

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Andreas J. Krause

aus: Worms, Deutschland

Tag der mündlichen Prüfung:

Eintrittsinhibition von Hepatitis-B- und -D-Viren

Funktionelle Charakterisierung HBV-abgeleiteter Peptide und Hybride

Gutachter: Prof. Dr. Walter Mier

Prof. Dr. Gert Fricker

Zusammenfassung

Infektionen mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) und dem Hepatitis-D-Virus (HDV) stellen eines der größten Gesundheitsrisiken weltweit dar. Als Virusoid produziert HDV keine eigenen Hüllproteine, sondern ist auf HBV als Helfervirus angewiesen. Eine HBV/HDV-Ko-Infektion gilt als schwerste Form der Hepatitis und bislang stehen nur stark limitierte Therapieoptionen zur Verfügung. Der *first-in-class* Eintrittsinhibitor Myrcludex B (Bulevirtide), ein synthetisches 47 Aminosäuren langes Lipopeptid, das sich von der preS1 Domäne des großen HBV Oberflächenproteins L-HBsAg ableitet, stellt die erste zielgerichtete Therapie gegen eine HDV-Infektion dar. Es besetzt die Bindestelle der Virushülle am Eintrittsrezeptor *sodium taurocholate co-transporting polypeptide* (NTCP) und verhindert die Aufnahme des Viruspartikels in die Hepatozyte. Myrcludex B wurde in der Forschung vielseitig genutzt z.B. zur Identifizierung von NTCP als viraler Eintrittsrezeptor oder zum spezifischen Transport anderer Moleküle zur Leber. Vor allem die essentielle Sequenz, Aminosäuren 9-15, wurde intensiv untersucht. Da derzeit keine Kristallstruktur von NTCP bekannt ist, ist der exakte Bindemechanismus von Myrcludex B und der Viren schwer zu erfassen.

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, Sequenzbereiche innerhalb der akzessorische Domäne (Aminosäuren 22-48) von Myrcludex B zu identifizieren, die entscheidend zur Wirksamkeit beitragen und diese zu charakterisieren. Es wurden verschiedene Peptide mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt, die durch Deletionen, Alanin-Austausch und Austausch der akzessorischen Domäne gegen wirtsfremde Peptidbereiche verändert wurden. Dabei konnte das PDWD-Motiv (Positionen 30-33) identifiziert werden, welches auch in den wirtsfremden Sequenzen vorzufinden war. In Bindungsversuchen mit fluoreszenzmarkierten Peptiden und *in vitro* HBV/HDV-Infektionen konnte gezeigt werden, dass eine intakte akzessorische Domäne für die spezifische Zellbindung sowie die hochpotente Inhibition des Viruseintritts nötig ist. Die Deletion der akzessorischen Domäne resultierte in einem ca. 100-fachen Wirkverlust, ein Alanin-Austausch von ³²Trp und ³³Asp führte zu einem ca. 20-fach erhöhten IC₅₀-Wert. Die spezifische Leberanreicherung hängt hingegen von der essentiellen Sequenz des Peptids ab, was mittels ¹²⁵Iod-markierten Peptiden im Mausmodell festgestellt werden konnte. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde die Hypothese aufgestellt, dass das PDWD-Motiv als Gallensäure-Imitationssequenz mit der Substratbindetasche von NTCP interagiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die aufgestellte Hypothese untersucht, indem potentielle duale NTCP-Inhibitoren synthetisiert charakterisiert wurden. Dazu wurden Synthesestrategien etabliert, um Arzneistoffe, die von NTCP transportiert werden, mit unterschiedlichen Peptiden zu konjugieren, welche keine akzessorische Domäne besitzen. In HBV/HDV-Infektionen *in vitro* waren deutliche Aktivitätsunterschiede der verschiedenen hybriden Moleküle zu beobachten; variierend einerseits nach Kopplungsposition, andererseits nach Kopplungspartner. Ebenso waren unterschiedlich starke Einflüsse auf den physiologischen Gallensalztransport festzustellen. Die deutliche, synergistische Wirksteigerung der synthetisierten Substanzen stützt die aufgestellte Hypothese. Um die isolierte inhibitorische Effektivität der verwendeten Arzneistoffe in Infektionen untersuchen zu können, wurde ein HDV-Infektionsmodell etabliert. Es war möglich, eine hochaktive Leitsubstanz „myr-2-21yK(TRIAC)“ zu synthetisieren und charakterisieren. Das Molekül zeigte keine Zytotoxizität, während im Vergleich zum Vorläuferpeptid eine verbesserte Wirksamkeit *in vitro* und eine verlängerte leberspezifische Halbwertszeit *in vivo* erreicht wurde: myr-2-21yK(TRIAC) inhibierte HBV- bzw. HDV-Infektionen sechs- bzw. 30-fach stärker und reicherte sich im Mausmodell spezifisch in der Leber und der Milz an. Die Leitsubstanz wird schneller von der Milz als von der Leber eliminiert und verbleibt mit einer Halbwertszeit von acht Stunden im Vergleich zum Edukt-Peptid doppelt so lang am Wirkort.

Summary

Infections with the hepatitis B virus (HBV) and the hepatitis D virus (HDV) are a major global health concern. HDV is a satellite virus and relies on HBV as a helper virus, since it does not produce its own envelope proteins. A co-infection with both viruses results in the most severe hepatitis for which there are only very limited therapeutic approaches. The *first-in-class* entry-inhibitor Myrcludex B (Bulevirtide), a synthetic lipo-peptide consisting 47 amino acid (aa), is the first treatment specifically targeting HDV. It is derived from the large surface antigen of HBV (L-HBsAg) and prevents the uptake of viral particles, blocking the interaction between L-HBsAg and the viral entry-receptor *sodium taurocholate co-transporting polypeptide* (NTCP). In research, Myrcludex B was used extensively, e.g. for the identification of NTCP as the viral entry-receptor or as a vehicle for specific liver-targeting. Its essential sequence, aa 9-15, was also analyzed thoroughly. The exact binding mechanism of Myrcludex B or the viral particles is not completely understood as there has been no successful crystallization of NTCP yet.

In the first part of the thesis different peptides containing aa exchanges to alanine, foreign-to-host-sequences or deletions were synthesized via solid phase peptide synthesis. This allowed to identify aa within the accessory domain (aa 22-48) of Myrcludex B and their contribution to its efficacy. The PDWD-motif (aa 30-33), present in human as well as non-human sequences, was found to be significant. Binding assays using fluorescence-labeled peptides as well as *in vitro* HBV/HDV infection assays showed the importance of an intact accessory domain for specific cell-binding and highly potent entry-inhibition of the peptides. The deletion of the accessory domain resulted in a 100-fold decrease of activity, while an exchange of aa ³²Trp and ³³Asp with alanine increased the IC₅₀-value 20-fold. However, targeting the liver was mediated by the essential site which could be shown in a mouse model using ¹²⁵Iodine-labeled peptides. Based on these results, the hypothesis was made that the PDWD-motif acts as an imitation-sequence of bile acids and interacts with the substrate binding pocket of NTCP.

In the second part of the thesis this hypothesis was examined by synthesis and characterization of potential dual-acting NTCP-inhibitors. To obtain these molecules, strategies for the conjugation of NTCP-transported drugs and different peptides without an accessory domain were established. It could be shown that, depending on conjugation site and conjugation partner, activity levels of these hybrids varied in *in vitro* HBV/HDV-infections. Similarly, the physiological transport of bile acids was affected to different degrees. The distinct and synergistic increase of activity of the compounds supports the hypothesis. An HDV-infection model was established to analyze the isolated efficacy in infections of the drugs used. It was possible to synthesize a highly active lead substance “myr-2-21yK(TRIAC)”. It showed no cytotoxic effects but improved efficacy *in vitro* and prolonged specific liver enrichment *in vivo* when compared to its progenitor peptide: myr-2-21yK(TRIAC) was 6-fold and 30-fold more active in HBV/HDV-infections respectively while accumulating specifically in the liver and spleen of mice. The elimination of the lead substance from the spleen was faster than from the liver and the liver-specific half-life was eight hours – a twofold increase compared to the parent-peptide.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Virale Hepatitis	1
1.2	Hepatitis-B-Virus	2
1.2.1	Hepatitis B-Infektion: Epidemiologie	2
1.2.2	Aufbau und Struktur.....	3
1.2.3	Replikationszyklus	5
1.2.3.1	Bindung an die Zelloberfläche und Eintritt	5
1.2.3.2	DNA-Prozessierung und Bildung des Minichromosoms	6
1.2.3.3	Neubildung, Zusammenbau und Freisetzung viraler Partikel.....	7
1.2.3.4	HBV in anderen Spezies	7
1.2.4	Behandlung	8
1.2.4.1	Therapieindikation und Ziel der Therapie.....	8
1.2.4.2	Derzeitige Standardtherapie.....	8
1.3	Hepatitis-Delta-Virus	10
1.3.1	Hepatitis D-Infektion: Epidemiologie	10
1.3.2	Aufbau und Struktur.....	11
1.3.3	Replikationszyklus	11
1.3.3.1	Bindung an die Zelloberfläche und Eintritt	11
1.3.3.2	Rolling-Circle-Replikation und Austritt.....	11
1.3.3.3	HDV-ähnliche Viren und andere Helferviren	12
1.3.4	Behandlung	12
1.3.4.1	Derzeitige Standardtherapie.....	12
1.3.4.2	Problematik.....	13
1.4	NTCP	13
1.4.1	Funktion und Rolle	13
1.4.1.1	Physiologische und pathophysiologische Funktion	13
1.4.1.2	Einsatz in humanen Zellmodellen	14
1.4.2	Struktur- und Interaktionsanalyse	14
1.4.2.1	Kristallstruktur, Bindetaschen und Modifikationen.....	14
1.4.2.2	Interaktion mit anderen Rezeptoren	15
1.4.3	NTCP als therapeutisches Zielmolekül in HBV/HDV-Infektionen.....	16

1.4.3.1	Kompetitive Inhibition	16
1.4.3.2	Andere Wege der Interaktion	18
1.5	Ziel dieser Arbeit	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Material.....	21
2.1.1	Chemikalien.....	21
2.1.2	Zellkultur	22
2.1.2.1	Zelllinien und Chemikalien.....	22
2.1.2.2	Antikörper	23
2.1.3	Tiere	23
2.1.4	Instrumente und Equipment.....	24
2.1.5	Software	25
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Festphasenpeptidsynthese (SPPS)	25
2.2.1.1	Modifikationen.....	26
2.2.2	Synthese der Hybride	27
2.2.2.1	Kopplung von TRIAC.....	27
2.2.2.2	Kopplung von Sulfasalazin.....	27
2.2.3	Aufreinigung und Lyophilisation der Produkte	27
2.2.4	Kultivierung der Zellen	27
2.2.4.1	HuH7-NTCP.....	27
2.2.4.2	HepG2 A3	28
2.2.5	Bindungs-Assay	28
2.2.5.1	Mikroskopie	28
2.2.5.2	Fluorescence-Assisted Cell Sorting (FACS).....	28
2.2.6	HDV-Infektion.....	28
2.2.7	HBV-Infektion.....	29
2.2.8	Automatisierte Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	29
2.2.9	Infektionsinhibition	29
2.2.10	In-Cell ELISA.....	30
2.2.11	[³ H]-Taurocholat-Aufnahme-Assay	30
2.2.12	WST-1 Assay.....	31
2.2.13	Radiomarkierung mit Iod-125	31
2.2.14	Bioverteilung und Leberkinetik.....	31

2.2.15	Graphische und statistische Auswertung.....	32
--------	---	----

3 Ergebnisse.....33

3.1	Erster Teil: Synthese und Charakterisierung von Peptiden zur Analyse der akzessorischen Domäne.....	33
3.1.1	Auswahl und Synthese der verwendeten Peptide.....	33
3.1.1.1	Konservierte Aminosäuren in der preS1-Sequenz der verschiedenen Genotypen	34
3.1.1.2	Kontrollpeptide.....	34
3.1.1.3	Alanin-Substitutionen und Sequenztausch der akzessorischen Domäne.....	35
3.1.1.4	Synthese fluoreszenzmarkierter Peptide.....	36
3.1.2	Bindungsanalyse der fluoreszenzmarkierten Peptide an NTCP.....	37
3.1.2.1	Fluoreszenzmikroskopie der Bindung von myr-2-48yK _{atto} , myr-2-21yK _{atto} , myr-2-48yK(11-15Ala) _{atto} und myr-2-21yK(11-15Ala) _{atto} an HuH7-NTCP-Zellen.....	37
3.1.2.2	FACS-Analyse der Bindung von myr-2-48yK _{atto} , myr-2-21yK _{atto} myr-2-48yK(11-15Ala) _{atto} und myr-2-21yK(11-15Ala) _{atto} an HuH7-NTCP-Zellen.....	38
3.1.3	HDV-Infektionsinhibition in HepG2 A3-Zellen.....	39
3.1.3.1	In-Cell ELISA zur Bestimmung der Infektionsinhibition über Nacht in HepG2 A3-Zellen	40
3.1.3.2	Infektionsinhibition von MyrB und myr-2-21yK.....	40
3.1.3.3	Infektionsinhibition zur Untersuchung der akzessorischen Domäne	41
3.1.4	[³ H]-Taurocholat-Aufnahme-Assay	43
3.1.4.1	Fehlerstreuung im [³ H]-Taurocholat-Aufnahme-Assay bei Nutzung der HuH7-NTCP Zelllinie.....	43
3.1.4.2	[³ H]-Taurocholat-Aufnahme-Assay mit MyrB und myr-2-21yK in HepG2 A3-Zellen	43
3.1.4.3	[³ H]-Taurocholat-Aufnahme-Assay zur Untersuchung der akzessorischen Domäne in HepG2 A3-Zellen	44
3.1.5	HBV-Infektionsinhibition in HepG2 A3-Zellen.....	46
3.1.5.1	Bestimmung des HBe-Antigentiters.....	47
3.2	Zweiter Teil: Synthese und Charakterisierung potentieller dualer NTCP-Inhibitoren	51
3.2.1	Synthese der verwendeten Peptide.....	51
3.2.1.1	myr-2-21-Derivate.....	51
3.2.1.2	myr-K3-21-Derivate.....	51
3.2.2	Synthese der Peptid-Arzneistoff-Hybride	52
3.2.2.1	TRIAC-Kopplung	53
3.2.2.2	Sulfasalazin-Kopplung	53
3.2.3	HDV-Infektionsinhibition in verschiedenen Infektionsmodellen.....	56

3.2.3.1	Anwendung und Optimierung verschiedener Infektionsmodelle	56
3.2.3.2	In-Cell ELISA zur Bestimmung der Infektionsinhibition über Nacht in HuH7-NTCP-Zellen	57
3.2.3.3	In-Cell ELISA zur Bestimmung der Infektionsinhibition im modifizierten HuH7-NTCP Infektionsmodell	62
3.2.3.4	In-Cell ELISA zur Bestimmung der Infektionsinhibition über Nacht in HepG2 A3-Zellen	64
3.2.4	[³ H]-Taurocholat-Aufnahme-Assay	66
3.2.4.1	[³ H]-Taurocholat-Aufnahme-Assay mit myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul) ...	66
3.2.4.2	[³ H]-Taurocholat-Aufnahme-Assay mit TRIAC und Sulfasalazin	68
3.2.5	HBV-Infektionsinhibition in HepG2 A3-Zellen	68
3.2.5.1	Bestimmung des HBe-Antigentiters.....	69
3.2.6	Zytotoxizität in HuH7-NTCP-Zellen.....	71
3.2.6.1	Zytotoxizität von DMSO	71
3.2.6.2	Zytotoxizität von MyrB, myr-2-21yK, myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul).....	71
3.2.6.3	Zytotoxizität von TRIAC und Sulfasalazin	73
3.2.7	Szintigraphische Bildgebung im Mausmodell	75
3.2.7.1	Szintigraphische Bildgebung von ¹²⁵ I-myr-2-48y, ¹²⁵ I-myr-2-48yK(11-15Ala) und ¹²⁵ I-myr-2-21y	75
3.2.7.2	Szintigraphische Bildgebung von ¹²⁵ I-myr-2-21y, ¹²⁵ I-myr-2-21yK(TRIAC), ¹²⁵ I-myr-2-21yK(G-Sul) und ¹²⁵ I-myr-2-21yK(TRIAC)(11-15Ala).....	76
3.2.8	Bioverteilung und Leberkinetik von ¹²⁵ I-myr-2-48y, ¹²⁵ I-myr-2-21y und ¹²⁵ I-myr-2-21yK(TRIAC) im Mausmodell.....	78
4	Diskussion	81
4.1	myr-2-21yK interagiert spezifisch mit NTCP und verhindert den Eintritt von HBV/HDV in die Hepatozyten	81
4.1.1	myr-2-21yK zeigt eine spezifische Bindung an NTCP und agiert als Eintrittsinhibitor in HBV/HDV-Infektionen <i>in vitro</i>	81
4.1.2	myr-2-21yK reichert sich <i>in vivo</i> spezifisch in der Leber an	82
4.2	Konserviertes PDWD-Motiv in der akzessorischen Domäne trägt wesentlich zur Effektivität von MyrB bei	82
4.2.1	³² Trp und ³³ Asp sind maßgeblich an der Funktionalität der akzessorischen Domäne beteiligt	82
4.2.2	Addition wirtsfremder akzessorischer Domänen verbessert die Wirksamkeit von myr-2-21yK.....	83
4.3	Synthese und Charakterisierung neuartiger, hybrider NTCP-Inhibitoren.....	84

4.3.1	Screening zeigt Wirkunterschiede der Hybride je nach Kopplungsposition und –partner auf, einige Verbindungen zeigen starke Aktivität und unterstützen die Hypothese	84
4.3.2	myr-2-21yK(G-Sul) und myr-2-21yK(TRIAC) zeigen spezifische NTCP-Interaktion und inhibieren eine <i>in vitro</i> Infektion mit HBV/HDV.....	86
4.3.3	myr-2-21yK(TRIAC) zeigt neben der sehr hohen inhibitorischen Effektivität <i>in vitro</i> auch vorteilhafte Bioverteilung und Halbwertszeit <i>in vivo</i>	88
4.4	Fazit und Schlussfolgerungen.....	89
5	Publikationen und Präsentationen	91
6	Danksagung.....	91
7	Literaturverzeichnis.....	93

Abbildungen

Abbildung 1: Phylogenetischer Baum der Hepadnaviren.	1
Abbildung 2: Anzahl der Todesfälle durch virale Hepatitiden im Jahr 2015.	2
Abbildung 3: Weltweite Verteilung der HBV-Genotypen.	3
Abbildung 4: Schematische Übersicht des Hepatitis-B-Viruspartikels und seines Genoms.	4
Abbildung 5: Der HBV-Replikationszyklus.	6
Abbildung 6: Weltweite Verteilung der Prävalenz von anti-HDV-Antikörpern in HBsAg-positiven Patienten.	10
Abbildung 7: Strukturformel von Sulfasalazin.	17
Abbildung 8: Strukturformel von Tiratricol.	17
Abbildung 9: Schema des Entwicklungsprozesses von Myrcludex B.	18
Abbildung 10: Sequenzvergleich der preS1/2-48-Regionen der HBV-Genotypen A-F.	34
Abbildung 11: Darstellung der synthetisierten Kontrollpeptide.	34
Abbildung 12: Darstellung der synthetisierten Peptide zur Untersuchung der akzessorischen Domäne.	35
Abbildung 13: Reaktionsschema zur Synthese fluoreszenzmarkierter Peptide.	36
Abbildung 14: Bindung fluoreszenzmarkierter Peptide an HuH7-NTCP-Zellen.	38
Abbildung 15: FACS-Analyse der Bindung fluoreszenzmarkierte Peptide an HuH7-NTCP-Zellen.	39
Abbildung 16: HDaG Immunfärbung HDV-infizierter HepG2 A3-Zellen.	40
Abbildung 17: Reduktion der HDV-Infektion in HepG2 A3-Zellen bei Behandlung mit MyrB und myr-2-21yK.	41
Abbildung 18: Reduktion der HDV-Infektion in HepG2 A3-Zellen bei Behandlung mit unterschiedlichen Peptiden.	42
Abbildung 19: Reduktion der [³ H]-TC-Aufnahme in HepG2 A3-Zellen bei Behandlung mit MyrB und myr-2-21yK.	44
Abbildung 20: Reduktion der [³ H]-TC-Aufnahme in HepG2 A3-Zellen bei Behandlung mit unterschiedlichen Peptiden.	45
Abbildung 21: HBeAg-Sekretion bei Behandlung mit MyrB und myr-2-21yK nach sieben Tagen in HepG2 A3-Zellen.	47
Abbildung 22: HBeAg-Sekretion bei Behandlung mit unterschiedlichen Peptiden nach sieben Tagen in HepG2 A3-Zellen.	48
Abbildung 23: HBeAg-Sekretion bei Behandlung mit unterschiedlichen Peptiden nach zwölf Tagen in HepG2 A3-Zellen.	49

Abbildung 24: Darstellung der synthetisierten myr-2-21-Derivate.	51
Abbildung 25: Darstellung der synthetisierten myr-K3-21-Derivate.	52
Abbildung 26: Darstellung der synthetisierten Peptid-TRIAC-Hybride.	53
Abbildung 27: Darstellung der synthetisierten Peptid-Sulfasalazin-Hybride.	55
Abbildung 28: HDAg Immunfärbung HDV-infizierter HuH7-NTCP-Zellen.	56
Abbildung 29: Reduktion der HDV-Infektion in HuH7-NTCP-Zellen bei Behandlung mit myr-2-48yK und myr-2-21yK über Nacht.	57
Abbildung 30: Reduktion der HDV-Infektion in HuH7-NTCP-Zellen bei Behandlung mit kurzen Peptiden über Nacht.	58
Abbildung 31: Reduktion der HDV-Infektion in HuH7-NTCP-Zellen bei Behandlung mit myr-2-21yK-Hybriden über Nacht.	59
Abbildung 32: Reduktion der HDV-Infektion in HuH7-NTCP-Zellen bei Behandlung mit myr-K3-21yK-Hybriden über Nacht.	61
Abbildung 33: Reduktion der HDV-Infektion in HuH7-NTCP-Zellen über 2,5 Stunden.	62
Abbildung 34: Reduktion der HDV-Infektion durch TRIAC und Sulfasalazin in HuH7-NTCP-Zellen über 2,5 Stunden.	64
Abbildung 35: Reduktion der HDV-Infektion durch myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul) in HepG2 A3-Zellen.	65
Abbildung 36: Reduktion der ^[3H]-TC-Aufnahme in HepG2 A3-Zellen bei Behandlung mit ausgewählten Hybriden.	67
Abbildung 37: Reduktion der ^[3H]-TC-Aufnahme in HepG2 A3-Zellen bei Behandlung mit TRIAC und Sulfasalazin.	68
Abbildung 38: HBeAg-Sekretion bei Behandlung mit myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul) nach sieben Tagen in HepG2 A3-Zellen.	69
Abbildung 39: HBeAg-Sekretion bei Behandlung mit myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul) nach zwölf Tagen in HepG2 A3-Zellen.	70
Abbildung 40: Zytotoxizität von DMSO in HuH7-NTCP-Zellen.	71
Abbildung 41: Zytotoxizität verschiedener Substanzen im Vergleich zu DMSO in HuH7-NTCP-Zellen.	72
Abbildung 42: Zytotoxizität von TRIAC und Sulfasalazin in HuH7-NTCP-Zellen.	74
Abbildung 43: Vergleich der Zytotoxizität von DMSO, TRIAC und Sulfasalazin in HuH7-NTCP-Zellen.	74
Abbildung 44: Szintigraphische Bilder der Bioverteilung in weiblichen SWISS Mäusen von ^{125I}-markierten Peptiden.	75

Abbildung 45: Szintigraphische Bilder der Bioverteilung in weiblichen SWISS Mäusen von ¹²⁵I-markierten Substanzen.	77
Abbildung 46: Bioverteilung und Leberkinetik von ¹²⁵I-myr-2-48y, ¹²⁵I-myr-2-21y und ¹²⁵I-myr-2-21yK(TRIAC) in weiblichen SWISS Mäusen.	79

Tabellen

Tabelle 1: Übersicht der aktuell zugelassenen Arzneimittel für HBV- oder HBV-Infektionen.	9
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Chemikalien.	21
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Zelllinien.	22
Tabelle 4: Übersicht der in der Zellkultur verwendeten Chemikalien.	22
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Antikörper.	23
Tabelle 6: Übersicht aller verwendeter Gerätschaften.	24
Tabelle 7: Übersicht der verschiedenen verwendeten HPLC-Anlagen.	24
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Chromatographie-Säulen.	25
Tabelle 9: Molekülmassen und massenspektrometrische Ergebnisse der Kontrollpeptide.	35
Tabelle 10: Molekülmassen und massenspektrometrische Ergebnisse der Peptide zur Untersuchung der akzessorischen Domäne.	36
Tabelle 11: Molekülmassen und massenspektrometrische Ergebnisse der fluoreszenzmarkierten Peptide.	37
Tabelle 12: Übersicht der IC₅₀-Werte von MyrB und myr-2-21yK in einer HDV-Infektion in HepG2 A3-Zellen.	41
Tabelle 13: Übersicht der IC₅₀-Werte unterschiedlicher Peptide in einer HDV-Infektion in HepG2 A3-Zellen.	43
Tabelle 14: Übersicht der IC₅₀-Werte von MyrB und myr-2-21yK im [³H]-TC-Aufnahme-Assay in HepG2 A3-Zellen.	44
Tabelle 15: Übersicht der IC₅₀-Werte unterschiedlicher Peptide im [³H]-TC-Aufnahme-Assay in HepG2 A3-Zellen.	46
Tabelle 16: Übersicht der IC₅₀-Werte unterschiedliche Peptide in einer HBV-Infektion nach sieben Tagen in HepG2 A3-Zellen.	48
Tabelle 17: Übersicht der IC₅₀-Werte unterschiedliche Peptide in einer HBV-Infektion nach zwölf Tagen in HepG2 A3-Zellen.	49
Tabelle 18: Molekülmassen und massenspektrometrische Ergebnisse der myr-2-21-Derivate.	51
Tabelle 19: Molekülmassen und massenspektrometrische Ergebnisse der myr-K3-21-Derivate.	52
Tabelle 20: Molekülmassen und massenspektrometrische Ergebnisse der Peptid-TRIAC-Hybride. ..	53
Tabelle 21: Optimierung der Kopplung von Sulfasalazin an das primäre α-Amin von Glycin.	54
Tabelle 22: Reaktionsbedingungen zur Kopplung von Sulfasalazin an das primäre ε-Amin von Lysin.	54

Tabelle 23: Molekülmassen und massenspektrometrische Ergebnisse der Peptid-Sulfasalazin-Hybride.....	55
Tabelle 24: Übersicht der IC₅₀-Werte von myr-2-48yK und myr-2-21yK in einer HDV-Infektion in HuH7-NTCP-Zellen über Nacht.	58
Tabelle 25: Übersicht der IC₅₀-Werte kurzer Peptide in einer HDV-Infektion in HuH7-NTCP-Zellen über Nacht.	58
Tabelle 26: Übersicht der IC₅₀-Werte von myr-2-21yK-Hybriden in einer HDV-Infektion in HuH7-NTCP-Zellen über Nacht.	60
Tabelle 27: Übersicht der IC₅₀-Werte von myr-K3-21yK-Hybriden in einer HDV-Infektion in HuH7-NTCP-Zellen über Nacht.	61
Tabelle 28: Übersicht der IC₅₀-Werte in der 2,5 Stunden Infektion von HuH7-NTCP-Zellen.....	63
Tabelle 29: Übersicht der IC₅₀-Werte von TRIAC und Sulfasalazin in der 2,5 Stunden Infektion von HuH7-NTCP-Zellen.	64
Tabelle 30: Übersicht der IC₅₀-Werte von myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul) in einer HDV-Infektion von HepG2 A3-Zellen.	66
Tabelle 31: Übersicht der IC₅₀-Werte ausgewählter Hybride im [³H]-TC-Aufnahme-Assay in HepG2 A3-Zellen.	67
Tabelle 32: Übersicht der IC₅₀-Werte von TRIAC und Sulfasalazin im [³H]-TC-Aufnahme-Assay in HepG2 A3-Zellen.	68
Tabelle 33: Übersicht der IC₅₀-Werte von myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul) in einer HBV-Infektion nach sieben Tagen in HepG2 A3-Zellen.....	69
Tabelle 34: Übersicht der IC₅₀-Werte von myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul) in einer HBV-Infektion nach zwölf Tagen in HepG2 A3-Zellen.....	70
Tabelle 35: Übersicht der Zellviabilität nach drei Stunden.	73
Tabelle 36: Übersicht der Zellviabilität nach 24 Stunden.....	73

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
ACN	Acetonitril
BH₃NHMe₂	Boran-Dimethylamin-Komplex
BSA	bovines Serumalbumin
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i>
COMU	(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium-hexafluorophosphat
DCM	Dichlormethan
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	doppelsträngige DNA
EGFR	<i>epithelial growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
eq.	Äquivalent(e); <i>equivalent(s)</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence-Assisted Cell Sorting</i>
FBS	fötales Kälberserum
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HBcAg	Hepatitis-B-Virus <i>core</i> Antigen
HBeAg	Hepatitis-B-Virus <i>early/excretory/enigma</i> Antigen
HBsAg	Hepatitis-B-Virus <i>surface</i> Antigen
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HAV	Hepatitis-A-Virus
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDAg	Hepatitis-D-Virus Antigen
HDV	Hepatitis-D-Virus; Hepatitis-Delta-Virus
HEV	Hepatitis-E-Virus
HOBt	1-Hydroxobenzotriazol
Hoechst	bisBenzimid (<i>Hoechst 33342</i>)

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase; <i>horseradish peroxidase</i>
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
¹²⁵I	Iod-125
IC₅₀	Halbmaximale Inhibitorische Konzentration
MeOH	Methanol
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NTCP	<i>Sodium taurocholate co-transporting polypeptide; SLC10A1</i>
ORF	offenes Leseraster; <i>open reading frame</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
Pd(PPh₃)₄	Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0)
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
pgRNA	prägenomische virale RNA
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidonophosphonium-hexafluorophosphat
rcDNA	<i>relaxed circular DNA</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute; <i>revolutions per minute</i>
<i>t</i>Bu	<i>tert</i> -Butyl-Schutzgruppe
TC	Taurocholat
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TIS	Triisopropylsilan
TRIAC	Tiratricol
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WST-1	wasserlösliches Tetrazoliumsalz

1 Einleitung

1.1 Virale Hepatitis

Die virale Hepatitis ist eine Entzündung der Leber, die durch hepatotrope Viren ausgelöst wird. Es werden fünf verschiedene Viren unterschieden: Hepatitis-A-, -B-, -C-, -D- und -E-Virus. Während die Hepatitisviren A und E fäkal-oral übertragen werden und stets einen akuten Krankheitsverlauf zeigen, ist der Infektionsweg für das Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV) und Hepatitis-D-Virus (HDV) nur parenteral, sexuell oder perinatal möglich. HBV, HCV und HDV können eine akute Hepatitis hervorrufen, im Verlauf können die Infektionen chronifizieren¹. HBV gilt als Prototyp der *Hepadnaviridae*, einer Familie der hepatotropen Viren, die bestimmte Gemeinsamkeiten wie ein Kapsid, eine zirkuläre, teilweise doppelsträngige DNA und eine Virushülle aufweisen². Die *Hepadnaviridae* können weiter in Gattungen unterteilt werden, darunter die *Avihepadnaviren*, die ausschließlich in Vögeln zu finden sind und *Orthohepadnaviren*, die Säugetiere befallen²⁻⁴. Durch aktuelle Forschung werden weitere Gruppierungen der *Hepadnaviridae* gefunden, die vermutlich neue Gattungen bilden⁵⁻⁷.

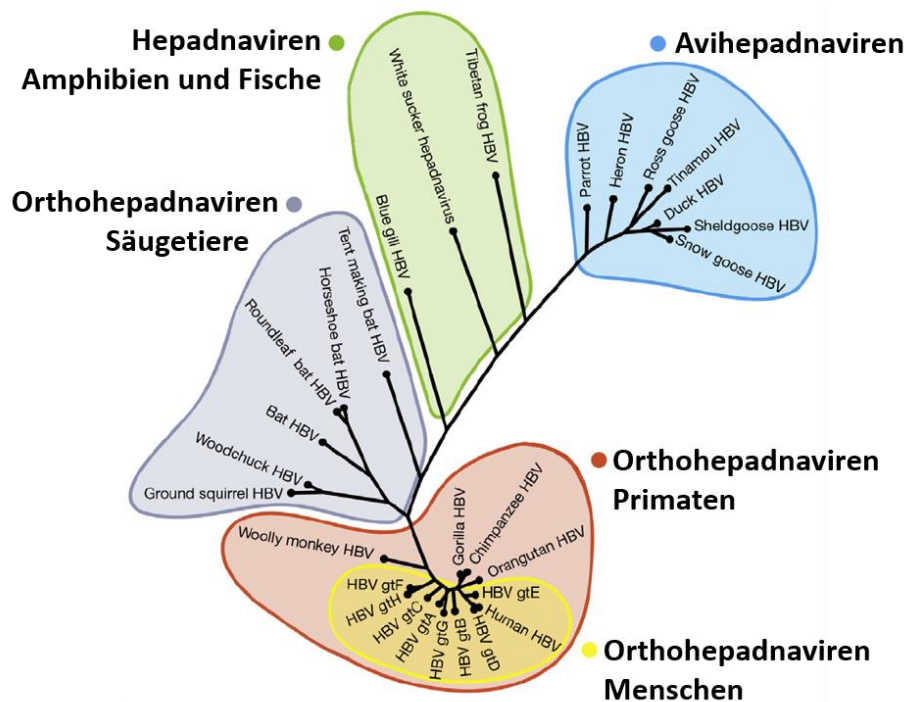


Abbildung 1: Phylogenetischer Baum der Hepadnaviren. Die Entfernungen eines Endpunktes zum anderen zeigen die genetische Nähe der verschiedenen Hepadnaviren untereinander an. Es wird in Viren unterschieden, die nur in Vögeln anzutreffen sind (Avihepadnaviren) und in Säugetieren (Orthohepadnaviren); die Gruppe der Amphibien und Fische ist erst seit kurzem bekannt und noch nicht näher charakterisiert. Adaptiert von *McNaughton et al., 2019*⁷.

Innerhalb der *Orthohepadnaviren* können verschiedene Spezies unterschieden werden (**Abbildung 1**), v.a. Primaten-HBV mitsamt humanen Hepatitis-B-Viren, Fledermaus-Hepatitis-B-Viren und Nagetier-Hepatitis-B-Viren⁷⁻¹¹. Das humane Hepatitis-B-Virus besteht aus neun identifizierten Genotypen A-I, welche sich in globaler Ausbreitung und Pathogenität unterscheiden^{1,12,13}.

1.2 Hepatitis-B-Virus

Das Hepatitis-B-Virus ist ein behülltes, hochorganisiertes DNA-Virus, dessen Gene überlappend im zirkulären Genom verankert sind^{14,15}. Da das Virus keinen direkten zytopathischen Effekt ausübt, entstehen die Symptomatik und die Folgeschäden erst durch die körpereigene Immunantwort des Wirts auf das Virus.

Bei einer akut verlaufenden Hepatitis B können Symptome auftreten, ein großer Teil der Erkrankten bleibt allerdings symptomlos¹⁶. Symptome der akuten Hepatitis sind meist ein allgemeines Unwohlsein wie Bauchschmerzen, Übelkeit und Müdigkeit, in einem Teil der Fälle kommt es zu einem Ikterus¹⁶⁻¹⁸. Bei weniger als 1 % kommt es zu akutem Leberversagen mit tödlichem Ausgang^{17,18}. Neben der akuten Hepatitis B besteht das Risiko der Chronifizierung, charakterisiert durch den Nachweis von *surface antigen* (HBsAg) über einen Zeitraum von > 6 Monaten¹⁸. Bei perinataler Transmission besteht ein hohes Risiko (80-90 %) eine chronische Hepatitis B zu entwickeln, bei Infektion im Erwachsenenalter liegt das Risiko bei ca. 5 %^{1,18}.

Schwerwiegende Folgeschäden einer chronischen Hepatitis B sind vor allem die Leberzirrhose und das hepatozelluläre Karzinom (HCC).

1.2.1 Hepatitis B-Infektion: Epidemiologie

Die Weltgesundheitsorganisation (*engl.: World Health Organisation; WHO*) ordnet der chronischen Hepatitis B-Infektion den Status als eines der größten Gesundheitsprobleme weltweit zu^{1,17}. Zurzeit werden 250-300 Millionen Menschen als an HBV infiziert geschätzt, wovon unter 10 % (22 Millionen) diagnostiziert sind^{1,17}. Im Jahr 2015 starben etwa 1,3 Millionen Menschen an einer viralen Hepatitis, wobei HBV der Großteil mit ca. 900 000 Toten zuzuordnen ist (**Abbildung 2**)¹.

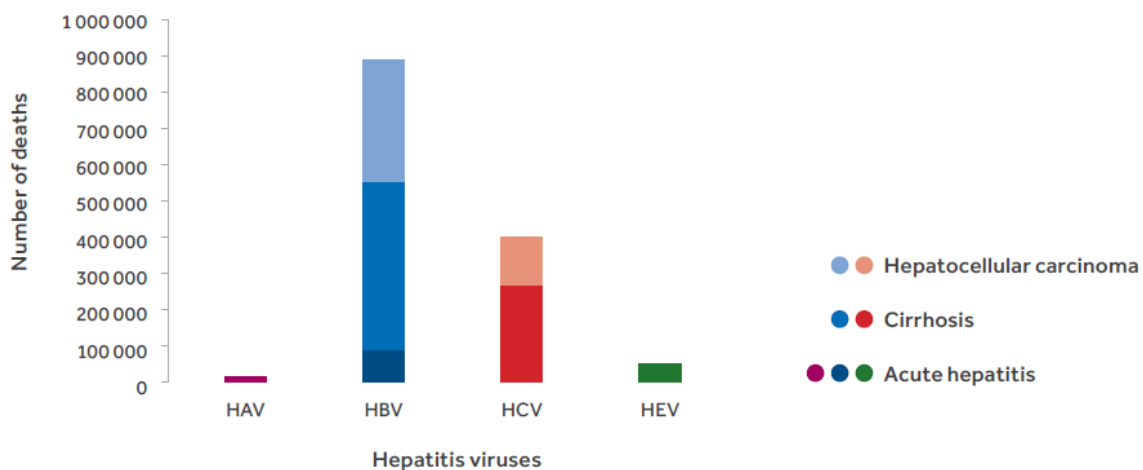


Abbildung 2: Anzahl der Todesfälle durch virale Hepatitiden im Jahr 2015. Hepatitis B-Infektionen (HBV) und Folgeerkrankungen konnten im Jahr 2015 mehr Todesfälle zugeordnet werden als Hepatitis C-Infektionen (HCV) inklusive Spätfolgen. Hepatitis A- (HAV) und -E-Infektionen (HEV) weisen nur akute Verläufe auf und niedrige Sterbezahlen. Quelle: *Global Hepatitis Report, 2017*¹

In großen Teilen Afrikas tritt HBV als endemische Krankheit mit einer Prävalenz von 5 % oder höher auf. Dort sind vor allem die Subsahara-Länder schwer betroffen, deren zentrale, südliche und westliche Regionen hoch endemisch ($\geq 8\%$) sind. In Asien gilt allein der Süden mit einer Prävalenz von ungefähr 3 % als weniger stark betroffen, während die restlichen Gebiete eine höhere Durchseuchung mit HBV

zeigen. Weiterhin ist Ozeanien mit einer Prävalenz von ungefähr 6 % stärker betroffen. Hingegen sind Europa, sowie Nord- und Südamerika mit einer Prävalenz unter 2 % weniger stark betroffen^{1,12,19}. Das größte Gesundheitsrisiko einer HBV-Infektion stellt die Chronifizierung mitsamt der Folgeschäden dar²⁰. Allein im Jahr 2012 konnten 430 000 Leberkarzinome auf HBV zurückgeführt werden – 56 % der weltweiten Fälle²¹. Es ist prognostiziert, dass das HCC die vierthäufigste Todesursache der Krebsleiden wird, mit 841 000 neuen Fällen und 782 000 jährlichen Todesfällen²². Die Nukleotidsequenzen der Genotypen A-I unterscheiden sich um mehr als 7,5 % voneinander^{12,13}. Es ist zu beobachten, dass sich bestimmte Genotypen in verschiedenen Regionen durchsetzen (**Abbildung 3**).

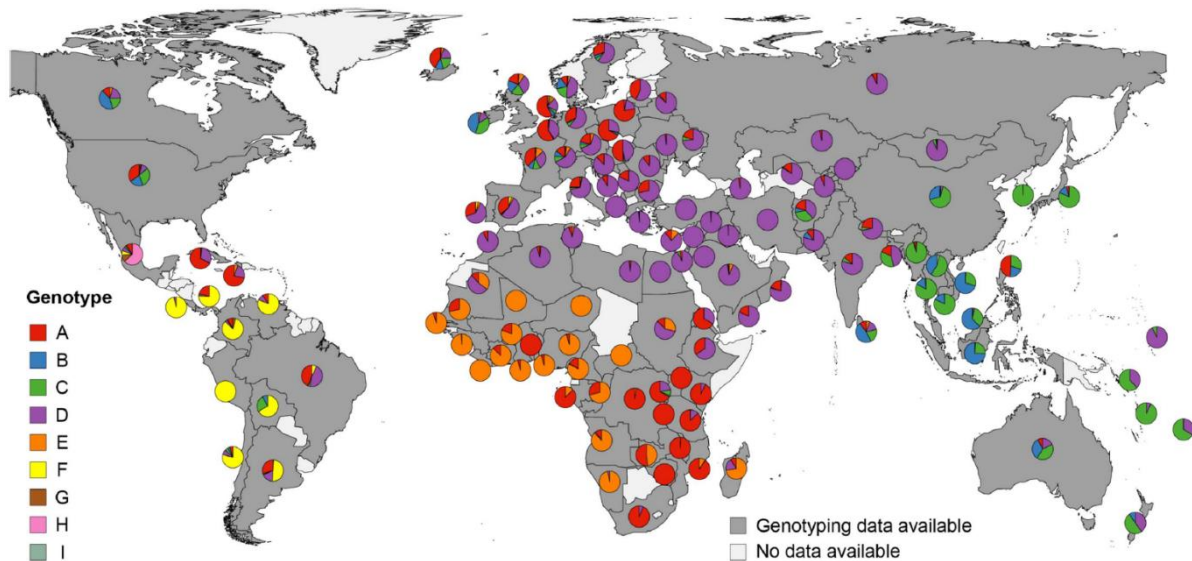


Abbildung 3: Weltweite Verteilung der HBV-Genotypen. Die neun verschiedenen Genotypen zeigen deutliche regionale Unterschiede. Die Kuchendiagramme stellen die proportionale Verteilung der Genotypen im jeweiligen Land dar. Nicht identifizierbare Genotypen oder verschiedene Genotypen in einer Testung sind nicht mit abgebildet. Quelle: *Velkov et al., 2018*¹²

So sind die Genotypen B und C in Ost- und Südost-Asien vertreten, Genotyp E in (West-)Afrika vorherrschend, Genotyp F beinahe ausschließlich in Südamerika zu finden, während die Genotypen A und D nahezu weltweit vorzufinden sind, mit dem Schwerpunkt in Eurasien^{1,12,13}.

1.2.2 Aufbau und Struktur

Das Genom des Hepatitis-B-Virus umfasst ungefähr 3200 DNA-Basenpaare, ist ringförmig aufgebaut und teilweise doppelsträngig^{14,15}. Unter den DNA-Viren besitzt HBV das kleinste Genom, welches allerdings sehr kompakt gepackt ist: Sieben Proteine können dank mehrerer offener Leseraster (*engl.: open reading frame; ORF*), welche überlappend angeordnet sind, aus dem Genom transkribiert werden^{23,24}. Dazu zählen die drei Varianten des Oberflächenproteins **HBsAg**, das Kapsidprotein **HBcAg** (*core antigen*) mit der alternativen Splicevariante **HBeAg** (*enigma, early* oder *excretory antigen*), die **virale Polymerase** (P-Protein), mit Teilfunktion als reverse Transkriptase und RNase H, sowie **HBx** oder X-Protein, das ein regulatorisches Protein darstellt.

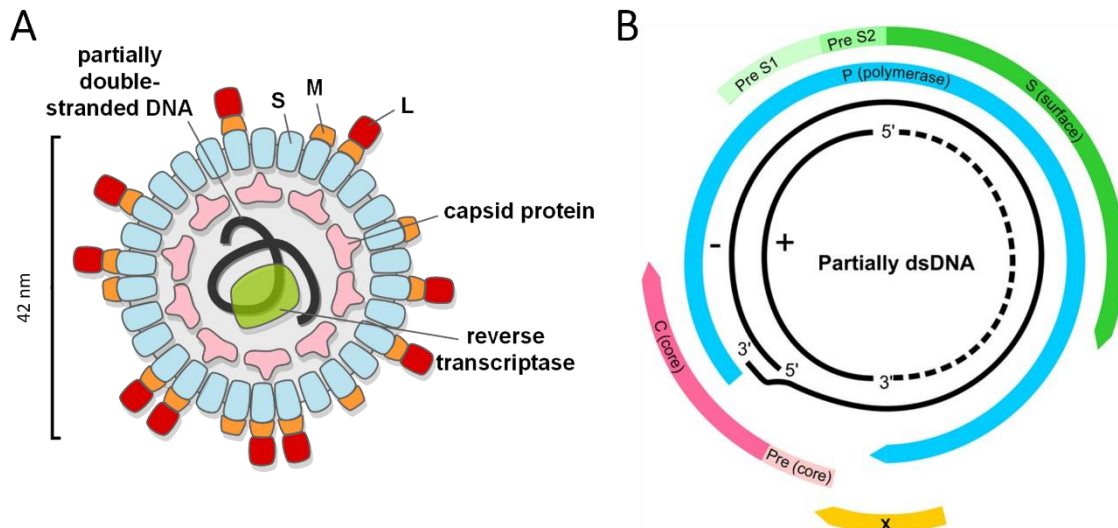


Abbildung 4: Schematische Übersicht des Hepatitis-B-Viruspartikels und seines Genoms. (A) Darstellung eines infektiösen Dane-Partikels. Abgebildet sind die Oberflächenproteine (S-, M-, L-HBsAg), Kapsidproteine, sowie die virale Transkriptase und die teilweise doppelsträngige DNA. Adaptiert von Müller, T., 2013²⁵ (B) Darstellung des HBV-Genoms mit teilweise doppelsträngiger DNA (dsDNA) und den vier ORFs. Nicht dargestellt ist die kovalent an das 5'-Ende des vollständigen (-)-Strangs gebundene virale Transkriptase. ORF PreS1/PreS2/S codiert für L-HBsAg/M-HBsAg/S-HBsAg; X codiert für HBx; Pre(core)/C(core) für HBeAg/HBcAg und P für die virale Polymerase. Quelle: Kramvis, A., 2016²⁶

Die Oberflächenproteine werden entsprechend ihrer Größe als *small*, *medium* oder *large* bezeichnet, wobei ORF „S“ für *small*, ORF „preS2“ für *middle* und ORF „preS1“ für *large* kodiert (**Abbildung 4**). Alle drei Varianten des HBsAg besitzen das S-HBsAg als Stamm. Dieses Protein ist in der Lipidhülle des Virus mit vier transmembranösen Domänen verankert und enthält immunogene Epitope²⁷⁻²⁹. Das L-HBsAg ist essentiell für den Eintritt des Virus in die Zelle, da die N-terminale Verlängerung des Proteins später im endoplasmatischen Retikulum (ER) zu einer Myristoylierung führt, welche für die hochspezifische Interaktion mit dem Eintrittsrezeptor *sodium taurocholate co-transporting polypeptide* (NTCP; auch *SLC10A1*) und letztendlich für die Aufnahme des Virus in die Zelle nötig ist³⁰⁻³⁴.

Das ikosaedrische Kapsid des Virus besteht aus 120 HBcAg-Dimeren, welche aus dem ORF „C“ synthetisiert werden und die virale DNA umschließen³⁵. Aus dem ORF „Pre(core)“ entsteht das im Vergleich zum HBcAg N-terminal um 29 Aminosäuren verlängerte Pre-Core-Protein, welches nach einer Abspaltung als HBeAg aus der Zelle sezerniert wird³⁶. Obwohl die genaue Rolle des HBeAg noch nicht geklärt ist, scheint eine immunmodulierende Funktion wahrscheinlich^{37,38}.

Die virale Polymerase entsteht aus dem ORF „P“, welcher ungefähr zwei Drittel des Genoms umfasst. Ein endständiges Protein am P-Protein ist dafür zuständig, dass die Polymerase zusammen mit prä-genomischer viraler RNA (pgRNA) in das Kapsid verpackt wird, wo sie dann ihre Funktion als reverse Transkriptase einnimmt^{14,39,40}.

Das X-Protein hat bislang keine eindeutig identifizierte Rolle. Allerdings gibt es eine Reihe an Mechanismen, in denen HBx nachgewiesenermaßen involviert ist. Darunter fällt die Regulation verschiedener zellulärer Wege und ebenso die Aufrechterhaltung der Virusreplikation nach stattgefundenener Infektion⁴¹⁻⁴³.

Zum Monitoring der Infektion können nicht alle Proteine genutzt werden. Diagnostisch dominiert der Nachweis von HBsAg, das bereits ein bis zehn Wochen nach Ansteckung, also noch vor Entwicklung klinischer Symptome, im Blut gefunden werden kann¹⁸. HBeAg gilt als Replikationsmarker und zeigt, wenn im Blut nachweisbar, eine aktive Virusreplikation an, wobei es auch HBeAg-negative Verläufe

gibt¹⁸. HBcAg selbst ist nur im Lebergewebe zu finden, allerdings treten Antikörper dagegen im Serum auf, welche infizierte Patienten lebenslang aufweisen, auch nach Ausheilung der Hepatitis B.

Wenn sich das Virus innerhalb der Zelle repliziert, werden ca. 42 nm große, infektiöse Partikel, so genannte Dane-Partikel, gebildet. Diese bestehen aus einer Lipiddoppelschicht als Hülle, in denen HBsAg im Verhältnis 1:1:4 (L:M:S) verankert ist^{44,45}. Innerhalb dieser Hülle befindet sich das Kapsid, zusammen mit der relaxed circular DNA (rcDNA), der dazugehörigen Polymerase und HBx-Protein^{42,46,47}. Neben den Dane-Partikeln sind zusätzlich nicht infektiöse Partikel im Blut zu finden: Die filamentösen und sub-viralen Partikel sind leere Lipidvesikel mit 22-25 nm Durchmesser, in welchen Oberflächenproteine verankert sind⁴⁸. Diese Partikelart tritt typischerweise im Überschuss im Vergleich zu den infektiösen Partikeln auf⁴⁹.

1.2.3 Replikationszyklus

1.2.3.1 Bindung an die Zelloberfläche und Eintritt

Der Replikationszyklus des HBV beginnt mit der Bindung und dem Eintritt in die Wirtszelle (**Abbildung 5**)^{42,50}. In einem ersten Schritt erfolgt eine niedrig affine Bindung mit Heparansulfat Proteoglykanen (HSPG), die auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert werden, unter anderem Leber- und Lungenzellen^{51,52}. Diese Interaktion basiert auf elektrostatischen Anziehungskräften der unterschiedlichen Ladungen – HSPGs sind durch ihre Sulfatreste stark negativ geladen, wohingegen in der exponierten Antigenschleife des S-HBsAg hochkonservierte Lysine und Arginine vorliegen, die für die Infektivität eines Viruspartikels von Bedeutung sind^{52,53}. Diese erste, elektrostatische Assoziation ist reversibel und katalysiert die hochspezifische Bindung des L-HBsAg mithilfe der myristoylierten preS1-Sequenz an den Eintrittsrezeptor NTCP^{32,42,50}. Kommt das Virus mit NTCP in Verbindung, findet eine hochaffine Bindung des Virus am Rezeptor statt und es kommt letztlich zur Aufnahme des Virus in die Zelle, sowie dem Verschmelzen der Membranen^{31,33}.

Der genaue Ablauf des Viruseintritts ist noch nicht im Detail aufgeklärt. So werden in der aktuellen Forschung immer weitere Interaktionspartner und Faktoren aufgedeckt, die diesen Prozess beeinflussen. Hervorzuheben sind neben Dimerisierungs- und Oligomerisierungsvorgängen von NTCP und anderen Molekülen (genauer unter 1.4.2.2) die Entdeckung, dass sowohl der *epithelial growth factor receptor* (EGFR), als auch Clathrin eine wesentliche Rolle in diesem Kontext spielen^{54,55}. Eine Inhibition von Clathrin in Zellversuchen verhinderte die Aufnahme von HBV, während eine Inhibition von EGFR zu stark verminderter Internalisierung von NTCP führte⁵⁶⁻⁵⁸.

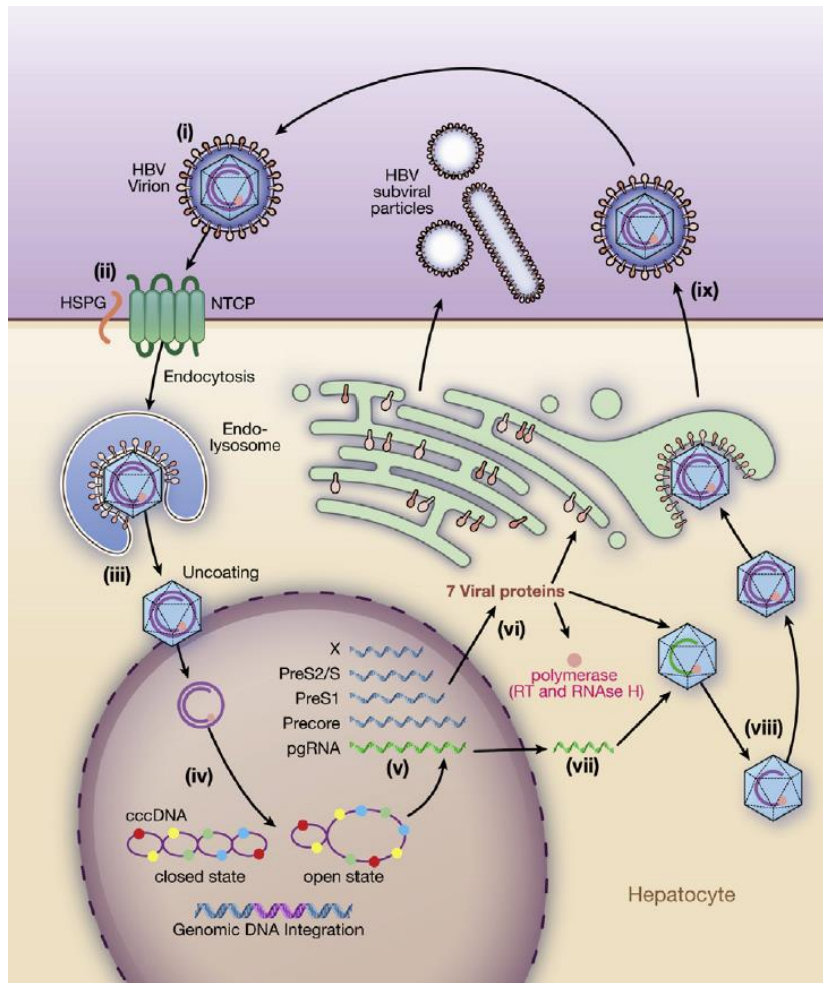


Abbildung 5: Der HBV-Replikationszyklus. (i) Infektiöse Dane Partikel im Serum. (ii) Assoziation mit der Zelloberfläche über HSPG (niedrig affine Bindung) und NTCP (hochaffine Bindung). (iii) Die genauen Prozesse der Aufnahme in die Zelle sowie der Ablauf der Enthüllung des HBV-Kapsids sind noch nicht im Detail geklärt. (iv) Die virale DNA wird als rcDNA in den Nucleus geschleust und dort zu cccDNA umgeformt mithilfe wirtseigener Faktoren. Es kann zur Integration von viraler DNA in das Zellgenom kommen. (v) Das cccDNA Minichromosom dient als Vorlage für die RNA Polymerase II des Wirts und es werden virale RNAs transkribiert. (vi) Aus den mRNAs (blau) werden die sieben viralen Proteine im Zytoplasma der Zelle translatiert. (vii) Zusätzlich zu den mRNAs wird eine RNA mit der vollen Länge des Genoms abgelesen, die pgRNA (grün). Diese wird von den Kapsidproteinen gebunden. (viii) Die gebundene pgRNA wird durch die virale reverse Transkriptase in die teilweise doppelsträngige, genomische DNA umgewandelt. (ix) Vollständige virale Partikel sowie subvirale Partikel und freies HBeAg werden von der Zelle sezerniert. Die Partikel können von der gleichen Zelle erneut aufgenommen werden oder andere Hepatozyten infizieren. Quelle: *McNaughton et al., 2019*⁷

1.2.3.2 DNA-Prozessierung und Bildung des Minichromosoms

Nachdem das Virus das Zellinnere erreicht hat, kann die Prozessierung der rcDNA beginnen. In einem ersten Schritt wird die rcDNA durch die Kapsidproteine in den Zellkern dirigiert, in welchem die virale Polymerase den unvollständigen (+)-Strang (**Abbildung 4 (B)**) repariert^{40,59}. Die Polymerase, die kovalent an die DNA gebunden vorliegt, wird im nächsten Schritt durch wirtseigene Faktoren abgespalten, ebenso wie die RNA-Primer^{40,59}.

Die beiden Enden der nun von Proteinen befreiten rcDNA werden kovalent aneinander gebunden und bilden die covalently closed circular DNA (cccDNA)^{11,40,42,60}. Dieses Molekül geht Interaktionen mit Histonen und anderen nukleären Proteinen ein, welche zu einem Supercoiling der cccDNA und der Formation des cccDNA Minichromosoms führen^{11,40,42,60}. Nachdem die virale DNA dieses Stadium erreicht hat, dient es als Ausgangspunkt für die Proteinbiosynthese der viralen Proteine (**Abbildung 5**). Die Rekrutierung wirtseigener Proteine wird hierbei durch HBx ausgelöst, wodurch das Virus seine

Proteine herstellen kann⁴¹. Je nach Transkriptionsstart werden entweder mehrere subgenomische RNAs abgelesen oder eine prägenomische RNA. Aus den subgenomischen RNAs können die Oberflächenproteine sowie HBx translatiert werden, aus der prägenomischen RNA das Kapsidprotein und das P-Protein.

Obwohl die HBV-DNA in das Genom der Wirtszelle integriert werden kann und dies teilweise auch geschieht, ist es kein notwendiger Schritt: Das Minichromosom ist als stabilisiertes Molekül in der Lage lange Zeit in der Hepatozyte zu überdauern, solange diese sich nicht teilt^{11,61–63}.

1.2.3.3 Neubildung, Zusammenbau und Freisetzung viraler Partikel

Die Neubildung viraler Partikel wird initiiert, indem die virale Polymerase an die prägenomische RNA bindet, was dazu führt, dass sich Kapsidproteine anlagern und ein noch unreifes Nukleokapsid formen⁴². Daraufhin startet das P-Protein mit der Transkription der prägenomischen RNA in prägenomische DNA; im gleichen Zug startet die Degradation der schon abgeschriebenen RNA durch die RNase-Funktion des P-Proteins, wobei stets ein Rest der prägenomischen RNA übrig bleibt⁴⁷.

Vollständige Nukleokapside wandern entweder ins ER oder werden wiederverwertet, wobei ein neuer Zyklus der DNA-Prozessierung startet⁶⁴. Dieser Verarbeitungsweg dient dem Bestehen und Aufrechterhalten des cccDNA-Pools und ist ein wichtiges Merkmal einer chronischen HBV-Infektion. Erreichen die Nukleokapside das ER, werden sie von wirtseigener Membran umhüllt, in welcher die Oberflächenproteine HBsAg integriert sind; die so entstandenen Partikel sind die infektiösen Dane-Partikel. Bilden sich im ER Membranvesikel, ohne dass ein Nukleokapsid zugegen ist, entstehen nicht infektiöse subvirale oder filamentöse Partikel.

Alle Partikel, die sich im ER bilden, werden schließlich von der Zelle in das Blutplasma abgegeben^{65,66}.

1.2.3.4 HBV in anderen Spezies

Wie unter 1.1 erläutert, ist das Hepatitis-B-Virus in vielen verschiedenen Organismen – Säugetieren, Vögeln, Fischen – zu finden und stetig kommen neue Erkenntnisse hinzu^{2,5–8}. Während Studien an Primaten essentiell für das Verständnis von HBV waren, führte auch die Forschung an Nagern und Vögeln und deren Hepatitis-B-Viren zu ausschlaggebenden Erkenntnissen. An dieser Stelle soll allerdings nur auf die Forschung an Fledermäusen eingegangen werden, da dies relevant für die vorliegende Arbeit ist.

Erstmals wurden Hepadnaviren in Fledermäusen 2013 von *Drexler et al.* entdeckt und beschrieben⁸. Infektionen wurden in Gelbohr-Fledermäusen (*lat.: Uroderma bilobatum; engl.: tent making bat*), Hufeisennasen-Fledermäusen (*lat.: Rhinolophidae; engl.: horseshoe bat*) und in Altwelt-Rundblattnasen (*lat.: Hipposideros; engl.: roundleaf bat*) gefunden und die viralen Genome analysiert. Dabei wurden starke strukturelle Ähnlichkeiten zum humanen Hepatitis-B-Virus gefunden, mit ORFs für eine virale Polymerase, Core-Proteine, ein X-Protein, sowie Oberflächenproteine, welche auch eine preS1, preS2 und S Domäne aufweisen. Ferner wurden konservierte Modifikationspositionen identifiziert für Glykosylierungen und N-terminale Myristoylierung⁸. Während die Genome der Fledermausviren um mindestens 35 % von den humanen HBV-Genomen abweichen, konnten myristoylierte Peptide, die von dem preS1-Peptid abgeleitet wurden, Infektionen mit dem humanen Hepatitis-B-Virus inhibieren. Im Zellmodell konnte das Virus von Gelbohr-Fledermäusen „TBHBV“ menschliche Zellen infizieren und sich auch vermehren. Den anderen Fledermausviren, Hufeisennasen-HBV „HBHBV“ und Rundblattnasen-HBV „RBHBV“ gelingt zwar die Replikation innerhalb einer humanen Hepatozyte, aber nicht der

Eintritt in diese⁸. Die Beobachtung lässt auf fehlendes bzw. nicht optimales Zusammenspiel mit dem Eintrittsrezeptor oder Ko-Rezeptoren und anderen Wirtsfaktoren schließen.

Die Ergebnisse haben eine Diskussion um den Ursprung des Hepatitis-B-Virus entfacht und lassen auf ein virales Reservoir in Fledermäusen spekulieren, auch weil die bestehende Impfung gegen humanes HBV nicht TBHBV zu neutralisieren vermag.

1.2.4 Behandlung

Wichtigstes Standbein in der Prävention von HBV weltweit ist die Impfung. Die WHO empfiehlt die Impfung für alle Neugeborenen als Standardimpfung, sowie für Erwachsene, wenn die Möglichkeit besteht.

1.2.4.1 Therapieindikation und Ziel der Therapie

Eine antivirale Therapie stellt nur im Falle einer chronischen Hepatitis B-Infektion eine Behandlungsoption dar, da die akut verlaufende Infektion in der Mehrzahl der Fälle ausheilt^{16,18}. Die Richtlinien der „European Association for the Study of the Liver“ (EASL) aus dem Jahr 2017 sprechen von einer Therapieindikation bei chronischer Hepatitis B, wenn Patienten eine HBV-DNA > 2000 IU/mL, erhöhte Leberenzymwerte und/oder Zeichen einer Lebergewebeschädigung zeigen¹⁸. Auch Patienten mit geringerer HBV-DNA, aber Anzeichen einer Zirrhose sollten mit einer antiviralen Therapie beginnen¹⁸. Das Ziel der Behandlung ist dabei stets die Verlängerung der Überlebenszeit, einhergehend mit der Verhinderung von Komplikationen und Spätfolgen, sowie einer Verbesserung der Lebensqualität der Patienten. Zu diesem Zweck wird eine Suppression der HBV-DNA, am besten unter die Nachweisgrenze, angestrebt^{16,18,67,68}. Im selten eintretenden Idealfall wird durch die Therapie ein HBsAg-Verlust im Blut erreicht; man spricht von der funktionalen Heilung. Eine Eradikation des Hepatitis-B-Virus in einem Patienten ist – aufgrund der cccDNA-Persistenz – (derzeit) nicht möglich, entspräche nach aktuellem Wissenstand aber einer tatsächlichen Ausheilung.

1.2.4.2 Derzeitige Standardtherapie

Die derzeitige Standardtherapie kann in zwei Wirkprinzipien unterteilt werden: (a) Inhibition der reversen Transkriptaseaktivität der viralen Polymerase und (b) Stimulierung der zellulären Immunantwort gegen virale RNA (**Tabelle 1**).

Unter (a) fallen die nukleosidischen oder nukleotidischen Substratanaloga, die so genannten „Nucleos(t)ide Reverse Transcriptase Inhibitors“ – NRTIs. Ihre Wirkweise beruht darauf, dass sie während der viralen Replikation in den neu entstehenden DNA-Strang eingebaut werden, sie aber strukturell nicht zur Elongation der DNA beitragen können^{67,69–71}. Dadurch kommt es zum Abbruch und anschließender Degradation der viralen DNA^{71,72}. Da infizierte Zellen eine stark erhöhte DNA-Biosynthese haben, kommt es in diesen Zellen zu einer potenten Inhibition dieser; nicht betroffene Zellen zeigen keinen erhöhten Nucleos(t)idbedarf, weswegen es dort zu geringen Konzentrationen und (Neben-)Wirkungen kommt.

Während HBV gegen den ersten Wirkstoff Lamivudin sehr schnell hohe Resistenzraten entwickelte, weisen neuere, hochpotente Substanzen wie Entecavir, Telbivudin und Tenofovir eine geringe Resistenzbildungsrate auf^{70,73–75}. Die NRTIs können in der Therapie auch miteinander kombiniert werden, sind selbst bei Immunsuppression nicht kontraindiziert und führen oft verlässlich zu HBV-DNA-Werten unter der Nachweisgrenze. Dies macht sie, in Verbindung mit der Möglichkeit ihrer oralen

Applikation und den geringen Nebenwirkungen, zur heutzutage ersten Wahl für die Therapie der chronischen Hepatitis B-Infektion^{16,18}.

Tabelle 1: Übersicht der aktuell zugelassenen Arzneimittel für HBV- oder HBV-Infektionen. NtRTI: Nukleotidische reverse Transkriptase-Inhibitoren; NRTI: Nukleosidische reverse Transkriptase-Inhibitoren

Arzneistoff	Arzneistoff klasse	HBV/HDV	Hersteller	Jahr der Zulassung (FDA)	Name
Adefovir	NtRTI	HBV	Gilead Sciences	2002	Hepsera
Entecavir	NRTI	HBV	Bristol-Myers Squibb	2005	Baraclude
Lamivudin	NRTI	HBV	GlaxoSmith- Kline	1995	Epivir
Telbivudin	NRTI	HBV	Novartis	2006	Tyzeka
Tenofovir	NtRTI	HBV	Gilead Sciences	2001 2016	Viread (TDF) Vemlidy (TAF)
Interferon α- 2b	Interferon	HBV/HDV	Schering/MSD	1986*	IntronA
PEG interferon α- 2a	Interferon	HBV/HDV	Roche	2002	Pegasys

*Interferon α -2b wurde zuerst zur HCV-Therapie zugelassen, später dann zur HBV-Therapie.

Die Wirkweise der Interferone fällt unter das Wirkprinzip (b), wodurch sie eine weitere Therapieoption darstellen. Interferone sind (Glyko-)Proteine, die im Körper die Funktion eines Gewebehormons übernehmen⁷⁶. Als Therapie der chronischen Hepatitis B-Infektion werden pegyliertes Interferon α -2a (PEG IFN α -2a) und Interferon α -2b (IFN α -2b) verwendet⁷⁷. Ihr Wirkmechanismus ist ein komplexes Zusammenspiel aus einer Stimulation infizierter und umliegender Zellen, sowie der Aktivierung natürlicher Killer-Zellen.

Im Gegensatz zu den NRTIs sind Interferone nicht oral applizierbar und da sie viele, z.T. schwerwiegende, Nebenwirkungen aufweisen, sind sie häufig kontraindiziert⁷⁸⁻⁸⁰. Zusammen mit niedrigen Ansprechraten von 10-40 % macht dies sie als Therapieoption heutzutage nur noch selten zur Therapie der Wahl⁸⁰.

1.3 Hepatitis-Delta-Virus

Das Hepatitis-D-Virus ist ein behülltes, RNA-haltiges Virusoid, das auf das Vorhandensein des Hepatitis-B-Virus im Wirt angewiesen ist^{81,82}. Findet eine Ko-Infektion mit HBV und HDV gleichzeitig statt, ist mit einer akuten Infektion und einer Ausheilung beider viralen Infektionen in 95 % der Fälle zu rechnen; ein geringer Teil der Patienten durchläuft eine schwere oder gar fulminante Hepatitis mit hoher Sterblichkeit⁸³. Infiziert HDV hingegen einen Patienten, der bereits an einer chronischen Hepatitis B-Infektion erkrankt ist, führt dies mit einer Wahrscheinlichkeit von 80 % zu einem chronischen Verlauf⁸⁴. Patienten, die einer Superinfektion ausgesetzt sind, zeigen einen kürzeren, aber schwereren Krankheitsverlauf, als Patienten mit einer HBV-Monoinfektion⁸⁵. Ebenso treten die schwerwiegenden Folgeschäden, v.a. Zirrhose und HCC, zweimal so häufig und ungefähr ein Jahrzehnt früher auf, zusammen mit einer zweifach höheren Mortalität⁸⁶. Die chronische HDV-Infektion gilt als schwerste Form der viralen Hepatitis mit deutlich erhöhtem Risiko auf Zirrhose und HCC und damit verbundener schlechter Prognose sowie verkürzter Lebenserwartung^{1,83,86,87}.

Die Diagnostik der HDV-Infektion ist schwierig: Einerseits ist es eine seltene Erkrankung und wird dadurch nicht standardmäßig in Laboren getestet, andererseits werden für die Testung geschultes Personal und teure Laborutensilien benötigt.

1.3.1 Hepatitis D-Infektion: Epidemiologie

Laut WHO sind weltweit ca. 10-20 Millionen Menschen an einer HBV/HDV-Superinfektion erkrankt, entsprechend ca. 5 % der chronischen HBsAg-Träger^{1,88}. Ähnlich zu HBV zeigt HDV regional unterschiedlich hohen Prävalenzen (**Abbildung 6**).

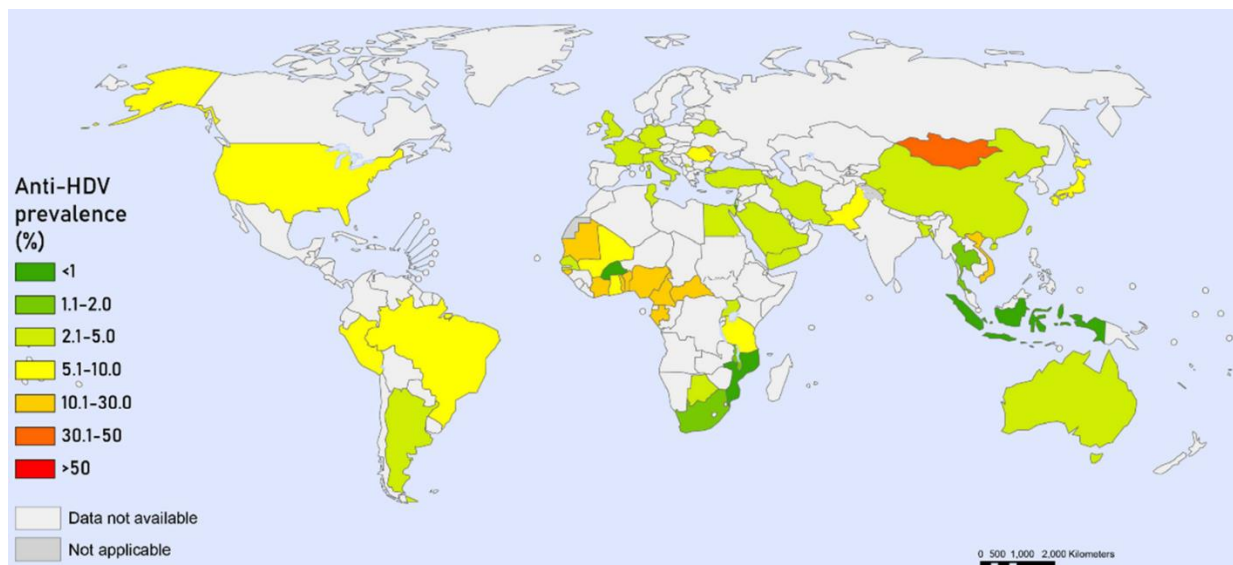


Abbildung 6: Weltweite Verteilung der Prävalenz von anti-HDV-Antikörpern in HBsAg-positiven Patienten. Quelle: Stockdale et al., 2020⁸³

In HBsAg-positiven Patienten weisen die westlichen Länder der Subsahara-Region Prävalenzen von bis zu 30 % auf, Nord- und Südamerika bis zu 10 %; Australien, China, sowie Europa und die ans Mittelmeer grenzenden Staaten haben Prävalenzen von 2-5 %, während die Mongolei eine sehr hohe Durchseuchung der HBsAg-positiven Patienten mit HDV von bis zu 50 % zeigt^{83,88}.

Hierbei ist zu beachten, dass in Bezug auf die HDV-Prävalenzen immer noch große Datenlücken vorhanden sind. Dies ist nicht nur in Schwellenländern wie Indien, Litauen, Mexiko, Russland und Ukraine der Fall, sondern auch in Industriestaaten wie Dänemark, Kanada und Spanien⁸³. Der Mangel an Testmöglichkeiten in wirtschaftsschwächeren Regionen und das Versäumnis der wirtschaftlich stärkeren Gebiete, HBsAg-positive Patienten routinemäßig auf HDV zu untersuchen, führt zu unsicheren Fallzahlen weltweit.

Das Virus ist in acht verschiedenen Genotypen vorzufinden, wobei sich die Genotypen um bis zu 35 % voneinander unterscheiden. Wie auch bei HBV kommen die Genotypen regional unterschiedlich häufig vor, wobei Genotyp 1 weltweit verbreitet ist. Genotyp 2 und 4 kommen vorwiegend in Asien vor, Genotyp 3 speziell im Amazonasbecken in Lateinamerika, Genotyp 5 in Westafrika, während die Genotypen 6-8 in Mittelfrika vorherrschen^{1,83}.

1.3.2 Aufbau und Struktur

Der Durchmesser eines infektiösen HDV-Partikels liegt zwischen 30 und 40 nm. HDV ist damit eines der kleinsten Viren, die einen Menschen infizieren können. Die Größe der Partikel ist kleiner als das Dane-Partikel, aber größer als die subviralen Partikel des HBV⁸⁹. Die Hülle, die das zirkuläre, ca. 1700 RNA-Basenpaar-haltige Genom umschließt, besitzt die gleichen Oberflächenproteine wie ein Dane-Partikel: die S-, M- und L-HBsAg^{89,90}. Es liegt einsträngig und stangenförmig vor, gehalten durch eine spezifische Basenpaarung. Kodiert wird ein einziges Protein, das HDAg, das als kurze (*small*; S-HDAg) oder lange (*large*; L-HDAg) Variante synthetisiert wird^{91,92}. Bis zu 200 Stück dieser Proteine helfen dem Virus bei der Replikation indem ein Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) gebildet wird⁹³.

1.3.3 Replikationszyklus

1.3.3.1 Bindung an die Zelloberfläche und Eintritt

Einzig beim Transport und dem Assoziieren mit den Hepatozyten ist HDV auf HBV als Helfervirus angewiesen; die eigentliche Replikation kann, z.B. in der Zellkultur, ohne Vorhandensein von HBV ablaufen.

Aufgrund des gleichen Aufbaus der Hülle läuft die Bindung von HDV an die Zielzelle identisch zu der Bindung von HBV ab. Somit wird nicht nur der sehr stark ausgeprägte Hepatotropismus übernommen, sondern auch der Eintrittsrezeptor, NTCP.

1.3.3.2 Rolling-Circle-Replikation und Austritt

Die eigentliche Replikation läuft als so genannte „Rolling-Circle-Replikation“ ab, d.h. es entstehen kontinuierlich RNA-Stränge, unter Verwendung wirtseigener Enzyme⁹⁴. Diese sind sehr lang und bestehen aus einer Aneinanderreihung der Genomtranskripte; sowohl genomische, als auch antigenomische Stränge werden produziert^{95,96}.

Auf dem antigenomischen Strang liegt der ORF für das HDAg. Hat eine Mutation im Stop-Codon des S-HDAg stattgefunden (UAG → UGG), wird die L-Variante synthetisiert^{92,97}. Ohne das S-HDAg findet die Replikation nicht effizient statt, es ist essentieller Bestandteil des HDV⁹⁸. Das L-HDAg wird normalerweise erst etwas später im Lebenszyklus von HDV exprimiert, da zuerst die Mutation des Stop-Codons auftreten muss. Wird das größere Protein synthetisiert, ist die posttranslationale Prenylierung (Addition eines Farnesylrests) von entscheidender Wichtigkeit: Findet dieser Schritt nicht statt, z.B.

durch medikamentöse Inhibition, wird nicht nur die Replikation, sondern auch die Bildung neuer viraler Partikel gestört⁹⁹.

Die Genomtranskripte zeigen Ribozymaktivität und katalysieren nicht nur ihre eigene Spaltung, sondern auch die Spaltung von anderen, multimeren Transkripten zu Monomeren, welche später zu einem Ring geschlossen werden können^{100,101}. Die nun zirkulären Genome assoziieren wiederum mit S- und L-HDAg, werden von einer Hülle des Helfervirus HBV umschlossen und die so entstandenen Partikel verlassen die Zelle um in den Blutstrom zu gelangen.

1.3.3.3 HDV-ähnliche Viren und andere Helferviren

Aktuelle Forschung deckt immer mehr Viren auf, die als „HDV-ähnlich“ („*HDV-like*“) beschrieben werden, allerdings sind noch nicht viele Details zu diesen Viren bekannt.

Durch Analysen des RNA-Inhalts verschiedener Organismen konnten andere, zirkuläre Genome von Viren der gleichen Größenordnung (1500-1700 RNA-Basenpaare) wie HDV entdeckt werden¹⁰². Außerdem wurde auch hier beobachtet, dass ein Großteil der Paarung zueinander komplementär war, sodass eine Formung der Genome stattfand. Die Viren können nur ein einziges Protein exprimieren, während die Transkripte Ribozymaktivität aufweisen.

Eines der so entdeckten Viren ist das *avian HDV-like virus*, ein zirkuläres Genom, das in Enten gefunden wurde¹⁰³. Neben Fischen (*fish HDV-like virus*) und Amphibien (*toad HDV-like virus*; *newt HDV-like virus*) konnten auch Genome aus Zellen von Schlangen (*snake HDV-like virus*) isoliert und identifiziert werden^{104,105}. Dort wurde das Virus in mehreren Organen, darunter Hirn, Leber und Milz, nachgewiesen.

Auch wenn in allen Wirten andere bekannte Viren in den Proben vorhanden waren, ist unklar, ob diese die Rolle des Helfervirus einnehmen.

Bei der Erforschung zusätzlicher potentieller humaner Helferviren konnte vor kurzem gezeigt werden, dass HDV auch mit anderen Virushüllen in der Zellkultur infektiöse Partikel bilden kann. So wird das Genom nicht nur vom HCV, sondern auch u.a. vom Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), dem Dengue-Virus (DENV) und dem Vesicular Stomatitis Virus (VSV) verpackt und ausgeschleust¹⁰⁶. Diese neuartigen Partikel zeigen größtenteils die Eigenschaften der Ursprungsviren: sowohl Tropismus, als auch Neutralisierung durch Antikörper werden von den elterlichen Partikeln übernommen¹⁰⁶. Es war auch möglich, HDV-Partikel in wirtsfremden Zellen herzustellen und auszustoßen. Während *Perez-Vargas et al.*¹⁰⁶ sogar in einem *in vivo* Mausmodell den Verbreitungsweg von HDV durch HCV-Hüllen zeigen konnten, bleibt die klinische Relevanz dieser Erkenntnisse abzuwarten, da bisher kein nachgewiesener Fall einer aktiven HDV-Infektion allein durch HCV als Helfervirus im Menschen bekannt ist.

1.3.4 Behandlung

1.3.4.1 Derzeitige Standardtherapie

Da HDV stets als Ko- oder Superinfektion zu HBV auftritt und zu einer Verstärkung des Krankheitsbildes führt, besteht grundsätzlich eine Therapieindikation.

Als einzige bisher zugelassene Therapie steht den Patienten eine 48-wöchige Behandlung mit PEG IFN α -2a zur Verfügung; der Wirkmechanismus ist unter 1.2.4.2 beschrieben⁷⁷.

Eine Kontrolle der zugrundeliegenden HBV-Infektion durch NRTIs hilft nur dann, wenn eine HBsAg-Serokonversion erreicht werden kann. Wird diese nicht erreicht, ist kein Effekt durch die Therapie zu erkennen, da die NRTIs weder die Neubildung von Partikeln hemmen, noch die Replikation von HDV stören¹.

Ideale Medikamente gegen eine HBV/HDV-Ko-Infektion stellen Mittel dar, die gegen die von HBV und HDV gemeinsam genutzten Hüllproteine gerichtet sind, wie die HBV-Impfung oder Eintrittsinhibitoren (Myrcludex B, „*Bulevirtide*“; näheres unter 1.4.3.2).

Die Prävention durch eine Impfung gegen HBV ist die effektivste und wichtigste Maßnahme gegen eine HDV-Infektion.

1.3.4.2 Problematik

Die Therapie mit PEG IFN α -2a birgt viele Risiken und kann aufgrund einer Reihe von Kontraindikationen nur ausgewählten Patienten angeboten werden^{78,79}. Problematisch sind Kontraindikationen, die durch eine bestehende HBV-Infektion sehr wahrscheinlich sind, wie Leberinsuffizienz, Leberzirrhose, Blutbildungsstörungen oder der Anwendung von Telbivudin.

Patienten, die das Medikament nehmen dürfen und es vertragen, zeigten in unter 50 % der Fälle eine negative HDV-RNA. Langzeitstudien beobachteten bei 56 % von HDV-RNA negativen Patienten ein Wiederauftreten eines positiven HDV-RNA-Nachweises¹⁰⁷.

1.4 NTCP

1.4.1 Funktion und Rolle

1.4.1.1 Physiologische und pathophysiologische Funktion

Der Gallensalztransporter NTCP wird auch als *SLC10A1* bezeichnet und gehört der *solute carrier family 10 (SLC10)* an, die ubiquitär im menschlichen Körper exprimiert wird¹⁰⁸. NTCP ist nahezu ausschließlich in der Leber vorzufinden, wo es als Transmembranprotein für den Ko-Transport konjugierter Gallensäuren mit Natriumionen aus dem Blut in die Hepatozyten zuständig ist¹⁰⁹. Das Glykoprotein baut sich aus 349 Aminosäuren auf und besitzt eine Masse von ca. 34 kDa; nach Glykosylierung wiegt es ungefähr 56 kDa¹¹⁰. Als Hauptsubstrat gilt Taurocholsäure (TC), weitere konjugierte Gallensäuren wie Taurodeoxycholsäure, aber auch andere Stoffe wie leberspezifische Wirkstoffe (z.B. Statine) und Hormone (Steroidhormone, Schilddrüsenhormone) werden von NTCP in die Hepatozyten geschleust^{111,112}. Die Homöostase der Gallensalze durch die Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs ist die Kernaufgabe von NTCP, welche in Verbindung mit weiteren Transportern der *SLC10*-Familie wahrgenommen wird¹¹³.

Während der Transporter an sich schon seit den 1990er Jahren bekannt und beschrieben ist, wurde seine Funktion als viraler Eintrittsrezeptor erst vor wenigen Jahren entschlüsselt. Im Jahr 2012 konnten *Yan et al.*³¹ durch Versuche mit irreversibler Photoaffinitätsmarkierung erstmals HBV mit NTCP in Verbindung bringen. Dabei wurde ein von HBV/preS1 abgeleitetes Peptid auf einer *tupaia belangeri* (Spitzhörnchen) Zelllinie verwendet; *tupaia belangeri* sind anfällig für humanes HBV. Diese Entdeckung konnte 2014 durch *Ni et al.*³³ bestätigt und für die Etablierung verschiedener Zelllinien genutzt werden. NTCP tritt in verschiedenen Spezies mit unterschiedlichen Sequenzen auf, was die Speziespezifität

von HBV/HDV erklärt. Der genaue Zusammenhang zwischen Speziespezifität, Virus und Eintrittsrezeptor ist noch nicht abschließend geklärt.

1.4.1.2 Einsatz in humanen Zellmodellen

Vor der Entdeckung von NTCP als viraler Eintrittsrezeptor musste für *in vitro* Modelle auf primäre humane Hepatozyten (PHH) oder auf HepaRG-Zellen zurückgegriffen werden, welche erst differenziert werden müssen.

Während PHHs eine getreue Abbildung physiologisch vorkommender Zellen sind, sind sie nicht der ideale Zelltyp für eine fortlaufende Kultivierung oder für Hochdurchsatzforschung. Eine der größten Herausforderungen ist die Spenderverfügbarkeit und eng verbunden damit die Qualität der gewonnenen Zellen. Darüber hinaus variieren die Zellen naturgemäß von Spender zu Spender, wodurch eine große Variabilität in alle Versuche mit einfließt. Insgesamt steht mit PHHs ein wertvolles und authentisches, wenn auch teures Zellsystem zur Verfügung, das vielseitig genutzt werden kann¹¹⁴. Die HepaRG-Zelllinie war die einzige Hepatoma-Zelllinie, die mit HBV/HDV infiziert werden konnte, jedoch nur nach einer vierwöchigen Differenzierung¹¹⁵. Im Laufe der Differenzierung ändern die Zellen ihr Expressionsmuster und am Ende der Prozedur ist der virale Eintritt möglich. Während die Zellen besser verfügbar als PHHs sind, ist die Differenzierung zeitaufwändig und Langzeitversuche mit diesem Zelltyp sind schwer umzusetzen, dennoch stellen HepaRG-Zellen weiterhin ein wichtiges Zellsystem dar^{114,116}.

Nach der Identifizierung der Rolle des Transporters wurde an der Entwicklung von stabilen, robusten, immortalisierten Zelllinien geforscht, die durch HBV/HDV infiziert werden können. *Ni et al.*³³ legten dafür 2014 den Grundstein und neue Zelllinien wurden etabliert, wie HepaRG-NTCP, HuH7-NTCP und HepG2-NTCP, die durch die Transfektion mit NTCP nun eine HBV/HDV-Infektion unterstützen, auch ohne Differenzierung. Diese Zelllinien zeichnen sich durch eine einfachere Kultivierung aus und erlauben neue Untersuchungsmöglichkeiten wie die Erforschung der Verbreitung des Virus von Zelle zu Zelle bzw. von Zellgeneration zu Zellgeneration oder Einblicke in die Aufrechterhaltung und den Verlust der cccDNA. Ebenso erschließt sich mit diesen Zelllinien die Möglichkeit, die pathophysiologischen Prozesse der Viren mit oder ohne Immunantwort zu untersuchen¹¹⁷.

1.4.2 Struktur- und Interaktionsanalyse

1.4.2.1 Kristallstruktur, Bindetaschen und Modifikationen

Die funktionale Rolle von NTCP wird immer klarer definiert, zuletzt mit der Erkenntnis, dass das Protein als Eintrittsrezeptor für HBV/HDV fungiert. Trotz der intensiven Forschung ist bisher die Kristallisierung des Transporters nicht geglückt. Daher sind die exakte sterische Anordnung, die Konformation in der Membran sowie der Eintrittsvorgang noch nicht abschließend bekannt. Die Kristallstruktur eines Homologs, des apikalen Natrium-abhängigen Gallensalztransporters (ASBT; *SLC10A2*), konnte hingegen erfolgreich entschlüsselt werden¹¹⁸. Dank dieser Daten konnten für NTCP Bindetaschen und Konformation vorausgesagt werden; mithilfe verschiedener Mutationsanalysen wurden diese Annahmen verfeinert und ergänzt^{119,120}. Ebenso können Ergebnisse von nicht-humanem NTCP, z.B. NTCP in Nagern oder Affen, als Vorlage für Modelle herangezogen werden¹²¹.

Auf Grundlage von ASBT wird für NTCP angenommen, dass es neun transmembranäre Domänen besitzt, wobei der N-Terminus extrazellulär gelegen ist und der C-Terminus intrazellulär¹¹⁸. NTCP besitzt mehrere Modifikationsstellen für Glykosylierungen und Phosphorylierungen. Wichtige

Aminosäuren sind hierbei N5 und N11 für Glykosylierungen, sowie S226 und S267 für Phosphorylierungen^{110,122,123}.

Ebenso konnten einige Positionen identifiziert werden, die für die Aufnahme von humanem HBV in verschiedenen Spezies ausschlaggebend sind. So sind die Aminosäuren S162 und L163 konserviert in Menschen, Affen und Mäusen. Hier konnte über eingeführte Mutationen herausgefunden werden, dass der extrazelluläre Sequenzabschnitt 157-165 als Bindestelle für das preS1-Peptid fungiert¹²⁴.

Eine weitere wichtige Region liegt bei Positionen 84-87: Während diese nicht unabdinglich für die Bindung des Virus sind, scheint die Fähigkeit, virale Partikel auch tatsächlich aufzunehmen, mit diesen Aminosäuren in Verbindung zu stehen¹²⁴.

Näher wurden auch die von ASBT abgeleiteten, postulierten Bindetaschen von NTCP für die Natriumionen und Gallensäuren betrachtet. In einer Studie von 2014 konnten die Aminosäuren Q68, S105, S106, E257 und Q261 als direkt an der Natriumbindung beteiligt identifiziert werden¹¹⁹. Mutationen an diesen Positionen führten zu einer Reduktion der Substrataufnahme von über 95 %. In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass ein Austausch zu Alaninen der Aminosäuren N262, Q293 und L294, was der Gallensäure-Bindetasche in ASBT entspricht, zu einem Verlust der Transporterfähigkeit führte.

Gleichzeitig wurde bei allen Mutationen eine verringerte Bindung des preS1-Peptids an NTCP, bis hin zum Verlust der Bindung (Q68A, E257A, N262A) beobachtet¹¹⁹. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass die Substratbindetasche mit der Bindestelle des viralen Peptids überlappen könnte, merken aber an, dass die Effekte auch durch tertiäre Strukturänderungen des ganzen Rezeptors hervorgehen könnten, welche Interaktionen verhindern.

1.4.2.2 Interaktion mit anderen Rezeptoren

Neben direkt strukturbezogenen Daten treten auch die Erkenntnisse rund um Multimerisierungsprozesse in den Vordergrund der aktuellen Forschung.

Vor allem steht die Oligomerisation von NTCP im Fokus. So konnte 2019 gezeigt werden, dass Homodimere gebildet werden, wobei die Interaktion scheinbar in besonderem Maße durch die Aminosäuren in Position 221-240 und 271-290 getragen wird¹²⁵. Weiterhin wurde beobachtet, dass die einzelnen NTCP-Einheiten innerhalb der Multimere voll funktionsfähige Transporter darstellen. Die physiologische Funktion hängt also nicht von einer erfolgreichen Oligomerisierung ab – die viralen Eintrittsprozesse hingegen scheinen daran geknüpft zu sein. Werden die Regionen 221-240 oder 271-290 durch Peptide genau dieser Sequenzen blockiert, findet die Internalisierung viraler HBV-Partikel mit einer deutlich verringerten Effizienz statt¹²⁵.

Abgesehen von Homo-Oligomerisation wird bei NTCP eine Heterodimerisierung mit ASBT vermutet⁵⁴.

Damit die Internalisierung von NTCP letztlich vollständig abläuft, scheint EGFR eine wichtige Rolle zu spielen. In einer Studie mit EGFR-knockdown Zellen konnte gezeigt werden, dass die Internalisierung ins Zellinnere der Hepatozyten gestört war⁵⁸. Durch Wiederaufhebung des Knockdowns konnte diese Störung rückgängig gemacht werden. In der Arbeit von *Iwamoto et al.*⁵⁸ spekulieren die Autoren, dass sich HBV den zellulären Transportmechanismus von EGFR zunutze macht, um die Internalisierung erfolgreich einzuleiten und abzuschließen.

Die genauen Abläufe der Internalisierung und des Entpackens in der Zelle werfen noch immer Fragen auf. Da die *SLC10* Familie noch nicht lange intensiv untersucht wird, sind neue Einblicke in diese Prozesse wichtige Schritte zum Verständnis von HBV.

1.4.3 NTCP als therapeutisches Zielmolekül in HBV/HDV-Infektionen

1.4.3.1 Kompetitive Inhibition

Da NTCP als Transporter Gallensalze in die Hepatozyten schleust, wurden die Substrate als erstes genutzt, um *in silico* Pharmakophore für kompetitive Inhibitoren zu erstellen¹¹⁹. *Greupink et al.*¹²⁶ beschrieben 2012 ein 3D-Pharmakophor, das mithilfe von Gallensäuren und einem weiteren Hormon-Substrat, Estronsulfat, trainiert wurde. Das Pharmakophor umfasst drei hydrophobe Bereiche und zwei Wasserstoffbrücken-Akzeptoren. Nach einem Datenbank-Screening konnten sie mehrere unbekannte, kompetitive NTCP-Inhibitoren identifizieren, die nicht Gallensäuren sind. Eine negative Ladung in Kombination mit einem gewissen Abstand der Akzeptoren voneinander führte zu einer gesteigerten Inhibition der TC-Aufnahme.

Ein Jahr später fand die Gruppe um *Dong et al.*¹²⁷ ähnliche Ergebnisse, wobei ihr Pharmakophor mit der Struktur von Ezetimib, das als NTCP-Inhibitor bekannt ist, als Ausgangssubstanz erstellt wurde¹²⁸. Während dieses Molekülmodell an einer kleineren Datenbank trainiert wurde, kommt es zu ähnlichen Eigenschaften eines Inhibitors: zwei hydrophobe Bereiche und ein Wasserstoffbrücken-Akzeptor. Eine negative Ladung verstärkt bei diesem Pharmakophor nicht die Aktivität. Unter den neu identifizierten Molekülen sind Statine (Rosuvastatin, Simvastatin) und Calciumkanalblocker (Nifedipin, Nimodipin). In den folgenden Jahren wurden weitere Studien zu Pharmakophoren veröffentlicht und weitere Arzneistoffe identifiziert, die eine Inhibition auf NTCP ausüben, darunter Ciclosporin A, Pioglitazon, Irbesartan und Losartan^{129,130}. Als wichtige Determinanten werden erneut mindestens ein hydrophober Bereich sowie Wasserstoffbrücken-Akzeptoren oder eine negative Ladung identifiziert.

Nicht alle dieser Substanzen konnten tatsächlich als kompetitive Inhibitoren verifiziert werden (z.B. Ciclosporin A), auch wenn sie anhand eines Substrat-abgeleiteten Pharmakophors entdeckt wurden¹³¹. Die *in silico* Entwicklung von Pharmakophoren ist als Wegbereiter für die Medizinalchemie unersetzlich, da sie früh wichtige Strukturelemente aufzeigen kann, so wie hier das Zusammenspiel von hydrophoben Bereichen gekoppelt an Wasserstoffbrücken-Akzeptoren bzw. eine negative Ladung. Allerdings deuten die Pharmakophore auf Ungewissheiten in Bezug auf genaue Anzahl und Anordnung der ausschlaggebenden Elemente hin. Daher ist gerade für die Medizinalchemie eine Aufklärung der Kristallstruktur von NTCP entscheidend.

Ein funktionelles Screening von 1280 durch die FDA zugelassenen Substanzen, das die Inhibition der TC-Aufnahme und die Interferenz mit der Bindefähigkeit eines preS1-Peptids an NTCP untersuchte, führten *Donkers et al.*¹³² 2017 durch. Unter den zehn potentesten Substanzen fanden sich sowohl Vertreter zuvor identifizierter Stoffklassen – Calciumkanalblocker (Nifedipin) und Glitazone (Rosiglitazon) – aber auch vollkommen neue Moleküle. Sechs dieser Stoffe besitzen eine (Sulfon-) Säuregruppe, alle weisen mehrere hydrophobe Teilbereiche auf. Die Molekülmassen reichen von ca. 250 g/mol bis zu 650 g/mol, allein der Farbstoff Chicago Sky Blue 6B wiegt mit 992,8 g/mol deutlich mehr als der Rest.

Da diese Studie von keinem Pharmakophor ausgeht, sondern ein funktionelles Screening darstellt, kann davon ausgegangen werden, dass die identifizierten Moleküle sowohl kompetitive, als auch nicht-kompetitive Inhibitoren darstellen. Bei einigen lässt sich anhand ihrer Struktur und Wirkung auf die Art der Interaktion spekulieren: So kann bei Tiratricol (TRIAC) als Schilddrüsenhormonersatz von einem Substrat ausgegangen werden, ebenso erinnern Flufenaminsäure und Tolfenaminsäure mit ihrer

Größe und Struktur stark an unkonjugierte Gallensäuren. Ein experimenteller Nachweis der kompetitiven Inhibition bleibt dennoch abzuwarten.

Im Folgenden werden zwei für diese Arbeit relevante Wirkstoffe kurz beschrieben.

Sulfasalazin

Der Wirkstoff Sulfasalazin besteht aus den Substrukturen 5-Aminosalicylsäure und Sulfapyridin, welche über eine Diazobindung miteinander verbunden sind (**Abbildung 7**).

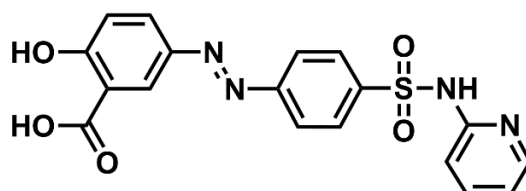


Abbildung 7: Strukturformel von Sulfasalazin. IUPAC: 2-Hydroxy-5-[4-(2-pyridylsulfamoyl)-phenyldiazenyl]-benzoesäure; $M_w = 398,39 \text{ g/mol}$

Bei oraler Einnahme wird Sulfasalazin zum Großteil durch Darmbakterien in die zwei Teilstrukturen gespalten, von welchen Sulfapyridin besser absorbiert werden kann, während 5-Aminosalicylsäure im Darm verbleibt und dort seine Wirkung entfaltet¹³³. Die Hauptindikation des Arzneistoffs ist die Colitis ulcerosa, eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung. Außerdem kann Sulfasalazin bei Morbus Crohn und rheumatoider Arthritis eingesetzt werden. Für die Behandlung ist Sulfasalazin sowohl durch die FDA, als auch die EMA seit Mitte des 20. Jahrhunderts zugelassen.

Der exakte Wirkmechanismus von Sulfasalazin ist nicht bekannt.

Tiratricol

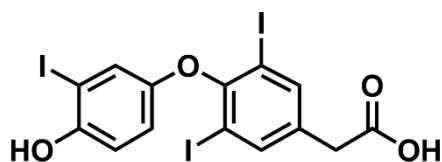


Abbildung 8: Strukturformel von Tiratricol. IUPAC: 3,3',5-Triiodothyroacetylsäure; auch TRIAC; $M_w = 621,93 \text{ g/mol}$

Das dem endogenen Schilddrüsenhormon T3 strukturell sehr ähnliche Tiratricol (TRIAC) (**Abbildung 8**) wurde in den 1950ern entdeckt. Zurzeit wird es von der EMA als Orphan Drug zur Behandlung des Allan-Herndon-Dudley Syndroms evaluiert¹³⁴. Die Erkrankung wird ausgelöst durch eine Fehlfunktion des Transportproteins MCT8, welches Schilddrüsenhormone in Nervenzellen transportiert^{135,136}. Erkrankte weisen eine Unterentwicklung des Gehirns und eine sowie muskuläre Schwäche auf; beide Symptome bilden sich bereits im Kindesalter aus¹³⁷. Im Gegensatz zu T3 kann TRIAC ohne die Hilfe von MCT8 in die Nervenzellen gelangen. Es wird in Frankreich schon seit längerem bei peripherer Schilddrüsenhormonresistenz und zur Behandlung von Schilddrüsentumoren eingesetzt.

In den USA war TRIAC als Nahrungsergänzungsmittel zur metabolischen Aktivierung (Diätetikum) zeitweise zu erhalten, inzwischen ist der Vertrieb allerdings eingestellt.

Seine Hormonwirkung entfaltet TRIAC an den Schilddrüsenhormonrezeptoren und anderen nukleären Rezeptoren wie dem Pregnan-X-Rezeptor^{138,139}. Das Molekül entwickelt spezifische Effekte in der Leber, sodass ein aktiver Transport in die Hepatozyten angenommen wird¹⁴⁰. Obwohl bisher der direkte Beweis des Transports durch NTCP fehlt, liegt dieser Weg nahe.

1.4.3.2 Andere Wege der Interaktion

Neben einer direkten kompetitiven Inhibition von NTCP sind auch Mechanismen beschrieben, die nicht diesem Wirkprinzip folgen. Dazu gehört die allosterische Bindung mit oder ohne Inhibition der physiologischen Funktion ebenso wie die Verhinderung der Oligomerisation von NTCP. Die Verhinderung einer Infektion mit HBV/HDV ist den unterschiedlichen Substanzen gemein.

Myrcludex B (INN: Bulevirtide)

Myrcludex B ist ein myristoyliertes, synthetisches Peptid, welches vom large HBsAg, genauer der preS1-Region (Aminosäuren 2-108 des large HBsAg) des Hepatitis-B-Virus abgeleitet wurde (**Abbildung 9**)^{141,142}. Es besteht aus einer 47 Aminosäuren langen Konsensussequenz der verschiedenen HBV-Genotypen und weist eine essentielle Sequenz (Aminosäuren 9-15, NPLGFFP) auf, ohne welche keine kompetente Bindung an NTCP stattfinden kann^{141,142}.

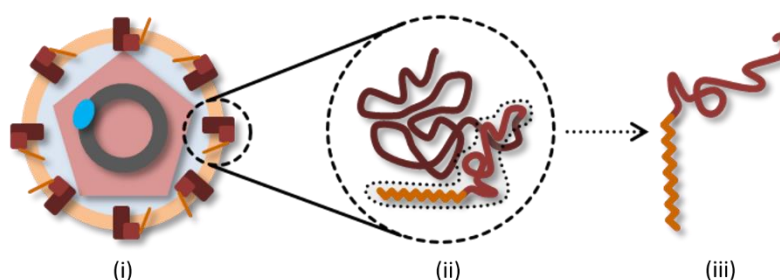


Abbildung 9: Schema des Entwicklungsprozesses von Myrcludex B. (i) Schema eines HBV-Partikels und der darin enthaltenen Proteine. Eingekreist: L-HBsAg in der Lipiddoppelschicht der Hülle. (ii) Schematische Darstellung des L-HBsAg als Sekundärstruktur. Der Myristylrest ist in orange abgebildet, die Aminosäuren 2-48 in hellrot. (iii) Der Wirkstoff Myrcludex B (INN: Bulevirtide) wird synthetisch als Konsensussequenz der L-HBsAg der verschiedenen HBV-Genotypen gewonnen und am N-Terminus myristoyliert.

Außerdem besitzt Myrcludex B einen Bereich, der als akessorische Domäne bezeichnet wird, welcher in der Literatur den Positionen 27-48 zugeschrieben wird¹⁴¹⁻¹⁴³. Die genaue Interaktion der akessorischen Domäne mit NTCP und ihre Funktion sind bisher nicht im Detail verstanden. Allerdings ist bekannt, dass es bei Anwesenheit dieses Sequenzabschnitts zu einer deutlich stärkeren Bindung und Infektionsinhibition kommt, als bei Abwesenheit¹⁴¹⁻¹⁴³.

Der Wirkmechanismus ist eine allosterische Bindung des Lipopeptids an den Aminosäuren 157-165 von NTCP, welche hochspezifisch ist und die Bindestelle der viralen Partikel besetzt¹²⁴. Auf diese Weise von Myrcludex B blockierte Rezeptoren können vom Virus nicht zum Eintritt in die Zelle genutzt werden, sodass eine Infektion ausbleibt. Als Nebeneffekt weist Myrcludex B eine Inhibition des physiologischen Transports von Gallensäuren auf. Es ist unklar, ob das Peptid direkt mit der Substratbindetasche interagiert und so den Gallensalztransport verhindert oder die Bindung eine Konformationsänderung des Rezeptors hervorruft, die einen effektiven Austausch nicht zulässt.

Myrcludex B spielte eine tragende Rolle bei der Identifikation des Eintrittsrezeptors für HBV/HDV und wurde als erster Vertreter der Arzneistoffklasse der Eintrittsinhibitoren für HBV/HDV klinisch weiterentwickelt. Erste klinische Studien überzeugten mit vielversprechenden Ergebnissen hinsichtlich der Verträglichkeit und Wirkung^{144,145}. Die europäische Zulassungsbehörde EMA (*European Medicines Agency*) bewilligte den Orphan Drug Status 2015 und gab am 28.05.2020 die Zustimmung zur Markteinführung des Arzneimittels Hepcludex® (Wirkstoff Bulevirtide)¹⁴⁶.

Derzeit laufen mehrere klinische Studien zu Myrcludex B (Stand Juni 2020), darunter eine Beobachtungsstudie mit HBV/HDV-Ko-Infizierten unter Therapie, eine multizentrische Phase IIb

Studie, die eine gemeinsame Therapie mit IFN α -2a untersucht und eine multizentrische, open-label Phase III Studie mit chronisch an Hepatitis D erkrankten Patienten.

Ciclosporin und Derivate

Das Immunsuppressivum Ciclosporin ist ein zyklisches Peptid, welches aus elf Aminosäuren aufgebaut ist. Die Substanz wird aus Pilzen gewonnen und heutzutage hauptsächlich bei Autoimmunerkrankungen oder nach Transplantationen eingesetzt. Der Wirkmechanismus des Peptids ist gut erforscht: Durch Bindung von Cyclophilin A und daraus resultierender Inhibition von Calcineurin wird eine Kaskade ausgelöst, an deren Ende eine verringerte Gentranskription steht – dieser Effekt findet vor allem in aktivierten T-Zellen statt¹⁴⁷.

Ciclosporin weist allerdings noch weitere therapeutisch nutzbare Wirkungen auf, nämlich die Aktivität gegen HCV beschrieben und die Inhibition von NTCP. Aufgrund dieser Beobachtung wurden mehrere Arbeiten zu Ciclosporin als potentieller Eintrittsinhibitor von HBV/HDV durchgeführt^{131,148,149}. So konnten *Nkongolo et al.*¹³¹ eine direkte, zielgerichtete Interaktion von Ciclosporin mit NTCP und der darauf zurückzuführenden Verminderung der Infektion mit HBV/HDV zeigen; dieser Wirkmechanismus funktionierte unabhängig von dem Cyclophilin A abhängigen Weg.

Die darauf aufbauende Arbeit von *Shimura et al.*¹⁴⁹ konnten zeigen, dass Ciclosporinderivate nicht nur die virale Aufnahme durch direkte NTCP-Interaktion verhindern, sondern auch den Substrataustausch zulassen können. Dieses Ergebnis deckt auf, dass die Bindung und Inhibition der viralen Funktion von NTCP unabhängig von der Transportfunktion möglich ist und dass das synthetische Ciclosporin-Derivat SCY995 eine eindeutig allosterische Bindung zu NTCP herstellt.

Troglitazon

Die Arzneistoffgruppe der Thiazolidindione, auch Glitazone genannt, wurde 1997 durch Zulassung von Troglitazon begründet. Die Glitazone werden wegen ihrer antidiabetischen Wirkung genutzt, welche sie durch eine Aktivierung des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor- γ (PPAR- γ), einem nukleären Rezeptors, erreichen. PPAR- γ spielt eine entscheidende Rolle im menschlichen Glukosehaushalt und ist dadurch an der Insulinsensitivität des Organismus mitbeteiligt.

Kürzlich konnten *Fukano et al.*¹²⁵ einen antiviralen Effekt bei Troglitazon identifizieren, der mit NTCP im Zusammenhang steht. Entgegen dem regulären Wirkmechanismus hängt die antivirale Wirkung nicht mit PPAR- γ zusammen. Anders als bei den bis dahin bekannten NTCP-Inhibitoren, die eine Bindung des Virus an den Rezeptor verhindern, ist die Wirkung von Troglitazon und dessen potenterem Derivat Ciglitazon auf die Verhinderung der Oligomerisation von NTCP-Molekülen zurückzuführen. Es konnte gezeigt werden, dass die Unterdrückung des Zusammenlagerns mehrerer Rezeptoreinheiten die virale Anfälligkeit senkt und es zu einer verminderten Internalisierung von preS1-gebundenem NTCP kommt. Die Fähigkeit des Virus eine Bindung mit dem Rezeptor einzugehen wurde demnach nicht eingeschränkt, der Eintritt in die Zelle findet dennoch in deutlich geringerem Maße statt.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist in zwei Teile gegliedert. Ziel des ersten Teils war es, basierend auf einer Analyse der Konsensus-Sequenz von HBV preS1/2-48 entscheidende Sequenzbereiche in der akzessorischen Domäne (Aminosäuren 22-48) zu identifizieren und deren Einfluss auf die Wirkweise des Peptids einzuschätzen.

Zu diesem Zweck wurden die innerhalb der verschiedenen Genotypen konservierten Aminosäuren ermittelt. Anschließend wurden Peptide, welche mittels Alanin-Substitution, Deletion oder dem Austausch gegen wirtsfremde Sequenzen in den entsprechenden Sequenzen verändert wurden, synthetisiert. Diese Peptide wurden *in vitro* auf ihre Wirkungen in physiologischen sowie pathophysiologischen Abläufen charakterisiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Fragestellung nachgegangen, ob es möglich ist, potentielle duale Inhibitoren zu synthetisieren und diese nachfolgend zu charakterisieren.

Zu diesem Zweck wurden Arzneistoffe mit unterschiedlichen Peptiden konjugiert, deren akzessorische Domäne deletiert wurde. Die Arzneistoffe wurden aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften sowie ihrer kompetitiven Inhibition von NTCP gewählt. Die Synthesen dieser Hybride wurden etabliert und die entstandenen Substanzen *in vitro* eingehend auf Infektionsinhibition, Inhibition der physiologischen Funktion von NTCP und Zytotoxizität untersucht. Die Bioverteilung *in vivo* und die Kinetik der Anreicherung in der Leber wurden im Mausmodell nach intravenöser Applikation betrachtet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller	Herkunft
ACN (HPLC)	Biosolve BV	Valkenswaard; NL
Ameisensäure	AppliChem GmbH	Darmstadt; DE
atto-565-NHS	ATTO-TEC GmbH	Siegen; DE
BH₃NHMe₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim; DE
Chloramin-T	Caesar und Loretz GmbH	Hilden; DE
COMU	Iris Biotech GmbH	Marktrechwitz; DE
DCM	Fisher Scientific	Loughborough; UK
DIC	Fluka Chemie Ag	Buchs; CH
DIPEA	Biosolve BV	Valkenswaard; NL
DMF	Iris Biotech GmbH	Marktrechwitz; DE
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim; DE
EDC-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim; DE
(Diethyl-)Ether	Honeywell Specialty Chemicals GmbH	Seelze; DE
Fmoc-L-Aminosäuren	Orpegen Peptide Chemicals GmbH	Heidelberg; DE
Fmoc-L-Lysin(alloc)	Iris Biotech GmbH	Marktrechwitz; DE
Fmoc-D-Tyrosin	Iris Biotech GmbH	Marktrechwitz; DE
H₂O (HPLC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim; DE
HBTU	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim; DE
HOBt	Biosolve BV	Valkenswaard; NL
¹²⁵I	Hartmann Analytic	Braunschweig; DE
isotonische Kochsalzlsg.	B. Braun AG	Melsungen; DE
MeOH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim; DE
Myristinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim; DE
NMP	Iris Biotech GmbH	Marktrechwitz; DE
PBS (Gibco)	Life Technologies	Paisley; UK
Pd(PPh₃)₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim; DE
Piperidin	Biosolve BV	Valkenswaard; NL

PyBOP	Novabiochem AG	Läufelfingen; DE
Rink-Amid Harz (0,2 mmol/g)	Merck KGaA	Darmstadt; DE
Sulfasalazin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim; DE
Sulfo-NHS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim; DE
TFA	Biosolve BV	Valkenswaard; NL
TIS	Thermo Fisher GmbH	Kandel; DE
TRIAc	Carbosynth Limited	Berkshire; UK

2.1.2 Zellkultur

Sämtliche Arbeiten der Zellkultur wurden in den Räumlichkeiten von Prof. Stephan Urban (Molecular Virology; Heidelberg) durchgeführt; Materialien, Zelllinien und Hilfestellungen wurden von ihm und seinen Mitarbeitern freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.1.2.1 Zelllinien und Chemikalien

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Zelllinien.

Name	Beschreibung	Referenz
HepG2	humane Hepatoma-Zelllinie; ursprünglich aus einem erwachsenen, kaukasischen Amerikaner gewonnen	<i>Knowles et al.</i> ¹⁵⁰
HepG2 A3	Zelllinie aus individuellem Klon der HepG2-NTCP-Zelllinie generiert; Überexprimierung von NTCP führt zu erhöhter Anfälligkeit von HBV/HDV-Infektionen	<i>Ni et al.</i> ³³
HuH7	humane Hepatoma-Zelllinie; ursprünglich aus einem erwachsenen Japaner gewonnen	<i>Nakabayashi et al.</i> ¹⁵¹
HuH7-NTCP	Überexprimierung von NTCP führt zu Anfälligkeit von HBV/HDV-Infektionen	<i>Ni et al.</i> ³³

Tabelle 4: Übersicht der in der Zellkultur verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
bisBenzimid-H(oechst)-33342-trihydrochlorid	Sigma-Aldrich (US)
BSA	Roth (DE)
DMSO	Merck (DE)
DMEM, high glucose	Gibco/Life Technologies (US)
ELISABright Chemilumineszenzsubstrat	Advansta Inc. (US)
Fluoromount G	Southern Biotech (US)

L-Glutamin	Gibco/Life Technologies (US)
Szintillationsflüssigkeit	Perkin Elmer (DE)
Milchpulver	Roth (DE)
PFA	Riedel-de Haën (DE)
Penicillin	Gibco/Life Technologies (US)
PBS	Sigma-Aldrich (US)
PEG	Merck (DE)
Puromycin	Gibco/Life Technologies (US)
SDS	Serva Electrophoresis (DE)
Streptomycin	Gibco/Life Technologies (US)
[³H]-TC	Hartmann Analytic (DE)
Triton X-100	Roth (DE)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (US)
Trypsin	Biochrom (DE)
Tween® 20	Roth (DE)

2.1.2.2 Antikörper

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Antikörper.

Bezeichnung	Hersteller
VUDA (anti-HDAg positives Patientenserum)	bereitgestellt von AG Urban (Molecular Virology, Heidelberg)
goat anti-human; AlexaFluor488 gekoppelt	Invitrogen
goat anti-human; Peroxidase gekoppelt	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.

2.1.3 Tiere

Die Tierversuche wurden von den Komitees zu Tierschutz und Tiergesundheit des Regierungspräsidiums Karlsruhe, Deutschland, freigegeben. Erwachsene, weibliche SWISS Mäuse (20 - 30 g) wurden von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) gekauft. Die Tiere wurden mittels Isofluran-Inhalation anästhesiert und angemessene Mengen der ¹²⁵I-markierten Peptide, gelöst in 100 µL 0,9 % NaCl, wurden in die Schwanzvene injiziert. Die Tötung der Tiere erfolgte mit CO₂-Narkose.

2.1.4 Instrumente und Equipment

Tabelle 6: Übersicht aller verwendeter Gerätschaften.

Bezeichnung	Hersteller
EnVision 2101 Multilabel reader	PerkinElmer (US)
FACS (Accuri C6)	BD Biosciences (US)
γ -Counter (Cobra auto-gamma)	PerkinElmer (US)
γ -Kamera (γ -imager-scr)	Biospace (FR)
Gefriertrockner (Alpha 2-4 LSCplus)	Christ (DE)
Greiner CellStar 96-well plates	Sigma-Aldrich (US)
Massenspektrometer (Exactive Plus Orbitrap)	Thermo Scientific (US)
Mikroskop (Nikon Eclipse Ti)	Nikon (JP)
Mikroskop (DFC350 FX)	Leica (DE)
Peptidsynthesizer (433A)	Applied Biosystems (US)
Pipettensatz	Thermo Fisher Scientific (US)
Pipettensatz, steril	Sigma-Aldrich (US)
Szintillations-Counter (LS 6000)	Beckmann Coulter (DE)
Waage (XS105 Dual Range)	Mettler-Toledo (DE)
Zellkulturflaschen	Thermo Scientific (US)
Zentrifuge (Labofuge 400)	Heraeus (DE)
Zentrifuge (Fresco 21)	Heraeus (DE)
Zentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus (DE)

Tabelle 7: Übersicht der verschiedenen verwendeten HPLC-Anlagen.

Verwendung und Typ der HPLC-Anlage	Hersteller
analytisch; 1100 series	Agilent (US)
analytisch, γ -Detektion; 1100 series	Agilent (US)
LC-MS; 1200 series	Agilent (US)
präparativ; 331 series	Gilson (US)
präparativ; LaPrep P110	VWR International (US)
präparativ, γ -Detektion; LaChrom	Hitachi (JP)

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Chromatographie-Säulen.

Verwendung und Bezeichnung der Säule	Typ und Abmessungen
analytisch; Chromolith Performance	RP-18e; 100 × 3 mm
analytisch, γ -Detektion; Chromolith Performance	RP-18e; 100 × 3 mm
LC-MS; Hypersil Gold	aQ; 200; 200 × 2,1 mm
präparativ; Reprosil Pur	120 C18-AQ 5 μ m; 250 × 25 mm
präparativ; Reprosil Pur	120 C18-AQ 5 μ m; 250 × 25 mm
präparativ, γ -Detektion; Chromolith Performance	RP-18e; 100 × 3 mm

2.1.5 Software

Zur Auswertung und Erstellung von Abbildungen wurden verschiedene Programme genutzt. Mikroskopische Bilder wurden mithilfe von FIJI/ImageJ zusammengestellt und analysiert. Chemische Reaktionen und Strukturformeln wurden in ChemDraw 16.0.1 gezeichnet. Microsoft Office Professional Plus 2013 wurde genutzt zur Textverarbeitung und -erstellung (Word), Berechnung und Auswertung (Excel), sowie Erstellung von schematischen und veranschaulichenden Grafiken (Power Point). Kurvendiagramme wurden in GraphPad Prism 8.0.1 erstellt und ausgewertet.

2.2 Methoden

2.2.1 Festphasenpeptidsynthese (SPPS)

Alle Peptide, bis auf unter GMP-Bedingungen hergestelltes MyrB, wurden mithilfe eines 433A Peptidsynthesizers, unter Anwendung der Fmoc/tBu-Strategie wie von *Schieck et al.*¹⁴² beschrieben, synthetisiert.

Rink-Amid-Harz (Beladungsgad: 0,2 mmol/g) wurde als feste Phase zu 50 μ mol verwendet und vor der Synthese mit Dichlormethan (DCM) gequollen. Anschließend erfolgten die Aminosäurekopplungen im 10-fachen Überschuss mit 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU)/Diisopropylethylamin (DIPEA) in *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP), wobei die Fmoc-Abspaltungen mit Piperidin (20 % in NMP), welchem 5 % Ameisensäure beigesetzt wurde, stattfanden. Zusätzlich zur Zugabe von Ameisensäure wurden die Kopplungszeiten von den Aminosäuren, die auf eine Asparaginsäure folgten, um 15 Minuten verlängert. Diese Maßnahmen dienten der Reduktion von Aspartimid-Bildung innerhalb des Peptids.

Ein D-Tyrosin wurde an alle synthetisierten Peptide am C-Terminus hinzugefügt, um eine Radiomarkierung mit ¹²⁵I zu ermöglichen; ebenso wurden die meisten Peptide um ein C-terminales Lysin erweitert, dessen Seitenkette mit der Alloc-Schutzgruppe geschützt war. Dies ermöglichte später eine orthogonale Abspaltung der Schutzgruppe und einen selektiven Angriff an dieser Seitenkette, ohne die Bindung des Peptids an die feste Phase zu verlieren.

Die restlichen Aminosäuren wurden mit der Abspaltung vom Polymerharz entschützt, indem über mindestens eineinhalb Stunden, außer anders vermerkt, mit Trifluoressigsäure (TFA):H₂O:Triisopropylsilan (TIS) = 95:2,5:2,5 auf dem Schüttler inkubiert wurde. Das Produkt wurde dann in kaltem Diethylether ausgefällt, zentrifugiert (3000 rpm, 5 Min), mit Diethylether gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Abschließend wurde das Peptid per analytischer HPLC bei einer Flussrate von 2 mL/min, UV Detektion bei $\lambda = 214$ nm und einem Gradienten von 100 % H₂O + 0,1 % TFA auf 100 % Acetonitril (ACN) + 0,1 % TFA in fünf Minuten, sowie Massenspektrometrie (LC-MS) analysiert und über präparative HPLC aufgereinigt.

2.2.1.1 Modifikationen

Myristoylierung des N-Terminus

Die meisten Peptide in dieser Arbeit wurden am N-Terminus mit Myristinsäure gekoppelt. Hierfür wurden 10 eq. der Fettsäure, zusammen mit 9,5 eq. HBTU und 20 eq. DIPEA in NMP gelöst. Währenddessen wurde das am Polymerharz gebundene Peptid in NMP gequollen und anschließend mit der Reaktionslösung über mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach beendeter Reaktion wurde mit NMP, DCM und Diethylether gewaschen und das Polymerharz unter Vakuum getrocknet.

Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe

Die Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe wurde über die katalytische Reaktion mit Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) (Pd(PPh₃)₄) und Boran-Dimethylamin-Komplex (BH₃NHMe₂) in DCM realisiert. Zu diesem Zweck wurden 50 μ mol des am Polymerharz gebundenen Peptids in DCM gequollen, während 3 mg Pd(PPh₃)₄ und 50 mg BH₃NHMe₂ in 2 mL DCM gelöst wurden. Daraufhin wurde die Reaktionslösung auf das Peptid gegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler reagieren gelassen. Anschließend wurde die Reaktionslösung entfernt, das Polymerharz mehrfach mit DCM und Methanol (MeOH) gewaschen und für 20 Minuten in DCM:MeOH = 90:10 geschüttelt. Abschließend wurde das Harz mit Diethylether gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffs atto-565

Zur Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffs *atto-565* an ein noch am Polymerharz gebundenes Peptid wurden 2 eq. des Farbstoffs in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, auf das Harz gebracht und mit DIPEA auf pH = 9 eingestellt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt; anschließend wurde die Reaktionslösung entfernt, das Peptid vom Harz abgespalten, per HPLC und Massenspektrometrie analysiert, sowie durch präparative HPLC aufgereinigt.

Kopplung von Aminosäuren an Lysin-Seitenketten

Die Konjugation von Aminosäuren an das ϵ -Amin entschützter Lysine erfolgte durch manuelle Kopplung. Hierfür wurde zunächst das am Harz gebundene Peptid in DCM gequollen, danach wurden 4 eq. der zu koppelnden Aminosäure und 4 eq. HBTU in Dimethylformamid (DMF) gelöst und zuletzt 8 eq. DIPEA zugegeben. Nach 45 minütiger Reaktionszeit wurde die Lösung entfernt und das Polymer mit NMP, DCM und Diethylether gewaschen. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte durch doppelte, zehnmündige Inkubation mit Piperidin (20 % in DMF), abschließenden Waschschritten und Trocknung unter Vakuum.

2.2.2 Synthese der Hybride

2.2.2.1 Kopplung von TRIAC

Zur Kopplung von TRIAC an primäre Amine wurden 1 eq. TRIAC, 0,88 eq. HBTU und 2 eq. DIPEA in DMF gelöst, anschließend wurde die Reaktionslösung ohne Voraktivierung zu dem am Harz gebundenen Peptid gegeben. Nach spätestens drei Stunden wurde die Reaktionslösung entfernt und die Reaktion beendet. Daraufhin wurde das Polymerharz mehrfach mit NMP, DCM und Diethylether gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Bei der Abspaltung des entstandenen Produkts von der festen Phase wurde das Harz nicht länger als eine Stunde inkubiert.

2.2.2.2 Kopplung von Sulfasalazin

Die Kopplung von Sulfasalazin zeigte nur bei Kopplung mit dem primären α -Amin von Glycin Erfolge. Die Reaktion wurde wie folgt durchgeführt: 5 eq. Sulfasalazin und 0,5 eq. Hydroxybenzotriazol (HOBt) wurden in vier Teilen NMP gelöst, während 5 eq. *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) in einem Teil DCM aufgelöst wurden. Anschließend wurden die Lösungen vereint und auf das am Polymerharz gebundene Peptid gegeben. Die Reaktion wurde nach sieben Stunden auf dem Schüttler beendet, das Harz mehrfach mit NMP, DCM und Diethylether gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Bei der Abspaltung des entstandenen Produkts von der festen Phase wurde das Harz nicht länger als eine Stunde inkubiert.

2.2.3 Aufreinigung und Lyophilisation der Produkte

Die Produkte wurden nach der Synthese mit TFA:H₂O:TIS = 95:2,5:2,5 vom Harz abgespalten und über präparative HPLC aufgereinigt. Hierfür wurde eine Flussrate von 20 mL/min verwendet und eine UV Detektion bei $\lambda = 214$ nm. Der Gradient wurde variabel auf die verschiedenen Moleküle angepasst, sodass eine genaue Abtrennung des Produkts von ungewünschten Nebenprodukten gewährleistet wurde. Nach einer Prüfung auf Reinheit der gewonnenen Fraktionen (analytische HPLC und Massenspektrometrie), wurden sie vereint, in flüssigem Stickstoff gefroren und über Nacht lyophilisiert.

2.2.4 Kultivierung der Zellen

Sämtliche Arbeiten der Zellkultur wurden in den Räumlichkeiten von Prof. Stephan Urban (Molecular Virology; Heidelberg) durchgeführt; Materialien, Zelllinien und Hilfestellungen wurden von ihm und seinen Mitarbeitern freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Alle Zellen wurden in Inkubatoren bei 37 °C, 95 % relative Luftfeuchte und 5 % CO₂ kultiviert. Die verwendeten Zelllinien wurden im Regelfall zweimal pro Woche passagiert und unter dem Lichtmikroskop überprüft.

2.2.4.1 HuH7-NTCP

Eine von humanen Hepatoma-Zellen abgeleitete Zelllinie, zuvor beschrieben von *Ni et al.*³³. In die Zelllinie wurde ein Vektor mit humanem NTCP eingebracht, wodurch NTCP in hohem Maße exprimiert wird. Das Kulturmedium enthielt stets 10 % fötales Kalbserum (FCS), 10 mg/mL Penicillin, 10 mg/mL Streptomycin, 200 mM L-Glutamin, sowie 10 mg/mL Puromycin als Selektionsmarker. Für Experimente wurden die Zellen mit $2,5 \cdot 10^5$ Zellen/mL in die entsprechenden Platten ausgesät und über Nacht wachsen gelassen.

2.2.4.2 HepG2 A3

Auch diese Zelllinie leitet sich aus humanen Hepatoma-Zellen ab, die zusätzlich NTCP stabil über-exprimieren³³. Das Kulturmedium enthielt stets 10 % FCS, 10 mg/mL Penicillin, 10 mg/mL Streptomycin, 200 mM L-Glutamin, sowie 10 mg/mL Puromycin als Selektionsmarker. Für Experimente wurden die Zellen mit $5 \cdot 10^5$ Zellen/mL in die entsprechenden Platten ausgesät und über Nacht wachsen gelassen.

2.2.5 Bindungs-Assay

Mit diesen Methoden wurde die Bindungsfähigkeit und Affinität verschiedener Farbstoff-gekoppelter Peptide an NTCP untersucht. Die Versuche wurden mit HuH7-NTCP-Zellen durchgeführt; es wurden Kontrollen zur Bestimmung des Hintergrunds sowie unspezifische Bindung durch Besetzung des Rezeptors mit ungekoppelten Peptiden 30 Minuten vor der eigentlichen Behandlung mit eingeschlossen.

2.2.5.1 Mikroskopie

Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät (10^5 Zellen/mL) und kultiviert, bis die Zellen konfluent gewachsen waren. Dann wurden die Zellen gewaschen und für 30 Minuten mit den genannten Farbstoff-gekoppelten Peptiden bei 37 °C inkubiert. Drei Waschschrte zu je fünf Minuten mit 2 % bovinem Serumalbumin (BSA) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) im Dunkeln erfolgten. Darauffolgend wurde einmal mit PBS gewaschen und mit 1,25 % PFA über 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen weitere Male gewaschen und die Zellkerne mit *Hoechst* angefärbt, gefolgt vom Aufbringen des Deckglases auf den Objektträger mithilfe von Fluoromount G. Abschließend wurde Immersionsöl aufgebracht und die Bilder aufgenommen. Als Kontrolle wurden Zellen 30 Minuten vor der Behandlung mit Farbstoff-markierten Peptiden mit 500 nM unmarkiertem MyrB inkubiert.

2.2.5.2 Fluorescence-Assisted Cell Sorting (FACS)

Nach Kultivierung von HuH7-NTCP-Zellen über Nacht in einer Zellkulturflasche wurde mehrfach mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin abgelöst. Anschließend wurde das Medium durch Zentrifugation und Resuspension gewechselt, sowie die Zellen durch ein Zellsieb vereinzelt und ausgezählt. Die so präparierten Zellen wurden 30 Minuten vor der Vermessung mit den entsprechenden Farbstoff-gekoppelten Peptiden in den angegebenen Konzentrationen behandelt.

Zur Auswertung wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) der Proben ermittelt. Weiterhin wurden die Hintergrundsignale der korrespondierenden Proben subtrahiert und das stärkste Signal auf 100 % normalisiert. Dies wurde als Bezugswert für die restlichen Analyten verwendet.

2.2.6 HDV-Infektion

Die zur Infektion verwendete, konzentrierte Lösung wurde freundlicherweise von Prof. Stephan Urban (Molecular Virology; Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Die Versuche wurden entweder mit HuH7-NTCP-Zellen oder HepG2 A3-Zellen durchgeführt. Für HuH7-NTCP-Zellen wurden zwei verschiedene Infektionsschemata angewendet: Nachdem die Zellen ausgesät und kultiviert wurden, wurde virushaltiges Medium auf die Zellen aufgebracht. Das

virushaltige Medium enthielt neben den typischen Zusätzen 2 % DMSO, sowie 4 % Polyethylenglykol (PEG). Die Infektionsdauer betrug entweder 2,5 Stunden oder 16-18 Stunden (über Nacht). In Experimenten mit 2,5 Stunden Infektionsdauer wurde Virus entsprechend 2 Genomäquivalenten pro Zelle (GEq/Zelle) verwendet, in über Nacht Experimenten 1 GEq/Zelle. Nach erfolgter Infektion wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, erhielten frisches Medium (mit 2 % DMSO, ohne PEG), wurden unter dem Lichtmikroskop beurteilt und weiter kultiviert.

Für HepG2 A3-Zellen wurde die Infektion immer über Nacht und mit 1 GEq/Zelle durchgeführt, ansonsten wurde wie oben beschrieben verfahren.

Für alle Experimente wurden Kontrollen eingeschlossen, die keiner Behandlung und Infektion ausgesetzt waren, sowie Infektionskontrollen.

2.2.7 HBV-Infektion

Die zur Infektion verwendete, konzentrierte Lösung wurde freundlicherweise von Prof. Stephan Urban (Molecular Virology; Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Für die HBV-Infektionen wurden HepG2 A3-Zellen ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag konnten die Zellen wie unter 2.2.9 beschrieben behandelt werden. Für die Infektion wurden die Media wie unter 2.2.6 beschrieben verwendet, wobei stets über Nacht bei 200 GEq/Zelle infiziert wurde. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen gewaschen und neues Medium zur Verfügung gestellt. Nach sieben oder zwölf Tagen wurden die Überstände gesammelt und zur Quantifizierung des HBeAg-Titers nach Verdünnung zum Analysenzentrum des Universitätsklinikums Heidelberg gebracht.

Für alle Experimente wurden Kontrollen eingeschlossen, die keiner Behandlung und Infektion ausgesetzt waren, sowie Infektionskontrollen.

2.2.8 Automatisierte Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Zur Quantifizierung der HDAG-positiven Zellen wurden nach der Infektion die Zellen mit 4 % PFA in PBS über 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, um überschüssiges PFA zu entfernen. Im Anschluss wurden sie 30 Minuten mit 0,25 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert und erneut mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen bei 4 °C über Nacht mit 1:3000 in 5 % Milch in PBS verdünntem Patientenserum (VUDA), das anti-HDAG-Antikörper enthält, inkubiert. Nach erneuten Waschschrritten wurde der Zweitantikörper (goat anti-human, AlexaFluor488 gekoppelt) zusammen mit *Hoechst* über zwei Stunden auf die Zellen gebracht. Abschließend wurde mehrfach gewaschen und in die wells PBS gegeben.

Die so angefärbten Zellen wurden per automatisierter Mikroskopie im Zentrum „Quantitative Analysis of Molecular and Cellular Biosystems“ Heidelberg aufgenommen und ausgewertet. Hierfür wurden in drei verschiedenen Versuchen je drei wells pro Platte gescannt. Pro well erfolgte eine automatische Erfassung von neun Bilder, in welchen die Zellkerne und HDAG-positiv angefärbten Zellen ausgezählt wurden.

2.2.9 Infektionsinhibition

In Infektionsinhibitions-Experimenten wurden die Zellen vor, während und z.T. nach der Infektion mit verschiedenen Substanzen behandelt. Die daraus resultierende Anzahl an infizierten Zellen wurde zur Bestimmung der Potenz dieser Substanzen ausgewertet.

Dazu wurde Medium 45 Minuten vor der Infektion mit den entsprechenden Substanzen in den vorgesehenen Konzentrationen versetzt und der DMSO-Gehalt auf 2 % in der höchsten Konzentration

eingestellt. Ab diesem Zeitpunkt wurde ausschließlich mit Medium, das 2 % DMSO enthielt, gearbeitet³³. Das Behandlungsmedium wurde auf die Zellen gegeben und virushaltiges Medium wurde hergestellt. Mithilfe des virushaltigen Mediums wurde dann die gleiche Verdünnungsreihe erstellt wie oben beschrieben. Nach Ablauf der 45 Minuten wurde das Behandlungsmedium gegen die virushaltige Verdünnungsreihe getauscht. Wenn die Infektion über Nacht andauern sollte, wurde das virushaltige Medium am Folgetag entfernt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und frisches Medium hinzugegeben.

Für Versuche mit einer Infektionsdauer von 2,5 Stunden, wurde wie oben beschrieben verfahren, aber nach 2,5 Stunden das virushaltige Medium entfernt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und die Substanzen in Medium ohne Virus wieder auf die Zellen gegeben. Am Folgetag wurde genauso verfahren, wie zuvor beschrieben.

2.2.10 In-Cell ELISA

Sechs Tage nach Infektion und Behandlung von HuH7-NTCP oder HepG2 A3-Zellen wurde zur Quantifizierung der Infektionsinhibition ein In-Cell ELISA durchgeführt, wie von *Lempp et al.*¹⁵² beschrieben: Hierfür wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen für 30 Minuten mit 4 % PFA fixiert. Nach zwei Waschschritten wurden die Zellen mit 0,25 % Triton X-100 in PBS für 30 Minuten permeabilisiert und anschließend mit einer Lösung von 0,05 % Tween® 20 und 3 % BSA in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Erstantikörper gegen HDAG wurde nun Patientenserum (VUDA) in der letztgenannten Lösung verdünnt, zu den Zellen zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur binden gelassen; in Versuchen mit HuH7-NTCP in der Verdünnung 1:40.000, in Versuchen mit HepG2 A3 1:70.000. Darauf folgend wurde mehrfach mit 0,05 % Tween® 20 in PBS gewaschen und dann mit 3 % (HuH7-NTCP) bzw. 1 % (HepG2 A3) H₂O₂-Lösung für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren Waschschritten wurde der Zweitantikörper (goat anti-human, Peroxidase gekoppelt; 1:5.000) für eine Stunde aufgebracht. Abschließend wurden die Zellen mehrfach intensiv gewaschen und für zehn Minuten nochmal 0,25 % Triton X-100 in PBS ausgesetzt, um dann mit dem Lumineszenzsubstrat behandelt zu werden. Die Messung erfolgte im direkten Anschluss als Erfassung der Lichtintensität pro well über 0,1 s.

Bei der Auswertung wurde das ermittelte Hintergrundsignal von sämtlichen Messergebnissen der gleichen Platte abgezogen. Anschließend wurde eine Normalisierung vorgenommen, bei der die Zellen, die einer ungehinderten Infektion ausgesetzt waren, gemittelt wurden und auf 100 % Infektion gesetzt wurden. Alle anderen Ergebnisse beziehen sich auf diesen Wert.

2.2.11 [³H]-Taurocholat-Aufnahme-Assay

HuH7-NTCP oder HepG2 A3-Zellen wurden in 24-well-Platten ausgesät und über Nacht kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit zunehmenden Konzentrationen an Substanzen für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde dem Medium eine Mischung von kaltem TC und [³H]-Taurocholat ([³H]-TC) zugegeben. Bei Versuchen mit HuH7-NTCP-Zellen wurde eine Endkonzentration von 50 µM kaltem und 5 nM radioaktivem TC eingestellt, bei Versuchen mit HepG2 A3-Zellen 50 µM/10 nM. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde fortgefahren, wie beschrieben von *Nkongolo et al.*¹³¹: Die Zellen wurden auf Eis gestellt und nach Entfernen des Mediums mehrfach mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Lösung von 0,05 % Natriumlaurylsulfat (SDS) und 0,25 M Natronlauge (NaOH) bei Raumtemperatur kurz inkubiert und mithilfe von Scherkräften lysiert. Dann wurde zu den Zellen Szintillationsflüssigkeit gegeben und für

mindestens 30 Sekunden gut gemischt. Letztlich wurden die so erhaltenen Suspensionen auf [³H]-Szintillation vermessen.

Pro Versuch wurden als Kontrollen Zellen ohne Behandlung und ohne Substrat verwendet; weiterhin wurden pro Versuch Zellen ohne Behandlung aber mit Substrat als Kontrolle vermessen. Die Daten sind in radioaktiven Zerfällen pro Minute [cpm] angegeben; die gemittelten Hintergrundsignale der unbehandelten Kontrollen ohne Substrat wurden von den zugehörigen Rohdaten subtrahiert. Es erfolgte keine Normalisierung der Ergebnisse. Die ungehinderte Aufnahme der Kontrollzellen ist in der Beschreibung der Versuche mit angegeben.

2.2.12 WST-1 Assay

Substanzspezifische Zytotoxizität wurde mithilfe des wasserlöslichen Tetrazolium-Salz Assays (WST-1 Assay) untersucht. Zu diesem Zweck wurden HuH7-NTCP-Zellen zu 25.000 Zellen/well in 96-well Platten ausgesät und über Nacht kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen steigenden Konzentrationen der Substanzen oder DMSO, verdünnt in 100 µL Medium, ausgesetzt. Als Kontrollen wurden Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden und Zellen, die parallel mit Triton X-100 lysiert wurden, hinzugefügt. Nach drei oder 24 Stunden Inkubation mit Substanzen wurde das gesamte Medium abgenommen. Danach wurde Medium, das 10 µL WST-1 enthielt, in jedes well gegeben und die Absorption bei 450 nm nach zwei Stunden gemessen. In der Auswertung wurde das Hintergrundsignal der lysierten Zellen von allen anderen Absorptionswerten subtrahiert. Anschließend wurden die unbehandelten Zellen als 100 % Viabilität definiert und die behandelten Zellen entsprechend normalisiert.

2.2.13 Radiomarkierung mit Iod-125

Die Radiomarkierung der verschiedenen Peptide erfolgte nach Standardprotokoll der Chloramin-T Methode¹⁵³: Hierfür wurde die Substanz zuerst in DMSO gelöst und anschließend in PBS zu 1 mM verdünnt. Davon wurden 25 µL mit 25 µL einer 0,25 M Phosphatpufferlösung (pH = 7,5) vereint, die erforderliche Menge Radioaktivität zugegeben und die Reaktion durch Zugabe von 10 µL der Chloramin-T Lösung (2 mg/mL) gestartet. Nach 30 Sekunden wurde die Markierung durch Zugabe von 20 µL einer gesättigten Methionin-Lösung abgestoppt. Der Erfolg wurde mittels Radio-HPLC (Flussrate = 2 mL/min, 100 % H₂O + 0,1 % TFA auf 100 % ACN + 0,1 % TFA in fünf Minuten, UV-Detektion λ = 214 nm, γ-Detektion) überprüft, die markierten Peptide dann per präparativer Radio-HPLC von freier Aktivität abgetrennt. Zu der aufgefangenen Fraktion wurde meist 10 µL DMSO hinzugefügt, um das Lösungsverhalten zu verbessern. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt und das Produkt in isotonischer Kochsalzlösung aufgenommen, um dem Tier verabreicht werden zu können.

2.2.14 Bioverteilung und Leberkinetik

Den Mäusen wurden nach vorhergehender Anästhesie die radioaktiven Substanzen über die Schwanzvene injiziert, wobei pro Zeitpunkt und Analyt drei Mäuse genommen wurden. Dreimal je 10 µL der verwendeten Lösung wurden als Standards zurückgestellt und zur Berechnung der injizierten Dosis pro Gramm Organ [%ID/g] herangezogen. Die Mäuse wurden mittels CO₂-Narkose getötet, ihr Blut und die angezeigten Organe entnommen, gewogen und im γ-Counter vermessen.

Für die Aufnahme der szintigraphischen Bilder wurden die Mäuse mit Isofluran sediert. Die Bilder wurden über zehn Minuten mit einer γ-Kamera (Biospace; FR) aufgenommen.

2.2.15 Graphische und statistische Auswertung

Die Erstellung der Kurven mit einhergehender Berechnung der wichtigsten Parameter (IC₅₀-Wert, 95 %-Konfidenzintervall (*oberes/unteres 95 %-KI*), Bestimmtheitsmaß (R^2)) erfolgte in *GraphPad Prism 8.0.1*. Zur Bestimmung der IC₅₀-Werte wurde nach der Transformation der Konzentrationen in ihren dekadischen Logarithmus eine nicht-lineare Regressionskurve erstellt. Diese wurde als eine nicht-standardisierte Kurve in Hinblick auf Steigung, Maximum und Form erstellt, allerdings erfolgte eine Fixierung des Minimalwerts auf null. Dosis-Wirkungs-Kurven besitzen immer die Angabe des Bestimmtheitsmaßes, des IC₅₀-Werts und die Angabe des 95 %-KI des IC₅₀-Werts. Fand ein Vergleich zu Kontrollmessungen oder –kurven statt, wurde dies in Prozent der Kontrolle ausgedrückt.

Vergleiche von IC₅₀-Werten wurden durch „*best-fit values*“ der entsprechenden Dosis-Wirkungs-Kurven in *Prism 8.0.1* graphisch durchgeführt und ausgewertet. Aus den erstellten Dosis-Wirkungs-Kurven konnten weiterhin gewünschte Parameter berechnet oder abgelesen werden.

In der Arbeit wird zwischen verschiedenen Signifikanzniveaus unterschieden: *nicht signifikant* („n.s.“; $p > 0,05$), *signifikant* ($p < 0,05$), *sehr signifikant* ($p < 0,01$) und *hochsignifikant* ($p < 0,001$).

3 Ergebnisse

Nomenklatur

Wenn Myrcludex B als Reinsubstanz eines zertifizierten GMP-Herstellers in Versuchen verwendet wurde, wird es in dieser Arbeit als „MyrB“ bezeichnet. Bei Änderungen an der Sequenz von Myrcludex B wird eine vereinfachte Schreibweise der exakten, in der Literatur zu findenden Nomenklatur „consensus HBV preS1/2-48“^{124,142,143}, nämlich „myr-2-48“ verwendet, zusammen mit einer Angabe der Änderung in Klammern. Tritt eine Addition von Aminosäuren nach Position 48 auf, werden diese im „single letter code“ angehängt; D-Aminosäuren werden als Kleinbuchstaben geschrieben; wurde die Gesamtlänge des Peptids verändert, die Sequenzfolge aber beibehalten, so wird die letzte C-terminale Position angegeben.

Die Nomenklatur der Alanin-Substitutions-Derivate ist derart, dass die gegen Alanin getauschten Positionen in Klammern hinter den Peptidstamm geschrieben werden, mit dem Zusatz „Ala“.

Um fluoreszenzmarkierte Peptide von unmarkierten zu unterscheiden, wird in der Nomenklatur bei farbstoffgekoppelten Peptiden ein tiefgestelltes „atto“ angefügt.

Beim Austausch der akzessorischen Domäne von MyrB gegen von Fledermaus-Hepatitis-Viren abgeleitete Sequenzen wird mit der beschriebenen Nomenklatur angezeigt, ab welcher Position die wirtsfremden Aminosäuren beginnen und abgekürzt, aus welchem Wirt die Sequenz stammt.

Im Rahmen der myr-2-21-Derivate wurde eine Reihe an Peptiden synthetisiert, die an Position 2 statt des Glycins ein Lysin tragen. Die Nomenklatur dieser Reihe ist „myr-K3-21“ und folgt ansonsten der restlichen beschriebenen Nomenklatur.

Aminosäuren, die an eine Lysin-Seitenkette gekoppelt wurden, stehen im „single letter code“ in Klammern hinter dem entsprechenden Lysin, von C- nach N-Terminus sortiert.

Die Nomenklatur der Hybride verhält sich wie bei Aminosäuren, die an eine Lysin-Seitenkette gekoppelt wurden: Das entsprechende *small molecule* wird in Klammern hinter das Lysin geschrieben, an welches es gebunden ist; in dieser Arbeit entweder Tiratricol (INN; abgekürzt TRIAC) oder Sulfasalazin (INN; abgekürzt Sul).

3.1 Erster Teil: Synthese und Charakterisierung von Peptiden zur Analyse der akzessorischen Domäne

3.1.1 Auswahl und Synthese der verwendeten Peptide

Myrcludex B (MyrB) ist ein Lipopeptid, bestehend aus 47 Aminosäuren. Es nutzt einen wirtsspezifischen Faktor, den nur in der Leber auffindbaren Gallentransporter NTCP, und bindet an diesen, wobei es eine Infektion mit HBV/HDV verhindern kann. Als erste Substanz der Wirkstoffklasse der Eintrittsinhibitoren wurde es bereits umfassend untersucht, vor allem in Bezug auf seine essentielle Sequenz. Im Laufe dieser Arbeit wurden die Varianten, bei denen die Aminosäuren 11-15 mit Alaninen ausgetauscht worden sind, als bindungsunfähige Peptide zur Kontrolle der Versuchsaufbauten verwendet. Aufgrund ihres nicht-bindenden Charakters werden diese Peptide allerdings nicht immer diskutiert.

Weniger ausführlich charakterisiert ist hingegen die Rolle der Aminosäuren nach dem essentiellen Teil. Bislang wurden hauptsächlich Studien mit Deletionen großer Abschnitte des Peptids gemacht, mit der Beobachtung, dass der Sequenzabschnitt zwischen den Aminosäuren 20 bis 30 keinen großen Einfluss

auf die inhibitorische Aktivität hat, aber die weiter C-terminal gelegenen Aminosäuren 30 bis 48 – die so genannte akzessorische Domäne – einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität aufweisen^{141–143}.

3.1.1.1 Konservierte Aminosäuren in der preS1-Sequenz der verschiedenen Genotypen

Während die verschiedenen Genotypen der humanen HBV/preS1-Sequenzen maximal eine Aminosäuren-Substitution innerhalb der essentiellen Sequenz zeigen, kommt es besonders im Bereich 22-29 zum mehrfachen Austausch. Auch in den Positionen 2-9, sowie 40-46 treten mehrfache Aminosäurewechsel auf. In der Sequenz 30-37 unterscheidet sich im Vergleich zum Konsensus maximal eine Aminosäure. Die Aminosäuren 30-33 (PDWD) sind über alle Genotypen konserviert und zusammen mit dem Sequenzabschnitt 9-21 gibt es sonst keine zusammenhängende Aminosäuresequenz, die derart konserviert vorliegt (**Abbildung 10**).

Konsensus	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWEANKVG
HBV A	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPVKDDWPAANQVG
HBV B	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDLNPHKDNWPDAAHKVG
HBV C	GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWEANQVG
HBV D	GQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVG
HBV E	GKNISTTNPLGFFPDHQLDPAFRANTRNPDWDHNPKNKDHWEANKVG
HBV F	GQNLVSNPLGFFPDHQLDPLFRANSSSPDWFNTNKDSWPMANKVG

Abbildung 10: Sequenzvergleich der preS1/2-48-Regionen der HBV-Genotypen A-F. Die blau hinterlegten Bereiche zeigen hochkonservierte Aminosäuren an, fettgedruckte Buchstaben zeigen Abweichungen von der Konsensussequenz an.

3.1.1.2 Kontrollpeptide

Um das Ausmaß des Einflusses der akzessorischen Domäne abschätzen zu können, wurden verschiedene Kontrollpeptide verwendet (**Abbildung 11; Tabelle 9**). Mithilfe von Standard-SPPS wurden myr-2-48yK und die bindungsunfähige Hepta-Alaninvariante myr-2-48yK(11-15Ala) synthetisiert. Zusätzlich wurden zwei Peptide synthetisiert, welchen die gesamte akzessorische Domäne fehlt – myr-2-21yK (**D**) und myr-2-21yK(11-15Ala) (**E**).



Abbildung 11: Darstellung der synthetisierten Kontrollpeptide. Alanin-Substitutionen sind orange hervorgehoben. „myr“ zeigt an, dass die Peptide am N-Terminus mit Myristinsäure konjugiert wurden. Aufgrund des verwendeten Polymerharzes bestehen die Peptide am C-Terminus aus einem Amid, hier durch die Endung „-NH₂“ verdeutlicht.

Tabelle 9: Molekülmassen und massenspektrometrische Ergebnisse der Kontrollpeptide.

Bezeichnung		Mittlere Molekülmasse	Berechnete Masse $z = 4, [M+4H]^{4+}$	Gemessene Masse $z = 4, [M+4H]^{4+}$
A	MyrB	5398,867	1349,910	1350,503
B	myr-2-48yK	5690,213	1422,7	1423,392
C	myr-2-48yK(11-15Ala)	5483,931	1371,172	1371,864
D	myr-2-21yK	2666,078	1333,233*	1333,671*
E	myr-2-21yK(11-15Ala)	2459,795	1230,168*	1230,619*

* = $z = 2, [M+2H]^{2+}$

3.1.1.3 Alanin-Substitutionen und Sequenztausch der akzessorischen Domäne

Um die akzessorische Domäne genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Peptide per SPPS synthetisiert, welche Alanin-Substitutionen in der Sequenz von MyrB beinhalten. Um die Wichtigkeit der hochkonservierten Bereiche im unmittelbaren Umfeld der essentiellen Sequenz (NPLGFFP) zu analysieren, sowie die Struktur der akzessorischen Domäne zu unterbrechen, wurde die Alaninvariante myr-2-48yK(16-21+34-39Ala) synthetisiert. Für eine differenziertere Analyse der Aminosäuren 30-39, die sich in den sechs untersuchten Genotypen um maximal zwei Aminosäuren unterscheiden, wurde das Peptid myr-2-48yK(32-37Ala) synthetisiert. Mit der Synthese der Alaninvariante myr-2-48yK(32-33Ala) wurde das hochkonservierte PDWD-Motiv (Aminosäuren 30-33) in der akzessorischen Domäne untersucht (siehe **Abbildung 10**, **Abbildung 12**).

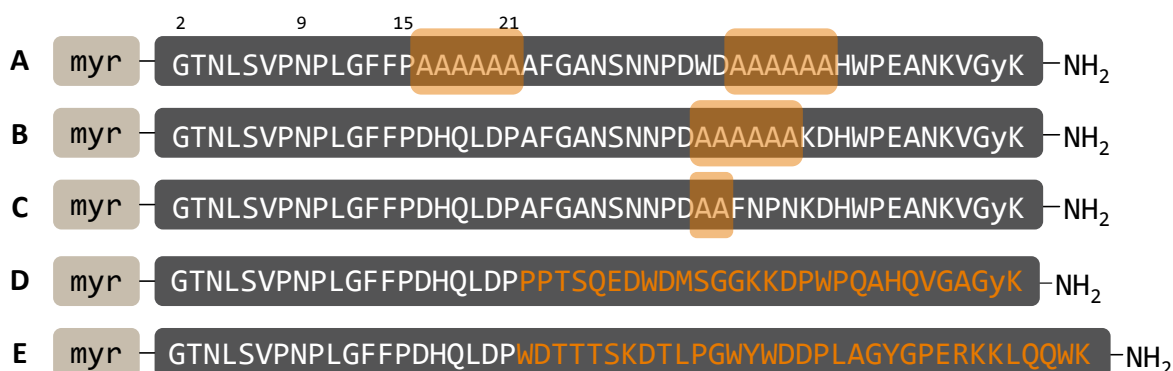


Abbildung 12: Darstellung der synthetisierten Peptide zur Untersuchung der akzessorischen Domäne. Alanin-Substitutionen sind orange hervorgehoben (A-C), während ein Austausch der akzessorischen Domäne gegen wirtsfremde Sequenzen in oranger Schrift abgebildet ist (D, E). „myr“ zeigt an, dass die Peptide am N-Terminus mit Myristinsäure konjugiert wurden. Aufgrund des verwendeten Polymerharzes bestehen die Peptide am C-Terminus aus einem Amid, hier durch die Endung „-NH₂“ verdeutlicht.

Für eine umfassendere Analyse der akzessorischen Domäne mit Blick auf ihre Rolle beim Zelleintritt oder Wirtsspezifität wurden zwei Varianten des myr-2-48yK Peptids synthetisiert. Hierbei wurden die 20 N-terminalen Aminosäuren belassen, die darauffolgende Sequenz jedoch abgewandelt (**Abbildung 12** (D, „myr-2-21/TB“) und (E, „myr-2-21/HB“); **Tabelle 10**). Verwendet wurden die Sequenzen von Oberflächenproteinen, die aus Hepatitisviren in Fledermäusen gewonnen worden sind; die Peptide bestehen also aus einer Kombinationssequenz.

Tabelle 10: Molekülmassen und massenspektrometrische Ergebnisse der Peptide zur Untersuchung der akessorischen Domäne.

	Bezeichnung	Mittlere Molekülmasse	Berechnete Masse $z = 4, [M+4H]^{4+}$	Gemessene Masse $z = 4, [M+4H]^{4+}$
A	myr-2-48yK(16-21+34-39Ala)	5121,677	1280,652	1281,349
B	myr-2-48yK(32-37Ala)	5342,889	1335,927	1336,588
C	myr-2-48yK(32-33Ala)	5531,071	1382,942	1383,610
D	myr-2-21/TB	5555,155	1388,94	1389,599
E	myr-2-21/HB	6325,06	1581,307	1581,927

3.1.1.4 Synthese fluoreszenzmarkierter Peptide

Die Synthese der Peptide erfolgte durch Standard-SPPS. Anschließend wurde der Myristylrest an den N-Terminus der voll geschützten Peptide konjugiert. Im dritten Schritt sollte der Fluoreszenzfarbstoff an das noch am Harz immobilisierte Peptid gebunden werden. Zu diesem Zweck erfolgte die orthogonale Entschützung der Alloc-Schutzgruppen der C-terminalen Lysine. Der Farbstoff wurde, unter Verwendung des NHS-Esters, über eine Amidbindung gekoppelt (**Abbildung 13**).

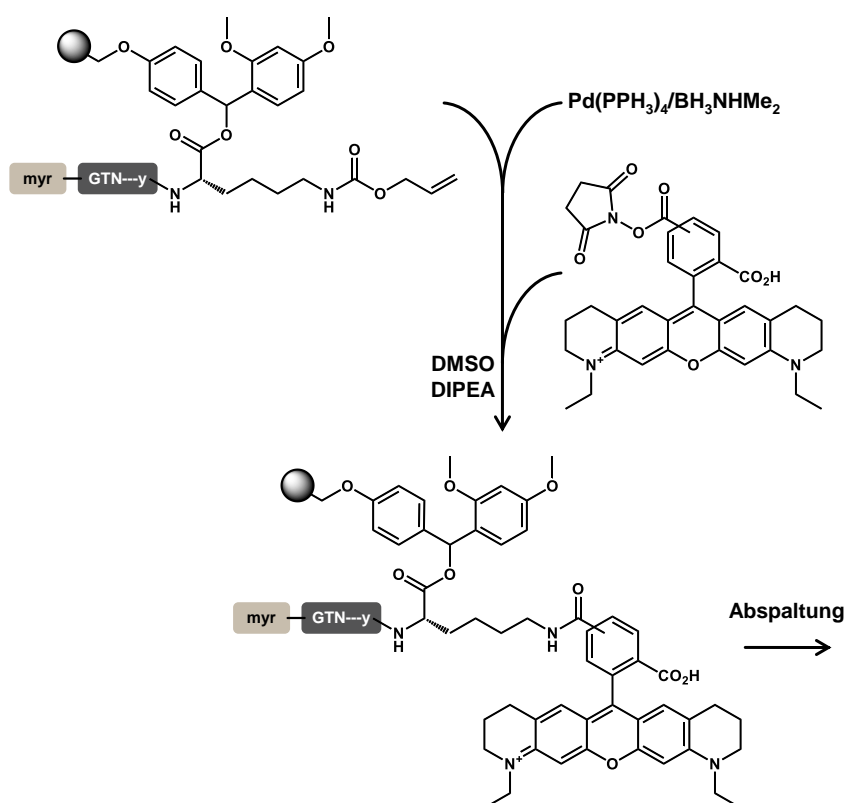


Abbildung 13: Reaktionsschema zur Synthese fluoreszenzmarkierter Peptide. Die Kopplung mit dem Farbstoff *atto-565* wurde am immobilisierten Peptid vollzogen. Im ersten Schritt wurde das primäre Amin des C-terminalen Lysins durch Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe zugänglich gemacht. Daraufhin wurde unter basischen Bedingungen eine Amidbindung zwischen Peptid und Farbstoff geknüpft. Letztlich wurden alle Schutzgruppen des Peptids und die Bindung an das Polymerharz abgespalten, um das Produkt zu erhalten.

Nach der Abspaltung und einhergehender kompletter Entschützung der Peptide wurden diese aufgereinigt. Die Vollständigkeit der Synthesen wurde durch Massenspektrometrie überprüft, siehe **Tabelle 11**. Der Fluoreszenzfarbstoff *atto-565* wurde verwendet, da der NHS-Ester eine einfache

Kopplungsreaktion mit der für die Fluoreszenzmikroskopie gewünschten Wellenlänge ($\lambda = 564 \text{ nm}$) vereint.

Tabelle 11: Molekülmassen und massenspektrometrische Ergebnisse der fluoreszenzmarkierten Peptide. Durch die Kopplung mit *atto-565* erfahren die Peptide eine Massenzunahme von 492,6 g/mol.

Bezeichnung	Mittlere Molekülmasse	Berechnete Masse $z = 4, [M+4H]^{4+}$	Gemessene Masse $z = 4, [M+4H]^{4+}$
myr-2-48yK_{atto}	6182,778	1545,751	1546,381
myr-2-48yK(11-15Ala)_{atto}	5976,496	1494,224	1494,882
myr-2-21yK_{atto}	3158,643	1579,326*	1579,882*
myr-2-21yK(11-15Ala)_{atto}	2952,360	1476,271*	1476,713*

* = $z = 2, [M+2H]^{2+}$

3.1.2 Bindungsanalyse der fluoreszenzmarkierten Peptide an NTCP

3.1.2.1 Fluoreszenzmikroskopie der Bindung von myr-2-48yK_{atto}, myr-2-21yK_{atto}, myr-2-48yK(11-15Ala)_{atto} und myr-2-21yK(11-15Ala)_{atto} an HuH7-NTCP-Zellen

Die hochspezifische Inhibitor-Rezeptor-Bindung der verschiedenen Lipopeptide kann mit Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden. Dies wurde durch die Kopplung der Analyten mit einem Fluoreszenzfarbstoff realisiert. Weiterhin wurde die unspezifische Bindung untersucht, indem der Rezeptor vorangehend mit MyrB besetzt wurde. Die Vorgehensweise erlaubt, das maximale, provozierte Ausmaß an unspezifischer Wechselwirkung einzuschätzen.

In dem nachfolgenden Versuchsaufbau wurden HuH7-NTCP-Zellen mit fluoreszenzmarkierten Substanzen in einer Konzentration von 400 nM inkubiert. Zusätzlich wurden parallel weitere Zellen für 30 Minuten bei 37 °C mit 500 nM MyrB vorbehandelt (geblockt).

In den Mikroskopiebildern in **Abbildung 14** ist zu erkennen, dass myr-2-48yK_{atto} (**A**) die höchste Bindung an die Zelloberfläche aufweist. Die Bindung ist um alle abgebildeten Zellkerne zu beobachten, sowohl in der 20-fachen, als auch der 40-fachen Vergrößerung. Zum Teil sind Bereiche der Zellen intensiver eingefärbt als andere; die Intensität ist nicht immer einheitlich verteilt. Bei Vorbehandlung mit MyrB verändert sich diese Verteilung hin zu einer einheitlich schwach vorhandenen, gleichmäßigen Intensität an der Zelloberfläche; einzelne Zellen zeigen intensivere Färbungsmuster. myr-2-21yK_{atto} (**C**) zeigt ohne Vorbehandlung eine schwache Bindung, in der 20-fachen Vergrößerung können nicht alle Zellen als eindeutig positiv angefärbt erkannt werden. In der 40-fachen Vergrößerung wird deutlich, dass viele Zellen angefärbt sind und dass die Bindung in ihrem Charakter der von myr-2-48yK_{atto} auf unbehandelten Zellen ähnelt – auch hier sind intensiver eingefärbt Bereiche auszumachen. Das Signal ist deutlich schwächer im Vergleich zu myr-2-48yK_{atto} und auch die Struktur nicht so ausgeprägt. Auf den geblockten Zellen ist eine schwache Anfärbung in beiden Vergrößerungen nur noch schwer zu erkennen. Einzelne Zellen treten auf, die eine intensivere und strukturierte Färbung haben. Die Negativkontrolle zu myr-2-48yK_{atto}, myr-2-48yK(11-15Ala)_{atto} (**B**) zeigt vor allem auf den Zellen ohne Vorbehandlung in beiden Vergrößerungen eine sehr schwache, gleichmäßige Bindung an die Zelloberflächen, es treten keine Zellen mit intensiveren Bereichen oder anderweitige Färbungsmuster auf. Auf den geblockten Zellen scheint die Bindung etwas intensiver und zum Teil strukturiert. Ähnliche Beobachtungen sind bei myr-2-21yK(11-15Ala)_{atto} (**D**) zu machen, wobei die Strukturierung in geringerem Maße stattfindet und die Hintergrundfärbung höher ist.

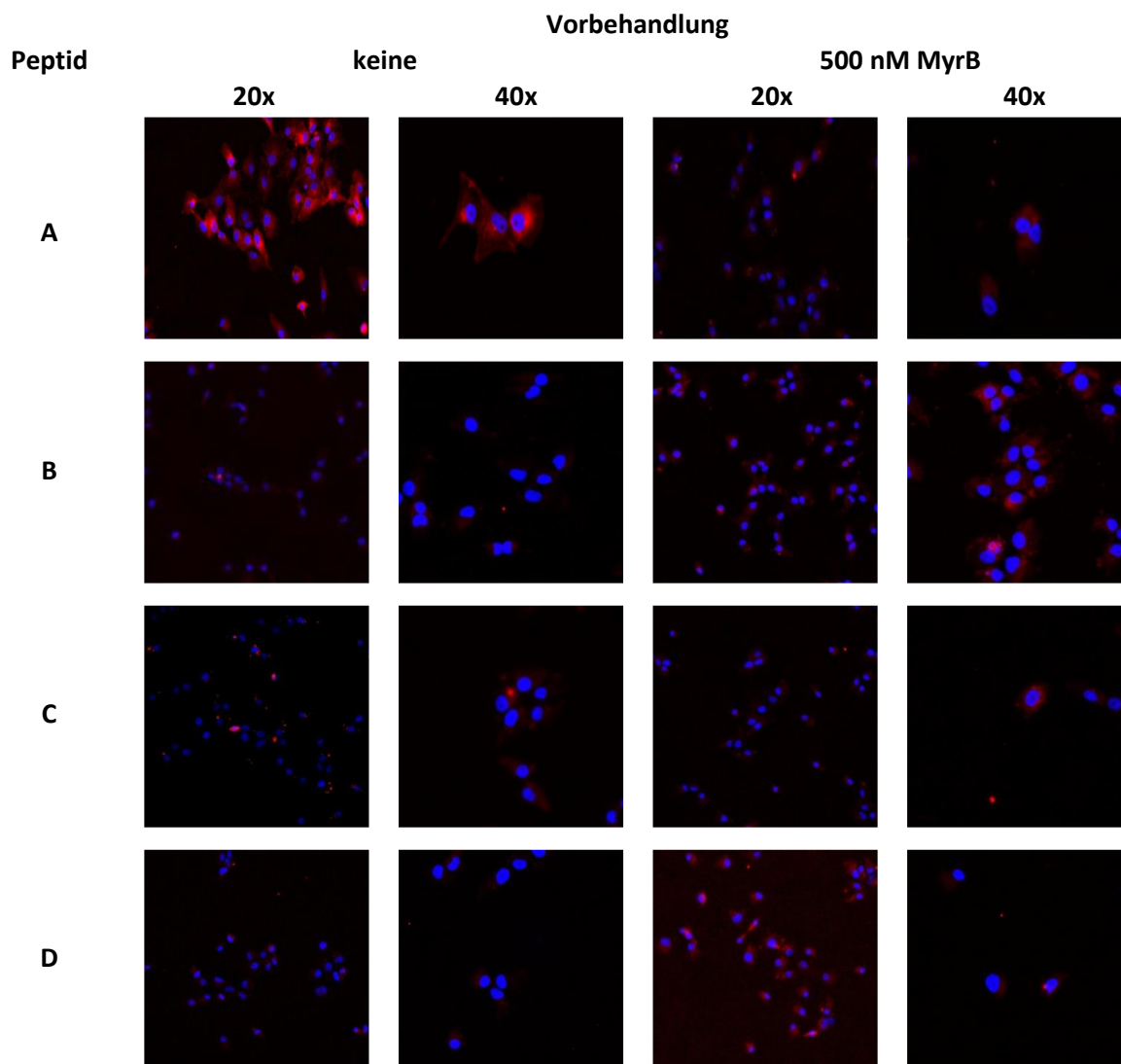


Abbildung 14: Bindung fluoreszenzmarkierter Peptide an HuH7-NTCP-Zellen. Die Zellen wurden ohne Vorbehandlung für 30 Minuten mit 400 nM fluoreszenzmarkierten Peptiden inkubiert (erste zwei Spalten) oder vor Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Peptiden für 30 Minuten mit 500 nM unmarkiertem MyrB behandelt (letzte zwei Spalten). (A) myr-2-48yK_{atto} (B) myr-2-48yK(11-15Ala)_{atto} (C) myr-2-21yK_{atto} (D) myr-2-21yK(11-15Ala)_{atto} Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff *Hoechst* angefärbt. Die Bilder entstanden durch Immersionsmikroskopie in 20- oder 40-facher Vergrößerung. Blau = Zellkerne, Rot = fluoreszenzmarkierte Peptide

3.1.2.2 FACS-Analyse der Bindung von myr-2-48yK_{atto}, myr-2-21yK_{atto}, myr-2-48yK(11-15Ala)_{atto} und myr-2-21yK(11-15Ala)_{atto} an HuH7-NTCP-Zellen

Neben einer optischen Analyse der Bindung durch Mikroskopie erlaubt eine FACS-Analyse einen quantitativen Assay – hier normalisiert auf die Bindung von myr-2-48yK_{atto}. Dafür wurden HuH7-NTCP-Zellen verwendet und kurz vor der Messung mit den fluoreszenzmarkierten Peptiden in zwei Konzentrationen – 200 nM und 400 nM – behandelt. Weiterhin wurde pro Peptid eine Messung mit geblocktem NTCP durchgeführt: Durch die Zugabe von 500 nM unmarkiertem MyrB 30 Minuten vor der Behandlung wurde sichergestellt, dass die Peptid-Bindungsstelle des Rezeptors besetzt wurde. In der Auswertung (**Abbildung 15**) ist zu sehen, dass myr-2-48yK_{atto} die stärkste Bindung zeigt und die Intensität ungefähr auf die Hälfte sinkt, wenn die halbe Konzentration (200 nM, 55,4 %) verwendet wird.

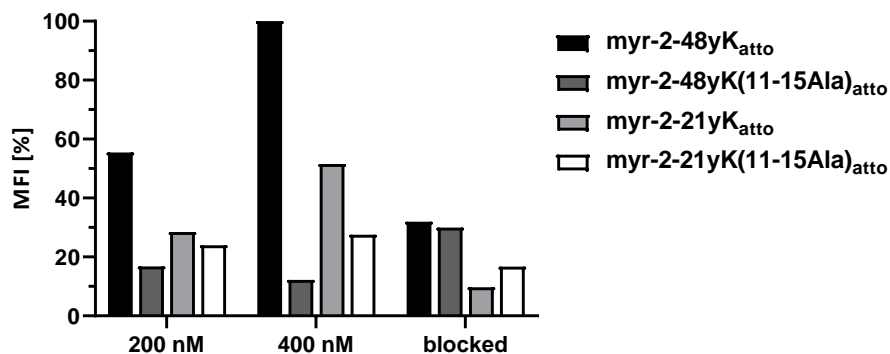


Abbildung 15: FACS-Analyse der Bindung fluoreszenzmarkierte Peptide an HuH7-NTCP-Zellen. Die Zellen wurden entweder ohne Vorbehandlung mit 200 nM oder 400 nM fluoreszenzmarkierten Peptiden für 30 Minuten inkubiert oder vor der Behandlung mit 500 nM unmarkiertem MyrB für 30 Minuten geblockt und anschließend per FACS mit freundlicher Unterstützung von Dr. Pascal Mutz analysiert.

Sobald die Zellen vor der Behandlung mit MyrB geblockt wurden, sinkt die Fluoreszenzintensität weiter ab auf 32 %. Bei dem gekürzten Peptid myr-2-21yK_{atto} ist eine Konzentrationsabhängigkeit festzustellen: Eine Konzentration von 200 nM resultiert in einer durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von 28,4 %, die doppelte Konzentration zeigt mit 51,6 % eine fast doppelt so hohe Intensität. Wurden die Zellen vorher geblockt, fällt der Wert auf 9,7 % ab. Bei beiden Negativkontrollen kann keine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden; bei myr-2-48yK(11-15Ala)_{atto} ist der Maximalwert von 29,9 % auf den geblockten Zellen zu finden, während in der Konzentration von 400 nM mit 12,2 % ein niedrigerer Wert als in der 200 nM Konzentration vorliegt (16,8 %). Bei myr-2-21yK(11-15Ala)_{atto} ist der Maximalwert zwar in der 400 nM Konzentration (27,6 %), allerdings weicht der Wert in der halben Konzentration mit 24 % nur um 3,6 Prozentpunkte von dem Maximalwert ab – beide Werte liegen im gleichen Bereich wie die Werte von myr-2-21yK_{atto} auf ungeblockten Zellen (28,4 %). Auf den geblockten Zellen erreicht myr-2-21yK(11-15Ala)_{atto} eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität von 16,7 %.

3.1.3 HDV-Infektionsinhibition in HepG2 A3-Zellen

Es ist bekannt, dass die ersten Bindungsschritte von HDV-Partikeln an die Zelloberfläche und den Eintrittsrezeptor genauso wie die Bindung von HBV-Virionen stattfinden, da in beiden Fällen die Hüllen von HBV gebildet werden. Um herauszufinden, ob ein Peptid den Eintrittsmechanismus blockiert, kann als Modellvirus das Hepatitis-D-Virus genutzt werden. Das Hepatitis-D-Virus ist als Modellvirus unter anderem deswegen bevorzugt, da es für Menschen ohne schon etablierte HBV-Infektion deutlich weniger gefährlich ist.

In HepG2 A3-Zellen erfolgten die Infektionen in dieser Arbeit stets über Nacht und mit 1 GEq/Zelle. Bei diesen Versuchen wurden im Mittel $10,14 \pm 1$ % der Zellen mit HDV infiziert. Die mikroskopische Auszählung ergab 2609 ± 376 Zellkerne und 263 ± 42 HDAg-positive Zellen pro Bild (**Abbildung 16**).

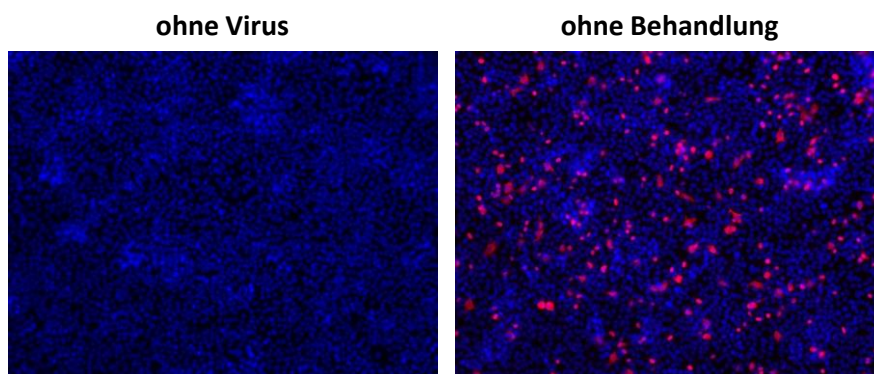


Abbildung 16: HDAg Immunfärbung HDV-infizierter HepG2 A3-Zellen. Die Zellen wurden mit HDV über Nacht infiziert (1 GEq/Zelle). Sechs Tage nach der Infektion wurden die Zellen fixiert, die Zellkerne mit *Hoechst* und mit Patientenserum (VUDA) angefärbt. Das linke Bild zeigt die IF von nicht infizierten Zellen, das rechte die von Zellen ohne Behandlung. Die Bilder wurden in 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Blau = Zellkerne, Rot = HDAg

3.1.3.1 In-Cell ELISA zur Bestimmung der Infektionsinhibition über Nacht in HepG2 A3-Zellen

In der folgenden Versuchsreihe wurden die verschiedenen Peptide auf ihre Fähigkeit getestet, eine HDV-Infektion zu verhindern. Dafür wurden konfluent gewachsene HepG2 A3-Zellen mit den entsprechenden Analyten behandelt. Anschließend wurde das Medium gegen virushaltiges Infektionsmedium ausgetauscht, unter Beibehaltung der entsprechenden Behandlung. Die Viruslast wurde auf 1 Genomäquivalent HDV pro Zelle (GEq/Zelle) eingestellt und die Infektion wurde über Nacht durchgeführt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen gewaschen mit anschließendem Mediumwechsel. Am sechsten Tag *post infectionem* wurde ein In-Cell ELISA durchgeführt bei dem die entstehende Lumineszenz gemessen und ausgewertet worden ist¹⁵².

3.1.3.2 Infektionsinhibition von MyrB und myr-2-21yK

Bei der Behandlung mit MyrB und myr-2-21yK fällt auf, dass für eine aussagekräftige Infektionsinhibition mit beiden Peptiden unterschiedliche Konzentrationsbereiche abgedeckt werden müssen. Bei dieser Versuchsreihe wurden die beiden Peptide in acht verschiedenen Konzentrationen getestet (**Abbildung 17**). Während MyrB eine Inhibition der Infektion auf unter 1 % ($0,24 \pm 0,31$ %) mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 3 μ M erreicht, kann myr-2-21yK in der höchsten Konzentration von 20 μ M die Infektion auf $5,45 \pm 1,51$ % der unbehandelten Kontrolle senken.

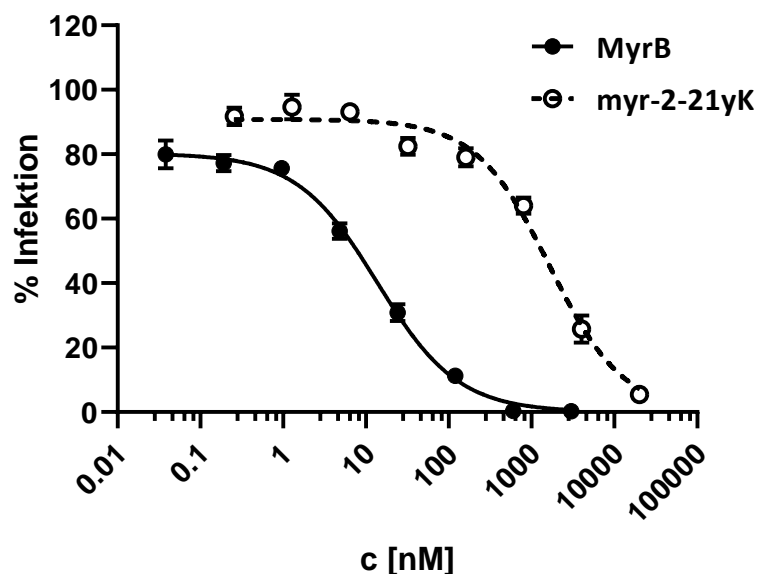


Abbildung 17: Reduktion der HDV-Infektion in HepG2 A3-Zellen bei Behandlung mit MyrB und myr-2-21yK. Die Zellen wurden für 45 Minuten mit den Substanzen vorbehandelt und anschließend über Nacht mit den Substanzen und HDV koinkubiert (1 GEq/Zelle). Sechs Tage nach der Infektion wurde ein In-Cell ELISA durchgeführt (n = 3; Duplikate). Die Infektionsinhibition wurde für die Peptide in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen bestimmt: MyrB von 0,04 nM – 3000 nM; myr-2-21yK von 0,3 nM – 20000 nM.

Die Berechnung der IC_{50} für die Peptide spiegelt diesen Unterschied wider (**Tabelle 12**). Im statistischen Vergleich erzielt MyrB einen hochsignifikant niedrigeren IC_{50} -Wert als myr-2-21yK ($p < 0,001$).

Tabelle 12: Übersicht der IC_{50} -Werte von MyrB und myr-2-21yK in einer HDV-Infektion in HepG2 A3-Zellen.

Bezeichnung	IC_{50} [nM]	unteres 95 % KI	oberes 95 % KI	R^2
MyrB	13,72	10,75	17,37	0,97
myr-2-21yK	1641	1277	2082	0,95

3.1.3.3 Infektionsinhibition zur Untersuchung der akzessorischen Domäne

Die nachfolgend getesteten Peptide wurden jeweils in acht unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Je nach Potenz wurden die Konzentrationsreihen angepasst, um aussagekräftige Kurven zu erhalten.

Bei der Behandlung mit myr-2-48yK(16-21+34-39Ala) ist in keiner Konzentration eine inhibitorische Aktivität feststellbar und es kann keine Berechnung der IC_{50} oder eine statistische Auswertung erfolgen. Über alle Konzentrationen liegt die Infektion für den Analyten im Mittel bei $111,06 \pm 11,81$ %. Alle anderen getesteten Peptide zeigen inhibitorische Eigenschaften mit mittelstarker Potenz (**Abbildung 18**).

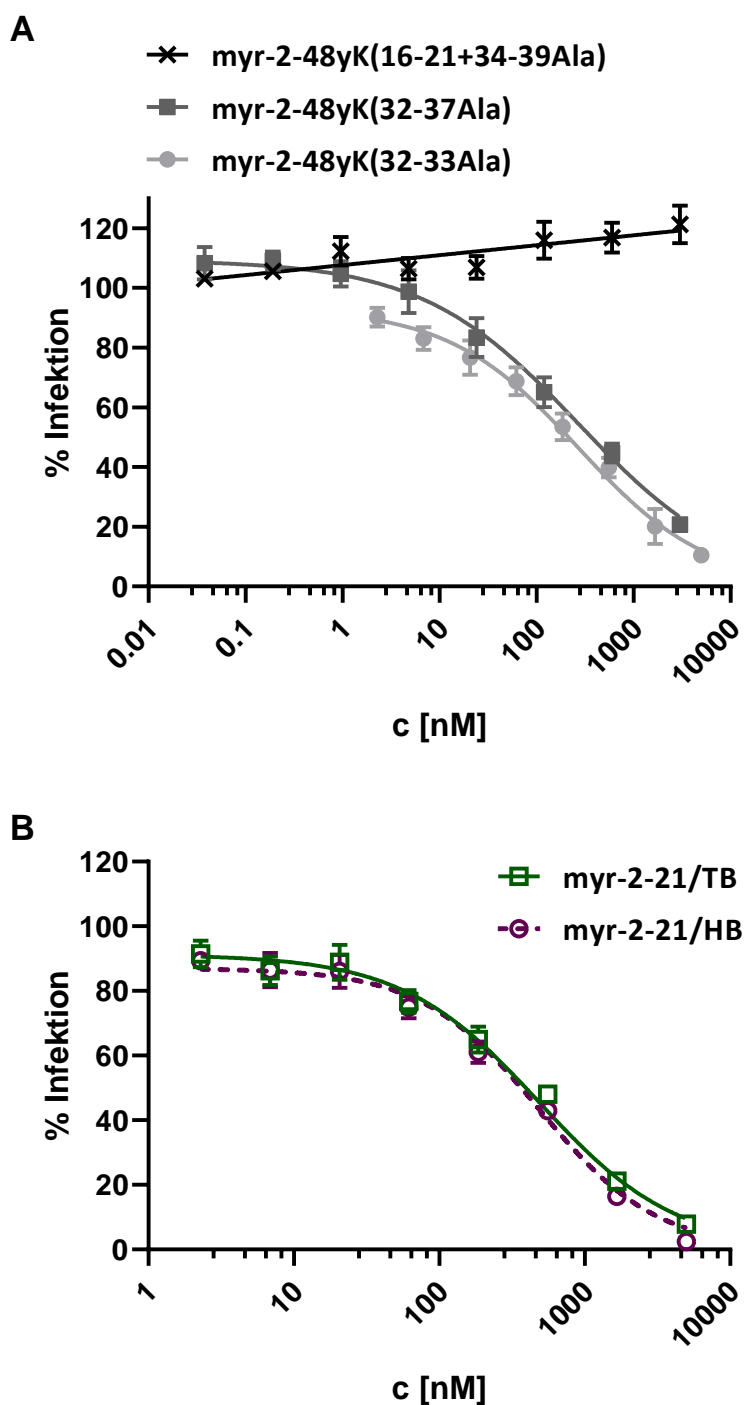


Abbildung 18: Reduktion der HDV-Infektion in HepG2 A3-Zellen bei Behandlung mit unterschiedlichen Peptiden. Die Zellen wurden für 45 Minuten mit den Substanzen vorbehandelt und anschließend über Nacht mit den Substanzen und HDV kokubiert (1 GEq/Zelle). Sechs Tage nach der Infektion wurde ein In-Cell ELISA durchgeführt (n = 3; Duplikate). (A) Infektionsinhibition der Alanin-Substitutions-Peptide, wobei für myr-2-48yK(32-33Ala) ein anderer Konzentrationsbereich (2,3 nM – 5000 nM) gewählt wurde, als für die anderen beiden Peptide (0,04 nM – 3000 nM). (B) Infektionsinhibition der chimären Peptide im Konzentrationsbereich von 2,3 nM – 5000 nM.

Die halbmaximalen Hemmkonzentrationen liegen im Bereich von 200-600 nM und weichen nicht um mehr als das Dreifache des niedrigsten IC_{50} -Wertes von myr-2-48yK(32-37Ala) (240,1 nM) ab. Die Kurven zur Berechnung der jeweiligen IC_{50} -Werte besitzen alle ein Bestimmtheitsmaß > 0,85; eine Übersicht der Werte ist in **Tabelle 13** zu finden.

Tabelle 13: Übersicht der IC₅₀-Werte unterschiedlicher Peptide in einer HDV-Infektion in HepG2 A3-Zellen.

Bezeichnung	IC ₅₀ [nM]	unteres 95 % KI	oberes 95 % KI	R ²
myr-2-48yK(16-21+34-39Ala)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
myr-2-48yK(32-37Ala)	240,1	140,6	389,6	0,89
myr-2-48yK(32-33Ala)	317,3	165,5	508,6	0,89
myr-2-21/TB	541,7	403,4	710,1	0,93
myr-2-21/HB	439,3	336,3	563,4	0,94

n.b. = nicht bestimmbar

Im direkten Vergleich können keine signifikanten Unterschiede zwischen myr-2-48yK(32-33Ala) und einem anderen der hier getesteten Peptide festgestellt werden ($p > 0,05$; n.s.). Ein signifikant besseres Ergebnis erreicht myr-2-48yK(32-37Ala) im Vergleich zu myr-2-21/HB ($p < 0,05$) und sehr signifikant im Vergleich zu myr-2-21/TB ($p < 0,01$). Untereinander unterscheiden sich myr-2-21/TB und myr-2-21/HB statistisch nicht ($p > 0,05$; n.s.).

Die Kontrollpeptide MyrB bzw. myr-2-21yK weisen hochsignifikante Unterschiede im Vergleich zu den anderen Peptiden auf: Die halbmaximale Hemmkonzentration von MyrB ist hochsignifikant niedriger als die aller anderer getesteten Peptide ($p < 0,001$). Im Gegensatz dazu ist der IC₅₀-Wert von myr-2-21yK hochsignifikant höher als die der anderen Analyten ($p < 0,001$).

3.1.4 [³H]-Taurocholat-Aufnahme-Assay

3.1.4.1 Fehlerstreuung im [³H]-Taurocholat-Aufnahme-Assay bei Nutzung der HuH7-NTCP Zelllinie

Um die Beeinflussung der physiologischen Funktion von NTCP durch die verschiedenen Peptide einschätzen zu können, wurde ein Aufnahme-Assay mit Tritium (³H) markiertem Substrat (Taurocholat, TC) in Anwesenheit der Substanzen durchgeführt¹³¹.

Zunächst wurde der Assay mit der HuH7-NTCP Zelllinie durchgeführt. Im Rahmen dieser Versuche lag die Konzentration von radioaktiv markiertem TC bei 5 nM. Dabei fiel auf, dass eine starke Schwankung in der ungehinderten Aufnahme in die Kontrollzellen auftrat. Über insgesamt sieben Versuchstage mit Zellen unterschiedlichen Alters – sowohl frisch aufgetaute Zellen, als auch Zellen aus mehrwöchiger Kultur – zeigten die Kontrollen eine mittlere Aufnahme von $345,55 \pm 134,41$ cpm. Die prozentuale Abweichung vom Mittelwert betrug damit $\pm 38,9$ %. Die Spanne der Werte über alle Versuchstage lag bei 466 cpm mit dem niedrigsten Wert von 78 cpm gegenüber dem höchsten mit 544 cpm. Bei näherer Betrachtung wurde keine eindeutige Passagenabhängigkeit gefunden.

Durch Verwendung der HepG2 A3-Zelllinie gingen die Schwankungen deutlich zurück. Die Auswertung zeigt, dass eine ungehinderte Aufnahme des Substrats einer Anreicherung von [³H]-TC in Höhe von $760,22 \pm 57,73$ cpm ($n = 4$) entspricht, mit einer prozentualen Abweichung vom Mittelwert von $\pm 7,59$ %. In den Versuchen wurden die Zellen mit der entsprechenden Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen vorbehandelt. Darauf folgte eine Inkubation für 15 Minuten in Anwesenheit von 10 nM [³H]-TC. Abschließend wurden die Zellen lysiert und das Lysat mit Szintillationsflüssigkeit im Szintillations-Counter vermessen.

3.1.4.2 [³H]-Taurocholat-Aufnahme-Assay mit MyrB und myr-2-21yK in HepG2 A3-Zellen

Die maximale Inhibition liegt für MyrB in der höchsten Konzentration (2000 nM) bei $77,50 \pm 17,23$ cpm, entsprechend $10,19 \pm 2,27$ % der Kontrolle. Eine Erhöhung der maximalen Konzentration auf 3000 nM

zeigte keinen verstärkten Effekt ($n = 1$): $65,33$ cpm bzw. $10,2\%$ der Kontrolle ($640,66 \pm 27,4$ cpm). Gleiches gilt für myr-2-21yK, das in der höchsten eingesetzten Konzentration (2000 nM) $84,00 \pm 9,9$ cpm, entsprechend $11,05 \pm 1,30\%$ aufweist (**Abbildung 19**). Auch hier ist keine nennenswerte Steigerung der Inhibition in einer höheren Konzentration von 3000 nM zu beobachten ($70,00$ cpm bzw. $10,93\%$). Beide Substanzen erreichen im Aufnahme-Assay ihren Maximaleffekt in der höchsten Konzentration, sowie die gleiche Aufnahmeeffizienz wie die unbehandelte Kontrolle in der niedrigsten Konzentration von 640 pM (MyrB = $96,88 \pm 5,06\%$ bzw. $736,50 \pm 38,49$ cpm; myr-2-21yK = $94,97 \pm 7,1\%$ bzw. $722,01 \pm 53,97$ cpm).

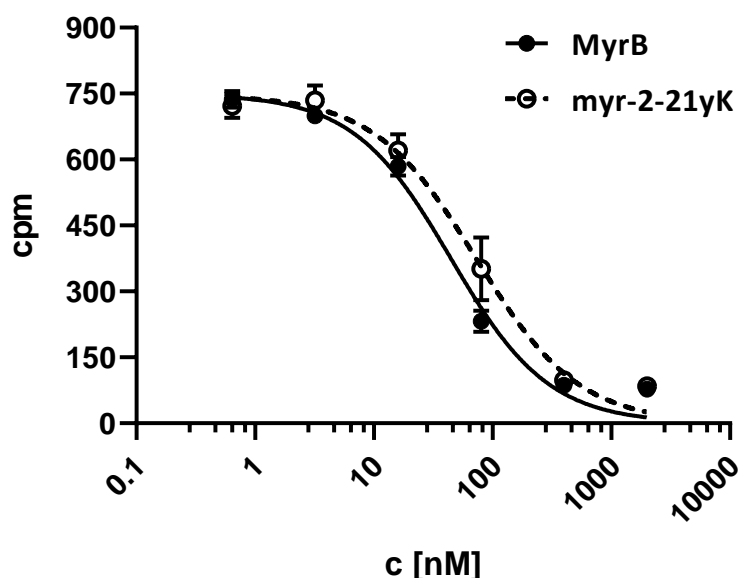


Abbildung 19: Reduktion der $[^3\text{H}]$ -TC-Aufnahme in HepG2 A3-Zellen bei Behandlung mit MyrB und myr-2-21yK. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei 37°C mit den Substanzen vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten bei 37°C mit den Substanzen und 10 nM $[^3\text{H}]$ -TC versetzt ($n = 3$). Der verwendete Konzentrationsbereich liegt von $0,6$ nM – 2000 nM.

Die IC_{50} -Werte erlauben eine genauere Einschätzung des hemmenden Effekts der Substanzen, da nicht allein der Maximal- und Minimaleffekt in die Berechnung einfließen, sondern auch der Kurvenverlauf. Ausschlaggebend ist hierbei auch das Bestimmtheitsmaß eben dieser Kurve; eine aussagekräftige Kurve liegt bei $R^2 \geq 0,8$ vor. Beide Kurven erfüllen dieses Kriterium mit $R^2 = 0,98$ und $0,94$ für MyrB bzw. myr-2-21yK. Die daraus abgelesenen IC_{50} -Werte sind demnach ebenfalls statistisch belastbar und sind im direkten Vergleich zueinander signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$; **Tabelle 14**).

Tabelle 14: Übersicht der IC_{50} -Werte von MyrB und myr-2-21yK im $[^3\text{H}]$ -TC-Aufnahme-Assay in HepG2 A3-Zellen.

Bezeichnung	IC_{50} [nM]	unteres 95 % KI	oberes 95 % KI	R^2
MyrB	44,57	34,14	58,18	0,98
myr-2-21yK	73,12	47,81	111,80	0,94

3.1.4.3 $[^3\text{H}]$ -Taurocholat-Aufnahme-Assay zur Untersuchung der akzessorischen Domäne in HepG2 A3-Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses der Peptide auf die physiologische Funktion von NTCP erfolgte eine Charakterisierung durch einen $[^3\text{H}]$ -TC-Aufnahme-Assay.

Die Kontrollzellen zeigen eine Aufnahme von $771,03 \pm 92,32$ cpm, berechnet über die gesamte Versuchsreihe ($n = 3$). Alle Substanzen wurden über die gleichen fünf Konzentrationen wie die Analyten in **Abbildung 19** getestet.

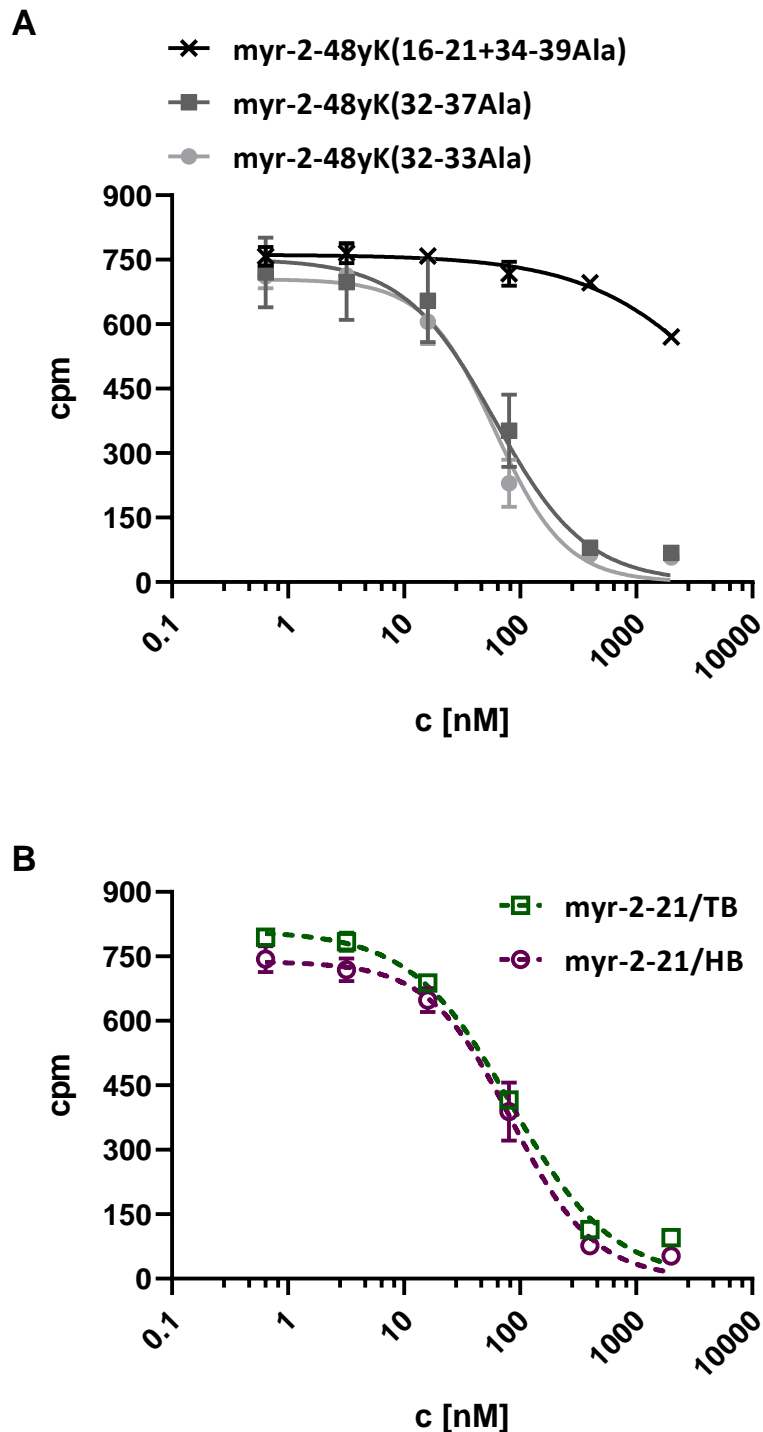


Abbildung 20: Reduktion der $[^3\text{H}]$ -TC-Aufnahme in HepG2 A3-Zellen bei Behandlung mit unterschiedlichen Peptiden. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei 37°C mit den Substanzen vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten bei 37°C mit den Substanzen und 10 nM $[^3\text{H}]$ -TC versetzt ($n = 3$). Der verwendete Konzentrationsbereich liegt von $0,6\text{ nM} - 2000\text{ nM}$. (A) Reduktion der Aufnahme durch Alanin-Substitutions-Peptide. (B) Reduktion der Aufnahme durch chimäre Peptide.

In **Abbildung 20** erreicht myr-2-48yK(16-21+34-39Ala) keine Inhibition > 30 % der Kontrolle; die mittlere [³H]-TC-Aufnahme in der höchsten Konzentration beträgt $73,94 \pm 1,9$ % der ungehinderten Aufnahme ($570,12 \pm 14,61$ cpm). In der zweithöchsten Konzentration kann die Aufnahme nicht um mehr als 10 % verhindert werden ($90,36 \pm 1,10$ % bzw. $696,67 \pm 8,51$ cpm) und in den niedrigeren Konzentrationen wird das Substrat ohne Beeinträchtigung aufgenommen ($97,25 \pm 4,95$ % bzw. $749,84 \pm 38,18$ cpm). Die zwei anderen Alaninvarianten myr-2-48yK(32-37Ala) und myr-2-48yK(32-33Ala), sowie myr-2-21/HB unterdrücken die Aufnahme in der höchsten Konzentration um mehr als 90 %. Nur myr-2-21/TB blockiert in der höchsten Konzentration die Aufnahme um weniger als 90 % mit $12,36 \pm 0,91$ % ($95,33 \pm 7,05$ cpm). In der niedrigsten Konzentration erreichen alle Substanzen > 90 % der Kontrollaufnahme (mittlere Aufnahme = $96,31 \pm 4,85$ % bzw. $742,61 \pm 37,39$ cpm), siehe **Abbildung 20**.

Mit Ausnahme von myr-2-48yK(16-21+34-39Ala) konnten die IC₅₀-Werte aller Substanzen berechnet werden (**Tabelle 15**).

Tabelle 15: Übersicht der IC₅₀-Werte unterschiedlicher Peptide im [³H]-TC-Aufnahme-Assay in HepG2 A3-Zellen.

Bezeichnung	IC ₅₀ [nM]	unteres 95 % KI	oberes 95 % KI	R ²
myr-2-48yK(16-21+34-39Ala)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
myr-2-48yK(32-37Ala)	79,79	37,03	152,1	0,88
myr-2-48yK(32-33Ala)	48,72	34,70	66,89	0,96
myr-2-21/TB	84,08	66,75	104,4	0,99
myr-2-21/HB	84,47	59,80	115,4	0,97

n.b. = nicht bestimmbar

Alle Kurven weisen dabei ein R² > 0,85 auf, die Kurven von myr-2-48yK(32-33Ala), myr-2-21/TB und myr-2-21/HB ein R² > 0,95. Es ist anzumerken, dass die berechneten halbmaximalen Inhibitions-konzentrationen innerhalb des Zweifachen von myr-2-48yK(32-33Ala) (48,72 nM) liegen, das den niedrigsten Wert darstellt. Im statistischen Vergleich sind dennoch signifikante Unterschiede festzustellen. Während myr-2-48yK(32-37Ala) sich nicht von den anderen Peptiden differenzieren lässt (p > 0,05; n.s.), ist myr-2-48yK(32-33Ala) zu myr-2-21/TB sehr signifikant (p < 0,01) und zu myr-2-21/HB signifikant (p < 0,05) verschieden. Zwischen den von Fledermaus-Viren abgeleiteten Peptiden besteht kein statistischer Unterschied (p > 0,05; n.s.).

3.1.5 HBV-Infektionsinhibition in HepG2 A3-Zellen

Um die Vergleichbarkeit zwischen einer HBV-Infektion und einer HDV-Infektion zu gewährleisten, wurden verschiedene Substanzen im HBV-Infektionsmodell in HepG2 A3-Zellen getestet. Nach einer Vorbehandlung wurden die konfluent gewachsenen Zellen über Nacht mit HBV und Analyten kokubiert. Die Infektion wurde mit einer höheren Viruskonzentration als in den HDV-Infektionen durchgeführt (200 GEq/Zelle). Als Endpunkte dienten die Antigentiter nach sieben Tagen und, in einer unabhängigen zweiten Testung für myr-2-21/HB, nach zwölf Tagen. Die Substanzen wurden in Verdünnungsreihen von neun Konzentrationen getestet und die IC₅₀-Werte wurden berechnet.

3.1.5.1 Bestimmung des HBe-Antigentiters

Nach sieben Tagen

Bei der Auswertung der HBe-Antigentiter nach sieben Tagen Kultivierung erreichen die Infektionskontrollen im Mittel $556,07 \pm 82,12$ IU/mL. MyrB senkt die Antigen-Sekretion auf $0,34 \pm 0,33$ IU/mL in der höchsten eingesetzten Konzentration von 1 μ M. Das Vorläuferpeptid myr-2-21yK zeigt in der höchsten eingesetzten Konzentration von 20 μ M eine Reduktion auf $4,53 \pm 0,84$ IU/mL. Wird die Behandlung prozentual zur Kontrolle betrachtet, lässt sich erkennen, dass beide Substanzen die Antigenkonzentration unter 1 % senken können: MyrB auf $0,06 \pm 0,06$ % und myr-2-21yK auf $0,81 \pm 0,15$ %. In den niedrigsten Konzentrationen von 3 pM (MyrB) bzw. 51 pM (myr-2-21yK) erreicht keine der Substanzen mehr als 85 % der Kontrolle (**Abbildung 21**).

Die errechneten halbmaximalen Inhibitionskonzentrationen sind **Tabelle 16** zu entnehmen.

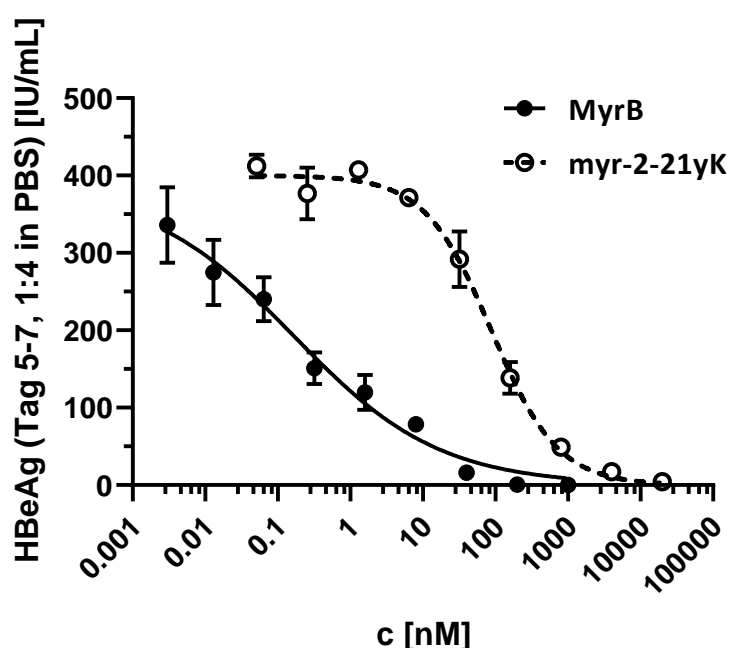


Abbildung 21: HBeAg-Sekretion bei Behandlung mit MyrB und myr-2-21yK nach sieben Tagen in HepG2 A3-Zellen. Die Zellen wurden für 45 Minuten mit den Substanzen vorbehandelt und anschließend über Nacht mit den Substanzen und HBV ko-inkubiert (200 GEq/Zelle). Der HBeAg-Titer aus dem Überstand von Tag 5-7 nach der Infektion wurde per ELISA bestimmt (n = 1; Duplikate). Das Ergebnis ist in der ursprünglichen Verdünnung des Überstands (1:4) angegeben. Die Peptide wurden in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen untersucht: MyrB von 3 pM – 1000 nM; myr-2-21yK von 0,05 nM – 20000 nM. Der Versuch wurde gemeinsam mit Benno Zehnder aus dem Labor von Prof. Stephan Urban durchgeführt.

In der Analyse mit den Substanzen myr-2-48yK(32-33Ala) und myr-2-21/TB wurde eine einheitliche Verdünnungsreihe mit neun Konzentrationen von 10 μ M bis 26 pM verwendet. Die Infektionskontrolle erreicht in diesem Versuch im Mittel einen Antigentiter von $625,49 \pm 81,02$ IU/mL. Die Analyten können alle in der höchsten Konzentration den Titer unter 1 % der Kontrolle senken, erreichen aber in der niedrigsten Konzentration nicht mehr als 75 % der Kontrolle (**Abbildung 22**).

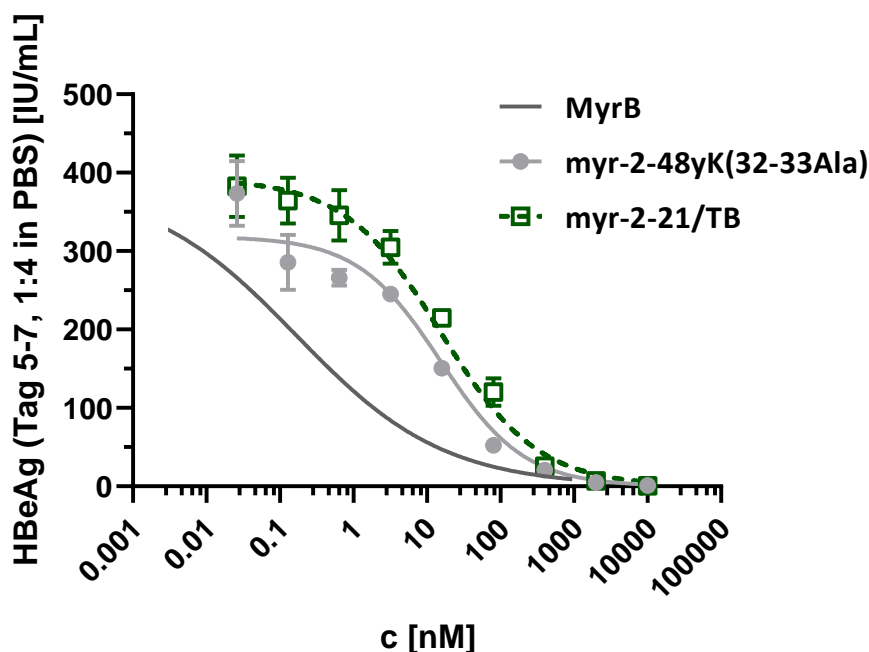


Abbildung 22: HBeAg-Sekretion bei Behandlung mit unterschiedlichen Peptiden nach sieben Tagen in HepG2 A3-Zellen. Die Zellen wurden für 45 Minuten mit den Substanzen vorbehandelt und anschließend über Nacht mit den Substanzen und HBV ko-inkubiert (200 GEq/Zelle). Der HBeAg-Titer aus dem Überstand von Tag 5-7 nach der Infektion wurde per ELISA bestimmt (n = 1; Duplikate). Das Ergebnis ist in der ursprünglichen Verdünnung des Überstands (1:4) angegeben. Die Peptide wurden im Konzentrationsbereich von 0,03 nM – 10000 nM untersucht. Die dunkelgraue Linie ohne Symbole entspricht der Kurve von MyrB aus **Abbildung 21** und wurde zur besseren Übersicht eingefügt. Der Versuch wurde gemeinsam mit Benno Zehnder aus dem Labor von Prof. Stephan Urban durchgeführt.

Aus den Verdünnungsreihen lassen sich halbmaximale Hemmkonzentrationen berechnen, die Hinweise auf die Potenz der Substanzen geben, siehe **Tabelle 16**.

Tabelle 16: Übersicht der IC_{50} -Werte unterschiedliche Peptide in einer HBV-Infektion nach sieben Tagen in HepG2 A3-Zellen.

Bezeichnung	IC_{50} [nM]	unteres 95 % KI	oberes 95 % KI	R^2
MyrB	166,4*	1,4*	795,8*	0,94
myr-2-21yK	87,75	61,26	124,3	0,98
myr-2-48yK(32-33Ala)	8,81	1,98	20,27	0,96
myr-2-21/TB	23,98	12,52	42,79	0,98

* = pM

Anzumerken ist der sehr niedrige IC_{50} -Wert von MyrB im sub-nanomolaren Bereich, wohingegen die restlichen Substanzen im nanomolaren Bereich liegen. Das 95 % Konfidenzintervall ist vor allem bei der Bestimmung von MyrB sehr breit. myr-2-21yK hat den höchsten IC_{50} -Wert, welcher um das Vierfache höher liegt als der zweithöchste IC_{50} -Wert des Analyten myr-2-21/TB. Auffällig ist die Aktivitätseinbuße um mehr als das 50-fache durch den Austausch von nur zwei Aminosäuren zu Alanin in der Sequenz von MyrB, wie an myr-2-48yK(32-33Ala) deutlich wird.

Nach zwölf Tagen

Für die Charakterisierung von myr-2-21/HB wurde der Antigentiter nach zwölf, statt nach sieben Tagen Kultivierung bestimmt. Weiterhin wurde die Infektionsinhibition für MyrB und myr-2-21yK wiederholt. Die Infektionskontrollen liegen dabei bei einem mittleren Titer von $691,05 \pm 82,72$ IU/mL. Für MyrB

kann in der höchsten Konzentration von 1 μM eine Inhibition der HBeAg-Sekretion auf unter 0,5 % der Kontrolle festgestellt werden. myr-2-21yK senkt in der höchsten Konzentration von 20 μM die Sekretion auf ca. 1 %. Nach zwölf Tagen können beide Substanzen in der jeweils niedrigsten Konzentration mehr als 90 % des Titors der Infektionskontrolle erreichen (**Abbildung 23**).

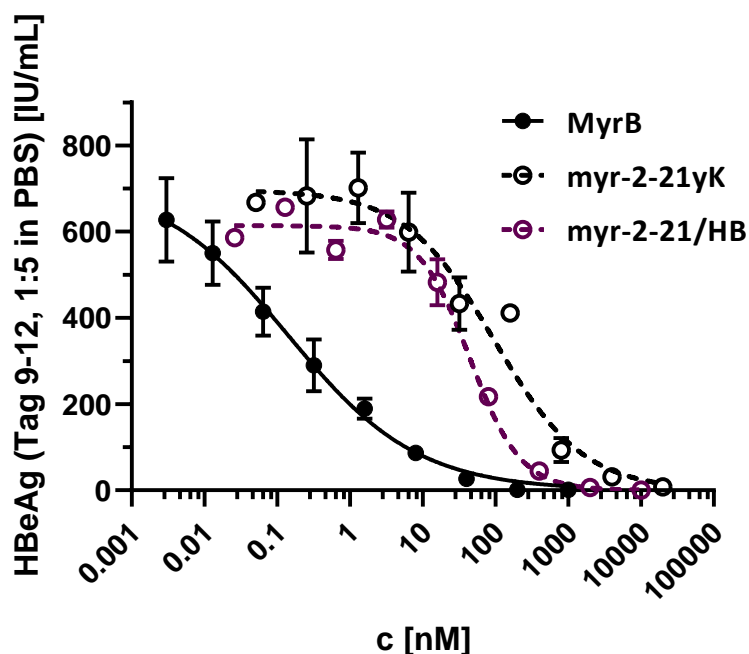


Abbildung 23: HBeAg-Sekretion bei Behandlung mit unterschiedlichen Peptiden nach zwölf Tagen in HepG2 A3-Zellen. Die Zellen wurden für 45 Minuten mit den Substanzen vorbehandelt und anschließend über Nacht mit den Substanzen und HBV ko-inkubiert (200 GEq/Zelle). Der HBeAg-Titer aus dem Überstand von Tag 9-12 nach der Infektion wurde per ELISA bestimmt (n = 1; Duplikate). Das Ergebnis ist in der ursprünglichen Verdünnung des Überstands (1:5) angegeben. Der Versuch wurde gemeinsam mit Benno Zehnder aus dem Labor von Prof. Stephan Urban durchgeführt.

In der höchsten Konzentration (10 μM) senkt myr-2-21/HB die Antigensekretion auf $0,11 \pm 0,06$ % der Kontrolle. In der niedrigsten Konzentration erreicht das Peptid ungefähr 85 % des Titors der Kontrolle. Die halbmaximalen Hemmkonzentrationen wurden berechnet und sind **Tabelle 17** zu entnehmen.

Tabelle 17: Übersicht der IC_{50} -Werte unterschiedliche Peptide in einer HBV-Infektion nach zwölf Tagen in HepG2 A3-Zellen.

Bezeichnung	IC_{50} [nM]	unteres 95 % KI	oberes 95 % KI	R^2
MyrB	142,4*	6,2*	500,3*	0,95
myr-2-21yK	96,15	29,39	277,3	0,93
myr-2-21/HB	50,26	37,10	67,59	0,98

* = μM

MyrB zeigt nach zwölf Tagen den niedrigsten IC_{50} -Wert im pico-molaren Bereich, gefolgt von myr-2-21/HB und letztlich dem kurzen myr-2-21yK Peptid. Die 95 % Konfidenzintervalle von MyrB und myr-2-21yK weisen in diesem Versuch eine große Spanne auf. Das mit 53 Aminosäuren längste getestete Peptid myr-2-21/HB kann die Infektion fast zweimal besser verhindern als myr-2-21yK.

Ergebnisse

3.2 Zweiter Teil: Synthese und Charakterisierung potentieller dualer NTCP-Inhibitoren

3.2.1 Synthese der verwendeten Peptide

3.2.1.1 myr-2-21-Derivate

Es wurden Derivate von myr-2-21 mittels Standard-SPPS synthetisiert, die über verschiedene Kopplungsstellen verfügen. Die Peptide unterscheiden sich in der Seitenkette des C-terminalen Lysins (²³Lys) (**Abbildung 24, Tabelle 18**).



Abbildung 24: Darstellung der synthetisierten myr-2-21-Derivate. Zusätzliche Aminosäuren, die an die Seitenkette des C-terminalen Lysins gekoppelt wurden, sind als Verzweigung dargestellt. „myr“ zeigt an, dass die Peptide am N-Terminus mit Myristinsäure konjugiert wurden. Aufgrund des verwendeten Polymerharzes bestehen die Peptide am C-Terminus aus einem Amid, hier durch die Endung „-NH₂“ verdeutlicht.

Tabelle 18: Molekülmassen und massenspektrometrische Ergebnisse der myr-2-21-Derivate.

	Bezeichnung	Mittlere Molekülmasse	Berechnete Masse $z = 2, [M+2H]^{2+}$	Gemessene Masse $z = 2, [M+2H]^{2+}$
A	myr-2-21yK	2666,078	1333,233	1333,671
B	myr-2-21yK(G)	2723,129	1361,734	1362,215
C	myr-2-21yK(DG)	2838,216	1419,247	1419,727

3.2.1.2 myr-K3-21-Derivate

Weiterhin erfolgte die Synthese einer Reihe von Peptiden, welche an Position 2 einen Aminosäureaustausch von Glycin zu Lysin erfuhren. Die Seitenketten der beiden vorhandenen Lysine wurden dann analog zu den myr-2-21-Derivaten modifiziert (**Abbildung 25, Tabelle 19**).



Abbildung 25: Darstellung der synthetisierten myr-K3-21-Derivate. Zusätzliche Aminosäuren, die an die Seitenkette eines Lysins gekoppelt wurden, sind als Verzweigung dargestellt. „myr“ zeigt an, dass die Peptide am N-Terminus mit Myristinsäure konjugiert wurden. Aufgrund des verwendeten Polymerharzes bestehen die Peptide am C-Terminus aus einem Amid, hier durch die Endung „-NH₂“ verdeutlicht.

Tabelle 19: Molekülmassen und massenspektrometrische Ergebnisse der myr-K3-21-Derivate.

Bezeichnung		Mittlere Molekülmasse	Berechnete Masse $z = 2, [M+2H]^{2+}$	Gemessene Masse $z = 2, [M+2H]^{2+}$
A	myr-K3-21yK	2737,199	1368,76	1369,244
B	myr-K3-21yK(G)	2794,250	1397,271	1397,652
C	myr-K(G)3-21yK	2794,250	1397,271	1397,655
D	myr-K3-21yK(DG)	2909,337	1454,784	1455,21
E	myr-K(DG)3-21yK	2909,337	1454,784	1455,187

3.2.2 Synthese der Peptid-Arzneistoff-Hybride

Aktuelle Literatur weist verstärkt auf die Möglichkeit hin, die Bindung von HBV/HDV-Virionen an NTCP zu unterbinden, aber gleichzeitig den Substrattransport zuzulassen¹⁴⁹. Die meisten bekannten *small molecule* NTCP-Inhibitoren blockieren den Rezeptor durch kompetitive Bindung in der Substratbindetasche. Das Ziel der folgenden Versuche ist es, sowohl eine peptidische, allosterische Bindung, als auch die substratspezifische Bindetasche in einer dualen Bindung zu adressieren. Im Rahmen des zweiten Teils dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine peptidische Komponente, gekoppelt mit einem kompetitiven *small molecule* zu einer hochspezifischen und –aktiven Substanz führt.

Dazu wurden zunächst bekannte *small molecules* selektiert, die als NTCP-Inhibitoren fungieren. Anschließend erfolgte eine Kopplung der Arzneistoffe an verschiedene synthetisierte Peptide. Abschließend wurden TRIAC und Sulfasalazin, sowie die im Folgenden synthetisierten Hybride, in Versuchen zu ihrem Einfluss auf physiologische und pathophysiologische Prozesse in Bezug auf Rezeptor-Interaktion und HDV-Infektion untersucht.

3.2.2.1 TRIAC-Kopplung

TRIAC konnte mit Aktivierung durch HBTU/DIPEA problemlos an primäre Amine gekoppelt werden (**Abbildung 26, Tabelle 20**). Die Reaktion war nach spätestens drei Stunden vollständig abgelaufen und das Produkt konnte entschützt und vom Harz abgespalten werden. TRIAC wurde im Unterschuss eingesetzt und reagierte vollständig. Das hauptsächlich auftretende, nicht identifizierte Nebenprodukt ($\Delta M = 96$ g/mol) trat nach Abspaltungen von mehr als 45 Minuten vermehrt auf.



Abbildung 26: Darstellung der synthetisierten Peptid-TRIAC-Hybride. „myr“ zeigt an, dass die Peptide am N-Terminus mit Myristinsäure konjugiert wurden, „TRIAC“ zeigt an, dass die Peptide am entsprechenden primären Amin mit TRIAC konjugiert wurden; Alanin-Substitutionen sind orange hervorgehoben (E). Aufgrund des verwendeten Polymerharzes bestehen die Peptide am C-Terminus aus einem Amid, hier durch die Endung „-NH₂“ verdeutlicht.

Tabelle 20: Molekülmassen und massenspektrometrische Ergebnisse der Peptid-TRIAC-Hybride. Durch die Kopplung mit TRIAC erfahren die Peptide eine Massenzunahme von 603,9 g/mol.

Bezeichnung	Mittlere Molekülmasse	Berechnete Masse $z = 2, [M+2H]^{2+}$	Gemessene Masse $z = 2, [M+2H]^{2+}$
A TRIAC-2-21yK	3057,986	1530,000	1530,478
B myr-2-21yK(TRIAC)	3269,995	1635,1	1635,554
C myr-K3-21yK(TRIAC)	3341,116	1670,636	1671,113
D myr-K(TRIAC)3-21yK	3341,116	1670,636	1671,114
E myr-2-21yK(TRIAC)(11-15Ala)	3063,712	1532,045	1532,508

3.2.2.2 Sulfasalazin-Kopplung

Sulfasalazin erfolgreich über die Carboxyfunktion mit einem primären Amin zu koppeln erforderte intensivere Optimierung. Die verschiedenen Reaktionsbedingungen und Ausbeuten der Kopplung an das primäre α -Amin von Glycin sind **Tabelle 21** zu entnehmen. Versuche, Sulfasalazin direkt an das ϵ -Amin von Lysin zu koppeln, zeigten keine Produktformation (**Tabelle 22**).

Tabelle 21: Optimierung der Kopplung von Sulfasalazin an das primäre α -Amin von Glycin. Verschiedene Reaktionsbedingungen wurden bei Raumtemperatur getestet.

Sulfasalazin	Aktivator(en)	Lösungsmittel	Base	Zeit [h]	Ausbeute [%]
10 eq.	HBTU (9,5 eq.)	NMP	DIPEA (20 eq.)	2	0
13 eq.	HBTU (15 eq.)	DMSO	TEA (12 eq.)	24	0
10 eq.	COMU (9,5 eq.)	NMP	DIPEA (20 eq.)	2	~30
12 eq.	COMU (13 eq.)	DMF	DIPEA (11 eq.)	24	0
2,6 eq.	DIC (2,6 eq.) HOBt (0,5 eq.)	DMF:DCM 4:1	-	24	~80
5 eq.	DIC (5 eq.) HOBt (0,5 eq.)	NMP:DCM 4:1	-	7	~85
2 eq.	EDC-HCl (3,4 eq.) HOBt (0,5 eq.)	EtOH:DMF 1:1	DIPEA (2 eq.)	23	0
5 eq.	EDC-HCl (10 eq.) Sulfo-NHS (25 eq.)	MES:PBS:DMF 14:2:1	-	22	0

Tabelle 22: Reaktionsbedingungen zur Kopplung von Sulfasalazin an das primäre ϵ -Amin von Lysin. Verschiedene Reaktionsbedingungen wurden bei Raumtemperatur getestet, ohne dass eine Amidbindung beobachtet wurde.

Sulfasalazin	Aktivator(en)	Lösungsmittel	Base	Zeit [h]	Ausbeute [%]
5 eq.	DIC (5 eq.) HOBt (0,3 eq.)	DMF:DCM 4:1	-	22	0
6 eq.	DIC (5 eq.) HOBt (0,6 eq.)	DMF:DCM 4:1	DIPEA (5 eq.)	20	0
5 eq.	DIC (5 eq.) HOBt (1 eq.)	NMP:DCM 4:1	-	24	0
5 eq.	DIC (5 eq.) HOBt (1 eq.)	NMP:DCM 4:1	DIPEA (10 eq.)	24	0
5 eq.	PyBOP (5 eq.)	DMF	DIPEA (10 eq.)	5	0
5 eq.	COMU (5 eq.)	NMP	DIPEA (5 eq.)	22	0
5 eq.	EDC-HCl (5 eq.) HOBt (5 eq.)	DMF:MES 7:1	DIPEA (10 eq.)	5	0

Letztlich erfolgte die Bildung einer Amidbindung zwischen Sulfasalazin und dem α -Amin von Glycin mit HOBt/DIC Aktivierung in NMP/DCM und führte zu Ausbeuten von ca. 80 % (**Abbildung 27, Tabelle 23**). Freies Sulfasalazin konnte nach der Reaktion nicht mehr detektiert werden. Um Sulfasalazin an den Positionen von ^{23}Lys zu integrieren, wurden dort Aminosäurelinker, bestehend aus Glycin oder Asparaginsäure und Glycin, eingebracht.

Ergebnisse

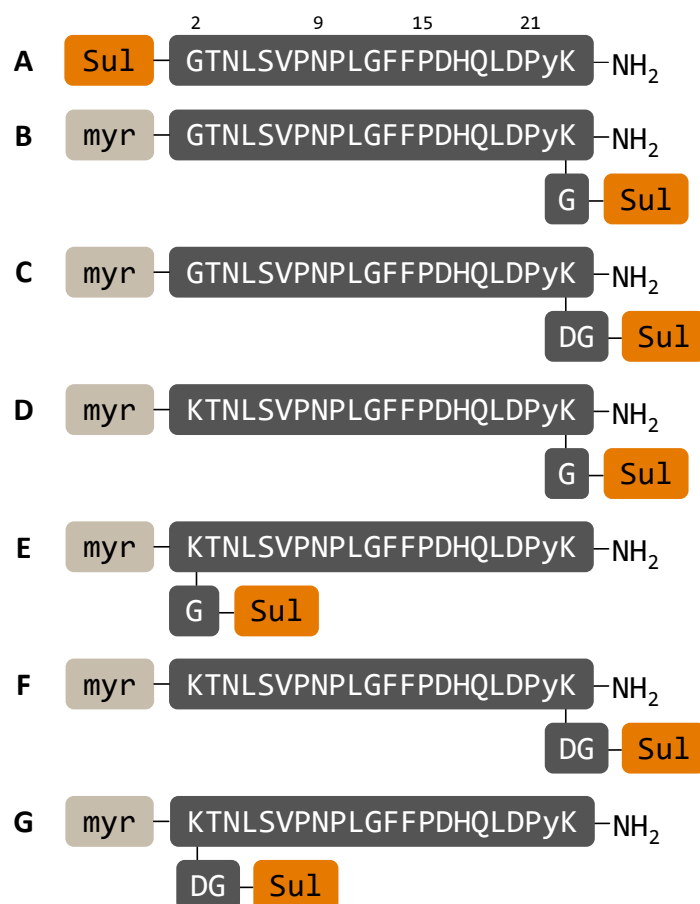


Abbildung 27: Darstellung der synthetisierten Peptid-Sulfasalazin-Hybride. „myr“ zeigt an, dass die Peptide am N-Terminus mit Myristinsäure konjugiert wurden, „Sul“ zeigt an, dass die Peptide am entsprechenden primären Amin mit Sulfasalazin konjugiert wurden. Aufgrund des verwendeten Polymerharzes bestehen die Peptide am C-Terminus aus einem Amid, hier durch die Endung „-NH₂“ verdeutlicht.

Tabelle 23: Molekülmassen und massenspektrometrische Ergebnisse der Peptid-Sulfasalazin-Hybride. Durch die Kopplung mit Sulfasalazin erfahren die Peptide eine Massenzunahme von 380,4 g/mol.

Bezeichnung		Mittlere Molekülmasse	Berechnete Masse $z = 2, [M+2H]^{2+}$	Gemessene Masse $z = 2, [M+2H]^{2+}$
A	Sul-2-21yK	2835,093	1417,649	1418,637
B	myr-2-21yK(G-Sul)	3103,507	1551,763	1552,242
C	myr-2-21yK(DG-Sul)	3218,595	1609,276	1609,754
D	myr-K3-21yK(G-Sul)	3174,628	1587,3	1587,777
E	myr-K(G-Sul)3-21yK	3174,628	1587,3	1587,793
F	myr-K3-21yK(DG-Sul)	3289,716	1644,813	1645,332
G	myr-K(DG-Sul)3-21yK	3289,716	1644,813	1645,302

3.2.3 HDV-Infektionsinhibition in verschiedenen Infektionsmodellen

3.2.3.1 Anwendung und Optimierung verschiedener Infektionsmodelle

Um alle Substanzen aussagekräftig analysieren zu können, wurden verschiedene Zelllinien und Infektionsmodelle verwendet. Im Folgenden eine kurze Übersicht zur unterschiedlichen Infektivität bei verschiedenen Inkubationszeiten und Genomäquivalenten.

In der Infektion von HuH7-NTCP-Zellen mit 1 GEq/Zelle über Nacht konnte eine Infektionsrate von $4,32 \pm 0,25$ % festgestellt werden. Durch Auszählung der Zellkerne wurden im Mittel 2359 ± 140 Zellkerne pro Bild ermittelt, wovon 102 ± 14 Zellen HDAg-positiv markiert waren (**Abbildung 28 (A)**). Wenn die Virus-Inkubation verkürzt, die Genomäquivalente allerdings verdoppelt wurden, stieg die Infektionsrate deutlich an. Nach 2,5 Stunden zeigen $11,92 \pm 2,44$ % der HuH7-NTCP-Zellen eine HDAg-positive Färbung (**Abbildung 28 (B)**). Damit ist die Infektionsrate in diesem Infektionsmodell direkt vergleichbar mit dem unter 3.1.3 beschriebenen HepG2 A3-Infektionsmodell. Im Mittel wurden 2216 ± 130 Zellkerne pro Bild gezählt, davon 262 ± 54 HDAg-positive. Die Anzahl an infizierten Zellen stieg somit um mehr als das Zweifache an.

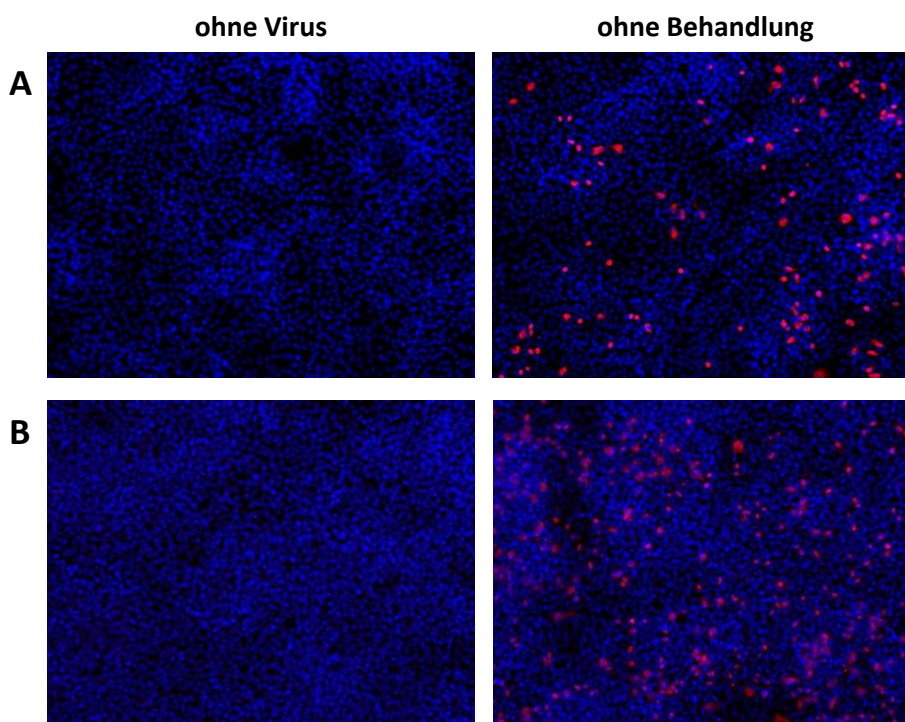


Abbildung 28: HDAg Immunfärbung HDV-infizierter HuH7-NTCP-Zellen. Die Zellen wurden mit HDV entweder über Nacht mit 1 GEq/Zelle (A) oder für 2,5 Stunden mit 2 GEq/Zelle (B) infiziert. Sechs Tage nach der Infektion wurden die Zellen fixiert, die Zellkerne mit *Hoechst* und mit Patientenserum (VUDA) angefärbt. Die linke Spalte zeigt die IF nicht infizierter Zellen, die rechte die von Zellen ohne Behandlung. Die Bilder wurden in 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Blau = Zellkerne, Rot = HDAg

Die Infektion über Nacht in HuH7-Zellen ist ein gutes und robustes Werkzeug um Substanzen in Hinblick auf ihre inhibitorische Aktivitäten einzuteilen. Es ist möglich durch den In-Cell ELISA zwischen unwirksamen, wirksamen und sehr gut wirksamen Gruppen zu unterscheiden.

Die höhere Infektionsrate von HepG2 A3-Zellen im Vergleich zu HuH7-NTCP-Zellen erlaubt eine feinere Unterteilung vor allem von hochpotenten Inhibitoren. Da mehr Zellen und dadurch mehr NTCP zur Verfügung stehen, erhöht sich die absolute Anzahl an infizierten Zellen. Eine Inhibition findet erst in

höheren Konzentrationen statt. Das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert sich und geringere Unterschiede können besser analysiert werden, da ein größerer Messbereich zur Verfügung steht.

3.2.3.2 In-Cell ELISA zur Bestimmung der Infektionsinhibition über Nacht in HuH7-NTCP-Zellen

In diesem Versuchsaufbau wurden konfluent gewachsene HuH7-NTCP-Zellen mit verschiedenen Substanzen vorbehandelt und anschließend unter fortgeführter Behandlung mit HDV über Nacht infiziert. Die Viruslast betrug 1 GEq/Zelle. Am sechsten Tag *post infectionem* erfolgte die Auswertung über einen In-Cell ELISA.

Infektionsinhibition von myr-2-48yK und myr-2-21yK

In mehreren Vorversuchen wurden die zu untersuchenden Konzentrationen der Peptide etabliert. Für myr-2-48yK wurde eine 9-stufige und für myr-2-21yK eine 15-stufige Verdünnungsreihe verwendet. Es fällt dabei auf, dass myr-2-48yK in der höchsten eingesetzten Konzentration von 500 nM eine Infektionsinhibition von über 95 % auf $2,65 \pm 0,78$ % erreicht, während myr-2-21yK in der höchsten Konzentration von 5000 nM eine Reduktion um ca. 90 % auf $9,25 \pm 6,26$ % erreicht (**Abbildung 29**).

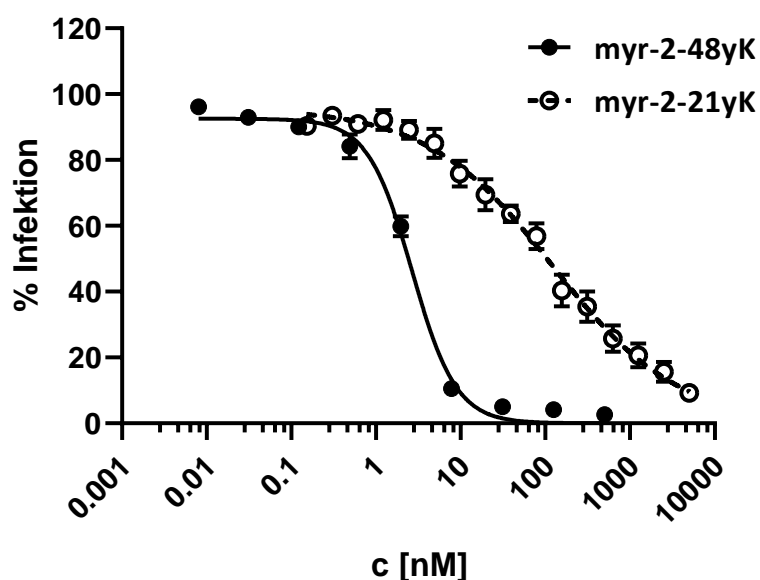


Abbildung 29: Reduktion der HDV-Infektion in HuH7-NTCP-Zellen bei Behandlung mit myr-2-48yK und myr-2-21yK über Nacht. Die Zellen wurden für 45 Minuten mit den Substanzen vorbehandelt und anschließend über Nacht mit den Substanzen und HDV ko-inkubiert (1 GEq/Zelle). Sechs Tage nach der Infektion wurde ein In-Cell ELISA durchgeführt (n = 3). Die Infektionsinhibition wurde für die Peptide in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen bestimmt: myr-2-48yK von 8 pM – 500 nM; myr-2-21yK von 0,15 nM – 5000 nM.

Eine Berechnung von IC_{50} -Werten bezieht nicht allein Maximal- und Minimaleffekt in die Auswertung mit ein, sondern auch den Kurvenverlauf. Daraus lässt sich eine detailliertere Einschätzung der Hemmeffektivität ziehen. Ausschlaggebend ist hierbei auch das Bestimmtheitsmaß eben dieser Kurve; eine aussagekräftige Kurve liegt bei $R^2 \geq 0,8$ vor. Im Vergleich sind die IC_{50} -Werte statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$) voneinander verschieden (**Tabelle 24**).

Tabelle 24: Übersicht der IC₅₀-Werte von myr-2-48yK und myr-2-21yK in einer HDV-Infektion in HuH7-NTCP-Zellen über Nacht.

Bezeichnung	IC ₅₀ [nM]	unteres 95 % KI	oberes 95 % KI	R ²
myr-2-48yK	2,66	2,35	3,01	0,99
myr-2-21yK	121,4	88,71	161,1	0,89

Infektionsinhibition von myr-2-21yK-Derivaten und myr-K3-21yK-Derivaten

Nachfolgend wurden drei Peptide, abgeleitet von myr-2-21yK, in acht Konzentrationen auf ihre Infektionsinhibition getestet. Zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit ist in **Abbildung 30** die 15-stufige Verdünnungsreihe des Ursprungspeptids myr-2-21yK und die dazugehörige Kurve aus **Abbildung 29** als graue Linie ohne Symbole dargestellt. In der höchsten eingesetzten Konzentration von 5 µM zeigen alle drei Peptide einen deutlichen Effekt. myr-2-21yK(G) und myr-2-21yK(DG) können die Infektion um mehr als 90 % senken ($7,56 \pm 0,31$ % bzw. $4,95 \pm 0,52$ %), während myr-K3-21yK eine Reduktion um mehr als 80 % erreicht ($16,94 \pm 1,39$ %). Die zugehörigen IC₅₀-Werte sind in **Tabelle 25** zusammengefasst.

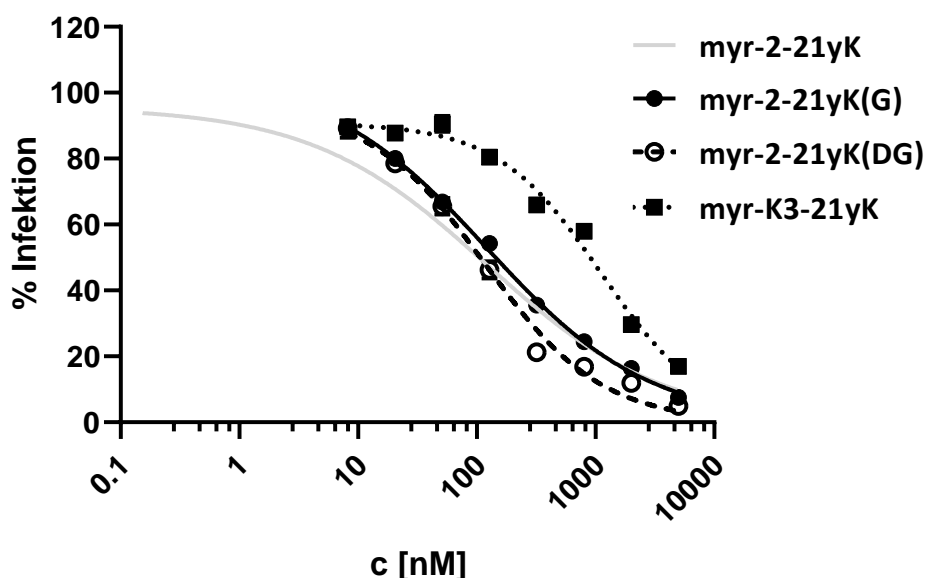


Abbildung 30: Reduktion der HDV-Infektion in HuH7-NTCP-Zellen bei Behandlung mit kurzen Peptiden über Nacht. Die Zellen wurden für 45 Minuten mit den Substanzen vorbehandelt und anschließend über Nacht mit den Substanzen und HDV ko-inkubiert (1 GEq/Zelle). Sechs Tage nach der Infektion wurde ein In-Cell ELISA durchgeführt (n = 3). Die Infektionsinhibition wurde für die Peptide im Konzentrationsbereich von 8,2 nM – 5000 nM bestimmt. Die hellgraue Linie ohne Symbole entspricht der Kurve von myr-2-21yK aus **Abbildung 29** und wurde zur besseren Übersicht eingefügt.

Tabelle 25: Übersicht der IC₅₀-Werte kurzer Peptide in einer HDV-Infektion in HuH7-NTCP-Zellen über Nacht.

Bezeichnung	IC ₅₀ [nM]	unteres 95 % KI	oberes 95 % KI	R ²
myr-2-21yK(G)	138,90	98,93	181,0	0,99
myr-2-21yK(DG)	94,11	58,54	130,0	0,99
myr-K3-21yK	1107	937,6	1296	0,98

Im Vergleich untereinander und zum Kontrollpeptid myr-2-21yK zeigt sich, dass einzig myr-K3-21yK eine signifikant schlechtere inhibitorische Kapazität hat ($p < 0,001$); die restlichen Vergleiche zeigen keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$; n.s.).

Infektionsinhibition von myr-2-21yK-Hybriden

Im gleichen Versuchsaufbau zeigen alle Hybride bestehend aus Arzneistoff und myr-2-21yK inhibitorische Aktivität ($n = 3$). Zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit ist in **Abbildung 31** die 15-stufige Verdünnungsreihe von myr-2-21yK und die dazugehörige Kurve aus **Abbildung 29** als graue Linie ohne Symbole dargestellt.

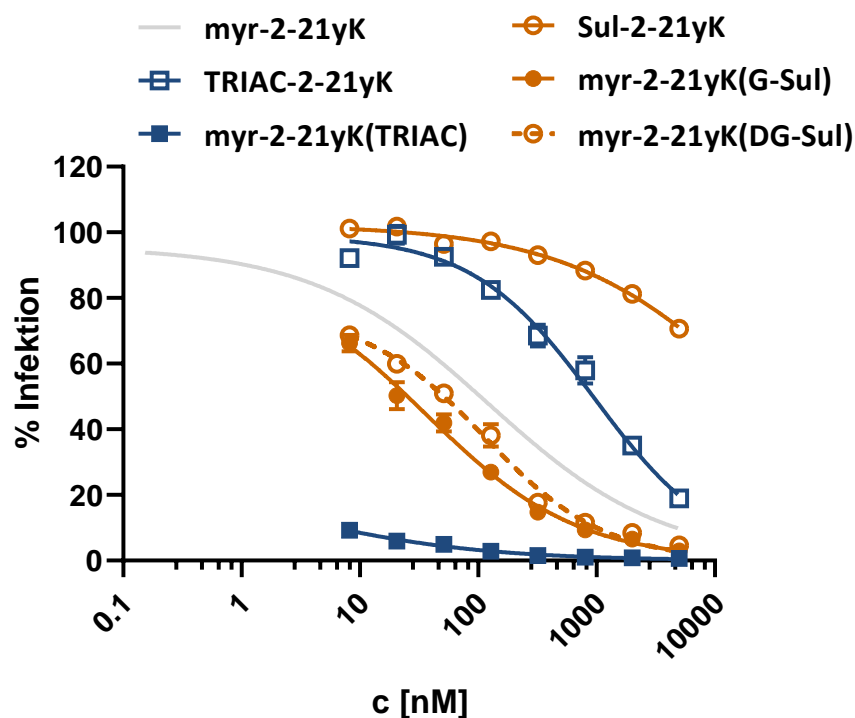


Abbildung 31: Reduktion der HDV-Infektion in HuH7-NTCP-Zellen bei Behandlung mit myr-2-21yK-Hybriden über Nacht. Die Zellen wurden für 45 Minuten mit den Substanzen vorbehandelt und anschließend über Nacht mit den Substanzen und HDV ko-inkubiert (1 GEq/Zelle). Sechs Tage nach der Infektion wurde ein In-Cell ELISA durchgeführt ($n = 3$). Die Infektionsinhibition wurde für die Analyten im Konzentrationsbereich von 8,2 nM – 5000 nM bestimmt. Die hellgraue Linie ohne Symbole entspricht der Kurve von myr-2-21yK aus **Abbildung 29** und wurde zur besseren Übersicht eingefügt.

Das Hybrid myr-2-21yK(TRIAC) verhindert die Infektion in der höchsten Konzentration nahezu vollständig ($0,66 \pm 0,05$ %). In der niedrigsten Konzentration bleibt die Infektion unter 10 % der Kontrolle ($9,26 \pm 0,87$ %). Aus der abgeleiteten Kurve kann kein IC_{50} -Wert errechnet werden.

myr-2-21yK(G-Sul) und myr-2-21yK(DG-Sul), die über die Konjugation von Sulfasalazin an Aminosäurelinker der Seitenkette des ^{23}Lys entstanden sind, inhibieren die Infektion in der höchsten Konzentration um mehr als 90 %. In der niedrigsten Konzentration zeigen sie noch immer deutliche Aktivität. Die Infektion erreicht für beide Substanzen vergleichbare Werte von $66,28 \pm 4,41$ % bzw. $68,64 \pm 1,24$ %.

Wurde die Myristinsäure am N-Terminus durch den entsprechenden Arzneistoff ersetzt, erreichte die Infektion in der höchsten Konzentration $18,91 \pm 1,56$ % bzw. $70,68 \pm 4,11$ % für TRIAC-2-21yK bzw. Sul-2-21yK. Wird die N-terminale Modifikation in der höchsten Konzentration mit der entsprechenden ^{23}Lys -Modifikation in der niedrigsten Konzentration verglichen, so weist die entsprechende N-terminale Änderung eine schlechtere Infektionsreduktion auf, als ihr Gegenpart (**Tabelle 26**).

Tabelle 26: Übersicht der IC₅₀-Werte von myr-2-21yK-Hybriden in einer HDV-Infektion in HuH7-NTCP-Zellen über Nacht.

Bezeichnung	IC ₅₀ [nM]	unteres 95 % KI	oberes 95 % KI	R ²
TRIAC-2-21yK	1042	826,3	1288	0,97
myr-2-21yK(TRIAC)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Sul-2-21yK	22,0*	14,3*	40,6*	0,94
myr-2-21yK(G-Sul)	36,39	7,39	75,23	0,98
myr-2-21yK(DG-Sul)	112,7	72,22	153,2	0,98

n.b. = nicht bestimmbar; * = µM

Im Vergleich zum Ursprungspeptid myr-2-21yK und zu den anderen getesteten Hybriden zeigen die am N-Terminus modifizierten Hybride signifikant schlechtere Infektionsinhibitionen ($p < 0,001$). Untereinander unterscheiden sich die Hybride in ihren IC₅₀-Werten hochsignifikant voneinander ($p < 0,001$), wobei das TRIAC Hybrid den besseren IC₅₀-Wert aufweist.

Das Hybrid myr-2-21yK(G-Sul) weist eine hochsignifikant bessere Infektionsinhibition als Sul-2-21yK auf ($p < 0,001$). Außerdem wurde ein signifikant niedrigerer IC₅₀-Wert als für myr-2-21yK(DG-Sul) berechnet ($p < 0,05$). Vergleiche mit myr-2-21yK(TRIAC) sind nicht möglich, da in allen Konzentrationen ein starke Inhibition der Infektion zu sehen ist.

Bei den am ²³Lys mit Sulfasalazin modifizierten Hybriden und myr-2-21yK konnte kein statistischer Unterschied festgestellt werden ($p > 0,05$; n.s.).

Infektionsinhibition von myr-K3-21yK-Hybriden

In **Abbildung 32** werden die IC₅₀-Kurven der unterschiedlichen Hybride von myr-K3-21yK gezeigt ($n = 3$). Zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit ist in **Abbildung 32** die 15-stufige Verdünnungsreihe und die dazugehörige Kurve aus **Abbildung 29** von myr-2-21yK als graue Linie ohne Symbole dargestellt.

Von dem Hybrid myr-K3-21yK(TRIAC) lässt sich anhand der Kurve kein IC₅₀-Wert ableiten, allerdings zeigt das Molekül eine ausgeprägte Reduktion der Infektion: In der niedrigsten Konzentration senkt es die Infektion auf $36,65 \pm 3,69$ %. myr-K(TRIAC)3-21yK inhibiert die Infektion in dieser Konzentration noch um mehr als 10 % (Infektion = $86,34 \pm 2,28$ %). Ebenso können myr-K3-21yK(G-Sul) und myr-K3-21yK(DG-Sul) in der niedrigsten Konzentration die infizierten Zellen um mehr als 10% reduzieren. Die über das ²Lys gekoppelten Sulfasalazin-Hybride erreichen in der niedrigsten Konzentration das Niveau der Infektionskontrolle. In der höchsten Konzentration können sie die Infektion aber auch effektiv verhindern: myr-K(G-Sul)3-21yK weist eine Infektionsinhibition von mehr als 95 % auf, während myr-K(DG-Sul)3-21yK nur knapp mehr als 80 % der Infektion verhindert.

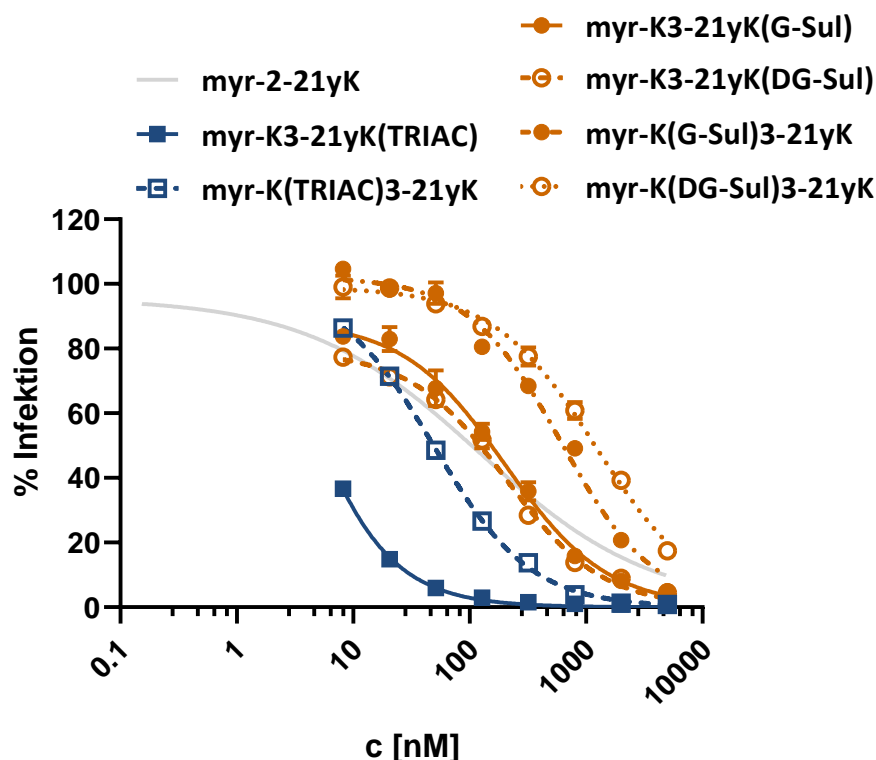


Abbildung 32: Reduktion der HDV-Infektion in HuH7-NTCP-Zellen bei Behandlung mit myr-K3-21yK-Hybriden über Nacht. Die Zellen wurden für 45 Minuten mit den Substanzen vorbehandelt und anschließend über Nacht mit den Substanzen und HDV ko-inkubiert (1 GEq/Zelle). Sechs Tage nach der Infektion wurde ein In-Cell ELISA durchgeführt (n = 3). Die Infektionsinhibition wurde für die Analyten im Konzentrationsbereich von 8,2 nM – 5000 nM bestimmt. Die hellgraue Linie ohne Symbole entspricht der Kurve von myr-2-21yK aus **Abbildung 29** und wurde zur besseren Übersicht eingefügt.

Werden die berechneten IC_{50} -Werte betrachtet, so liegen die Werte von myr-K3-21yK(G-Sul) und myr-K3-21yK(DG-Sul) ca. 4-fach höher als der von myr-K(TRIAC)3-21yK ($p < 0,001$). Die Kurven der beiden Sulfasalazin-Hybride liegen nahezu deckungsgleich und es gibt keine statistischen Differenz zwischen ihnen ($p > 0,05$; n.s.). Anders verhalten sich die am 2 Lys konjugierten Sulfasalazin-Hybride – im direkten Vergleich schneidet das Hybrid mit dem einfachen Glycinlinker statistisch hochsignifikant besser ab ($p < 0,001$).

Zwischen 2 Lys und 23 Lys gekoppelten Hybriden besteht ein hochsignifikanter Unterschied: alle 23 Lys-Hybride sind effizienter in der Infektionsinhibition ($p < 0,001$). Der TRIAC-Hybrid mit Kopplungsstelle am 2 Lys hat einen hochsignifikant niedrigeren IC_{50} -Wert als alle Sulfasalazin-Derivate in diesem Versuch ($p < 0,001$), ein Vergleich mit dem 23 Lys ist hier nicht möglich (**Tabelle 27**).

Tabelle 27: Übersicht der IC_{50} -Werte von myr-K3-21yK-Hybriden in einer HDV-Infektion in HuH7-NTCP-Zellen über Nacht.

Bezeichnung	IC_{50} [nM]	unteres 95 % KI	oberes 95 % KI	R^2
myr-K3-21yK(TRIAC)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
myr-K(TRIAC)3-21yK	49,48	42,05	56,76	0,99
myr-K3-21yK(G-Sul)	200,5	147,6	257,3	0,98
myr-K3-21yK(DG-Sul)	206,2	170,5	243,1	0,99
myr-K(G-Sul)3-21yK	609,4	502,9	727,4	0,98
myr-K(DG-Sul)3-21yK	1220	1049	1408	0,99

n.b. = nicht bestimmbar

Im Vergleich zum Kontrollpeptid myr-2-21yK kann nur myr-K(TRIAC)3-21yK eine statistisch relevante Verbesserung zeigen ($p < 0,05$). Die ^{23}Lys gekoppelten Sulfasalazin-Hybride sind statistisch nicht zu unterscheiden ($p > 0,05$; n.s.) und die ^2Lys -Derivate verschlechtern ihre IC_{50} -Werte hochsignifikant ($p < 0,001$).

Infektionsinhibition von TRIAC und Sulfasalazin

Bei den kompetitiven Inhibitoren TRIAC und Sulfasalazin konnte unter diesen Bedingungen kein Effekt beobachtet werden, der nicht zytotoxischer Natur war (Maximalkonzentration = 10 μM). Da die Arzneistoffe in einem Infektionsmodell mit U2OS-NTCP Zellen eine HDV-Infektion inhibieren können, wurde das unter „Anwendung und Optimierung verschiedener Infektionsmodelle“ eingeführte verkürzte HuH7-NTCP Infektionsmodell etabliert und verwendet¹³².

Dafür wurden im Folgenden konfluente HuH7-NTCP-Zellen mit Analyten vorbehandelt. Danach erfolgte eine Behandlung unter einer Viruslast von 2 GEq/Zelle für 2,5 Stunden. Die Behandlung wurde ohne Virus über Nacht fortgesetzt, anschließend wurden die Zellen gewaschen und ein Mediumwechsel fand alle zwei Tage statt. Am sechsten Tag *post infectionem* wurde ein In-Cell ELISA durchgeführt.

3.2.3.3 In-Cell ELISA zur Bestimmung der Infektionsinhibition im modifizierten HuH7-NTCP Infektionsmodell

Infektionsinhibition von MyrB, myr-2-21yK, myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul)

Die Peptide MyrB und myr-2-21yK, sowie jeweils die Hybride mit der besten Wirkung (myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul)), wurden in den folgenden Versuchen näher charakterisiert. Die höchste Konzentration betrug 200 nM und die niedrigste weniger als 3 pM in sieben Verdünnungsschritten. Die dargestellten Kurven (**Abbildung 33**) entsprechen drei unabhängigen Versuchstagen mit zwei Messpunkten ($n = 3$; Duplikate).

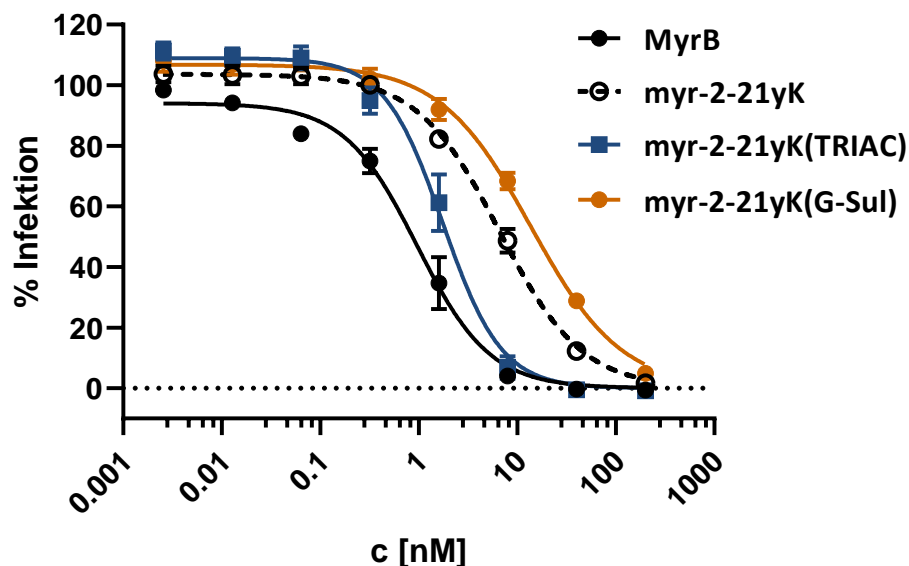


Abbildung 33: Reduktion der HDV-Infektion in HuH7-NTCP-Zellen über 2,5 Stunden. Die Zellen wurden für 45 Minuten mit den Substanzen vorbehandelt und anschließend über 2,5 Stunden mit den Substanzen und HDV ko-inkubiert (2 GEq/Zelle). Nach Waschschrinen wurde die Behandlung ohne Virus über Nacht fortgesetzt. Sechs Tage nach der Infektion wurde ein In-Cell ELISA durchgeführt ($n = 3$; Duplikate). Die Infektionsinhibition wurde für die Analyten im Konzentrationsbereich von 3 pM – 200 nM bestimmt.

Alle Substanzen können in der höchsten Konzentration die Infektion um mehr als 90 % inhibieren, wobei myr-2-21yK(G-Sul) mit $4,9 \pm 2,04$ % die schlechteste Inhibition zeigt. In der niedrigsten Konzentration erreichen alle Substanzen das Niveau der uninhibierten Viruskontrolle (Mittelwert der vier Substanzen = $105,36 \pm 8,29$ %).

Die aus den Kurven errechneten IC_{50} -Werte liegen alle im niedrigen nanomolaren Bereich (**Tabelle 28**). Die Spanne der 95 % Konfidenzintervalle ist bei allen vier Substanzen sehr eng gestreut und insgesamt werden hohe R^2 -Werte erreicht. MyrB hat die niedrigste halbmaximale Hemmkonzentration, gefolgt von myr-2-21yK(TRIAC), myr-2-21yK und zuletzt myr-2-21yK(G-Sul). Im Vergleich gibt es hochsignifikante Unterschiede zwischen allen Analyten ($p < 0,001$). Allein zwischen MyrB und myr-2-21yK(TRIAC) wird lediglich eine sehr signifikante Änderung festgestellt ($p < 0,01$).

Tabelle 28: Übersicht der IC_{50} -Werte in der 2,5 Stunden Infektion von HuH7-NTCP-Zellen.

Bezeichnung	IC_{50} [nM]	unteres 95 % KI	oberes 95 % KI	R^2
MyrB	0,96	0,72	1,26	0,96
myr-2-21yK	6,6	5,57	7,79	0,98
myr-2-21yK(TRIAC)	1,76	1,38	2,18	0,96
myr-2-21yK(G-Sul)	13,69	11,19	16,66	0,97

Obwohl sich die IC_{50} -Werte im niedrigen nanomolaren Bereich gruppieren, ist der am wenigsten potente Analyt um mehr als das Zehnfache weniger aktiv, als das potenteste Peptid.

Infektionsinhibition von TRIAC und Sulfasalazin

Die ungekoppelten Arzneistoffe TRIAC und Sulfasalazin wurden in demselben Versuchsaufbau untersucht. Sie zeigen beide eine deutliche Reduktion der HDV-Infektion über ihre Konzentrationsreihe mit sieben Verdünnungsschritten, die von 200 μ M bis 1,5 μ M reicht. Die in **Abbildung 34** dargestellten Kurven sind aus drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmungen erstellt worden ($n = 3$; Duplikate).

In der höchsten Konzentration können beide Substanzen die Infektion um mehr als 85 % reduzieren; TRIAC senkt die Infektion auf $8,47 \pm 5,75$ %, Sulfasalazin auf $13,23 \pm 1,45$ %. Bei beiden Molekülen wird in der niedrigsten Konzentration das Niveau der uninhibierten HDV-Kontrolle erreicht. Bei der Behandlung mit Sulfasalazin zeigt sich hier eine leichte Steigerung der Infektion auf $119,85 \pm 5,21$ %, bei TRIAC nicht ($105,95 \pm 3,54$ %).

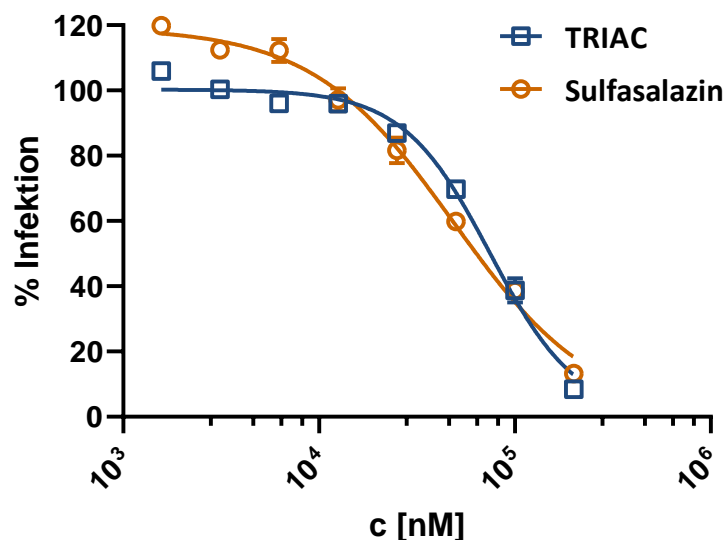


Abbildung 34: Reduktion der HDV-Infektion durch TRIAC und Sulfasalazin in HuH7-NTCP-Zellen über 2,5 Stunden. Die Zellen wurden für 45 Minuten mit den Substanzen vorbehandelt und anschließend über 2,5 Stunden mit den Substanzen und HDV ko-inkubiert (2 GEq/Zelle). Nach Waschschritten wurde die Behandlung ohne Virus über Nacht fortgesetzt. Sechs Tage nach der Infektion wurde ein In-Cell ELISA durchgeführt (n = 3; Duplikate). Die Infektionsinhibition wurde für die Analyten im Konzentrationsbereich von 1,6 µM – 200 µM bestimmt.

Tabelle 29: Übersicht der IC₅₀-Werte von TRIAC und Sulfasalazin in der 2,5 Stunden Infektion von HuH7-NTCP-Zellen.

Bezeichnung	IC ₅₀ [µM]	unteres 95 % KI	oberes 95 % KI	R ²
TRIAC	74,62	68,08	81,55	0,97
Sulfasalazin	48,52	42,25	55,09	0,97

Die errechneten IC₅₀-Werte liegen mit 74,62 µM und 48,52 µM für TRIAC bzw. Sulfasalazin im zweistelligen mikromolaren Bereich (**Tabelle 29**). Ein statistischer Vergleich zwischen den beiden Werten ergibt einen hochsignifikanten Unterschied (p < 0,001), wobei beachtet werden sollte, dass Sulfasalazin keine Reduktion der Infektion um mehr als 85 % erreicht.

3.2.3.4 In-Cell ELISA zur Bestimmung der Infektionsinhibition über Nacht in HepG2 A3-Zellen

Infektionsinhibition von myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul) mit Vergleich zu MyrB und myr-2-21yK

Wie unter „Anwendung und Optimierung verschiedener Infektionsmodelle“ erklärt, bietet das HepG2 A3-Infektionsmodell eine bessere Auflösung zwischen hochpotenten inhibitorischen Substanzen. Im Folgenden wurden die zwei potentesten Hybride myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul) auf ihre inhibitorische Aktivität bei einer HDV-Infektion in HepG2 A3-Zellen getestet. Die Analyten wurden in acht verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (n = 3; Duplikate). Zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit sind in der **Abbildung 35** die Kurven aus **Abbildung 17** von MyrB und myr-2-21yK als dunkel- bzw. hellgraue Linie ohne Symbole dargestellt.

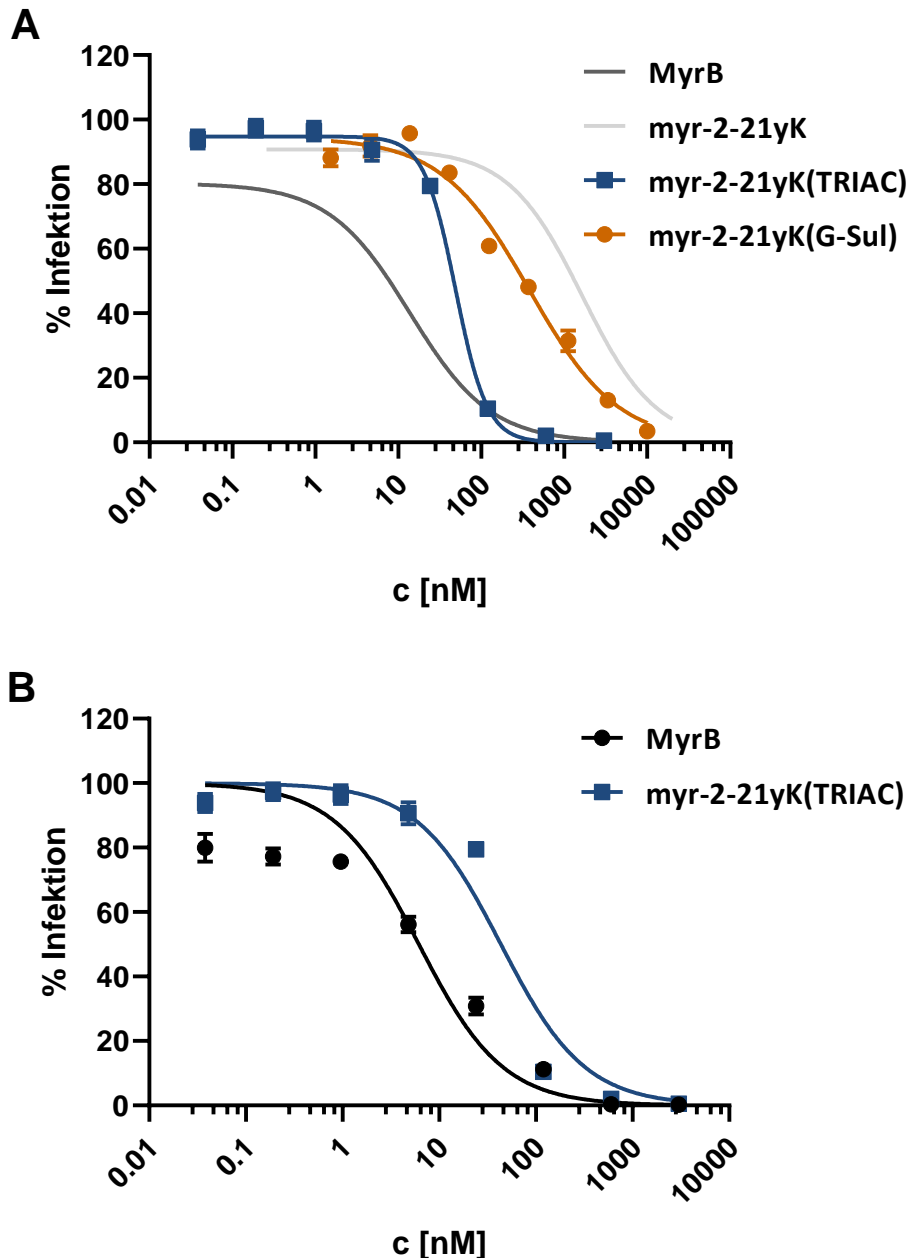


Abbildung 35: Reduktion der HDV-Infektion durch myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul) in HepG2 A3-Zellen. Die Zellen wurden für 45 Minuten mit den Substanzen vorbehandelt und anschließend über Nacht mit den Substanzen und HDV ko-inkubiert (1 GEq/Zelle). Sechs Tage nach der Infektion wurde ein In-Cell ELISA durchgeführt (n = 3; Duplikate). **(A)** Inhibitionsinhibition der Hybride. Die dunkelgraue Linie ohne Symbole entspricht der Kurve von MyrB, die hellgraue Linie ohne Symbole der Kurve von myr-2-21yK, beide entnommen aus **Abbildung 17**. **(B)** Vergleich der normalisierten und standardisierten Kurven von MyrB und myr-2-21yK(TRIAC).

Wie der **Abbildung 35 (A)** zu entnehmen ist, inhibieren die beiden über ^{23}Lys gekoppelten Derivate die HDV-Infektion konzentrationsabhängig. In der maximal eingesetzten Konzentration von $3\ \mu\text{M}$ kann myr-2-21yK(TRIAC) die Infektion zu über 99 % auf $0,57 \pm 0,35\%$ senken. myr-2-21yK(G-Sul) kann die Infektion erst in der maximalen Konzentration von $20\ \mu\text{M}$ um mehr als 90 % auf $3,42 \pm 0,49\%$ der Kontrolle reduzieren. Bei beiden Substanzen wird das Niveau der uninhibierten Infektionskontrolle in den niedrigeren Konzentrationen erreicht.

Der berechnete IC_{50} -Wert von myr-2-21yK(TRIAC) liegt mit $48,83\ \text{nM}$ um mehr als das 7,5-fache niedriger als der des Sulfasalazin-Hybrids myr-2-21yK(G-Sul) ($378,8\ \text{nM}$) (**Tabelle 30**). Im statistischen Vergleich zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$).

Tabelle 30: Übersicht der IC₅₀-Werte von myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul) in einer HDV-Infektion von HepG2 A3-Zellen.

Bezeichnung	IC ₅₀ [nM]	unteres 95 % KI	oberes 95 % KI	R ²
myr-2-21yK(TRIAC)	48,83	42,83	55,81	0,98
myr-2-21yK(G-Sul)	378,8	304,1	467,9	0,97

Werden die zwei Hybride mit dem Vorläuferpeptid myr-2-21yK verglichen, können für beide Substanzen eine hochsignifikante Verringerung des IC₅₀-Werts festgestellt werden ($p < 0,001$). Der Vergleich mit dem ungekürzten Peptid MyrB kann für myr-2-21yK(G-Sul) ohne Probleme angestellt werden und ergibt eine statistisch hochsignifikante Abweichung ($p < 0,001$), wobei MyrB der deutlich potentere Analyt ist (vgl. **Tabelle 12**).

Für myr-2-21yK(TRIAC) lässt sich dieser Vergleich nicht ohne weiteres in *PRISM 8.0.1* durchführen: Die Steigung sowie die Maximal- und Minimalwerte der beiden Kurven sind zu unterschiedlich, als dass ein Vergleich der IC₅₀ mit den vorerst berechneten Kurven stattfinden kann. Erst, wenn eine normalisierte und standardisierte Dosis-Wirkungs-Kurve über die Messwerte gelegt wird, lassen sie sich miteinander vergleichen. Daraus ergibt sich ein statistischer Unterschied von hoher Signifikanz ($p < 0,001$), wobei die Kurve von MyrB ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,86$ und die Kurve des Hybrides ein $R^2 = 0,95$ aufweist (**Abbildung 35 (B)**).

Nicht dargestellt ist das ²³Lys gekoppelte TRIAC Hybrid, welches einen Alaninaustausch in der essentiellen Sequenz aufweist, myr-2-21yK(TRIAC)(11-15Ala). Die Substanz wurde als Kontrolle synthetisiert, um die peptidischen Einflüsse und die Einflüsse des gekoppelten Arzneistoffs besser gegeneinander einschätzen zu können. Im Infektionsmodell zeigt das Hybrid keine inhibitorische Aktivität und lässt im Mittel über alle Konzentrationen die Infektion in $100,93 \pm 16,85$ % der Zellen zu.

Infektionsinhibition von TRIAC und Sulfasalazin

Wie zuvor auf den HuH7-NTCP-Zellen, ist bei den HepG2 A3-Zellen in einer Infektion über Nacht mit 1 GEq/Zelle keine Aktivität der *small molecules* zu beobachten. In der höchsten eingesetzten Konzentration von 1 mM TRIAC konnten starke zytotoxische Effekte in der Mikroskopie beobachtet werden. In Konzentrationen ≤ 200 μ M traten keine derartigen Effekte mehr auf, allerdings auch keine inhibitorischen Aktivität.

3.2.4 [³H]-Taurocholat-Aufnahme-Assay

3.2.4.1 [³H]-Taurocholat-Aufnahme-Assay mit myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul)

Die funktionale Inhibition wurde bei den ausgewählten Hybriden myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul), sowie dem Kontrollhybrid myr-2-21yK(TRIAC)(11-15Ala), untersucht (**Abbildung 36**). Die ungehinderte Aufnahme erreichte in den folgenden Versuchen $752,35 \pm 81,92$ cpm.

Bei den Analyten ist in der niedrigsten Konzentration kein inhibitorischer Effekt mehr zu erkennen, bei einer gemittelten Aufnahme von $100,10 \pm 14,33$ % ($753,14 \pm 107,82$ cpm). Das Hepta-Alaninderivat myr-2-21yK(TRIAC)(11-15Ala) zeigt in der höchsten Konzentration kaum eine Verringerung der Substrataufnahme mit $97,92 \pm 18,37$ % der Kontrollzellen ($736,67 \pm 138,19$ cpm). Die Substanz kann nicht für eine IC₅₀ Berechnung herangezogen werden und es ist somit kein Vergleich mit anderen Stoffen möglich.

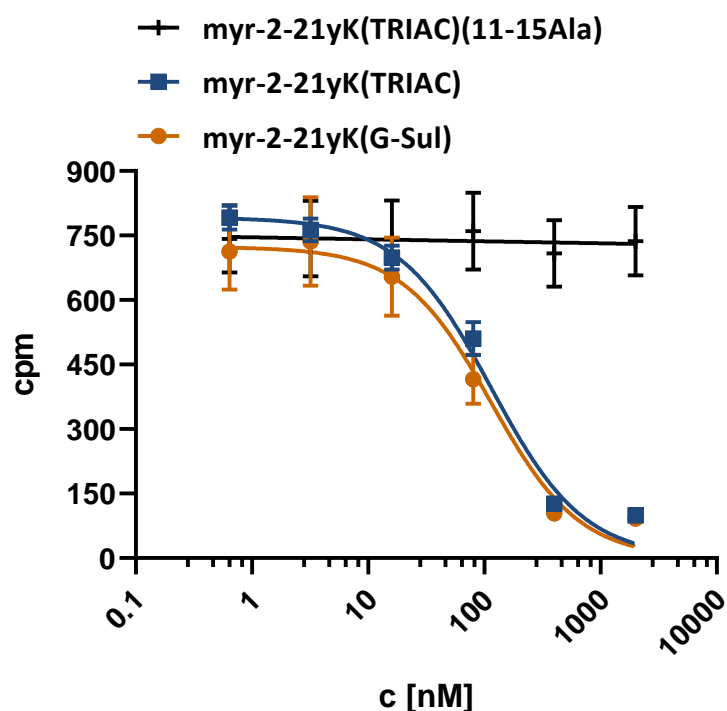


Abbildung 36: Reduktion der $[^3\text{H}]$ -TC-Aufnahme in HepG2 A3-Zellen bei Behandlung mit ausgewählten Hybriden. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei 37 °C mit den Substanzen vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten bei 37 °C mit den Substanzen und 10 nM $[^3\text{H}]$ -TC versetzt ($n = 3$). Der verwendete Konzentrationsbereich liegt von 0,6 nM – 2000 nM.

Sowohl myr-2-21yK(TRIAC) als auch myr-2-21yK(G-Sul) können die Aufnahme nicht um mehr als 90 % in der höchsten Konzentration inhibieren. In der niedrigsten Konzentration erreichen die beiden Analyten eine Aufnahme von $105 \pm 7,36$ % ($791,67 \pm 55,38$ cpm) respektive $94,73 \pm 20,5$ % ($712,67 \pm 154,21$ cpm) und für beide Analyten konnten die IC_{50} -Werte berechnet werden (**Tabelle 31**). Im direkten statistischen Vergleich ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Hybriden zu erkennen ($p > 0,05$; n.s.).

Tabelle 31: Übersicht der IC_{50} -Werte ausgewählter Hybride im $[^3\text{H}]$ -TC-Aufnahme-Assay in HepG2 A3-Zellen.

Bezeichnung	IC_{50} [nM]	unteres 95 % KI	oberes 95 % KI	R^2
myr-2-21yK(TRIAC)	125,6	93,77	164,60	0,96
myr-2-21yK(G-Sul)	100,00	43,97	198,10	0,87
myr-2-21yK(TRIAC)(11-15Ala)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

n.b. = nicht bestimmbar

Wird ein Vergleich mit MyrB angestellt, ist festzuhalten, dass zwischen den Hybriden und dem Peptid ein statistischer Unterschied besteht: MyrB ($\text{IC}_{50} = 44,57$ nM) inhibiert die physiologische Funktion signifikant stärker als myr-2-21yK(G-Sul) ($p < 0,05$) und hochsignifikant stärker als myr-2-21yK(TRIAC) ($p < 0,001$). Beim Vergleich mit dem Vorläuferpeptid myr-2-21yK ($\text{IC}_{50} = 73,12$ nM) ist eine geringere Differenz zu finden – der Unterschied zwischen myr-2-21yK(TRIAC) und dem Peptid ist signifikant ($p < 0,05$). Im Gegensatz zu myr-2-21yK(TRIAC) gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen myr-2-21yK und myr-2-21yK(G-Sul) ($p > 0,05$; n.s.).

3.2.4.2 [³H]-Taurocholat-Aufnahme-Assay mit TRIAC und Sulfasalazin

In dieser Versuchsreihe zeigen die Kontrollzellen eine ungehinderte Aufnahme des radioaktiv markierten Substrates von $878,00 \pm 43,38$ cpm ($n = 3$).

Die beiden *small molecules* wurden über fünf Konzentrationen von 1,2 mM bis 1,17 μ M getestet, mit dem Ergebnis, dass sie sich in ihrer inhibitorischen Effektivität nicht signifikant voneinander unterscheiden ($p > 0,05$; n.s.). Sulfasalazin weist gegenüber TRIAC mit 124,8 μ M zu 139,1 μ M einen niedrigeren IC_{50} -Wert auf.

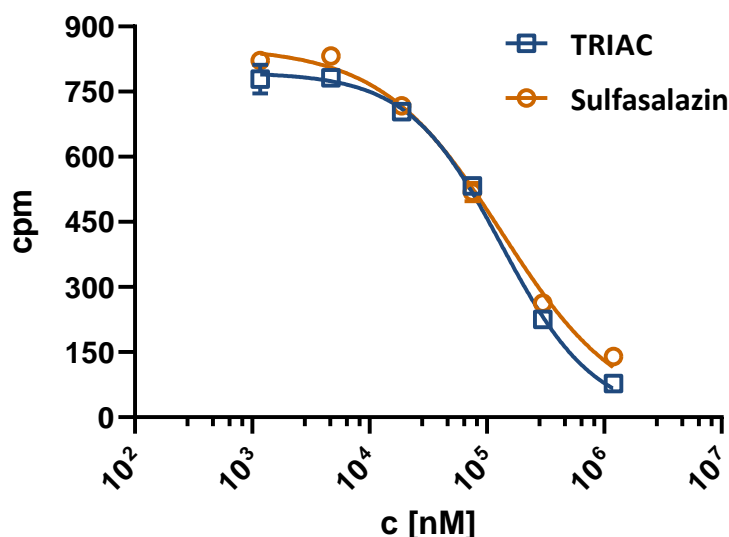


Abbildung 37: Reduktion der [³H]-TC-Aufnahme in HepG2 A3-Zellen bei Behandlung mit TRIAC und Sulfasalazin. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei 37 °C mit den Substanzen vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten bei 37 °C mit den Substanzen und 10 nM [³H]-TC versetzt ($n = 3$). Der verwendete Konzentrationsbereich liegt von 1,2 μ M – 1200 μ M.

Trotz der weniger effektiven Inhibition kann bei TRIAC in der höchsten eingesetzten Konzentration eine stärkere Hemmung um ca. 90 % auf $8,88 \pm 1,8$ % ($78 \pm 15,76$ cpm) beobachtet werden, während Sulfasalazin ca. 85 % der Kontrolle inhibiert, auf $15,89 \pm 1,23$ % ($139,55 \pm 10,8$ cpm).

Tabelle 32: Übersicht der IC_{50} -Werte von TRIAC und Sulfasalazin im [³H]-TC-Aufnahme-Assay in HepG2 A3-Zellen.

Bezeichnung	IC_{50} [μ M]	unteres 95 % KI	oberes 95 % KI	R^2
TRIAC	139,1	120,6	159,7	0,99
Sulfasalazin	124,8	103,8	148,4	0,99

3.2.5 HBV-Infektionsinhibition in HepG2 A3-Zellen

Um die Vergleichbarkeit zwischen einer HBV-Infektion und einer HDV-Infektion zu gewährleisten, wurden verschiedene Substanzen im HBV-Infektionsmodell in HepG2 A3-Zellen getestet. Nach einer Vorbehandlung wurden die konfluent gewachsenen Zellen über Nacht mit HBV und Analyten kokultiviert. Die Infektion wurde mit einer höheren Viruskonzentration als in den HDV-Infektionen durchgeführt (200 GEq/Zelle). Als Endpunkte dienten die Antigentiter nach sieben Tagen und, in einer unabhängigen zweiten Testung, nach zwölf Tagen. Die Substanzen wurden in Verdünnungsreihen von neun Konzentrationen getestet und die IC_{50} -Werte wurden berechnet.

3.2.5.1 Bestimmung des HBe-Antigentiters

Nach sieben Tagen

Bei der Auswertung der HBe-Antigentiter nach sieben Tagen erreichen die Infektionskontrollen im Mittel $590,78 \pm 77,73$ IU/mL.

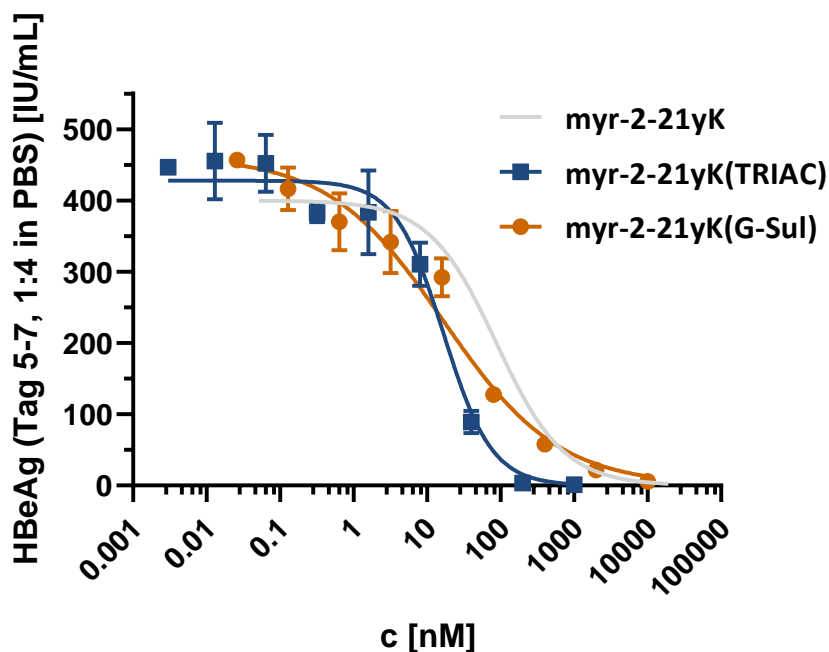


Abbildung 38: HBeAg-Sekretion bei Behandlung mit myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul) nach sieben Tagen in HepG2 A3-Zellen. Die Zellen wurden für 45 Minuten mit den Substanzen vorbehandelt und anschließend über Nacht mit den Substanzen und HBV ko-inkubiert (200 GEq/Zelle). Der HBeAg-Titer aus dem Überstand von Tag 5-7 nach der Infektion wurde per ELISA bestimmt (n = 1; Duplikate). Das Ergebnis ist in der ursprünglichen Verdünnung des Überstands (1:4) angegeben. Die hellgraue Linie ohne Symbole entspricht der Kurve von myr-2-21yK aus **Abbildung 21** und wurde zur besseren Übersicht eingefügt.

myr-2-21yK(TRIAC) senkt in der maximalen Konzentration von $1 \mu\text{M}$ den Titer auf $0,97 \pm 0,12$ IU/mL, myr-2-21yK(G-Sul) in der Höchstkonzentration von $10 \mu\text{M}$ auf $5,87 \pm 0,74$ IU/mL (**Abbildung 38**). Wird die Effektivität prozentual zur Kontrolle betrachtet, lässt sich erkennen, dass beide Substanzen die Antigenkonzentration auf ca. 1 % senken können: myr-2-21yK(TRIAC) auf $0,16 \pm 0,02$ % und myr-2-21yK(G-Sul) auf $0,99 \pm 0,12$ %. In den niedrigsten Konzentrationen erreicht keine der Substanzen mehr als 80 % der Kontrollen.

Aus den Verdünnungsreihen lassen sich halbmaximale Hemmkonzentrationen berechnen, die einen Hinweis auf die Potenz der Substanzen geben, siehe **Tabelle 33**.

Tabelle 33: Übersicht der IC_{50} -Werte von myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul) in einer HBV-Infektion nach sieben Tagen in HepG2 A3-Zellen.

Bezeichnung	IC_{50} [nM]	unteres 95 % KI	oberes 95 % KI	R^2
myr-2-21yK(TRIAC)	14,83	8,91	23,29	0,96
myr-2-21yK(G-Sul)	29,29	13,53	52,93	0,97

Wird der IC_{50} -Wert von myr-2-21yK ($87,75$ nM) mit dem des TRIAC-Hybrids verglichen, so liegt der Wert des Peptids fast sechsfach höher und dreifach höher als der des Sulfasalazin-Hybrids.

Nach zwölf Tagen

Die Hybride myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul) wurden auch nach zwölf Tagen Kultivierung über Bestimmung des Antigentiters charakterisiert. Die Infektionskontrollen wiesen dabei bei einem mittleren Titer von $691,05 \pm 82,72$ IU/mL auf.

In der höchsten eingesetzten Konzentration von $1 \mu\text{M}$ erreicht myr-2-21yK(TRIAC) eine Inhibition der HBeAg-Sekretion von über 99,5 % der Kontrolle ($2,03 \pm 0,64$ IU/mL). Das Sulfasalazin-Hybrid myr-2-21yK(G-Sul) kann in der Maximalkonzentration von $10 \mu\text{M}$ den Antigentiter um ca. 98 % reduzieren ($9,39 \pm 3,08$ IU/mL) (**Abbildung 39**).

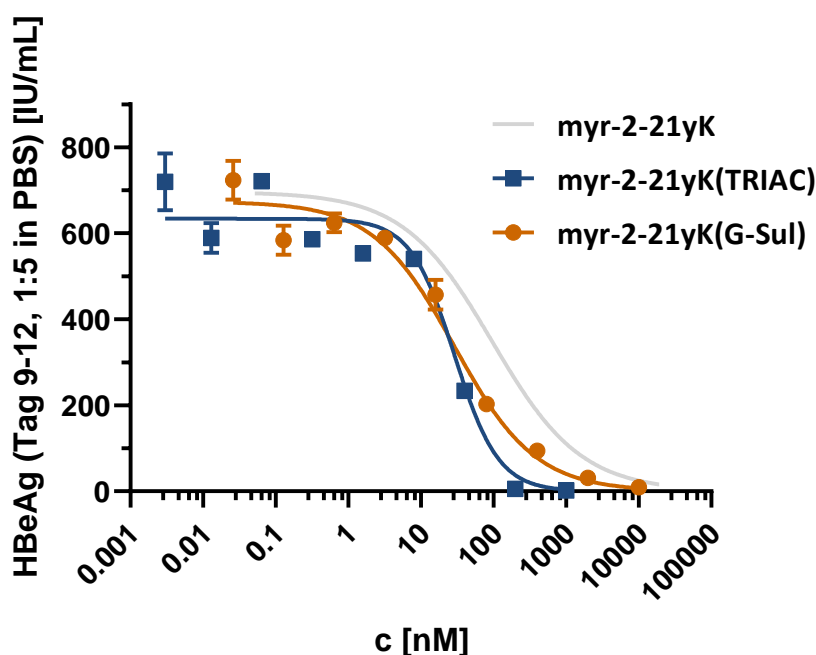


Abbildung 39: HBeAg-Sekretion bei Behandlung mit myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul) nach zwölf Tagen in HepG2 A3-Zellen. Die Zellen wurden für 45 Minuten mit den Substanzen vorbehandelt und anschließend über Nacht mit den Substanzen und HBV ko-inkubiert (200 GEq/Zelle). Der HBeAg-Titer aus dem Überstand von Tag 9-12 nach der Infektion wurde per ELISA bestimmt ($n = 1$; Duplikate). Das Ergebnis ist in der ursprünglichen Verdünnung des Überstands (1:5) angegeben. Die hellgraue Linie ohne Symbole entspricht der Kurve von myr-2-21yK aus **Abbildung 23** und wurde zur besseren Übersicht eingefügt.

In den niedrigsten Konzentrationen weisen beide Hybride mit ca. 105 % eine Sekretion des Antigens auf, das auf dem Niveau der Kontrolle liegt.

Tabelle 34: Übersicht der IC_{50} -Werte von myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul) in einer HBV-Infektion nach zwölf Tagen in HepG2 A3-Zellen.

Bezeichnung	IC_{50} [nM]	unteres 95 % KI	oberes 95 % KI	R^2
myr-2-21yK(TRIAC)	25,40	15,26	39,19	0,95
myr-2-21yK(G-Sul)	37,42	23,63	57,02	0,97

Die Potenzreihe ist hier genauso anzuordnen wie unter „Bestimmung des HBe-Antigentiters“. myr-2-21yK(TRIAC) als aktivste Substanz erzielt einen IC_{50} -Wert von 25,40 nM und wird in absteigender Aktivität gefolgt von dem Sulfasalazin-Hybrid (**Tabelle 34**) und dem myr-2-21yK Peptid (96,15 nM). myr-2-21yK(TRIAC) ist 3,8-fach potenter als sein Vorläuferpeptid myr-2-21yK und auch myr-2-21yK(G-Sul) kann eine Steigerung der Aktivität um ungefähr das 2,5-fache aufweisen.

3.2.6 Zytotoxizität in HuH7-NTCP-Zellen

Die sechs Substanzen MyrB, myr-2-21yK, myr-2-21yK(TRIAC), myr-2-21yK(G-Sul), sowie ungekoppeltes TRIAC und Sulfasalazin, wurden in HuH7-hNTCP Zellen zu ihrer Zytotoxizität untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein WST-1 Assay durchgeführt, dessen photometrische Auswertung Rückschlüsse auf die Integrität der Atmungskette der Zellen zulässt. Die Konzentrationen in diesem Versuch wurden so gewählt, dass die höchste getestete Konzentration ein Vielfaches der Maximalkonzentration ist, die in anderen Zellversuchen verwendet wurde, mindestens jedoch das Zweifache. Zwei Inkubationszeiten wurden analysiert, drei Stunden und 24 Stunden und da alle Stammlösungen der Analyten als Lösungsmittel reines DMSO enthielten, wurde eine weitere Verdünnungsreihe erstellt, welche die Toxizität von reinem DMSO in fünf Konzentrationen untersucht.

3.2.6.1 Zytotoxizität von DMSO

In **Abbildung 40** ist zu beobachten, dass nach dreistündiger Inkubation mit 5 % DMSO noch ungefähr 80 % der Zellen mit einer intakten Atmungskette detektiert werden ($81,39 \pm 8,69$ %). Definitionsgemäß liegt eine Zytotoxizität vor, wenn die Zellviabilität unter 85 % der Kontrollzellen sinkt. Nach 24 Stunden bei dieser Konzentration sind über 90 % der Zellen als nicht mehr gesund einzuordnen ($9,32 \pm 2,13$ %). Für die Inkubation über 24 Stunden lässt sich eine halbmaximale Hemmkonzentration ableiten, welche bei 2,65 % [2,26 %; 4,34 %] mit $R^2 > 0,96$ liegt.

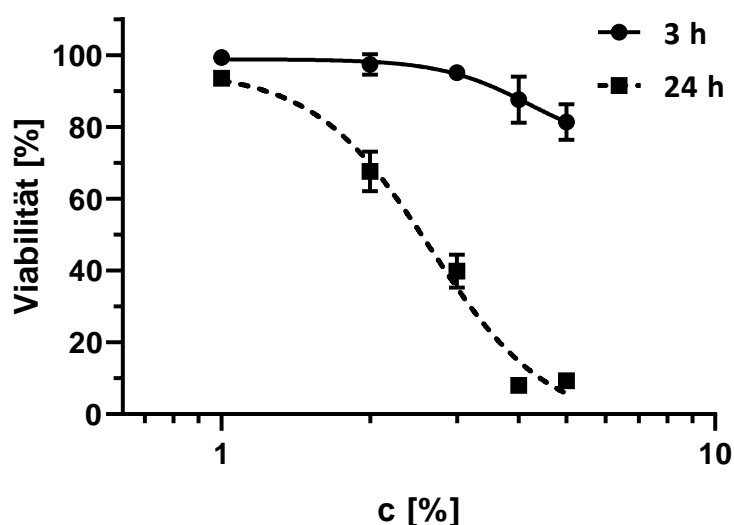


Abbildung 40: Zytotoxizität von DMSO in HuH7-NTCP-Zellen. DMSO wurde in fünf Konzentrationen nach zwei Inkubationszeiten im WST-1 Assay auf Zytotoxizität untersucht ($n = 3$).

3.2.6.2 Zytotoxizität von MyrB, myr-2-21yK, myr-2-21yK(TRIAC) und myr-2-21yK(G-Sul)

Abbildung 41 (A) stellt die Zellviabilität nach drei Stunden Inkubation mit DMSO, MyrB, myr-2-21yK, myr-2-21yK(TRIAC) oder myr-2-21yK(G-Sul) dar: Keiner der Analyten weist klare zytotoxische Effekte, d.h. eine Verringerung der Viabilität der Zellen unter 85 % der Kontrollen, auf. Zwischen den Substanzen gibt es keinerlei statistische Unterschiede ($p > 0,05$; n.s.).

In **Abbildung 41 (B)** ist zu erkennen, dass mit der längeren Inkubation eine höhere Zytotoxizität einhergeht, auch bei gleichbleibender Konzentration. Während in der niedrigsten abgebildeten Konzentration nur geringe Unterschiede zu sehen sind, nimmt mit steigender Konzentration auch die

Toxizität zu. Keine der untersuchten Substanzen verschlechtert die Zellviabilität mehr, als die DMSO-Kontrolle; meist sind die Analyten signifikant weniger toxisch.

In der höchsten Konzentration weisen alle Verbindungen und die DMSO-Kontrolle nach 24 Stunden zytotoxische Effekte auf. Die Analyten beeinträchtigen die gesunden Zellen statistisch signifikant weniger als die DMSO-Kontrolle. Bei Inkubation mit 10 μM , entsprechend 2 % DMSO, kann beobachtet werden, dass die Testsubstanzen nicht mehr im klassischen Sinn zytotoxisch sind (Zellviabilität $\geq 85\%$). Für die Peptide und Hybride ist ab einer Konzentration von 5 μM , entsprechend 1 % DMSO, keine Verringerung der gesunden Zellen mehr festzustellen. Für reines DMSO ist in der Konzentration von 2 % noch immer ein klarer zytotoxischer Effekt mit $67,64 \pm 9,58\%$ gesunden Zellen zu sehen. Erst in der niedrigsten getesteten Konzentration von 1 % findet keine Reduzierung der Zellviabilität mehr statt. Die genauen prozentualen Werte und die vollständigen Verdünnungsreihen der Substanzen sind **Tabelle 35** und **Tabelle 36** zu entnehmen.

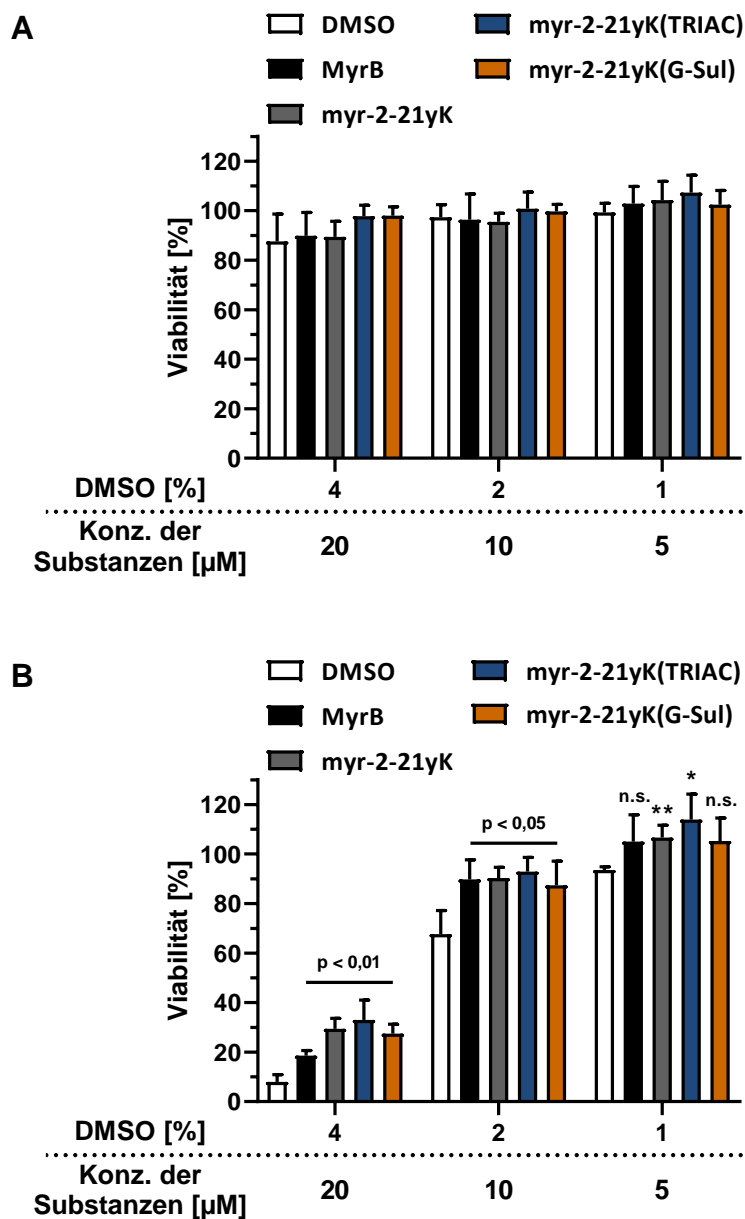


Abbildung 41: Zytotoxizität verschiedener Substanzen im Vergleich zu DMSO in HuH7-NTCP-Zellen. Die Zellen wurden entweder drei Stunden (A) oder 24 Stunden (B) mit den Substanzen inkubiert, danach wurde ein WST-1 Assay durchgeführt (n = 3; Duplikate). Das Testmedium enthielt die unter den Graphen angegebene Konzentration an DMSO in Prozent, sowie

die angegebene Stoffkonzentration in mikromolar. Die Angabe von statistischer Signifikanz ist der Vergleich von der entsprechenden Substanz zur DMSO-Kontrolle.

Tabelle 35: Übersicht der Zellviabilität nach drei Stunden.

3 h	Zellviabilität, Mittelwert [%]					
	c [μ M]	20	10	5	2,5	1,25
	DMSO [%]	4	2	1	0,5	0,25
MyrB		89,91	96,34	102,87	99,96	102,73
myr-2-21yK		89,47	95,51	104,29	100,21	110,07
myr-2-21yK(TRIAC)		97,82	100,85	107,27	106,53	109,75
myr-2-21yK(G-Sul)		97,99	99,76	102,42	101,59	109,00

Tabelle 36: Übersicht der Zellviabilität nach 24 Stunden.

24 h	Zellviabilität, Mittelwert [%]					
	c [μ M]	20	10	5	2,5	1,25
	DMSO [%]	4	2	1	0,5	0,25
MyrB		18,63	89,81	105,06	115,68	112,78
myr-2-21yK		29,43	90,35	106,61	111,22	109,09
myr-2-21yK(TRIAC)		33,04	92,91	113,86	115,35	109,74
myr-2-21yK(G-Sul)		27,45	87,41	105,28	105,43	101,61

3.2.6.3 Zytotoxizität von TRIAC und Sulfasalazin

In **Abbildung 42 (A)** sind die ungekoppelten Moleküle TRIAC und Sulfasalazin im gleichen Versuchsaufbau nach drei Stunden Inkubation gezeigt, die zugehörige DMSO-Konzentration ist jeweils oberhalb der Balken dargestellt und überschreitet 0,5 % nicht.

TRIAC reduziert in der höchsten eingesetzten Konzentration von 500 μ M die Zellviabilität hochsignifikant auf ungefähr 50 % ($46,76 \pm 14,22$ %) ($p < 0,001$). In der gleichen Konzentration hat Sulfasalazin hingegen keinen zytotoxischen Effekt ($100,31 \pm 5,91$ %). Medium mit 250 μ M TRIAC verringert die Anzahl an gesunden Zellen noch immer hochsignifikant bis an die Grenze der Zytotoxizität ($83,65 \pm 3,47$ %) ($p < 0,001$). Ab einer Konzentration von 125 μ M ist TRIAC keine Zytotoxizität mehr nachweisbar ($p > 0,05$; n.s.).

Werden die Substanzen in einer Inkubation über 24 Stunden untersucht (**Abbildung 42 (B)**), ist zu erkennen, dass Sulfasalazin auch hier in der höchsten Konzentration keinerlei negative Wirkung auf das Überleben der Zellen hat ($p > 0,05$; n.s.). TRIAC kann in dieser Versuchsreihe allerdings keine Zellviabilität > 90 % aufweisen und ist auch in der niedrigsten Konzentration mit $88,23 \pm 7,43$ % knapp an der Grenze zur Zytotoxizität. Im Vergleich zu Sulfasalazin zeigt TRIAC in der 24 Stunden Inkubation durchweg eine statistisch niedrigere Zellviabilität.

Die höchste getestete Konzentration für TRIAC und Sulfasalazin weist eine niedrigere DMSO-Konzentration auf (0,5 %), als die niedrigste, auf Zytotoxizität getestete, DMSO-Konzentration (1 %). Um zu untersuchen, ob es zytotoxische Effekte gibt, die über die Toxizität des reinen DMSO hinausgehen, wurde in **Abbildung 43** ein Vergleich zwischen den niedrigsten Konzentrationen angestellt.

Ergebnisse

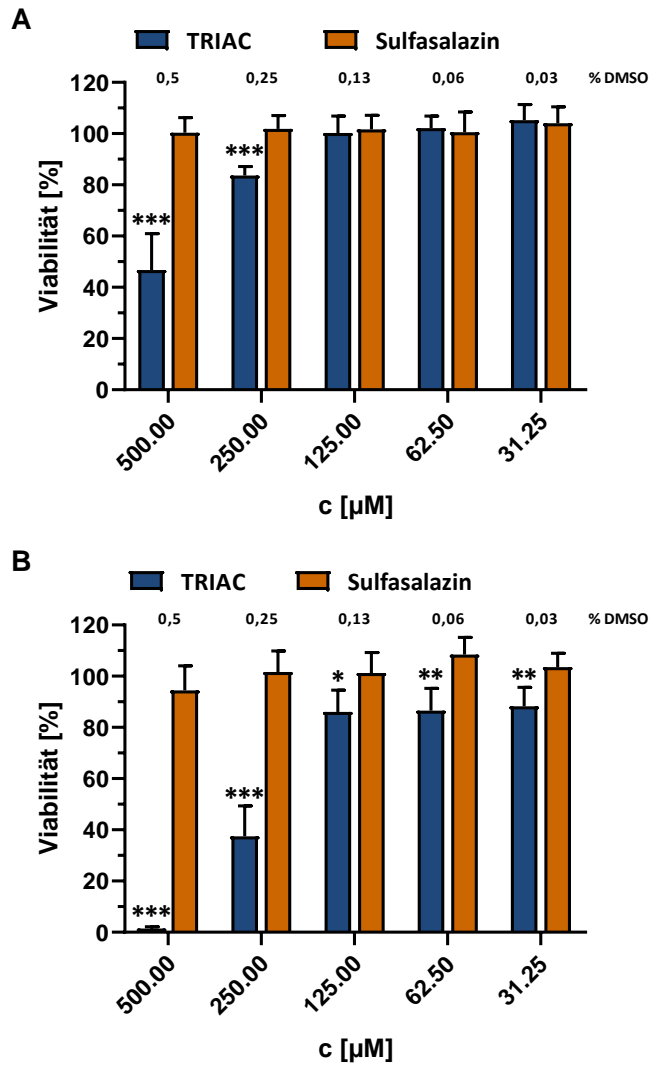


Abbildung 42: Zytotoxizität von TRIAC und Sulfasalazin in HuH7-NTCP-Zellen. Die Zellen wurden entweder drei Stunden (A) oder 24 Stunden (B) mit den Substanzen inkubiert, danach wurde ein WST-1 Assay durchgeführt (n = 3; Duplikate). Das Testmedium enthielt die über den Graphen angegebene Konzentration an DMSO in Prozent, sowie die angegebene Stoffkonzentration in mikromolar. Die Angabe von statistischer Signifikanz ist der Vergleich zwischen TRIAC und Sulfasalazin.

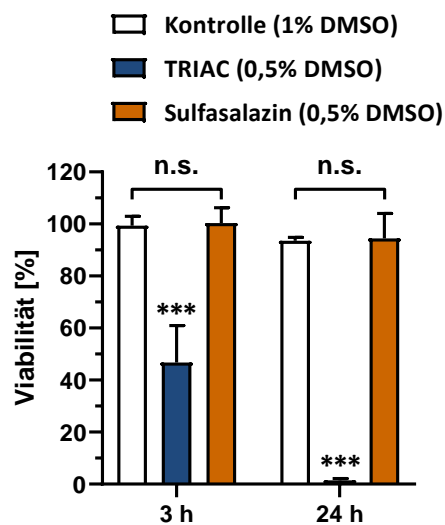


Abbildung 43: Vergleich der Zytotoxizität von DMSO, TRIAC und Sulfasalazin in HuH7-NTCP-Zellen. Medium mit TRIAC und Sulfasalazin in der höchsten Stoffkonzentration von 500 µM enthielt 0,5 % DMSO. Die niedrigste DMSO-Kontrolle enthielt 1 % DMSO.

Hierbei fällt auf, dass weder 1 % DMSO, noch 500 μM Sulfasalazin (entsprechend 0,5 % DMSO) nach 3 Stunden oder 24 Stunden die Zellviabilität verringern. Außerdem ist statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungen festzustellen. TRIAC zeigt eine ausgeprägte Zytotoxizität, sowohl nach 3 Stunden, wie auch nach 24 Stunden. In beiden Fällen weicht es hochsignifikant von den beiden anderen Behandlungen ab und weist damit eine Zytotoxizität auf, die unabhängig von der DMSO-Konzentration vorliegt und außerdem die des reinen DMSO übersteigt.

3.2.7 Szintigraphische Bildgebung im Mausmodell

3.2.7.1 Szintigraphische Bildgebung von ^{125}I -myr-2-48y, ^{125}I -myr-2-48yK(11-15Ala) und ^{125}I -myr-2-21y

Neben einer ausführlichen Charakterisierung *in vitro* ist die Bioverteilung und Anreicherung *in vivo* ausschlaggebend für die weitere Entwicklung einer vielversprechenden Substanz. Bei Peptiden und Analyten mit peptidischer Teilstruktur ist zumeist eine szintigraphische Bildgebung Mittel der Wahl. An das in die Sequenz eingebrachte D-Tyrosin wurde das Radionuklid ^{125}I mit der Chloramin-T Methode gebunden¹⁵³. Die dadurch markierten Verbindungen wurden weiblichen *SWISS* Mäusen per Injektion in die Schwanzvene appliziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Bilder mit einer γ -Kamera über zehn Minuten aufgenommen.

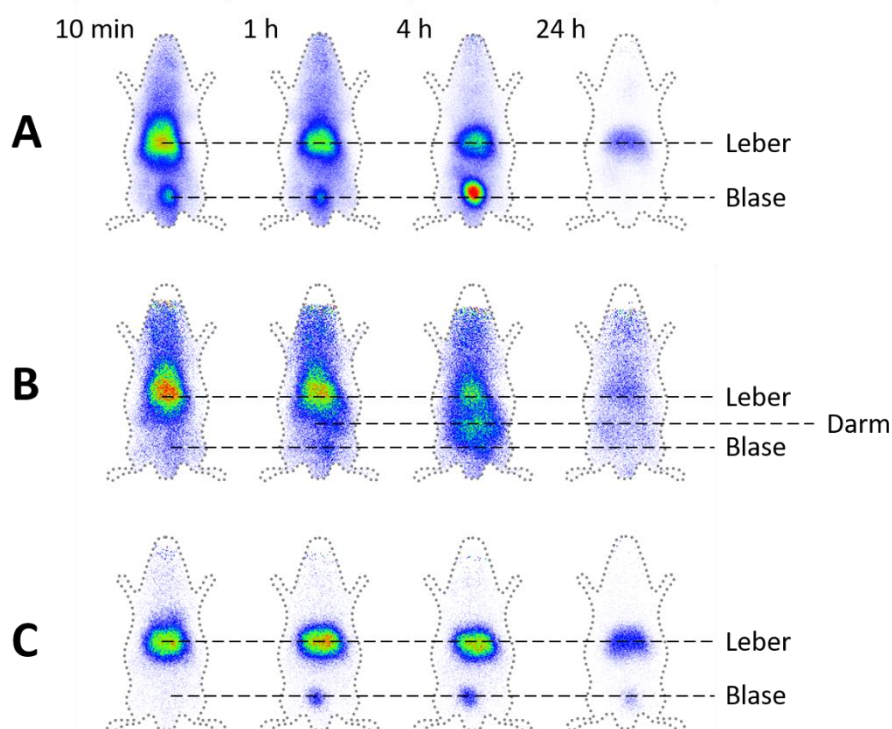


Abbildung 44: Szintigraphische Bilder der Bioverteilung in weiblichen *SWISS* Mäusen von ^{125}I -markierten Peptiden. Nach Injektion der markierten Substanzen in die Schwanzvenen der Mäuse wurden Bilder nach zehn Minuten, einer Stunde, vier Stunden und 24 Stunden mit der γ -Kamera aufgenommen. (A) Aufnahmen von ^{125}I -myr-2-48y; (B) Aufnahmen von ^{125}I -myr-2-48yK(11-15Ala); (C) Aufnahmen von ^{125}I -myr-2-21y. Die Radiomarkierungen und Aufnahmen wurden gemeinsam mit Dr. Philipp Uhl und Karin Leotta durchgeführt.

Anhand der szintigraphischen Bilder (**Abbildung 44**) ist zu erkennen, dass bei den getesteten Substanzen ^{125}I -myr-2-48y (A), ^{125}I -myr-2-48yK(11-15Ala) (B) und ^{125}I -myr-2-21y (C) schon innerhalb der ersten zehn Minuten nach Applikation eine erhöhte Anreicherung in der Leber stattfindet. ^{125}I -myr-2-48y und ^{125}I -myr-2-21y zeigen im Verlauf des Versuchs eine klare Spezifität zur Leber: Die

unspezifischen, diffusen Signale der markierten Peptide nehmen ab, die höchste Intensität ist fast durchgehend in der Leber. Nach 24 Stunden kann für beide Substanzen noch immer ein spezifisches Signal in der Leber gemessen werden. Während bei ^{125}I -myr-2-48y und ^{125}I -myr-2-21y zu den späteren Zeitpunkten eine deutliche Retention und Akkumulation in der Leber zu beobachten ist, verteilt sich das ^{125}I -Hepta-Alaninderivat (**B**) zunehmend. Die Intensität des Signals in der Leber nimmt über die Zeit ab, während die unspezifisch ans Blut gebundene sowie gastrointestinal lokalisierte Signalstärke gleichbleibend hoch ist. Vor allem nach einer Stunde ist zu erkennen, dass die Umverteilung von ^{125}I -myr-2-48yK(11-15Ala) in den Magen-Darm-Trakt beginnt, nach vier Stunden ist eine deutliche Abnahme der Leberintensität zu sehen. Am Ende der Messung, nach 24 Stunden, ist eine unspezifische, gleichmäßig im Körper verteilte Radioaktivität aufzufinden.

3.2.7.2 Szintigraphische Bildgebung von ^{125}I -myr-2-21y, ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC), ^{125}I -myr-2-21yK(G-Sul) und ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC)(11-15Ala)

Die vorherigen Versuche verdeutlichten, dass Umverteilungs- bzw. Ausscheidungsprozesse in nicht unerheblichem Maß nach dem vier-Stunden-Messpunkt stattfanden. In der folgenden Versuchsreihe wurden die in dieser Arbeit neu synthetisierten Hybride ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC), ^{125}I -myr-2-21yK(G-Sul) und ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC)(11-15Ala) untersucht. Während der Versuchsaufbau identisch ist, wurde ein zusätzlicher Messpunkt nach sechs Stunden hinzugefügt. Zudem wurde das Vorläuferpeptid ^{125}I -myr-2-21y ein weiteres Mal szintigraphisch aufgenommen.

Die Aufnahmen von ^{125}I -myr-2-21y, **Abbildung 45 (A)**, zeigen den gleichen Verlauf der *in vivo* Verteilung, wie in „Szintigraphische Bildgebung von ^{125}I -myr-2-48y, ^{125}I -myr-2-48yK(11-15Ala) und ^{125}I -myr-2-21y“ gezeigt und beschrieben. Darüber hinaus ist die maximale Intensität zu allen Zeitpunkten in der Leber zu finden, auch nach 24 Stunden noch mit einem eindeutigen Signal.

Abbildung 45 (B) bildet die Verteilung von ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC) ab. Bereits bei der ersten Aufnahme nach zehn Minuten ist ein Unterschied zum Vorläuferpeptid ^{125}I -myr-2-21y zu erkennen: Unterhalb der Leber zeichnet sich eine starke Anreicherung ab und im gesamten Verlauf scheint die Leber im Vergleich zu **Abbildung 45 (A)** nach unten vergrößert zu sein. Diese Beobachtung ist auf eine Aufnahme der Substanz in die Milz zurückzuführen. Zusätzlich ist unschwer zu erkennen, dass der Analyt nach spätestens vier Stunden in geringer Intensität im Darm verteilt wird, nach sechs Stunden nimmt das Signal zu. Am spätesten Messpunkt nach 24 Stunden ist das einzige klare Signal der Leber zuzuordnen, wobei auch diffuse Signale im Darm zu sehen sind. Die höchste Intensität liegt zu allen Zeitpunkten in der Leber.

Das Sulfasalazin-Hybrid ^{125}I -myr-2-21yK(G-Sul) wurde auch untersucht **Abbildung 45 (C)**. Es verhält sich insgesamt vergleichbar zu ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC), allerdings ohne Beteiligung der Milz. Auch hier ist nach vier Stunden eine anfangende Verteilung in den Darm zu sehen, die nach sechs Stunden den Höhepunkt erreicht. Nach 24 Stunden findet sich ein klares Signal in der Leber, aber ebenso ein deutliches Signal im Darmbereich. Das maximale Signal liegt zu allen Zeitpunkten in der Leber.

Ergebnisse

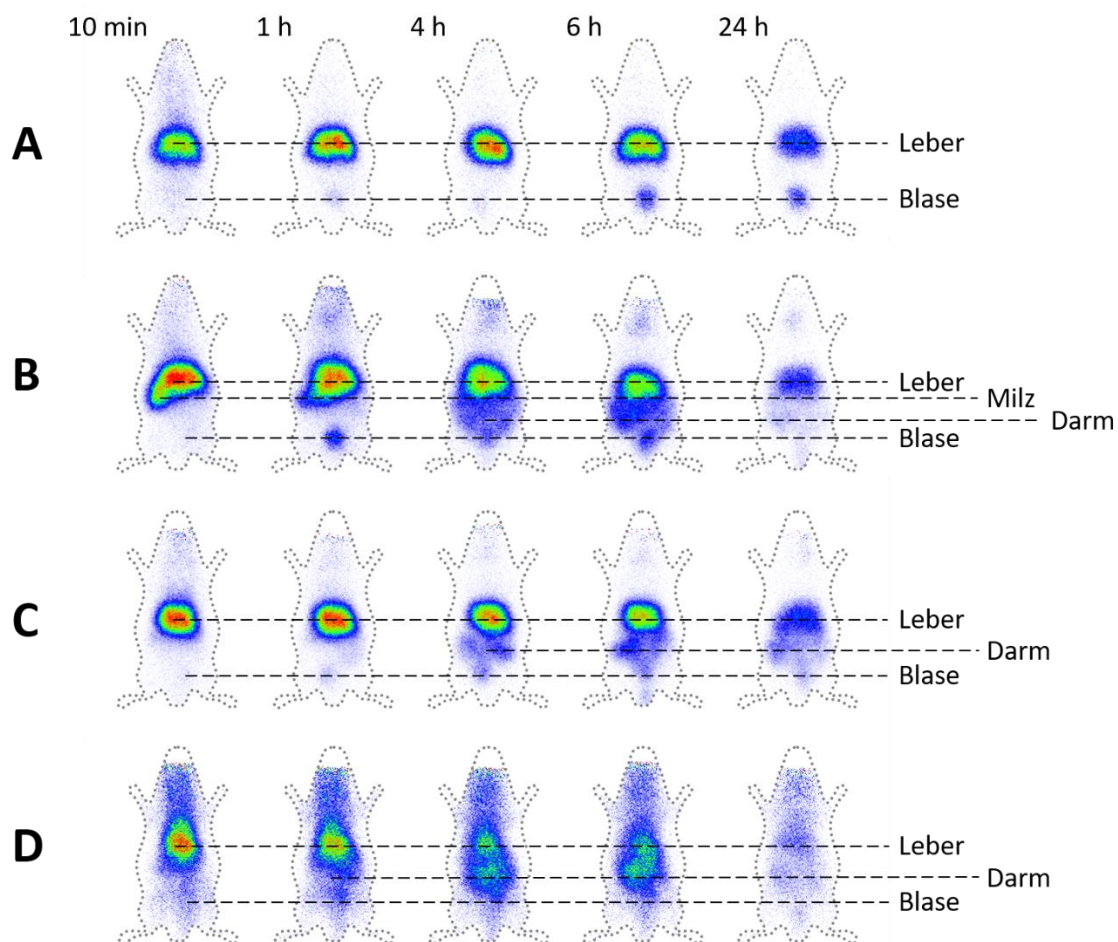


Abbildung 45: Szintigraphische Bilder der Bioverteilung in weiblichen SWISS Mäusen von ^{125}I -markierten Substanzen. Nach Injektion der markierten Substanzen in die Schwanzvenen der Mäuse wurden Bilder nach zehn Minuten, einer Stunde, vier Stunden, sechs Stunden und 24 Stunden mit der γ -Kamera aufgenommen. (A) Aufnahmen von ^{125}I -myr-2-21y; (B) Aufnahmen von ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC); (C) Aufnahmen von ^{125}I -myr-2-21yK(G-Sul); (D) Aufnahmen von ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC)(11-15Ala). Die Radiomarkierungen und Aufnahmen wurden gemeinsam mit Dr. Philipp Uhl und Karin Leotta durchgeführt.

Neben den wirksamen Analyten wurde auch die *in vitro* ineffektive Verbindung ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC)(11-15Ala) appliziert um eine Bioverteilung aufzunehmen (**Abbildung 45 (D)**). Hierbei ist zu beobachten, dass anfangs eine hohe Anreicherung im Bereich der Leber stattfindet, die allerdings in ihrer Form nicht allein der Leber zuzuschreiben ist. Die Lage und Form der abgebildeten Radioaktivität lässt darauf schließen, dass die Substanz neben der Leber auch im Herz vorzufinden ist. Zusätzlich zeichnet sich bei dieser Aufnahme ein stärkeres Hintergrundsignal ab, als bei den vorangegangenen Aufnahmen, was auf eine stärkere Verteilung im Blut schließen lässt. In den darauffolgenden Messpunkten ist klar zu erkennen, dass die Leber nicht mehr alleiniges Hauptanreicherungsort der Substanz ist: Die Anreicherung bleibt im Blut nahezu konstant über sechs Stunden, während sie in Leber und Herz abnimmt. Im Darm nimmt das Signal stetig zu, bis nach vier Stunden die gleiche Intensität im Darm wie in der Leber vorliegt. Dieses Gleichgewicht bleibt bis zum Ende der Messung nach 24 Stunden bestehen, wo nur noch geringe, unspezifisch angereicherte Radioaktivität vorliegt.

3.2.8 Bioverteilung und Leberkinetik von ^{125}I -myr-2-48y, ^{125}I -myr-2-21y und ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC) im Mausmodell

Zusätzlich zur bildgebenden Untersuchung wurde die Bioverteilung und Kinetik der Anreicherung von ^{125}I -myr-2-48y, ^{125}I -myr-2-21y und ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC) in der Leber analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Substanzen wie unter 3.2.7 beschrieben mit ^{125}I radioaktiv markiert und anschließend weiblichen SWISS Mäusen über die Schwanzvenen appliziert. Zu jedem Zeitpunkt wurden drei Mäuse pro Analyt getötet und ihre Organe zur Messung entnommen. Daraus wurde auf die Verteilung in die verschiedenen Organe, sowie die Kinetik der Anreicherung in der Leber geschlossen.

Da für ^{125}I -myr-2-48y und ^{125}I -myr-2-21y keine wesentlichen Umverteilungen zwischen vier und sechs Stunden beobachtet wurden (vgl. **Abbildung 44 (A)** und **(C)**), wurden diese Zeitpunkte für die beiden Peptide in diesem Versuch übernommen. Nach sechs Stunden fand bei ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC) eine vermehrte Umverteilung in den Darm statt (vgl. **Abbildung 45 (B)**), weswegen in dem folgenden Versuch für ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC) der sechs-Stunden-Wert erhoben wurde, statt dem vier-Stunden-Wert.

Zehn Minuten nach der Injektion wird ^{125}I -myr-2-48y (**Abbildung 46 (A)**) mit $92,71 \pm 2,37$ % ID/g fast ausschließlich in der Leber detektiert. Blut, Lunge und Milz liegen zu diesem Zeitpunkt bei jeweils ca. 5 % ID/g und die Einstichstelle am Schwanz zeigt mit $20,53 \pm 14,61$ % ID/g einen auffallend hohen Wert, der stark fehlerbehaftet ist. Eine Stunde später sinkt der Leberwert auf $78,06 \pm 2,86$ % ID/g und keines der anderen entnommenen Organe zeigt eine Anreicherung ≥ 5 % ID/g. Der vier-Stunden-Wert fällt auf, da eine höhere Leberanreicherung erreicht wird, als zum vorangegangenen Zeitpunkt: $86,40 \pm 16,64$ % ID/g finden sich in der Leber, wobei sich auch dieser Wert durch einen großen Fehler auszeichnet. Nach 24 Stunden verbleiben noch über 20 % ID/g in der Leber, kein anderes Organ kann 1 % ID/g erreichen.

Wird dieses Profil mit dem von ^{125}I -myr-2-21y verglichen (**Abbildung 46 (B)**), so fällt auf, dass eine spezifische Anreicherung in der Leber stattfindet, diese aber weniger effizient abläuft: Zum ersten Zeitpunkt befinden sich $31,96 \pm 13,76$ % ID/g in der Leber, ungefähr ein Drittel der Anreicherung von myr-2-48y. Nach einer Stunde verbleiben rund 13 % ID/g des Peptids in der Leber, was einem Verlust von über der Hälfte der zuvor gebundenen Menge entspricht. Zum nächsten Zeitpunkt nach vier Stunden hat sich die Substanzmenge ein weiteres Mal ungefähr halbiert: Es sind $5,30 \pm 3,96$ % ID/g detektierbar. Die restlichen Organe liegen allesamt unter 0,1 % ID/g. Die letzte Messung, 24 Stunden nach Applikation, zeigt einen niedrigen Leberwert von $1,09 \pm 0,16$ % ID/g.

Das Hybrid ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC) (**Abbildung 46 (C)**) beginnt die Anreicherung in der Leber auch weniger effizient als ^{125}I -myr-2-48y (**Abbildung 46 (A)**), zeigt aber zusätzlich eine fast gleich hohe, spezifische Anreicherung in der Milz: Zehn Minuten nach der Applikation befinden sich $38,20 \pm 8,81$ % ID/g in der Leber, während $36,10 \pm 4,65$ % ID/g in der Milz zu finden sind. Eine Stunde später beinhaltet die Leber noch $26,51 \pm 1,20$ % ID/g, d.h. die Retention im Lebergewebe beträgt nach einer Stunde ungefähr 70 % der vorher gemessenen Menge. Die Milz enthält mit $16,18 \pm 4,95$ % ID/g noch ca. 45 % der anfänglichen Substanzmenge. In den nächsten Stunden bleibt der Großteil des Hybrids im Lebergewebe bestehen. So ergibt die Messung der Leber nach sechs Stunden einen Wert von $22,32 \pm 3,48$ % ID/g, während die Messung der Milz mit $6,03 \pm 1,68$ % ID/g eine deutliche Abnahme zeigt. Nach 24 Stunden verbleiben rund 10 % ID/g in der Leber und 5 % ID/g in der Milz; in den restlichen Organen befinden sich $\geq 0,5$ % ID/g.

Ergebnisse

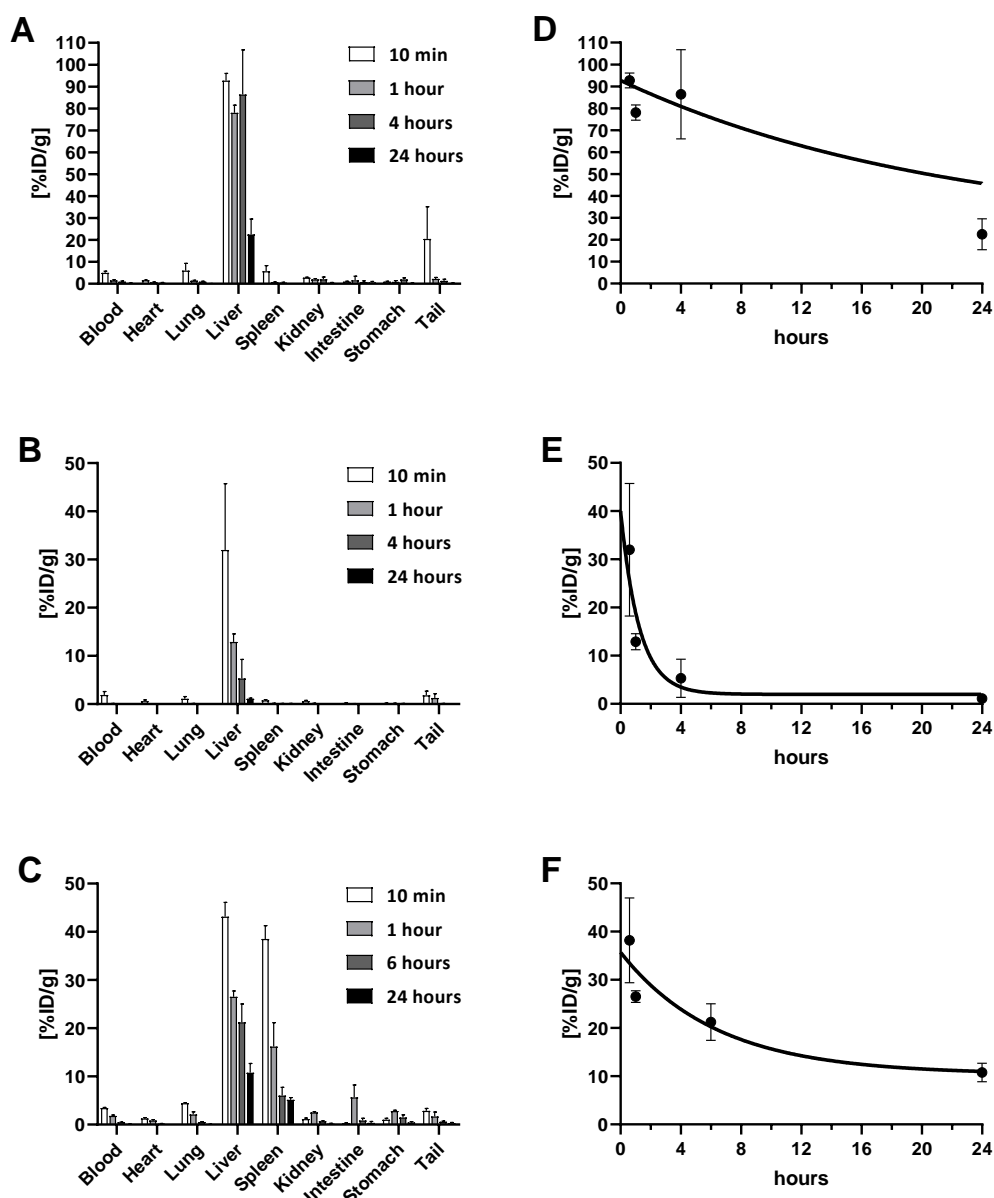


Abbildung 46: Bioverteilung und Leberkinetik von ^{125}I -myr-2-48y, ^{125}I -myr-2-21y und ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC) in weiblichen SWISS Mäusen. Nach Injektion der markierten Substanzen in die Schwanzvenen der Mäuse wurden die Organe zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen, gewogen und im γ -Counter vermessen ($n = 3$). (A) Organverteilung von ^{125}I -myr-2-48y; (B) Organverteilung von ^{125}I -myr-2-21y; (C) Organverteilung von ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC); (D) Leberkinetik von ^{125}I -myr-2-48y; (E) Leberkinetik von ^{125}I -myr-2-21y; (F) Leberkinetik von ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC). Die Radiomarkierung wurde gemeinsam mit Dr. Philipp Uhl durchgeführt.

Der Wirkort der Eintrittsinhibitoren ist die Leber und die Bioverteilung macht deutlich, dass sich alle drei getesteten Substanzen primär dort anreichern. Eine isolierte Betrachtung der Leberanreicherung über die Zeit kann Aufschluss über die biorelevante Halbwertszeit der Analyten geben.

Bei ^{125}I -myr-2-48y (**Abbildung 46 (D)**) lässt sich graphisch eine sehr lange Halbwertszeit von ca. 20 Stunden ermitteln. Wird die Halbwertszeit in *PRISM 8.0.1* als einphasige Elimination berechnet, ergibt sich $t_{1/2} = 15$ Stunden. Allerdings ist es mit diesem Programm nicht möglich, für die Kurve ein Bestimmtheitsmaß zu berechnen und die Kurvenanpassung wird insgesamt als nicht erfolgreich eingeordnet.

In (**Abbildung 46 (E)**) ist die Leberkinetik von ^{125}I -myr-2-21y abgebildet. Auffällig ist die starke Elimination aus der Leber innerhalb der ersten Stunden, bis nach vier Stunden ein Substanzresiduum in der Leber über lange Zeit verbleibt. Die graphische und berechnete Halbwertszeit überschneiden sich hier: Beide Methoden ergeben eine leberspezifische Halbwertszeit von knapp einer Stunde. Das Bestimmtheitsmaß der angepassten Kurve beträgt $R^2 = 0,68$.

Das Hybrid ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC) (**Abbildung 46 (F)**) weist die am besten angepasste Kurve auf ($R^2 = 0,74$) und eine deutlich verlängerte Halbwertszeit im Vergleich zum Vorläuferpeptid ^{125}I -myr-2-21y. Bei graphischer Auswertung kann eine Halbwertszeit von etwas mehr als acht Stunden abgelesen werden. Wird die errechnete Zeit betrachtet, so zeigt ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC) mit viereinhalb Stunden auch mit dieser Methode eine eindeutig erhöhte leberspezifische Halbwertszeit als ^{125}I -myr-2-21y.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich von den drei getesteten Substanzen ^{125}I -myr-2-48y am effektivsten am Wirkort, der Leber, anreichert und dort am langsamsten dissoziiert.

Das kürzere Peptid, ^{125}I -myr-2-21y, zeigt zwar auch eine leberspezifische Anreicherung, kann diese aber nicht so effektiv wie ^{125}I -myr-2-48y bewerkstelligen. Vor allem in der Eliminationskinetik der Leber fällt auf, dass sich ^{125}I -myr-2-21y zügig vom Wirkort löst und ausgeschieden wird.

^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC) verteilt sich im Gegensatz zu den beiden Peptiden zusätzlich in der Milz. Im Vergleich zu ^{125}I -myr-2-21y findet trotzdem eine höhere Anreicherung in der Leber statt, die auch von längerer Dauer ist. Wird die Elimination aus Leber und Milz betrachtet, so ist festzuhalten, dass der Analyt langsamer aus der Leber ausgeschieden wird, als aus der Milz. Somit verbleibt ^{125}I -myr-2-21yK(TRIAC) länger und in höherer Konzentration am Wirkort.

4 Diskussion

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde das Peptid myr-2-21yK im HBV/HDV-Infektionsmodell und sein Einfluss auf den Eintrittsrezeptor NTCP untersucht. Zudem wurde die Relevanz bestimmter Aminosäuren innerhalb der akzessorischen Domäne von MyrB ermittelt. Es war möglich, die Aminosäuren ³²Trp und ³³Asp als maßgeblich an der Wirksamkeit der akzessorischen Domäne beteiligt zu identifizieren. Anhand dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass die akzessorische Domäne mit der Substratbindetasche von NTCP interagiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden neuartige, hybride NTCP-Inhibitoren synthetisiert, um diese Hypothese zu verifizieren. Durch Tausch der akzessorischen Domäne mit den kompetitiven *small molecule* Inhibitoren TRIAC und Sulfasalazin konnte der spezifische inhibitorische Aktivitätsverlust abgeschwächt (Sulfasalazin) bzw. zum Großteil rückgängig gemacht werden (TRIAC). Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese und erlauben Rückschlüsse auf die Interaktion von MyrB sowie HBV/HDV mit NTCP.

4.1 myr-2-21yK interagiert spezifisch mit NTCP und verhindert den Eintritt von HBV/HDV in die Hepatozyten

Aus vorherigen Publikationen war bekannt, dass kürzere Varianten von MyrB eine geringere inhibitorische Aktivität zeigen, allerdings fehlte bisher eine detaillierte Charakterisierung dieser kurzen Peptide¹⁴¹⁻¹⁴³. In dieser Arbeit wurde das Peptid myr-2-21yK in zwei Hepatoma-Zelllinien *in vitro* charakterisiert, wobei die Bindung an NTCP, Inhibition von HBV/HDV-Infektionen und Interferenz mit dem physiologischen Gallensäuretransport untersucht wurden. Weiterhin wurde das Verhalten *in vivo* im Mausmodell analysiert.

4.1.1 myr-2-21yK zeigt eine spezifische Bindung an NTCP und agiert als Eintrittsinhibitor in HBV/HDV-Infektionen *in vitro*

Es ist bekannt, dass MyrB effektiv den viralen Eintritt von HBV/HDV in die Zelle durch eine hochspezifische Bindung an NTCP verhindert¹⁴¹⁻¹⁴³. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch nach Deletion der akzessorischen Domäne eine spezifische Interaktion mit NTCP eingegangen wird, die in direkter Konkurrenz mit der Bindung von MyrB steht (**Abbildung 14**). myr-2-21yK bindet dabei ungefähr halb so effektiv an NTCP wie MyrB (**Abbildung 15**). Die essentielle Sequenz ist ausschlaggebend für die spezifische Bindung beider Peptide: Ein Austausch der Aminosäuren 11-15 mit Alaninen führt zum Verlust der Spezifität und einhergehend jeder Wirkung. Diese Beobachtung ist im Einklang mit der Literatur^{141,142}. Die hochspezifische Zielrichtung gegen NTCP wird demnach nicht in bedeutendem Maße von der akzessorischen Domäne beeinflusst.

Im nächsten Schritt wurde eine Charakterisierung im HDV-Infektionsmodell (MOI = 1) in HuH7-NTCP-Zellen und HepG2 A3-Zellen durchgeführt. Es wurde ein drastischer Unterschied zwischen dem langen Peptid mit akzessorischer Domäne (MyrB) und dem verkürzten Peptid ohne akzessorische Domäne (myr-2-21yK) beobachtet, unabhängig von der verwendeten Zelllinie (**Abbildung 17, Abbildung 29**). MyrB zeigt eine hochsignifikant stärkere Infektionsinhibition; die Deletion der akzessorischen Domäne führt zu einer 45-fach niedrigeren Effektivität in HuH7-NTCP-Zellen und 120-fach niedrigeren Effektivität in HepG2 A3-Zellen. Noch ausgeprägter ist dieser Effekt in HBV-Infektionen: MyrB erreicht

eine ca. 600-fach bessere Inhibition als myr-2-21yK; die erhöhte Viruslast in den HBV-Infektionen (MOI = 200) verstärkt dabei die Wirkung der akzessorischen Domäne (**Abbildung 21, Abbildung 23**). Wird in diesem Zusammenhang der Einfluss der Peptide auf die physiologische Funktion von NTCP betrachtet, wird ersichtlich, dass myr-2-21yK weniger stark den Substrattransport inhibiert (**Abbildung 19**). Die Diskrepanz der Ergebnisse der Infektionsinhibitionen und des TC-Aufnahme-Assays zeigt, dass die akzessorische Domäne einen großen Einfluss auf die Prozesse Virusbindung und -eintritt nimmt. Dies kann auf eine intensivere Bindung des Peptids und einer damit verbundenen vollständigeren Blockade von NTCP, auch im physiologischen Kontext, zurückgeführt werden. Eine weiterführende Charakterisierung der akzessorischen Domäne und ihrer Wirkung in Infektionen und physiologischem Transport ist unter 4.2 diskutiert.

4.1.2 myr-2-21yK reichert sich *in vivo* spezifisch in der Leber an

Die essentielle Sequenz wurde *in vitro* als ausschlaggebend für die NTCP-Selektivität identifiziert, wobei die Deletion der akzessorischen Domäne die Bindung deutlich verschlechterte. Im komplexen *in vivo* Modell bestätigt sich diese Beobachtung: Obwohl ^{125}I -myr-2-21y eine um zwei Drittel geringere Anreicherung als ^{125}I -myr-2-48y in der Leber aufweist, ist diese Anreicherung hochspezifisch, da kein anderes Organ eine Kumulation zeigt (**Abbildung 46**).

Ebenso konnte verifiziert werden, dass die akzessorische Domäne entscheidend für eine effektive und langanhaltende Bindung an NTCP ist. ^{125}I -myr-2-21y kann von der Leber mit einer Halbwertszeit von ca. einer Stunde eliminiert werden, während ^{125}I -myr-2-48y eine 15-fach verlängerte Verweildauer besitzt.

Die Versuche legen nahe, dass die zielgerichtete Bindung an NTCP im Zusammenhang mit der essentiellen Sequenz steht, während die akzessorische Domäne einen Einfluss auf die Verweildauer des Peptids an der Hepatozyte nimmt. Bisher ist die Region der akzessorischen Domäne (Aminosäurenabschnitt 22-48) unzureichend im Kontext der Rezeptorbindung untersucht.

Im folgenden Abschnitt wird die Sequenz der akzessorischen Domäne näher analysiert und Regionen mit besonderer Aktivität identifiziert.

4.2 Konserviertes PDWD-Motiv in der akzessorischen Domäne trägt wesentlich zur Effektivität von MyrB bei

In dieser Arbeit wurde sowohl der größtmögliche Einfluss der akzessorischen Domäne analysiert – durch Deletion der Aminosäuren 22-48 (siehe Abschnitt 4.1) – als auch die preS1-Sequenzen von sechs HBV-Genotypen (A-F) auf zusammenhängende, konservierte Aminosäuren untersucht. Hierbei wurde das PDWD-Motiv der Aminosäuren 30-33 identifiziert und deren Rolle im (patho-)physiologischen Zusammenhang *in vitro* untersucht.

4.2.1 ^{32}Trp und ^{33}Asp sind maßgeblich an der Funktionalität der akzessorischen Domäne beteiligt

Es wurde der Fragestellung nachgegangen, welche Aminosäuren innerhalb der akzessorischen Domäne eine tragende Rolle für deren Funktionalität innehaben. Dabei wurden sowohl die Aminosäuren ^{32}Trp und ^{33}Asp als auch ein größerer Bereich der akzessorischen Domäne (Aminosäuren

32-37) durch Alanine ersetzt (**Abbildung 12**). Beide Varianten weisen einen hochsignifikanten Effektivitätsverlust im Vergleich zu MyrB in den Infektionsinhibitionsversuchen auf (**Abbildung 18 (A)**). Die akzessorische Domäne – und genauer das PDWD-Motiv – nimmt demnach eine wichtige Rolle in der Verhinderung des viralen Binde- und Eintrittsprozesses ein. Eine detaillierte Auswertung der Versuche ergibt, dass myr-2-48yK(32-33Ala) den Gallensäuretransport stärker inhibiert als myr-2-48yK(32-37Ala), auch wenn dieses Ergebnis statistisch nicht signifikant ist (**Abbildung 20 (A)**). Im HDV-Infektionsmodell kehrt sich diese Tendenz um: Hier zeigt myr-2-48yK(32-37Ala) eine stärkere, nicht signifikante Infektionsinhibition als das Vergleichspeptid, welches einen Wirkverlust um mehr als das 20-fache im Vergleich zu MyrB erfährt.

Die Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit der akzessorischen Domäne in der Interaktion zwischen Virus und Hepatozyte.

Zwei Aminosäuren des PDWD-Motivs konnten als maßgeblich zur Funktionalität beiträgend identifiziert werden: ³²Trp und ³³Asp. Während der Einfluss der akzessorischen Domäne nicht allein von diesen Aminosäuren ausgeht, führt ein Alanin-Austausch in diesen Positionen zu einem statistisch relevanten Wirkverlust in der Inhibition der physiologischen Transporteraktivität und der HDV-Infektion.

4.2.2 Addition wirtsfremder akzessorischer Domänen verbessert die Wirksamkeit von myr-2-21yK

Von aus Fledermäusen gewonnenen, nicht humanen Hepatitis-Viren können Peptide abgeleitet werden, die auch im humanen Zellsystem Infektionen mit HBV/HDV inhibieren⁸. Die Aminosäureabfolgen weisen hohe Übereinstimmungen mit der humanen Sequenz im essentiellen Bereich (9-15) auf, variieren aber stark im Bereich der akzessorischen Domäne (nach Position 21). Es wurden zwei Peptide synthetisiert, die bis Position 21 der humanen preS1-Konsensussequenz entsprechen und ab Position 21 dem analogen, nicht humanen Peptid (myr-2-21/TB; myr-2-21/HB; vgl. **Abbildung 12**). Beide Chimären inhibieren den physiologischen Gallensäuretransport auf dem gleichen Niveau wie myr-2-21yK, verbessern aber dessen inhibitorische Aktivität in Infektionen hochsignifikant (**Abbildung 18 (B)**, **Abbildung 20 (B)**).

Obwohl keine Aussage zu der Wichtigkeit der akzessorischen Domäne in der Wirtsspezifität der Hepadnaviren getroffen werden kann, zeigen die Ergebnisse, dass auch die akzessorischen Domänen wirtsfremder Oberflächenproteine die Bindung an NTCP begünstigen. Eine Aufklärung der Mechanismen, die das Virus hochspezifisch für seine Wirte macht, wäre ein wichtiger Schritt zum besseren Verständnis von HBV. Im Rahmen dieser Arbeit ist aufgefallen, dass beide von den Fledermäusen abgeleiteten Peptidsequenzen innerhalb der akzessorischen Domäne ein Asparaginsäure/Tryptophan-Motiv besitzen, ähnlich zu dem in der Konsensussequenz vorliegenden PDWD-Motiv. Da die nicht-humanen Peptide eine andere Sequenz zeigen und sich demnach räumlich anders darstellen, unterscheiden sich die Positionen dieses Motivs um einige Aminosäuren. So sind die Motive nicht in Position 30-33, sondern in Position 28-30 in der myr-2-21/TB-Chimäre (DWD) und in Position 36-38 in der myr-2-21/HB-Chimäre (WDD) (vgl. **Abbildung 12**). Es finden sich also, konserviert in verschiedenen humanen Genotypen und in der Sequenz von Hepatitisviren in Fledermäusen, eine Abfolge an Aminosäuren, welche offensichtlich von Bedeutung ist.

Das konservierte (P)DWD(D)-Motiv kann in verschiedenen Spezies gefunden werden und spielt entweder als strukturgebendes Element eine zentrale Rolle in der Sekundärstruktur des Peptids oder als Imitationssequenz einer Gallensäure. Die Position des Motivs unterscheidet sich allerdings um

einige Aminosäuren, getrennt von der essentiellen Sequenz durch eine Abfolge von Aminosäuren, denen bisher keine Funktionalität zugesprochen wird. Die Wirtsspezifität hängt eventuell eher von der Position der Imitationssequenz ab, als von der Aminosäureabfolge selbst. Möglicherweise ist die Spezifität aber auch in anderen, hier nicht identifizierten Regionen verankert, wie z.B. der Region zwischen essentieller Sequenz und akzessorischer Domäne. Die Wichtigkeit der akzessorischen Domäne in Homo- oder Heterodimerisierungsprozessen und in der Akquirierung von Ko-Faktoren wie EGFR bleibt weiterhin unbekannt^{58,125}.

Eine Aussage zur Selektion des Wirts kann somit nicht abschließend getroffen werden – es wird weitere Forschung benötigt, die sich intensiv mit den Aminosäureabschnitten nach der Position 22 des preS1-Peptids beschäftigt.

Die negativen Ladungen der Asparaginsäuren in Verbindung mit dem lipophilen, aromatischen Ringsystem des Tryptophans im (P)DWD(D)-Motiv erinnern an die Ladungsverteilung und Struktur einer Gallensäure. Dadurch wäre eine Interaktion des Peptids, neben der allosterischen Bindung durch die essentielle Sequenz, mit der Substratbindetasche des jeweiligen, artspezifischen Rezeptors möglich und es wird eine um ein Vielfaches erhöhte Aktivität erreicht. Diese Hypothese wird durch die Versuche mit myr-2-48yK(32-33Ala) und myr-2-48yK(32-37Ala) in 4.2.1 gestützt.

4.3 Synthese und Charakterisierung neuartiger, hybrider NTCP-Inhibitoren

Die aktuelle Literatur lenkt das Augenmerk auf neue Moleküle, die den Eintritt von HBV/HDV in die Zelle verhindern können^{130–132,149}. Bei vielen der Moleküle wurde gezeigt, dass die Inhibition durch kompetitive Bindung an der Substratbindetasche stattfindet, bei anderen ist ein anderer Bindemodus vorhanden^{128,130–132,149}. Um die unter 4.2.2 aufgestellte Hypothese, dass die akzessorische Domäne eine Interaktion mit der Substratbindetasche eingeht, weitergehend zu untersuchen, wurden neuartige, hybride NTCP-Inhibitoren synthetisiert. Diese bestehen aus dem Peptidteil myr-2-21yK oder myr-K3-21yK und zwei ausgewählten, von *Donkers et al.*¹³² identifizierten kompetitiven Inhibitoren, TRIAC und Sulfasalazin. Beide Moleküle fallen mit einem Molekulargewicht < 800 g/mol unter die Definition des *small molecule* und werden derzeit als Therapeutika im Menschen angewendet. Es war möglich, für beide Moleküle eine Synthesestrategie zu entwickeln und die hybriden NTCP-Inhibitoren *in vitro* und *in vivo* zu charakterisieren, wobei myr-2-21yK(TRIAC) vielversprechende Eigenschaften zeigte.

4.3.1 Screening zeigt Wirkunterschiede der Hybride je nach Kopplungsposition und –partner auf, einige Verbindungen zeigen starke Aktivität und unterstützen die Hypothese

Die aufgestellte Hypothese, dass das PDWD-Motiv der akzessorischen Domäne mit der Gallensalzbindetasche von NTCP eine Interaktion eingeht, wurde in der vorliegenden Arbeit durch Synthese und anschließendem Screening potentieller dualer Inhibitoren näher untersucht. Hierfür wurde ein kombinatorischer Ansatz gewählt, in dem der Einfluss der Myristinsäure, Unterschiede in der Position der Kopplungsstelle, sowie Differenzen der verwendeten Kopplungspartner (*small molecule*) betrachtet werden konnten. Außerdem wurde die Wirksamkeit der *small molecules* allein untersucht.

Zunächst wurden nur die später in den Kopplungen verwendeten Peptide auf HuH7-NTCP-Zellen in Infektionsinhibitionsversuchen getestet, welche sich durch die Position der späteren Kopplungsstelle des *small molecules* unterscheiden: Eine Reihe von Peptiden wurde synthetisiert, in welcher die Peptide am C-Terminus um ein ²³Lys erweitert wurden (2-21yK-Derivate, **Abbildung 24**) – ein potentielles NTCP-Substrat konnte in späteren Versuchen mit einigen Aminosäuren Abstand addiert

werden. Eine weitere Reihe von Peptiden wurde synthetisiert, in denen zusätzlich anstelle des ^2Gly ein ^2Lys eingebracht wurde (K3-21yK-Derivate, **Abbildung 25**) – diese Derivate entsprechen nicht der Imitations-Hypothese (siehe 4.2.2). In darauffolgenden Versuchen wurden TRIAC und Sulfasalazin an die eingefügten Lysine gekoppelt, inklusive des Austausches der N-terminalen Myristinsäure mit den *small molecules* und in verschiedenen Experimenten untersucht (vgl. **Abbildung 26, Abbildung 27**).

Hierbei wurde gezeigt, dass die Einbringung einer positiven Ladung durch Austausch von ^2Gly zu ^2Lys zu einer neunfachen Verschlechterung der inhibitorischen Aktivität im Vergleich zum Ausgangspeptid myr-2-21yK führte (**Abbildung 30**). Auch wenn diese Ladung durch Kopplung an ein *small molecule* wieder entfernt wurde, zeigten alle ^2Lys gekoppelten myr-K3-21yK-Derivate schlechtere inhibitorische Wirksamkeit als die entsprechenden ^{23}Lys gekoppelten myr-K3-21yK-Derivate (**Abbildung 32**).

Die Fähigkeit eine Infektion mit HDV zu verhindern ist demnach nicht nur sensibel auf Ladungsänderungen, sondern auch sterische Veränderungen im N-terminalen Bereich der Peptidsequenz. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Kopplung von TRIAC oder Sulfasalazin am ^{23}Lys die Wirksamkeit der Hybride stärker erhöht als die positive Ladung eines ^2Lys diese negativ beeinflusst. Diese Ergebnisse bestätigen die aufgestellte Hypothese in Hinsicht auf die Notwendigkeit einer Abstandssequenz zwischen akzessorischer Domäne und essentieller Sequenz.

Weiterhin wurden die Hybride getestet, welche aus der 2-21yK-Peptidreihe synthetisiert wurden: Alle Analyten konnten die Infektion besser inhibieren als die entsprechenden K3-21yK-Vertreter, was die Beeinflussung der Wirkung durch Ladungsveränderungen hervorhebt und einmal mehr die Wichtigkeit der Kopplungsposition unterstreicht (**Abbildung 31**).

Die Notwendigkeit einer Fettsäure am N-Terminus der Sequenz wurde bereits vorher bewiesen^{141,143}. Wurde die Myristinsäure gegen eines der *small molecules* ausgetauscht, so ergibt sich eine ausgeprägte Verschlechterung der Wirkung (**Abbildung 31**). TRIAC und Sulfasalazin ersetzen somit nicht die postulierte Funktion eines Membranankers, wenn sie gekoppelt werden, sondern fungieren vermutlich auch nach der Kopplung als Substrate für NTCP.

Wie von *Donkers et al.*¹³² gezeigt, besitzen TRIAC und Sulfasalazin gerichtete inhibitorische Wirksamkeit gegen eine Infektion mit HBV/HDV. In dem von ihnen angewandten Modell wurden NTCP-geklonte U2OS-Zellen verwendet; ein Osteosarkom-Zellmodell, das hier vor allem genutzt wurde, da es ein groß angelegtes Screening erlaubte. Eine Leberphysiologie kann dabei nicht abgebildet werden. Um einen inhibitorischen Effekt von TRIAC oder Sulfasalazin in dieser Arbeit in einem der physiologischen Leber nahen Zellsystem zeigen zu können, wurde ein zeitlich verkürztes Infektionsmodell mit HepG2 A3-Zellen etabliert, bei dem die Viruslast verdoppelt wurde. Erst in diesem Aufbau konnte eine spezifische Inhibition der HDV-Infektion nachgewiesen werden, welche nicht auf zytotoxische Effekte zurückzuführen ist.

Die IC_{50} -Werte liegen für beide Substanzen im mittleren, zweistelligen μM -Bereich (**Tabelle 31**). Die Versuche zeigen eine Beeinträchtigung der Transportfunktion ab einer ca. 1000-fach höheren Konzentration als die der Peptide oder Hybride. Es konnte gezeigt werden, dass die Testmodelle valide und die Ergebnisse in Einklang mit der Literatur sind¹³².

Die aus den Versuchen erlangten Beobachtungen können die Hypothese, dass die akzessorische Domäne mit dem konservierten PDWD-Motiv als Imitation einer Gallensäure fungiert, nicht widerlegen. Vielmehr zeigten die synthetisierten Verbindungen einen starken synergistischen Effekt, der durch die Kopplung zustande kommt. Dieser Effekt war positions- und substanzabhängig, wobei C-terminale Kopplungen und Kopplungen mit TRIAC generell eine bessere Wirkung zeigten (vgl. **Abbildung 31** und **Abbildung 32**). All diese Ergebnisse unterstützen die postulierte Abstands- und

Imitationshypothese. Die wirksamsten Vertreter der TRIAC und Sulfasalazin Kopplungen – myr-2-21yK(G-Sul) und myr-2-21yK(TRIAC) – wurden weiter untersucht.

4.3.2 myr-2-21yK(G-Sul) und myr-2-21yK(TRIAC) zeigen spezifische NTCP-Interaktion und inhibieren eine *in vitro* Infektion mit HBV/HDV

Aus dem unter 4.3.1 beschriebenen Screening gingen myr-2-21yK(G-Sul) und myr-2-21yK(TRIAC) als wirksamste Vertreter der getesteten Hybride heraus und wurden einer näheren Charakterisierung unterzogen. In dieser sollte die Effektivität in anderen Infektions- bzw. Zellsystemen, die Interaktion mit dem Eintrittsrezeptor NTCP, die Zytotoxizität und der Einfluss des peptidischen Anteils untersucht werden.

Beide Hybride wurden in unterschiedlichen, HepG2 A3 basierten Infektionsmodellen getestet. myr-2-21yK(TRIAC) konnte sowohl bei Inkubation über Nacht mit HDV (MOI = 1), als auch bei verkürzter Inkubationszeit (2,5 Stunden; MOI = 2) stets hochsignifikant stärker (33,5-fach und 3,5-fach) die Infektion inhibieren als das Vorläuferpeptid myr-2-21yK. myr-2-21yK(G-Sul) erreichte eine weniger starke, ca. vierfache Steigerung des IC₅₀-Werts in der Inkubation über Nacht, zeigte allerdings eine ca. zweifach schlechtere Wirksamkeit im verkürzten Infektionsmodell (**Abbildung 33, Abbildung 35**).

Diese unterschiedlichen Versuchsaufbauten geben erste Hinweise auf unterschiedliche Kinetiken zwischen den Hybriden untereinander, wie auch im Vergleich zu myr-2-21yK. Bei kürzerer Inkubation inhibierte myr-2-21yK(G-Sul) die Infektion schlechter als das Vorläuferpeptid myr-2-21yK, während es bei längerer Inkubation besser abschnitt. Dieser Effekt könnte auf eine langsamere Assoziation von myr-2-21yK(G-Sul) zu NTCP hindeuten, verbunden mit einer im längeren Versuch auftretenden schnelleren Dissoziation von myr-2-21yK von NTCP. Auch kann die im 2,5 Stunden-Modell durchgeführte Nachbehandlung zur Beeinflussung des Bindeverhaltens führen. myr-2-21yK(TRIAC) zeigte sich in beiden Modellen als sehr potent. Um ein besseres Verständnis über die Kinetik der hybriden Inhibitoren zu gewinnen, sollten zukünftig kompetitive Bindungsversuche mit MyrB durchgeführt werden. Außerdem sollte die Wirksamkeit in dem menschenähnlichsten Zellsystem, den PHH, untersucht werden.

Neben den Infektionen mit HDV wurden myr-2-21yK(G-Sul) und myr-2-21yK(TRIAC) auch in Infektionsinhibitionen mit HBV getestet. Beide Verbindungen zeigten eine gesteigerte Wirksamkeit im Vergleich zu myr-2-21yK, wobei wiederum myr-2-21yK(TRIAC) deutlich potenter war als myr-2-21yK(G-Sul) (**Abbildung 38, Abbildung 39**). Dieser Versuchsaufbau zeigt, dass die Hybride auch bei stark erhöhter Viruslast (MOI = 200) den Wirkverlust durch Deletion der akzessorischen Domäne teilweise retten können.

Die Versuche zur [³H]-TC-Aufnahme ergaben einen leicht höheren IC₅₀-Wert als für das ungekoppelte Peptid (vgl. **Tabelle 31**). Die Beobachtung, dass Substanzen die physiologische Funktion des Rezeptors weniger stark beeinflussen, während gleichzeitig eine starke Inhibition des Viruseintritts erreicht wird, ist literaturbekannt und liegt vermutlich an Oligomerisierungsprozessen von NTCP^{54,125,131}. Für MyrB wurde eine 3,26-fache Spezifität für die Eintrittsinhibition in dieser Arbeit berechnet, für myr-2-21yK(TRIAC) eine 2,57-fache. myr-2-21yK weist mit 0,04 einen Faktor < 1 auf, was bedeutet, dass eine höhere Konzentration zur Inhibition des viralen Eintritts benötigt wird, als zur Inhibition der physiologischen Funktion. Als Folge dessen beeinträchtigen Substanzen mit einem Faktor < 1 stets den Gallensäuretransport bevor eine inhibitorische Wirkung auf eine Infektion eintritt. Auch bei myr-2-21yK(G-Sul) liegt dieser Faktor mit 0,3 unter 1. Die Berechnung des Faktors ist fehlerbehaftet, da zwei verschiedene Methoden miteinander ins Verhältnis gesetzt werden, die unterschiedlicher Natur sind.

Bei der Analyse auf Zytotoxizität konnten sowohl die beiden Hybride, als auch MyrB und myr-2-21yK im relevanten Bereich als nicht zytotoxisch eingestuft werden (**Abbildung 41**).

Es wurde eine weitere Verbindung synthetisiert, welche den Einfluss des peptidischen Teils, genauer der essentiellen Sequenz, der Hybride aufzeigen sollte. Dazu wurde die Kopplung von TRIAC nicht mit myr-2-21yK durchgeführt, sondern mit myr-2-21yK(11-15Ala) (**Abbildung 26 (E)**). Das Ergebnis – myr-2-21yK(TRIAC)(11-15Ala) – stellt das wirksamste Hybrid dar, allerdings mit nicht bindungskompetenter essentieller Sequenz¹⁴¹. Eine Inhibition einer HDV-Infektion dieser Substanz in HepG2 A3-Zellen über Nacht war nicht festzustellen (*nicht abgebildet*). Ebenso gab es keine Wirkung auf den physiologischen Transport im [³H]-TC-Aufnahme-Assay (**Abbildung 36**). Dies zeigt deutlich, dass der peptidische Teil und vor allem die essentielle Sequenz maßgeblich die Wirkung der Hybride beeinflussen. Der ausgeprägte synergistische Effekt, den die hier charakterisierten Hybride aufweisen, benötigt eine intakte peptidische Bindung an NTCP. Findet diese Bindung statt, können die *small molecules* vermutlich die Bindetasche bedienen und führen zu einer verstärkten Wirkung.

Die Infektionsinhibitionsversuche stützen die aufgestellte Hypothese, da die durch Deletion der akzessorischen Domäne verlorene Wirksamkeit nach Kopplung mit einem NTCP-Substrat teilweise wiederhergestellt werden konnte. Das Modell, dass das PDWD-Motiv ein Substrat für NTCP imitiert, kann die erhaltenen Resultate stimmig vereinen. Ein klarer Beweis dieser Theorie kann mit den vorliegenden Daten allerdings nicht gezeigt werden.

Weitere stützende Faktoren sind die physiko-chemischen Eigenschaften der beiden *small molecules* nach der Kopplung: Durch den positiven mesomeren Effekt und den leicht ausgeprägten, negativen induktiven Effekt (+M/-I-Effekt) von Iod kann die freie Hydroxygruppe des TRIAC leichter deprotoniert werden, als es bei einem unsubstituierten Phenol möglich ist. Der pK_s-Wert der *ortho*-Iodphenyl-Substruktur liegt bei ca. 8 – 8,5 und damit nah am physiologischen pH-Wert von 7,4. Eine negative Ladung an dieser Position könnte durchaus den Wirkunterschied zwischen den TRIAC- und den Sulfasalazin-Hybriden erklären, die durch die Kopplung keine negative Ladung mehr aufbauen können. Das bedeutet, dass TRIAC nach der Kopplung in der Lage ist, eine bei physiologischem pH ebenfalls deprotonierte Gallensäure besser zu imitieren als Sulfasalazin und dadurch eine intensivere Interaktion mit der Bindetasche erreicht.

Die Bindemechanismen von TRIAC und Sulfasalazin sind höchstwahrscheinlich als Substrate mit der Gallensäurebindetasche von NTCP^{112,132,138}. Trotzdem wären auch allosterische Bindungen der *small molecules* möglich, wie von *Shimura et al.*¹⁴⁹ oder *Fukano et al.*¹²⁵ für andere Verbindungen beschrieben. Auch eine simultane Bindung zu zwei Rezeptoren bei Homo- oder Heterodimerisierung bzw. eine Unterbindung dieser Interaktion ist denkbar.

Die Bindungsmodalitäten der neu synthetisierten Verbindungen genau aufzuklären bedarf weiterer Forschung, vor allem im Bereich der Aufklärung der Kristallstruktur von NTCP. Zu verstehen, welche Komponenten der Oberflächenproteine zu einer Wirtsselektion führen, wie sich die Konformation des Rezeptors bei Bindung mit der essentiellen Sequenz ändert, ob die akzessorische Domäne weitere Bindungspartner akquiriert oder inhibiert, ist ein wichtiger Bestandteil zum vollständigen Verständnis des Hepatitis-B- und -D-Virus.

4.3.3 myr-2-21yK(TRIAC) zeigt neben der sehr hohen inhibitorischen Effektivität *in vitro* auch vorteilhafte Bioverteilung und Halbwertszeit *in vivo*

Nach der Charakterisierung *in vitro* wurde myr-2-21yK(TRIAC) als Leitsubstanz der hybridischen NTCP-Inhibitoren identifiziert. Geringe Zytotoxizität, gepaart mit starker inhibitorischer Potenz gegen HBV- und HDV-Infektionen bei gleichzeitig geringer Beeinflussung des physiologischen Gallensäuretransports, machen es zu einer vielversprechenden Substanz, deren *in vivo* Eigenschaften erfasst werden sollten.

Zuerst wurde eine szintigraphische Bildgebung als Vorversuch mit ¹²⁵I-myr-2-21y, ¹²⁵I-myr-2-21yK(G-Sul), ¹²⁵I-myr-2-21yK(TRIAC) und ¹²⁵I-myr-2-21yK(TRIAC)(11-15Ala) durchgeführt. Diese Versuche gaben eine erste Einschätzung der *in vivo* Biodistribution und Verweildauer und erlaubten eine Beurteilung des Einflusses des peptidischen Teils.

Die Fähigkeit, die Leber als Wirkort anzusteuern, wird klar von der peptidischen Sequenz bestimmt: Alle Substanzen außer myr-2-21yK(TRIAC)(11-15Ala) kumulierten schon zehn Minuten nach der Injektion in der Leber; diese Anreicherung hielt für die Substanzen über mindestens sechs Stunden an. Nach 24 Stunden war für alle Substanzen, myr-2-21yK(TRIAC)(11-15Ala) inbegriffen, eine Restaktivität in den Tieren zu erkennen, wobei bei den Verbindungen mit intakter essentieller Sequenz auch zu diesem Zeitpunkt noch eine leichte Präferenz zur Leber festzustellen war (**Abbildung 45**).

myr-2-21yK(TRIAC)(11-15Ala) zeigte eine Verteilung, wie sie bei myr-2-48yK(11-15Ala) zu sehen war: Es findet eine Anreicherung in allen gut durchbluteten Organen (Herz, Leber, Lunge) statt, während ein starkes, diffuses Hintergrundsignal auf eine starke Plasmabindung schließen lässt (vgl. **Abbildung 44**). Mit der Zeit wurden die Substanzen aus dem Blut ausgeschieden und Umverteilungsprozesse von Organen zu Blut fanden statt, wobei keine spezifische Bindung zu einem Organ erkennbar war. Die Veränderung der essentiellen Sequenz durch Alanine führt also sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* zu einem Wirkverlust, auch wenn eine Kopplung mit TRIAC durchgeführt wurde^{141,142}. Die Wirksteigerung durch das *small molecule* ist direkt abhängig von der intakten peptidischen Sequenz.

myr-2-21yK(G-Sul) und myr-2-21yK(TRIAC) zeigten in diesem Vorversuch ein vergleichbares Verhalten *in vivo* (vgl. **Abbildung 45 (B)** und **(C)**). Da die *in vitro* Wirkung des TRIAC-Hybrids um ein Vielfaches stärker war als die des Sulfasalazin-Hybrids, wurde myr-2-21yK(G-Sul) nicht in einer intensiveren *in vivo* Charakterisierung mit eingeschlossen.

Die organspezifische Bioverteilung ergab, dass myr-2-21yK(TRIAC) nicht allein hochspezifisch an die Leber, sondern auch an die Milz bindet. Während die erste Verteilung auf diese Organe ungefähr 1:1 ausfällt, verweilt das Hybrid länger an der Leber (**Abbildung 46**). Die Substanz zeigt eine verbesserte Bioverteilung im Vergleich zum Vorläuferpeptid myr-2-21y, mit erhöhter Bindung am Lebergewebe zu jedem Zeitpunkt, langsamerer Elimination von diesem Gewebe und entsprechend verlängerter Gewebehalbwertszeit – von ca. einer Stunde (myr-2-21y) auf ungefähr acht Stunden (myr-2-21yK(TRIAC)). Der *first-in-class* Inhibitor MyrB weist eine noch höhere Halbwertszeit von 15-20 Stunden und höhere Akkumulation in der Leber auf als das Hybrid.

Die *in vivo* Versuche untermauern die *in vitro* Ergebnisse eines hohen Wirkpotentials von myr-2-21yK(TRIAC) mit vorteilhaften *in vivo* Eigenschaften. Weitere Studien sollten zur Aufklärung von eventuell entstehenden Metaboliten und deren Wirksamkeit durchgeführt werden, ferner sollte die Toxizität des Hybrids mit einer von der Milz abgeleiteten Zelllinie untersucht werden. Die Frage, ob abgespaltenes TRIAC eventuelle Nebenwirkungen im Organismus ausübt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht behandelt werden. Es ist durchaus denkbar, dass das Hybrid ins Zellinnere aufgenommen

wird. Ob es dort eine Hormonwirkung ausüben kann, wie es prozessiert und transportiert wird, bleibt zu untersuchen. Die Gabe von TRIAC allein führt zu leberspezifischen Effekten, die durch ihre Cholesterin-senkende Wirkung als protektiv für das Herz-Kreislaufsystem angesehen werden¹⁴⁰. Eine Wirkung im Milzgewebe hingegen ist nicht bekannt, ebenso sind keine toxischen Erscheinungen bei einer normalen TRIAC Administration beschrieben.

4.4 Fazit und Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte das PDWD-Motiv in der preS1-Sequenz des HBV-Oberflächenproteins identifiziert werden. Anhand der Versuche mit verschiedenen Peptiden wird postuliert, dass die akzessorische Domäne über dieses Motiv als Imitationssequenz einer Gallensäure mit der TC-Bindetasche interagiert.

Es konnten erstmals hochspezifische, hybride NTCP-Inhibitoren synthetisiert werden, deren Edukte den Rezeptor auf unterschiedliche Weise blockieren. Es wurden sowohl die Edukte, als auch die potentesten Hybride charakterisiert, wobei ein starker synergistischer Effekt gefunden wurde, der erst durch die Kopplung entsteht.

Die Kopplung der kompetitiven Inhibitoren TRIAC und Sulfasalazin an myr-2-21yK beeinflusste dessen Wirkung im [³H]-TC-Aufnahme-Assay nur geringfügig, die Infektionsinhibition wurde aber stark verbessert. Es lässt sich schlussfolgern, dass bei der Bildung eines myr-2-21yK/NTCP-Komplexes über die essentielle Sequenz die Substratbindetasche zugänglich bleibt und die gekoppelten *small molecules* diese bedienen. Die Wirksteigerung durch die Kopplung zeigt einen synergistischen Effekt, der durch eine Interaktion des *small molecules* mit der Bindetasche zu einer Konformationsänderung des Rezeptors führen könnte, sodass das Virus diesen nicht mehr nutzen kann. Alternativ weist die erhöhte Aktivität darauf hin, dass das Virus die Bindetasche direkt zum Eintreten in die Zelle benötigt und die *small molecules* dort interferieren oder dass eine Inhibition von mehr als nur einem Rezeptormolekül bei Homo- oder Heterodimerisierung stattfindet. Versuche mit Hybriden aus MyrB und TRIAC oder Sulfasalazin könnten wichtige Ergebnisse liefern, die eines dieser Modelle stützen oder widersprechen. In der Literatur konnte durch Mutation der Na⁺-Bindestelle die Assoziation des Virus/MyrB an NTCP komplett unterbunden werden – wobei keine einheitliche Auslegung der Ergebnisse vorliegt – bei Mutationen der Substratbindestelle wurde die Bindung stark vermindert¹¹⁹. Die Aufklärung der genauen Bindungsmodalitäten des preS1-Peptids ohne die Kristallstruktur von NTCP bleibt extrem schwierig. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für eine direkte Interaktion des Virus mit der Substratbindetasche und der Inhibition dieser durch die neuartigen hybriden Inhibitoren. Weiterhin weisen die Ergebnisse darauf hin, dass MyrB mit der akzessorischen Domäne eine erweiterte Wirkung über die oben genannten Wege oder über Interaktion mit weiteren, eintrittsrelevanten Faktoren erreicht. Die Rekrutierung von Ko-Faktoren durch HBV ist in der Literatur beschrieben und stellt einen wichtigen potentiellen Wirkmechanismus der akzessorischen Domäne dar^{54,55,58,125}.

Um die Rolle der akzessorischen Domäne weiter aufzuklären, sollten weitere Studien durchgeführt werden, die die Wichtigkeit der einzelnen Aminosäuren des PDWD-Motivs genauer untersuchen. Die exakte Kristallstruktur von NTCP ist noch immer nicht aufgeklärt; diese würde allerdings der medizinischen Chemie weitere vielversprechende Ansätze zu zielgerichteten Synthesestrategien liefern und viele virologische Fragestellungen aufklären helfen. Die aktuelle Forschung an Ciclosporin-Derivaten und Troglitazon-Derivaten zeigen Moleküle, die weder an der Bindestelle der essentiellen Sequenz von MyrB binden, noch in der TC-Bindetasche^{125,149}. Die Verbindung solcher Wirkstoffe mit dem

peptidischen Inhibitor myr-2-21yK könnten weitere hochspezifische Inhibitoren mit einzigartigen Eigenschaften hervorbringen.

Die vorliegende Arbeit eröffnet die bislang noch unbekanntenen Möglichkeiten eines hybriden Ansatzes zur Forschung an neuen antiviralen Wirkstoffen. Diese Grundlage sollte genutzt werden, um das langfristige Ziel einer hochwirksamen, oral applizierbaren Therapie für mit HDV infizierten Patienten zu verwirklichen. Eine Limitation peptidischer Arzneistoffe ist die Applikation, da die orale Bioverfügbarkeit oft sehr gering ausfällt. Die Leitsubstanz der hybriden NTCP-Inhibitoren, die eine Reduktion um mehr als die Hälfte der Aminosäuren von MyrB erlaubt, während eine nicht-zytotoxische, hochpotente Wirkung *in vitro* und eine spezifische, langanhaltende Bindung *in vivo* erreicht wurde, sollte als Ausgangspunkt für neue Synthesen dienen. Der nicht-peptidische Teil des Hybrids ist ein oral bioverfügbares *small molecule*. Die neue Verbindung sollte mithilfe von aktuellen Formulierungen, wie z.B. Uhl *et al.*¹⁵⁴, auf orale Bioverfügbarkeit getestet werden. Weiterhin sollte das Hybrid als Inspiration für innovative synthetische Arbeiten dienen mit dem Ziel, einen hochwirksamen, pseudo-peptidischen und oral applizierbaren Wirkstoff zu entwickeln.

5 Publikationen und Präsentationen

Review

Krause, A., Haberkorn, U., Mier, W. (2018). "Strategies for the treatment of HBV/HDV". *European Journal of Pharmacology*, 833, 379–391.

Artikel

Mühlberg, E., Umstätter, F., Domhan, F., Hertlein, T., Ohlsen, K., **Krause, A.**, Kleist, C., Beijer, B., Zimmermann, Z., Haberkorn, U., Mier, W. and Uhl, P. (2020). "Vancomycin-Lipopeptide Conjugates with High Antimicrobial Activity on Vancomycin-Resistant Enterococci". *Pharmaceuticals*, 13(6), 110.

Posterpräsentation

"Hepatitis B and D: The importance of accessory domains in peptidic entry-inhibitors."
21. GFPP-Kongress in Amboise, Frankreich; 2019

6 Danksagung

Die Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne eine Vielzahl an Personen. Ich bin dankbar für die Hilfe und Unterstützung von jedem/r Einzelnen.

Im Besonderen danke ich meinem Doktorvater Walter Mier für die Ermöglichung dieser vielseitigen Arbeit. Ohne deine Unterstützung und Ratschläge wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich möchte mich bei Stephan Urban bedanken, in seinem Arbeitskreis mitarbeiten zu dürfen. Vielen Dank für die konstruktiven Diskussionen und die Zusammenarbeit.

Gert Fricker danke ich für die Annahme der Position als Zweitgutachter.

Weiterhin möchte ich allen gegenwärtigen und früheren Mitgliedern der AG Mier und AG Urban danken. Vielen Dank für die freundliche Aufnahme in beide Arbeitsgruppen, die nette Atmosphäre und gute Zusammenarbeit.

Ein großer Dank an meine Laborkollegen, die immer ein Ohr für mich hatten: Carlos Dos Santos, Florian Umstätter, Philip Storck, Sabrina Wohlfart und Eric Mühlberg; durch euch war selbst der kühle Keller gemütlich!

Für die Hilfe bei so vielen Fragen möchte ich mich bei Christian Kleist, Thomas Lindner und Philipp Uhl bedanken, ebenso bei Karin Leotta für die Unterstützung bei der Durchführung der *in vivo* Versuche.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Kollegen aus der AG Urban bedanken, im Besonderen bei Benno Zehnder, Florian Lempp, Katrin Schöneweis und Mila Leuthold.

Franziska Schlund möchte ich für ihre unermüdliche Hilfe mit der Zellkultur danken.

Durch die Zusammenarbeit mit meinen Bachelorstudenten Anna Metzger und Dennis Friedel konnte die Arbeit in dieser Form fertiggestellt werden. Vielen Dank!

Last but most certainly not least möchte ich mich bei meiner Freundin Charlotte, meiner Mutter und meinem Bruder Tobias bedanken. Danke für eure stete Unterstützung, euer Verständnis und euer Vertrauen in mich in dieser Zeit!

Danksagung

7 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization, W. Global hepatitis report, 2017. (2017).
2. Seeger, C. & Mason, W. S. Hepatitis B Virus Biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 51–68 (2000).
3. Mason, W. S., Seal, G. & Summers, J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.* **36**, 829–836 (1980).
4. Tennant, B. C. *et al.* Hepatocellular carcinoma in Richardson’s ground squirrels *Spermophilus richardsonii*: Evidence for association with hepatitis B–like virus infection. *Hepatology* **13**, 1215–1221 (1991).
5. Hahn, C. M. *et al.* Characterization of a Novel Hepadnavirus in the White Sucker (*Catostomus commersonii*) from the Great Lakes Region of the United States. *J. Virol.* **89**, 11801–11811 (2015).
6. Lauber, C. *et al.* Deciphering the Origin and Evolution of Hepatitis B Viruses by Means of a Family of Non-enveloped Fish Viruses. *Cell Host Microbe* **22**, 387-399.e6 (2017).
7. McNaughton, A. L. *et al.* Insights From Deep Sequencing of the HBV Genome—Unique, Tiny, and Misunderstood. *Gastroenterology* **156**, 384–399 (2019).
8. Drexler, J. F. *et al.* Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 16151–16156 (2013).
9. Starkman, S. E., MacDonald, D. M., Lewis, J. C. M., Holmes, E. C. & Simmonds, P. Geographic and species association of hepatitis B virus genotypes in non-human primates. *Virology* **314**, 381–393 (2003).
10. Seeger, C., Ganem, D. & Varmus, H. E. The cloned genome of ground squirrel hepatitis virus is infectious in the animal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 5849–5852 (1984).
11. Tuttleman, J. S., Pourcel, C. & Summers, J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* **47**, 451–460 (1986).
12. Velkov, S., Ott, J. J., Protzer, U. & Michler, T. The global hepatitis B virus genotype distribution approximated from available genotyping data. *Genes (Basel)*. **9**, (2018).
13. Pourkarim, M. R., Amini-Bavil-Olyaei, S., Kurbanov, F., Van Ranst, M. & Tacke, F. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/ subgenotypes: Revised classification hurdles and updated resolutions. *World J. Gastroenterol.* **20**, 7152–7168 (2014).
14. Summers, J. & Mason, W. S. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* **29**, 403–415 (1982).
15. Summers, J., O’Connell, A. & Millman, I. Genome of hepatitis B virus: Restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 4597–4601 (1975).
16. Cornberg, M. *et al.* [Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis B virus infection - the German guideline]. *Z. Gastroenterol.* **49**, 871–930 (2011).
17. Razavi-Shearer, D. *et al.* Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 383–403 (2018).
18. Idilman, R. The summarized of EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Turkish J. Gastroenterol.* **28**, 412–416 (2017).
19. Ott, J. J., Stevens, G. A., Groeger, J. & Wiersma, S. T. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine* **30**,

- 2212–2219 (2012).
20. Singal, A. G., Lampertico, P. & Nahon, P. Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends. *J. Hepatol.* **72**, 250–261 (2020).
 21. Maucort-Boulch, D., de Martel, C., Franceschi, S. & Plummer, M. Fraction and incidence of liver cancer attributable to hepatitis B and C viruses worldwide. *Int. J. Cancer* **142**, 2471–2477 (2018).
 22. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
 23. Newbold, J. E. *et al.* The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J. Virol.* **69**, 3350–3357 (1995).
 24. Pasek, M. *et al.* Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature* **282**, 575–579 (1979).
 25. Müller, T. *et al.* Liver Imaging with a Novel Hepatitis B Surface Protein Derived SPECT-Tracer. *Mol. Pharm.* **10**, 2230–2236 (2013).
 26. Kramvis, A. The clinical implications of hepatitis B virus genotypes and HBeAg in pediatrics. *Rev. Med. Virol.* **26**, 285–303 (2016).
 27. Molnar-Kimber, K. L. *et al.* Distinctive properties of the hepatitis B virus envelope proteins. *J. Virol.* **62**, 407–416 (1988).
 28. Jaoudé, G. A. & Sureau, C. Role of the Antigenic Loop of the Hepatitis B Virus Envelope Proteins in Infectivity of Hepatitis Delta Virus. *J. Virol.* **79**, 10460–10466 (2005).
 29. Abou-Jaoudé, G. & Sureau, C. Entry of Hepatitis Delta Virus Requires the Conserved Cysteine Residues of the Hepatitis B Virus Envelope Protein Antigenic Loop and Is Blocked by Inhibitors of Thiol-Disulfide Exchange. *J. Virol.* **81**, 13057–13066 (2007).
 30. Gripon, P., Cannie, I. & Urban, S. Efficient Inhibition of Hepatitis B Virus Infection by Acylated Peptides Derived from the Large Viral Surface Protein. *J. Virol.* **79**, 1613–1622 (2005).
 31. Yan, H. *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* **2012**, 1–28 (2012).
 32. Schulze, A., Gripon, P. & Urban, S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* **46**, 1759–1768 (2007).
 33. Ni, Y. *et al.* Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* **146**, 1070–1083 (2014).
 34. Gripon, P., Seyec, J. L. E., Rumin, S. & Guguen-Guillouzo, C. Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology* **213**, 292–299 (1995).
 35. Crowther, R. A. *et al.* Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* **77**, 943–950 (1994).
 36. Bruss, V. & Gerlich, W. H. Formation of transmembraneous hepatitis b e-antigen by cotranslational in vitro processing of the viral precore protein. *Virology* **163**, 268–275 (1988).
 37. Chen, M. T. *et al.* A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 14913–14918 (2004).
 38. Milich, D. R. *et al.* Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? (hepatitis B virus/T celi/transgenic mice/persistent infection). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6599–6603 (1990).
 39. Bavand, M., Feitelson, M. & Laub, O. The hepatitis B virus-associated reverse transcriptase is encoded by the viral pol gene. *J. Virol.* **63**, 1019–1021 (1989).

40. Levrero, M. *et al.* Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* **51**, 581–592 (2009).
41. Lucifora, J. *et al.* Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J. Hepatol.* **55**, 996–1003 (2011).
42. Urban, S., Schulze, A., Dandri, M. & Petersen, J. The replication cycle of hepatitis B virus. *J. Hepatol.* **52**, 282–284 (2010).
43. Livingston, C. M., Ramakrishnan, D., Strubin, M., Fletcher, S. P. & Beran, R. K. Identifying and characterizing interplay between hepatitis B virus X protein and Smc5/6. *Viruses* **9**, 1–8 (2017).
44. Heermann, K. H. *et al.* Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J. Virol.* **52**, 396–402 (1984).
45. Heermann, K.-H., Kruse, F., Seifer, M. & Gerlich, W. H. Immunogenicity of the Gene S and Pre-S Domains in Hepatitis B Virions and HBsAg Filaments. *Intervirology* **28**, 14–25 (1987).
46. Kann, M. & Gerlich, W. H. Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *J. Virol.* **68**, 7993–8000 (1994).
47. Hirsch, R. C., Lavine, J. E., Chang, L. J., Varmus, H. E. & Ganem, D. Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature* vol. 344 552–555 (1990).
48. Stannard, L. M. & Hodgkiss, M. Morphological irregularities in Dane particle cores. *J. Gen. Virol.* **45**, 509–514 (1979).
49. Chai, N. *et al.* Properties of Subviral Particles of Hepatitis B Virus. *J. Virol.* **82**, 7812–7817 (2008).
50. Urban, S. Liver capsule: Entry and entry inhibition of hepatitis B virus and hepatitis delta virus into hepatocytes. *Hepatology* **63**, 633–633 (2016).
51. Lindblom, A. & Fransson, L. Å. Endothelial heparan sulphate: Compositional analysis and comparison of chains from different proteoglycan populations. *Glycoconj. J.* **7**, 545–562 (1990).
52. Sureau, C. & Salisse, J. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatology* **57**, 985–994 (2013).
53. Leistner, C. M., Gruen-Bernhard, S. & Glebe, D. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell. Microbiol.* **10**, 122–133 (2008).
54. Bijsmans, I. T. G. W., Bouwmeester, R. A. M., Geyer, J., Faber, K. N. & Van De Graaf, S. F. J. Homo- and hetero-dimeric architecture of the human liver Na⁺-dependent taurocholate co-transporting protein. *Biochem. J.* **441**, 1007–1015 (2012).
55. Chothe, P. P., Czuba, L. C., Moore, R. H. & Swaan, P. W. Human bile acid transporter ASBT (SLC10A2) forms functional non-covalent homodimers and higher order oligomers. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1860**, 645–653 (2018).
56. Stross, C. *et al.* A dileucine motif is involved in plasma membrane expression and endocytosis of rat sodium taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp). *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **305**, 722–730 (2013).
57. Herrscher, C. *et al.* Hepatitis B virus entry into HepG2-NTCP cells requires clathrin-mediated endocytosis. *Cell. Microbiol.* **n/a**, e13205.
58. Iwamoto, M. *et al.* Epidermal growth factor receptor is a host-entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 8487–8492 (2019).
59. Nassal, M. Hepatitis B viruses: Reverse transcription a different way. *Virus Res.* **134**, 235–249 (2008).
60. Sohn, J. A., Litwin, S. & Seeger, C. Mechanism for CCC DNA Synthesis in Hepadnaviruses. *PLoS*

- One* **4**, (2009).
61. Chaung, K. T. *et al.* High frequency of recurrent viremia after hepatitis B e antigen seroconversion and consolidation therapy. *J. Clin. Gastroenterol.* **46**, 865–870 (2012).
 62. Jeng, W. J. *et al.* Off-therapy durability of response to entecavir therapy in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients. *Hepatology* **58**, 1888–1896 (2013).
 63. Matsubara, K. & Tokino, T. Integration of hepatitis B virus DNA and its implications for hepatocarcinogenesis. *Mol. Biol. Med.* **7**, 243–260 (1990).
 64. Summers, J., Smith, P. M. & Horwich, A. L. Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J. Virol.* **64**, 2819–2824 (1990).
 65. Watanabe, T. *et al.* Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10205–10210 (2007).
 66. Patient, R., Hourieux, C. & Roingeard, P. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell. Microbiol.* **11**, 1561–1570 (2009).
 67. Marcellin, P. *et al.* Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: A 5-year open-label follow-up study. *Lancet* **381**, 468–475 (2013).
 68. Kim, G. A. *et al.* Incidence of hepatocellular carcinoma after HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B patients: A need for surveillance. *J. Hepatol.* **62**, 1092–1099 (2015).
 69. Hosaka, T. *et al.* Long-term entecavir treatment reduces hepatocellular carcinoma incidence in patients with hepatitis B virus infection. *Hepatology* **58**, 98–107 (2013).
 70. Kumada, H. *et al.* Efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate rescue therapy for chronic hepatitis B patients who failed other nucleos(t)ide analogs. *Hepatol. Res.* **47**, 1032–1041 (2017).
 71. Cherrington, J. M., Allen, S. J. W., Bischofberger, N. & Chen, M. S. Kinetic Interaction of the diphosphates of 9-(2-phosphonyl-methoxyethyl)adenine and other anti-HIV active purine congeners with HIV reverse transcriptase and human DNA polymerases α , β and γ . *Antivir. Chem. Chemother.* **6**, 217–221 (1995).
 72. Cammack, N. *et al.* Cellular metabolism of (-) enantiomeric 2'-deoxy-3'-thiacytidine. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 2059–2064 (1992).
 73. Bartholomew, M. M. *et al.* Early reports Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation amplified from serum and sequenced through a conserved within the YMDD locus of the HBV polymerase gene in all Orthotopic liver t. **349**, 20–22 (1997).
 74. Lai, C. L. *et al.* A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* **339**, 61–68 (1998).
 75. Lampertico, P. *et al.* Adefovir rapidly suppresses hepatitis B in HBeAg-negative patients developing genotypic resistance to lamivudine. *Hepatology* **42**, 1414–1419 (2005).
 76. Kuhen, K. L. & Samuel, C. E. Mechanism of interferon action: Functional characterization of positive and negative regulatory domains that modulate transcriptional activation of the human RNA-dependent protein kinase Pkr promoter. *Virology* **254**, 182–195 (1999).
 77. Heidrich, B., Manns, M. P. & Wedemeyer, H. Treatment options for hepatitis delta virus infection. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **15**, 31–38 (2013).
 78. Cooksley, W. G. E. *et al.* Peginterferon α -2a (40 kDa): An advance in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *J. Viral Hepat.* **10**, 298–305 (2003).
 79. Lin, S. M. *et al.* Interferon therapy in HBeAg positive chronic hepatitis reduces progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **46**, 45–52 (2007).

80. Dienstag, J. L. Hepatitis B Virus Infection. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1486–1500 (2008).
81. Rizzetto, M. *et al.* Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (δ /anti- δ) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* **18**, 997–1003 (1977).
82. Rizzetto, M. *et al.* Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. *J. Infect. Dis.* **141**, 590–602 (1980).
83. Stockdale, A. J. *et al.* The global prevalence of hepatitis D virus infection: systematic review and meta-analysis. *J. Hepatol.* (2020) doi:10.1016/j.jhep.2020.04.008.
84. Negro, F. Hepatitis D virus coinfection and superinfection. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, 1–10 (2014).
85. Fattovich, G. *et al.* Influence of Hepatitis Delta Virus Infection on Progression to Cirrhosis in Chronic Hepatitis Type B. *J. Infect. Dis.* **155**, 931–935 (1987).
86. Giovanna, F., Bortolotti, F. & Francesco, D. Natural history of chronic hepatitis B: Special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J. Hepatol.* **48**, 335–352 (2008).
87. Rizzetto, M. The Delta Agent. *Hepatology* **3**, 729–737 (1983).
88. Vlachogiannakos, J. & Papatheodoridis, G. V. New epidemiology of hepatitis delta. *Liver Int.* **40**, 48–53 (2020).
89. Rizzetto, M. *et al.* δ agent: Association of δ antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of δ -infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 6124–6128 (1980).
90. Sureau, C., Guerra, B. & Lanford, R. E. Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. *J. Virol.* **67**, 366–372 (1993).
91. Bonino, F., Heermann, K. H., Rizzetto, M. & Gerlich, W. H. Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *J. Virol.* **58**, 945–950 (1986).
92. Weiner, A. J. *et al.* A single antigenomic open reading frame of the hepatitis delta virus encodes the epitope(s) of both hepatitis delta antigen polypeptides p24 delta and p27 delta. *J. Virol.* **62**, 594–599 (1988).
93. Gudima, S., Chang, J., Moraleda, G., Azvolinsky, A. & Taylor, J. Parameters of Human Hepatitis Delta Virus Genome Replication: the Quantity, Quality, and Intracellular Distribution of Viral Proteins and RNA. *J. Virol.* **76**, 3709–3719 (2002).
94. Branch, A. D. & Robertson, H. D. A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science (80-.)*. **223**, 450–455 (1984).
95. Diegelman, A. M. & Kool, E. T. Mimicry of the hepatitis delta virus replication cycle mediated by synthetic circular oligodeoxynucleotides. *Chem. Biol.* **6**, 569–576 (1999).
96. Modahl, L. E., Macnaughton, T. B., Zhu, N., Johnson, D. L. & Lai, M. M. C. RNA-Dependent Replication and Transcription of Hepatitis Delta Virus RNA Involve Distinct Cellular RNA Polymerases. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6030–6039 (2000).
97. Luo, G. X. *et al.* A specific base transition occurs on replicating hepatitis delta virus RNA. *J. Virol.* **64**, 1021–1027 (1990).
98. Kuo, M. Y., Chao, M. & Taylor, J. Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: role of delta antigen. *J. Virol.* **63**, 1945–1950 (1989).
99. Glenn, J., Watson, J., Havel, C. & White, J. Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. *Science (80-.)*. **256**, 1331–1333 (1992).
100. Sharmeen, L., Kuo, M. Y. & Taylor, J. Self-ligating RNA sequences on the antigenome of human hepatitis delta virus. *J. Virol.* **63**, 1428–1430 (1989).

101. Chao, M., Hsieh, S. Y. & Taylor, J. Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. *J. Virol.* **64**, 5066–5069 (1990).
102. Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit (ZKBS). Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung von *Vibrio natriegens* und *Vibrio natriegens*-Stamm VmaxTM als Spender- oder Empfängerorganismus gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV. 7–10 (2017).
103. Wille, M. *et al.* A divergent hepatitis D-like agent in birds. *Viruses* **10**, (2018).
104. Hetzel, U. *et al.* Identification of a Novel Deltavirus in Boa Constrictors. *MBio* **10**, 1–8 (2019).
105. Chang, W. *et al.* OUP accepted manuscript. *Virus Evol.* **5**, 1–10 (2019).
106. Perez-Vargas, J. *et al.* Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
107. Heidrich, B. *et al.* Late HDV RNA relapse after peginterferon alpha-based therapy of chronic hepatitis delta. *Hepatology* **60**, 87–97 (2014).
108. Craddock, A. L. *et al.* Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **274**, 157–169 (1998).
109. Kramer, W. *et al.* Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na⁺/bile acid cotransporters of the rabbit. I. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters. *J. Lipid Res.* **40**, 1604–1617 (1999).
110. Hagenbuch, B. & Meier, P. J. Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J. Clin. Invest.* **93**, 1326–1331 (1994).
111. Döring, B., Lütteke, T., Geyer, J. & Petzinger, E. *The SLC10 carrier family: Transport functions and molecular structure. Current Topics in Membranes* vol. 70 (Elsevier, 2012).
112. Visser, W. E. *et al.* Study of the transport of thyroid hormone by transporters of the SLC10 family. *Mol. Cell. Endocrinol.* **315**, 138–145 (2010).
113. Anwer, M. S. & Stieger, B. Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: More than solute transporters. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **466**, 77–89 (2014).
114. Bell, C. C. *et al.* Transcriptional, functional, and mechanistic comparisons of stem cell-derived hepatocytes, HepaRG cells, and three-dimensional human hepatocyte spheroids as predictive in vitro systems for drug-induced liver injury. *Drug Metab. Dispos.* **45**, 419–429 (2017).
115. Gripon, P. *et al.* Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 15655–15660 (2002).
116. Tolosa, L. *et al.* Advantageous use of HepaRG cells for the screening and mechanistic study of drug-induced steatosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **302**, 1–9 (2016).
117. Lempp, F. A. *et al.* Recapitulation of HDV infection in a fully permissive hepatoma cell line allows efficient drug evaluation. *Nat. Commun.* **10**, 1–11 (2019).
118. Hu, N. J., Iwata, S., Cameron, A. D. & Drew, D. Crystal structure of a bacterial homologue of the bile acid sodium symporter ASBT. *Nature* **478**, 408–411 (2011).
119. Yan, H. *et al.* Viral Entry of Hepatitis B and D Viruses and Bile Salts Transportation Share Common Molecular Determinants on Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide. *J. Virol.* **88**, 3273–3284 (2014).
120. Zahner, D., Eckhardt, U. & Petzinger, E. Transport of taurocholate by mutants of negatively charged amino acids, cysteines, and threonines of the rat liver sodium-dependent taurocholate cotransporting polypeptide Ntcp. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1117–1127 (2003).

121. Sun, A. Q., Balasubramaniyan, N., Chen, H., Shahid, M. & Suchy, F. J. Identification of functionally relevant residues of the rat ileal apical sodium-dependent bile acid cotransporter. *J. Biol. Chem.* **281**, 16410–16418 (2006).
122. Anwer, M. S. *et al.* Dephosphorylation of Ser-226 facilitates plasma membrane retention of Ntcp. *J. Biol. Chem.* **280**, 33687–33692 (2005).
123. Appelman, M. D., Chakraborty, A., Protzer, U., McKeating, J. A. & Van De Graaf, S. F. J. N-glycosylation of the Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) Determines Its Trafficking and Stability and Is Required for Hepatitis B Virus Infection. *PLoS One* **12**, 1–14 (2017).
124. Urban, S., Bartenschlager, R., Kubitz, R. & Zoulim, F. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. *Gastroenterology* **147**, 48–64 (2014).
125. Fukano, K. *et al.* Troglitazone impedes the oligomerization of sodium taurocholate cotransporting polypeptide and entry of hepatitis B virus into hepatocytes. *Front. Microbiol.* **10**, 1–14 (2019).
126. Greupink, R. *et al.* In silico identification of potential cholestasis-inducing agents via modeling of Na⁺-dependent taurocholate cotransporting polypeptide substrate specificity. *Toxicol. Sci.* **129**, 35–48 (2012).
127. Dong, Z., Ekins, S. & Polli, J. E. Structure-activity relationship for FDA approved drugs as inhibitors of the human sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Mol. Pharm.* **10**, 1008–1019 (2013).
128. König, A. *et al.* Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes. *J. Hepatol.* **61**, 867–875 (2014).
129. Dong, Z., Ekins, S. & Polli, J. E. Quantitative NTCP pharmacophore and lack of association between DILI and NTCP Inhibition. *Eur. J. Pharm. Sci.* **66**, 1–9 (2015).
130. Dong, Z., Ekins, S. & Polli, J. E. A substrate pharmacophore for the human sodium taurocholate co-transporting polypeptide. *Int. J. Pharm.* **478**, 88–95 (2015).
131. Nkongolo, S. *et al.* Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor. *J. Hepatol.* **60**, 723–731 (2014).
132. Donkers, J. M. *et al.* Reduced hepatitis B and D viral entry using clinically applied drugs as novel inhibitors of the bile acid transporter NTCP. *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).
133. FDA. *Alzulfidine Label* FDA. *Sciences-New York* https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/007073s124lbl.pdf (2009).
134. Agency, E. M. Public summary of opinion on orphan designation 1,2:5,6-Dianhydrogalactitol for the treatment of glioma. *Eur. Med. agency* **000**, 2–5 (2013).
135. Friesema, E. C. H. *et al.* Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J. Biol. Chem.* **278**, 40128–40135 (2003).
136. Schwartz, C. E. *et al.* Allan-Herndon-Dudley syndrome and the monocarboxylate transporter 8 (MCT8) gene. *Am. J. Hum. Genet.* **77**, 41–53 (2005).
137. Wirth, E. K. *et al.* Neuronal 3',3,5-triiodothyronine (T3) uptake and behavioral phenotype of mice deficient in Mct8, the neuronal T3 transporter mutated in Allan-Herndon-Dudley syndrome. *J. Neurosci.* **29**, 9439–9449 (2009).
138. Friesema, E. C. H. *et al.* Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**, 497–501 (1999).
139. Wagner, R. L. *et al.* Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. *Mol. Endocrinol.* **15**, 398–

- 410 (2001).
140. Sherman, S. I. *et al.* Augmented hepatic and skeletal thyromimetic effects of tiratricol in comparison with levothyroxine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 2153–2158 (1997).
 141. Schulze, A., Schieck, A., Ni, Y., Mier, W. & Urban, S. Fine Mapping of Pre-S Sequence Requirements for Hepatitis B Virus Large Envelope Protein-Mediated Receptor Interaction. *J. Virol.* **84**, 1989–2000 (2010).
 142. Schieck, A. *et al.* Hepatitis B virus hepatotropism is mediated by specific receptor recognition in the liver and not restricted to susceptible hosts. *Hepatology* **58**, 43–53 (2013).
 143. Glebe, D. *et al.* Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology* **129**, 234–245 (2005).
 144. Blank, A. *et al.* First-in-human application of the novel hepatitis B and hepatitis D virus entry inhibitor myrcludex B. *J. Hepatol.* **65**, 483–489 (2016).
 145. Bogomolov, P. *et al.* A proof-of-concept Phase 2a clinical trial with HBV/ HDV entry inhibitor Myrcludex B. *Hepatology* **60**, 1279–1280 (2014).
 146. EMA. *Hepcludex bulevirtide*. vol. 1 (2020).
 147. Liu, J. *et al.* Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807–815 (1991).
 148. Madan, V., Paul, D., Lohmann, V. & Bartenschlager, R. Inhibition of HCV Replication by Cyclophilin Antagonists Is Linked to Replication Fitness and Occurs by Inhibition of Membranous Web Formation. *Gastroenterology* **146**, 1361-1372.e9 (2014).
 149. Shimura, S. *et al.* Cyclosporin derivatives inhibit hepatitis B virus entry without interfering with NTCP transporter activity. *J. Hepatol.* **66**, 685–692 (2017).
 150. Knowles, B. B., Howe, C. C. & Aden, D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science (80-.)*. **209**, 497 LP – 499 (1980).
 151. Nakabayashi, H., Miyano, K., Sato, J., Yamane, T. & Taketa, K. Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* **42**, 3858–3863 (1982).
 152. Lempp, F. A. & Urban, S. Hepatitis delta virus: Replication strategy and upcoming therapeutic options for a neglected human pathogen. *Viruses* **9**, (2017).
 153. Crim, J. W., Garczynski, S. F. & Brown, M. R. Approaches to radioiodination of insect neuropeptides. *Peptides* **23**, 2045–2051 (2002).
 154. Uhl, P. *et al.* Oral delivery of vancomycin by tetraether lipid liposomes. *Eur. J. Pharm. Sci.* **108**, 111–118 (2017).