a molecular biological approach.* Virol J, 2011. **8**(487): p. 1-9.
168. Jothikumar, N., et al., *A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus.* J Virol Methods, 2006. **131**(1): p. 65-71.
169. Kanai, Y., et al., *Entirely plasmid-based reverse genetics system for rotaviruses.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(9): p. 2349-2354.
170. Yamada, K., et al., *ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells.* J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 8): p. 1880-1891.
171. Conrad, T., et al., *Maximizing transcription of nucleic acids with efficient T7 promoters.* Commun Biol, 2020. **3**(1): p. 1-8.
172. Lin, S. and Y.J. Zhang, *Advances in Hepatitis E Virus Biology and Pathogenesis.* Viruses, 2021. **13**(2): p. 1-23.
173. Munoz-Chimeno, M., et al., *Proline-Rich Hypervariable Region of Hepatitis E Virus: Arranging the Disorder.* Microorganisms, 2020. **8**(9): p. 1-15.
174. Nguyen, H.T., et al., *A naturally occurring human/hepatitis E recombinant virus predominates in serum but not in faeces of a chronic hepatitis E patient and has a growth advantage in cell culture.* J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 3): p. 526-530.
175. Emerson, S.U., et al., *In vitro replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein.* J Virol, 2004. **78**(9): p. 4838-46.
176. Blazquez, A.B. and J.C. Saiz, *Potential for Protein Kinase Pharmacological Regulation in Flaviviridae Infections.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(24).
177. Chen, H., et al., *MeMo: a web tool for prediction of protein methylation modifications.* Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Web Server issue): p. W249-53.
178. Finkemeier, I. and D. Schwarzer, *Lysin-Acetylierung: eine altbekannte Proteinmodifikation in neuem Licht.* BIOspektrum, 2013. **19**(7): p. 810-812.
179. Popovic, D., D. Vucic, and I. Dikic, *Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment.* Nat Med, 2014. **20**(11): p. 1242-53.
180. Hu, J., L. Zhang, and X. Liu, *Role of Post-translational Modifications in Influenza A Virus Life Cycle and Host Innate Immune Response.* Front Microbiol, 2020. **11**: p. 517461.
181. Liu, P., et al., *The role of nuclear localization signal in parvovirus life cycle.* Virol J, 2017. **14**(1): p. 1-6.
182. Rowland, R.R. and D. Yoo, *Nucleolar-cytoplasmic shuttling of PRRSV nucleocapsid protein: a simple case of molecular mimicry or the complex regulation by nuclear import, nucleolar localization and nuclear export signal sequences.* Virus Res, 2003. **95**(1-2): p. 23-33.
183. Todt, D., et al., *In vivo evidence for ribavirin-induced mutagenesis of the hepatitis E virus genome.* Gut, 2016. **65**(10): p. 1733-43.