

# Isolation neuartiger Hepatitis-E-Virus-Wildtyp-Stämme durch Etablierung und Optimierung eines Zellkultur-basierten Infektionssystems



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Humanwissenschaften  
(Dr. sc. hum.)

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Mathias Schemmerer  
aus  
Landshut

im Jahr  
2020



# Isolation neuartiger Hepatitis-E-Virus-Wildtyp-Stämme durch Etablierung und Optimierung eines Zellkultur-basierten Infektionssystems



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Humanwissenschaften  
(Dr. sc. hum.)

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Mathias Schemmerer  
aus  
Landshut

im Jahr  
2020

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

Betreuer:

Prof. Dr. Jürgen Wenzel

Tag der mündlichen Prüfung:

03.02.2021

Ich, Schemmerer Mathias geboren am 26.03.1987 in Landshut erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 21. September 2020

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Schemmerer Mathias', written in a cursive style.

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Taxonomie und Epidemiologie	8
1.2 Morphologie und Replikationszyklus	12
1.3 Transmission	15
1.4 Klinik	16
1.5 Diagnostik	17
1.6 Behandlung und Prävention	18
1.7 Zellkultur-basiertes Infektionssystem	20
2. Material	22
2.1 Geräte	22
2.2 Verbrauchsmaterialien	23
2.3 Chemikalien	24
2.4 Puffer und Zellkulturmedien	25
2.5 Humane Zelllinien	26
2.6 HEV-positives Material	27
2.7 Kits, Enzyme und Antikörper	28
2.8 Oligonukleotide	29
2.9 Software	32
3. Methoden	33
3.1 Zellkultur	33
3.2 Virusisolierung	33
3.3 Nukleinsäure-Isolation	34
3.4 HEV-RNA-Quantifizierung	34
3.5 HEV-ORF2-Antigen-Nachweis	34
3.6 Immunfluoreszenzfärbung	35
3.7 Genomsequenzierung	35

3.8	Phylogenetische Analysen	41
4.	Ergebnisse	42
4.1	Einfluss der Frequenz des Mediumwechsels auf die Viruslast und Isolierung eines neuen HEV-3c-Stammes	42
4.2	Steigerung der Infektionseffizienz durch früher ausgesäte und überkonfluent gewachsene Zellen	44
4.3	Spezifische Mediumsupplemente steigern die Virusreplikation und optimierte Medien begünstigen die de-novo-Isolierung eines HEV-3e-Stammes	47
4.4	Isolierung eines HEV-3f-Stammes bestätigt PLC/PRF/5 als geeignetste Zelllinie für die HEV-Isolierung	50
4.5	Titration der neuen HEV-Isolate weist auf Subtyp-spezifische Replikationsdynamik hin	52
4.6	Optimiertes HEV-Zellkultursystem produziert zeitlich praktisch unbegrenzt hohe Viruslasten	54
4.7	Gesamtgenomsequenzierung bestätigt Wildtyp-Charakter ohne HVR-Insertionen	56
4.8	Validierung des optimierten Zellkultursystems durch Isolierung von 16 zusätzlichen HEV-3-Stämmen	59
5.	Diskussion	61
6.	Zusammenfassung	68
7.	Summary	69
	Literaturverzeichnis	70
	Danksagung	90
	Curriculum Vitae	92

# Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
(v/v)	Volumen pro Volumen (engl. volume per volume)
(w/v)	Gewicht pro Volumen (engl. weight per volume)
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
3D	Dreidimensional
A	Adenin
Ag	Antigen
ALP	Alkalische Phosphatase
ALT	Alanin-Aminotransferase
Amph. B	Amphotericin B
as	Antisense
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATCC	American Type Culture Collection (engl.)
B	G, C, oder T Nukleinbase
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CA	Kalifornien (engl. California)
cDNA	Komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
cm <sup>2</sup>	Quadratmeter
CPE	Zytopathischer Effekt (engl. cytopathic effect)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
dpi	Tag(e) nach Inokulation (engl. day(s) post inoculation)
EBSS	Earle-Salze (engl. Earle's Balanced Salt Solution)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eEF1α1	Eukaryotischer Elongationsfaktor 1 Isoform-1
eHEV	Quasi-behülltes HEV (engl. quasi-enveloped HEV)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (engl.)
engl.	Englisch
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	Fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Glycin
G	Guanin
GB	GenBank
GGS	Gesamtgenomsequenz
HBsAg	HBV surface antigen (engl.)
HBV	Hepatitis-B-Virus
Hel	RNA-Helikase
HEV	Hepatitis-E-Virus
HEV-LP	HEV-ähnliche(s) Partikel (engl. HEV-like particle(s))



HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HVR	Hypervariable Region
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration (engl. half maximal inhibitory concentration)
ID	Identifikator
IFF	Immunfluoreszenzfärbung
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IMHR	Institut für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg
K	G oder T Nukleinbase
K/ml	Kopie(n) pro Milliliter
kb	Kilobase(n)
konz.	Konzentriert
l	Liter
IU	Internationale Einheit(en) (engl. International Unit(s))
Log	Dekadischer Logarithmus
M	A oder C Nukleinbase
MA	Massachusetts
MEM	Minimal Essential Medium (engl.)
Met	Methyltransferase
mg	Milligramm
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
MO	Missouri
mTOR	Mechanistic target of rapamycin (engl.)
MVB	multivesikuläre Körperchen (engl. multivesicular bodies)
n	Vielfaches
N	G, A, C oder T Nukleinbase
n.d.	Nicht detektiert
n.v.	Nicht verfügbar
NEAA	Nicht essentielle Aminosäuren (engl. non-essential amino acids)
nHEV	Unbehülltes HEV (engl. naked HEV)
NJ	New Jersey
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nt	Nukleotid(e)
NY	New York
ORF	Offener Leserahmen (engl. open reading frame)
ORF2c	Gespaltenes ORF2 (engl. cleaved ORF2)
ORF2 <sup>C</sup>	Kapsid-assoziiertes ORF2 (engl. capsid-associated ORF2)
ORF2g	Glykosyliertes ORF2
ORF2i	Infektiöses oder intrazelluläres ORF2
ORF2 <sup>S</sup>	Sezerniertes ORF2
p	Passagenzahl
PA	Pennsylvania
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate-buffered saline)
PBSm	PBS mit den divalenten Kationen Calcium und Magnesium
PBSo	PBS ohne die divalenten Kationen Calcium und Magnesium
PCP	Papain-ähnliche Cysteinprotease
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
Peg-IFN-α	Pegyliertes Interferon-α

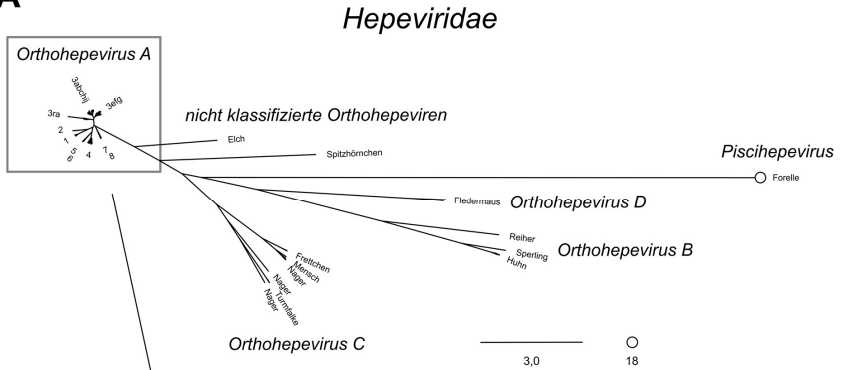
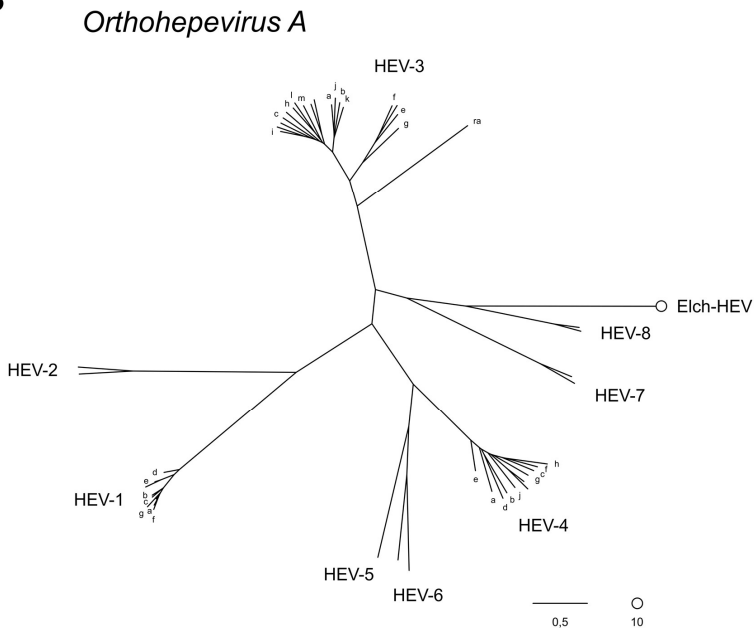
PES	Polyethersulfon
pos.	Positiv
R	Arginin
R	G oder A Nukleinbase
ra	Kaninchen (engl. rabbit)
RACE	Schnelle Amplifikation der cDNA-Enden (engl. rapid amplification of cDNA-ends)
RBV	Ribavirin
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase (engl. RNA-dependent RNA polymerase)
ref	Referenzsequenz
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (engl. National Institute for Public Health and the Environment)
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RT	Reverse Transkriptase
RT	Reverse Transkription
RT-qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR (engl. real-time quantitative PCR)
s	Sense
S	G oder C Nukleinbase
s.o.	Siehe oben
SCR	Quotient aus Messsignal und Grenzwert (engl. signal-to-cutoff ratio)
Sek.	Sekunde(n)
SVR	Andauerndes virologisches Ansprechen (engl. sustained virologic response)
T	Thymin
T <sub>a</sub>	Hybridisierungstemperatur (engl. annealing temperature)
TAMRA	5-Carboxytetramethylrhodamin
TCID <sub>50</sub>	Dosis, die 50% einer Zellkultur infiziert (engl. 50% tissue culture infective dose)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSG101	Tumor susceptibility gene 101 (engl.)
TX	Texas
U	Einheit(en) (engl. Unit(s))
U	Uracil
u.a.	Unter anderem
unverd.	unverdünnt
UR	Universität Regensburg
USA	Vereinigten Staaten von Amerika (engl. United States of America)
UTR	Untranslatierte Region
V	G, A, oder C Nukleinbase
VA	Virginia
VL	Viruslast
W	A oder T Nukleinbase
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organization)
wpi	Wochen nach Inokulation (engl. week(s) post inoculation)
WU	WHO Units
X	X-Domäne
Y	Y-Domäne
Y	C oder T Nukleinbase
ZKÜ	Zellkulturüberstand
γ-GT	γ-Glutamyltransferase

# 1. Einleitung

Das Hepatitis-E-Virus (HEV) ist der Erreger der Hepatitis E und weltweit die Hauptursache akuter Hepatitis (1). Das Virus wurde erstmalig bei einem Hepatitis-Ausbruch 1978 in Kaschmir beschrieben, der weder auf das Hepatitis-A- noch auf das Hepatitis-B-Virus zurückgeführt werden konnte (2). Zunächst als ein Erreger der Non-A/Non-B-Hepatitis bezeichnet, konnte das Virus in einem Selbstversuch durch elektronenmikroskopische Aufnahmen im Stuhl nachgewiesen werden (3). Die globale Krankheitslast der enteral übertragenen Hepatitis E wurde im Jahr 2005 auf 20,1 Millionen Infektionen geschätzt, wovon 3,4 Millionen symptomatisch und 70.000 tödlich verliefen (4). Für 2015 schätzte die WHO die durch Hepatitis E bedingten Todesfälle auf 44.000 (5). In tropischen und subtropischen Ländern kommt es regelmäßig zu größeren Ausbrüchen (6). Dementgegen galt die Hepatitis E in Industrieländern zunächst als reiseassoziierte Erkrankung (7), jedoch änderte sich dieses Bild um die Jahrtausendwende mit einer steigenden Zahl an Berichten über autochthone Fälle (8). Mittlerweile ist belegt, dass in industrialisierten Ländern HEV ebenso endemisch ist, die Übertragung aber nicht fäkal-oral wie bei größeren Ausbrüchen, sondern hauptsächlich zoonotisch oder über Blutprodukte sporadisch stattfindet (9,10). In Deutschland ist die Infektion mit HEV seit 2001 meldepflichtig, wobei die jährlichen Meldezahlen seitdem kontinuierlich stiegen und im Jahr 2019 ein neues Maximum von 3714 Fällen erreichten.

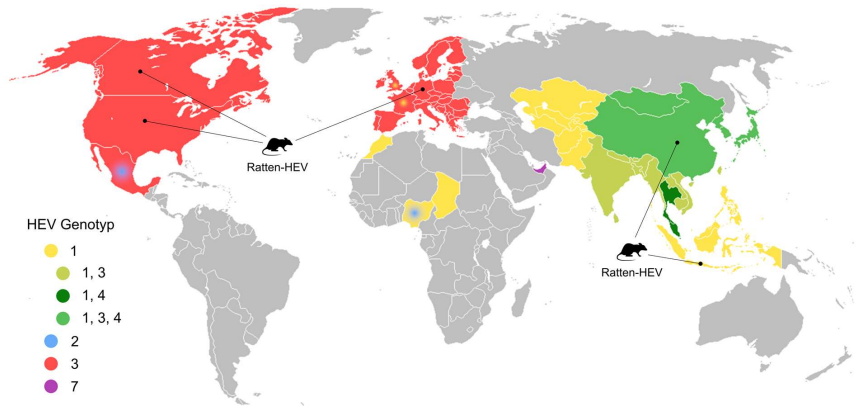
## 1.1 Taxonomie und Epidemiologie

Die Familie der *Hepeviridae* umfasst die Gattungen *Piscihepevirus* und *Orthohepevirus*. Die Gattung *Orthohepevirus* ist weiter unterteilt in die Arten *Orthohepevirus A*, *B*, *C* und *D*. Betrachtet man den phylogenetischen Baum in Abbildung 1, der repräsentative Gesamtgenomsequenzen und Sequenzen länger als 5,5 kb der Familie *Hepeviridae* enthält, erkennt man die Verwandtschaft der einzelnen Arten.

**A****B**

**Abbildung 1.** Phylogenetische Verwandtschaft innerhalb der Familie *Hepeviridae* und der Gattung *Orthohepevirus A*. **(A)** Der phylogenetische Baum der Familie *Hepeviridae* umfasst repräsentative Sequenzen mit einer Länge von mindestens 5,5 kb (GenBank-Abfrage am 31.01.2020) und wurde mit *Piscihepevirus* als Außengruppe verwurzelt. **(B)** Der phylogenetische Baum der Gattung *Orthohepevirus A* besteht aus den (sub-)genotypisierten Sequenzen nach Smith et al., 2020 (11) und wurde mit Elch-HEV verwurzelt. Die Sequenzen wurden mit MAFFT angealigniert und in RAxML prozessiert. Über die Maximum-Likelihood-Methode und einem 1000 Replikate umfassenden Bootstrap wurde der Baum mit der höchsten Passgenauigkeit errechnet, in FigTree visualisiert und mittels Inkscape beschriftet. Ra, Kaninchen (engl. rabbit).

*Orthohepevirus A*, gemeinhin bezeichnet als Hepatitis-E-Virus (HEV), ist derzeit in acht Genotypen unterteilt (11). HEV-1 infiziert ausschließlich Menschen und ist endemisch in Asien und Afrika. Zudem treten gehäuft Fälle in Frankreich und dem Vereinigten Königreich auf. HEV-2 ist ebenfalls auf den Menschen beschränkt, konnte bisher aber nur in Mexiko und Nigeria nachgewiesen werden. HEV-3 ist derzeit in 14 Subtypen (HEV-3a bis m und HEV-3ra) untergliedert, die sich wiederum zu drei monophyletischen Gruppen 3abchij(+klm), 3efg und 3ra zusammensetzen (siehe Abbildung 1B). Dieser Genotyp ist endemisch in Europa, Asien und Amerika und befällt abhängig vom Subgenotyp hauptsächlich den Menschen, Paarhufer (wie Schweine, Rinder und Ziegen), sowie Kaninchen und Hasen, konnte aber auch in Primaten und Mangusten nachgewiesen werden. In Europa kommen die Subtypen HEV-3c, e und f am häufigsten vor (12). Ein ähnlich breites Wirtsspektrum weist das nur in Asien verbreitete HEV-4 auf. Die Genotypen HEV-5 und -6 wurden bisher nur in Wildschweinen in Japan detektiert, HEV-7 und -8 in Kamelen aus dem Nahen Osten und China. Von diesen vier Genotypen ist lediglich ein humanpathogener Fall mit HEV-7 bekannt (13). Das enge Wirtsspektrum der restlichen Arten legt die Bezeichnungen Vogel-HEV (*Orthohepevirus B*), Nager-/Frettchen-HEV (*Orthohepevirus C*) und Fledermaus-HEV (*Orthohepevirus D*) nahe. Dabei sticht *Orthohepevirus C* heraus, da diese Art kürzlich auch im Menschen nachgewiesen werden konnte, was eine Übertragung vom Nager auf den Menschen nahelegt (14,15). Engverwandte Gesamtgenome konnten bisher aus Kanada, USA, Deutschland, China und Indonesien sequenziert werden. Der Nachweis von *Orthohepevirus C* im Turmfalken deutet zudem auf eine alimentäre Transmission von Nagern auf Raubvögel hin. Bisher nicht klassifizierte *Orthohepevirus*-Arten konnten im Elch und in Spitzhörnchen nachgewiesen werden. Eine Übersicht über die weltweite Verteilung humanpathogener HEV-Varianten ist in Abbildung 2 zu sehen.

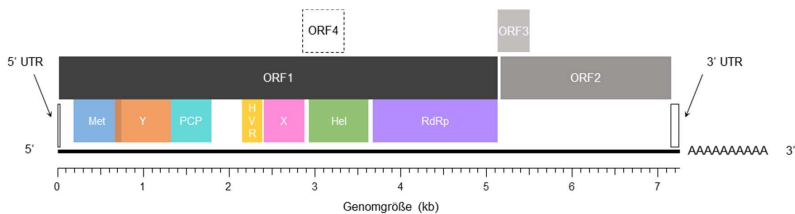


**Abbildung 2.** Schematische Darstellung der weltweiten Verteilung humanpathogener HEV-Genotypen. Die Basiskarte stammt von <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c3/BlankMap-World.png> und wurde mittels GIMP eingefärbt, basierend auf mindestens 5,5 kb langen *Orthohepevirus A*-Sequenzen die bis zum 31.01.2020 in die GenBank eingetragen wurden.

Die Seroprävalenz in Form von anti-HEV IgG-Antikörpern nimmt mit dem Alter zu und unterliegt geografisch sehr starken Schwankungen (16). Bedauerlicherweise wird die Ermittlung der Seroprävalenz stark vom verwendeten Test beeinflusst (17) was es erschwert, unabhängige Studien, die nicht mit dem gleichen Test durchgeführt wurden, miteinander zu vergleichen. Mehrere Metaanalysen haben dies jedoch versucht und kamen zu dem Schluss, dass die Seroprävalenz in der europäischen Allgemeinbevölkerung unter Verwendung des sensitivsten Testsystems zwischen 7,5 und 31,9% beträgt (18–20). Frankreich, Dänemark, Niederlande und Polen gelten dabei als Hochrisikoländer. Zudem gibt es hyperendemische Gebiete wie Ariège in Südfrankreich, das mit 86,4% eine mehr als zehnmals so hohe Seroprävalenz aufweist wie das nur 350 km entfernte Haute Loire mit 8,0% (21). Verglichen mit Europa weisen die USA eine ähnlich hohe Seroprävalenz auf. In Südamerika wird sie dagegen ähnlich bis lediglich halb so hoch geschätzt (20,22). In Deutschland hat die Seroprävalenz seit den 1990er Jahren nachweislich abgenommen und pendelt sich seit 2010 um ~15–30% ein, wobei sich Männer öfter als Frauen infizieren (17,23–25).

## 1.2 Morphologie und Replikationszyklus

HEV besteht aus einem 32–34 nm großen Virion, in das ein einzelsträngiges RNA-Genom positiver Polarität (Einzel(+)-Strang RNA) verpackt ist (26). Das 7,2 kb lange HEV-Genom (siehe Abbildung 3) ist am 5'-Ende durch eine Cap-Struktur geschützt und am 3'-Ende polyadenyliert (27,28). Drei offene Leserahmen (open reading frame, ORF) kodieren für Nicht-Struktur-Proteine (ORF1), das Kapsidprotein (ORF2) und ein multifunktionelles Phosphoprotein (ORF3). Durch den Sequenzabgleich des ORF1 mit Proteinen anderer Einzel(+)-Strang RNA-Viren konnten funktionelle Domänen einer Methyltransferase (Met), Y-Domäne (Y), Papain-ähnlichen Cysteinprotease (PCP), X-Domäne (X), RNA-Helikase (Hel) und einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp, engl. RNA-dependent RNA polymerase) identifiziert werden (29). Des Weiteren findet sich eine prolinreiche Region im ORF1, welche als hypervariable Region (HVR) wahrscheinlich eine strukturelle Rolle spielt, die eher von Länge und Aminosäurezusammensetzung als von der spezifischen Sequenz bestimmt wird (30). Bisher ist noch nicht geklärt, ob das ORF1-Polyprotein in separate, funktionelle Untereinheiten prozessiert wird. Dem ORF1 vorgelagert und dem ORF2 nachgelagert findet sich jeweils eine untranslatierte Region (UTR). Zudem wurde die Translation eines ORF4 beschrieben, welches ausschließlich von HEV-1 kodiert wird und in Verbindung mit dem Wirtsfaktor eEF1 $\alpha$ 1 (eukaryotischer Elongationsfaktor 1 Isoform-1) die Aktivität der RdRp stimuliert (31).



**Abbildung 3.** Schematische Darstellung des am 5'-Ende durch eine Cap-Struktur geschützten und am 3'-Ende polyadenylierten HEV-Genoms. UTR, untranslatierte Region; ORF, offener Leserahmen (engl. open reading frame); Met, Methyltransferase; Y, Y-Domäne; PCP, Papain-ähnliche Cysteinprotease; HVR, hypervariable Region; X, X-Domäne; Hel, RNA-Helikase; RdRp, RNA-abhängige RNA-Polymerase (engl. RNA-dependent RNA polymerase); kb, Kilobasen.

HEV kommt einerseits unbehüllt (nHEV, engl. naked) in Stuhl und Galle vor, andererseits quasi-behüllt (eHEV, engl. quasi-enveloped) in Blut, Urin und Zellkulturüberstand (32,33). Die Hülle setzt sich aus Lipiden und ORF3-Proteinen zusammen und

vergrößert das Virion auf 40 nm (34,35). In dieser Form ist HEV nicht so infektiös da sich nHEV deutlich effektiver an Zellen anheftet und in vitro 90% des Maximums an Infektion bereits nach 3 Stunden erreicht ist, wohingegen eHEV dafür 6 Stunden benötigt. Zudem werden durch eHEV nur halb so viele Zellen infiziert, selbst wenn die Inokulationsdauer auf 12 Stunden angehoben wird (36).

Die Infektion beginnt mit der Aufnahme von HEV in die Zelle. Dieser Prozess verläuft für nHEV und eHEV unterschiedlich. Studien mit HEV-ähnlichen Partikeln (HEV-LP, engl. HEV-like particle) zeigten, dass sich diese über Heparansulfat-Proteoglykane und Asialoglycoprotein-Rezeptoren an die Zelle anheften und nachfolgend über Dynamamin-2-, Clathrin- und Membran-Cholesterol-abhängige Wege in die Zelle gelangen (37–39). Wie sich eHEV an die Zelle anheftet, ist bisher nicht bekannt, in dieser Form gelangt das Virus aber hauptsächlich über die Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zelle und ist dabei auf den Rab5- und Rab7-abhängigen endosomalen Transport angewiesen, in dessen Verlauf die Quasi-Hülle nach endosomaler Ansäuerung degradiert wird (36). Nachdem HEV in die Zelle gelangt ist, wird das Einzel(+)-Strang RNA-Genom aus dem Kapsid freigegeben und im Zytoplasma über ribosomale Translation in Nicht-Struktur-Proteine (ORF1-Polyprotein) übersetzt. Infolgedessen führen die funktionellen Domänen der Met, Hel und RdRp zur Produktion viraler einzelsträngiger RNA negativer Polarität, die wiederum als Vorlage zur Produktion genomischer und bicistronisch, subgenomischer Einzel(+)-Strang-RNA dient. Aus letzterer gehen über ribosomale Translation die ORF2- und ORF3-Proteine hervor (40).

Das ORF2-Protein wird dabei in drei Formen produziert: ORF2i (infektiös/intrazellulär), ORF2g (glykosyliert) und ORF2c (gespalten, engl. cleaved). ORF2g und ORF2c werden zwar in großen Mengen produziert und sezerniert, aber nur ORF2i, welches höchstwahrscheinlich nicht in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums geschleust wird, ist letztlich mit infektiösen Virionen assoziiert. Demnach werden auch zwei unterschiedliche ORF2-Produktionswege vorgeschlagen. Zum einen ein unproduktiver Weg, in dem große Mengen an ORF2-Proteinen über den Sekretionsweg prozessiert und zügig sezerniert werden. Zum anderen ein produktiver Weg, in dem ORF2-Proteine aus dem Zytosol zur Virusassemblierung geleitet werden (41). Zwei der drei unterschiedlichen ORF2-Proteine konnten in einer unabhängigen Studie ebenfalls nachgewiesen werden: ORF2g, bezeichnet als ORF2<sup>S</sup> (sezerniert) und



ORF2<sup>i</sup>, bezeichnet als ORF2<sup>c</sup> (Kapsid-assoziiert, engl. capsid-associated). Die Initiation der Translation von ORF2<sup>s</sup> findet hierbei am gemeinhin angenommenen AUG-Startcodon statt. Hingegen beginnt die Translation des ORF2<sup>c</sup> an einem internen AUG-Codon, das 15 Codons hinter dem ersten AUG liegt. Der Großteil an ORF2<sup>s</sup> wird in Form von glykosylierten Dimeren sezerniert und ist in der Lage, die Antikörper-vermittelte Neutralisierung von HEV zu inhibieren. Aufgrund von selektivem Verlust an Epitopen blockiert ORF2<sup>s</sup> aber nicht die Bindung und den Eintritt von HEV in die Zelle (42). ORF2<sup>c</sup> verbleibt im Zytosol und assembliert zu infektiösen Virionen. Die virale genomische RNA wird vermutlich an das ORF2-Protein über eine 76 nt lange Sequenz am 5'-Ende gebunden, die als Enkapsidierungssignal erkannt wird (43).

Ähnlich wie ORF2, beherbergt ORF3 mehrere *in frame*-Startcodons. Es konnte gezeigt werden, dass das dritte Startcodon das authentische ist und die ersten beiden in der subgenomischen RNA gar nicht erst vorhanden sind (44). Nach der Assemblierung interagiert das ORF3-Protein mit den Virionen und Wirtsfaktoren und es kommt zur Ausschleusung. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind nicht sehr gut charakterisiert, der Verlauf kann aber wie folgt skizziert werden (45). Phosphoryliertes ORF3-Protein interagiert mit nicht glykosyliertem ORF2-Protein (46) und einer Reihe an Wirtsproteinen wie Mikrotubuli und TSG101 (engl. tumor susceptibility gene 101) (47,48). Letzteres interagiert mit prolinreichen Motiven des ORF3 welches so die ESCRT-Maschinerie (engl. endosomal sorting complexes required for transport) nutzt um Virionen in multivesikuläre Körperchen (MVB, engl. multivesicular bodies) zu laden (48). Im weiteren Verlauf ist das Protein Rab27a involviert, das für das Andocken der MVBs an die Zellmembran wichtig ist und zusammen mit dem Protein Hrs (ESCRT-0-Komponente) für die Sezernierung der Exosomen benötigt wird (49–51). Neben der Interaktion mit Wirtsproteinen, können ORF3-Proteine oligomerisieren und als Ionenkanäle fungieren, die für die Freisetzung infektiöser Virionen benötigt werden. Diese Ionenkanäle ähneln strukturell den Viroporinen der Klasse I, die eine einzelne transmembrane Helix besitzen (52). In vitro wird HEV überwiegend apikal in Gallenflüssigkeit freigesetzt und nur ein kleiner Bruchteil basolateral in das Blut (53). Im Menschen zirkuliert das Virus während einer akuten Infektion in der behüll-

ten Form im Blut. Die Quasihülle wird vom Virion dissoziiert, sobald es in den Gallengang abgegeben wurde und wird letztlich unbehüllt über den Stuhl ausgeschieden (33).

### **1.3 Transmission**

Die Übertragungswege von HEV sind Genotyp-abhängig. So werden HEV-1 und -2 fäkal-oral von Mensch zu Mensch über verunreinigtes Wasser hauptsächlich in tropischen und subtropischen Regionen Asiens, Afrikas und Südamerikas übertragen und verursachen regelmäßig größere Ausbrüche (54,55). Die globale Krankheitslast dieser Genotypen wurde im Jahr 2005 auf 20,1 Millionen Infektionen geschätzt, wovon 3,4 Millionen symptomatisch und 70.000 tödlich verliefen (4). Mittels Daten über die Populationsdichte, jährliche Evapotranspiration und saisonalen Niederschläge lassen sich auf globaler Ebene HEV-1 und -2 Ausbrüche am besten vorhersagen. Auf regionaler Ebene beeinflusst der Wasserpegel des Ganges die Zahl der Ausbrüche. Je mehr Wasser der Fluss führt, desto weniger Ausbrüche treten auf, was wohl auf eine Verdünnung der Erregerkonzentration zurückgeführt werden kann (6).

Die Übertragung von HEV-3 und -4 ist hingegen vielfältiger. Diese Genotypen werden alimentär beispielsweise über rohes oder nicht genügend erhitztes Schweine- und Wildfleisch übertragen (56,57). Auch in verarbeiteter Form bleibt das Virus in Rohwürsten wie Figatellu infektiös und wird übertragen (58). Neben der alimentären Übertragung werden HEV-3 und -4 ebenso parenteral über Blutprodukte übertragen (59,60). In Europa sind derzeit 0,03 bis 0,14% der Blutspenden virämisch (10), in Deutschland im Mittel eine unter 1324 (61–63). In diesem Kontext ist es wichtig zu erwähnen, dass das Vorhandensein von anti-HEV IgG-Antikörpern nicht zwingend vor Infektion schützt und es darüber hinaus zu Episoden von Reinfektionen kommen kann. Empirisch scheint eine Antikörperkonzentration von <7 World Health Organization (WHO) Units pro ml (WU/ml) nicht sicher protektiv zu sein (64,65). Aufgrund der potentiellen Gefährdung von Patienten durch mit HEV kontaminierte Blutprodukte wurde durch das Paul-Ehrlich-Institut eine verpflichtende Testung von Blutprodukten auf HEV-RNA ab dem 01.01.2020 eingeführt. Für Quarantäne-gelagerte therapeutische Frischplasmen gilt diese Testanordnung ab 01.01.2021. Eine sexuelle Übertra-

gung oder Übertragung von Person zu Person kann bei HEV-3 und -4 nicht angenommen werden (66,67). Dagegen gelten als potentielle Risikofaktoren ein Alter von über 45 Jahren (lebenslange kumulative Exposition), Verzehr von (un-)verarbeitetem Schweine- und Wildfleisch, Konsum von nicht abgepacktem Trinkwasser, sowie regelmäßiger Kontakt zu Schweinen und Wild (21,68).

## 1.4 Klinik

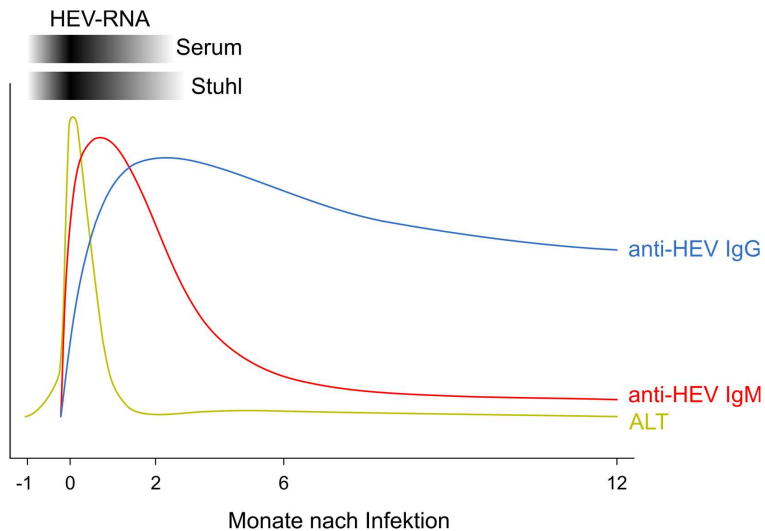
Der Großteil der Infektionen mit HEV verläuft asymptomatisch. So lässt sich für Deutschland grob berechnen, dass bei jährlich 417.242 Serokonversionen (23) und der im Jahr 2019 insgesamt 3.714 gemeldeten Fälle (Robert Koch-Institut: SurvStat@RKI 2.0, <https://survstat.rki.de>, Abfragedatum: 31.01.2020) nur einer in 112 Fällen symptomatisch wird. Nach einer Inkubationsphase von 2–9 Wochen können erste unspezifische Grippe-ähnliche Symptome wie Fieber, Myalgie, Arthralgie, Müdigkeit und Appetitverlust beobachtet werden. Bei manchen Patienten kann die Infektion zu einer klassischen akuten Hepatitis mit Ikterus und erhöhten Leberwerten (Transaminasen AST und ALT, Bilirubin, ALP und  $\gamma$ -GT) fortschreiten (69), wobei die Mortalität bei 1–4% liegt (16). Abhängig vom Genotyp werden schwerere Verläufe bis hin zum Tod bei schwangeren Frauen (HEV-1) bzw. eine Häufung von akuter Hepatitis mit schwereren Verläufen bei älteren Männern (HEV-3) beschrieben (68,70,71). In aller Regel ist die Hepatitis E selbstlimitierend, jedoch kann eine Infektion mit HEV-3, -4 oder -7 auch chronisch verlaufen, was durch eine persistente Infektion von mindestens drei Monaten definiert ist (13,72–75). Diese Definition scheint jedoch zu eng gefasst und sollte auf 6 Monate angehoben werden, da spontane Viruseliminationen in immunsupprimierten Patienten auch nach 3-monatiger Virämie beschrieben sind (76). Chronische Infektionen sind bisher ausschließlich bei Patienten mit einem geschwächten Immunsystem beschrieben – sei es durch die Gabe von Immunsuppressiva oder aufgrund einer Koinfektion mit HIV. Bei 10% der Patienten kann eine chronische HEV-Infektion zu einer chronischen Hepatitis führen, die sich rasch zu einer Leberzirrhose weiterentwickeln kann, woran einige dieser Patienten 2–3 Jahre nach Diagnose versterben (77).

Mittlerweile sind eine Reihe an HEV-assoziierten extrahepatischen Manifestationen beschrieben, wobei es sich am häufigsten um neurologische Komplikationen wie

neuralgische Schulteramyotrophie, Guillain-Barré-Syndrom, Enzephalitis und Myasthenia gravis handelt (78–81). Aber auch Erkrankungen wie Thrombozytopenie, Kryoglobulinämie und Glomerulonephritis wurden mit einer HEV-Infektion in Verbindung gebracht (82–84).

## 1.5 Diagnostik

Eine akute Hepatitis E geht in der Regel einher mit erhöhten Leberwerten. Demnach können erhöhte Transaminasen (ALT und AST), ALP und/oder  $\gamma$ -GT ein Hinweis auf eine Hepatitis E sein, was durch den Nachweis des Virusgenoms mittels PCR abgeklärt werden kann. HEV-RNA ist während einer Infektion für ~2–10 Wochen in Serum und etwas länger im Stuhl nachweisbar (siehe Abbildung 4) (85,86).



**Abbildung 4.** Schematische Darstellung der Verlaufskurven relevanter Marker in der Diagnostik einer akuten Hepatitis E.

Bereits zu Beginn der Infektion werden anti-HEV IgM- und zu einem geringeren Maße anti-HEV IgG-Antikörper gebildet (86). Die Detektion von anti-HEV IgM- bzw. ein mindestens vierfacher Anstieg der anti-HEV IgG-Antikörper in einem Folgeserum sind daher kein Beleg, aber ein Hinweis auf eine frische Infektion. Experimentell kann

zudem die Avidität von anti-HEV IgG über das Einführen von Harnstoffpuffer im Testablauf bestimmt werden, um eine frische von einer abgelaufenen Hepatitis E zu unterscheiden bzw. um eine Reinfektion zu diagnostizieren (65,87). Die Antikörper können mittels unterschiedlicher Testsysteme wie ELISA und Immunoblot detektiert werden. In den Anfängen hatten diese serologischen Testsysteme teils Probleme mit Kreuzreaktivitäten und variierten voneinander stark in ihrer Sensitivität (17,88). Mittlerweile detektieren kommerzielle serologische Tests aber zuverlässig anti-HEV Antikörper in immunkompetenten Patienten. Ein Antigennachweis mit einer Spezifität von 100% ist zwar verfügbar, spielt aber aufgrund der geringeren Sensitivität gegenüber der PCR in der Routinediagnostik keine Rolle (89). Zudem ist die Sensitivität bei anti-HEV IgG-positivem Serostatus zusätzlich verringert (90). Der Antigennachweis scheint allerdings zuverlässiger eine akute HEV-Infektion anzuzeigen, als dies mit dem Nachweis von anti-HEV IgM der Fall ist (91).

## **1.6 Behandlung und Prävention**

Gegenwärtig gibt es keine spezifisch für die Behandlung von HEV-Infektionen zugelassene Medikamente. Die erste erfolgreiche Elimination des Virus konnte in chronisch mit HEV infizierten organtransplantierten Patienten durch die Reduzierung der Immunsuppression erreicht werden (92). Diese Strategie führte jedoch nur in 4 von 16 Patienten zum Erfolg und so war der nächste Schritt die Behandlung von chronischen HEV-Trägern mit pegyliertem Interferon- $\alpha$  (Peg-IFN- $\alpha$ ). Eine Reihe an kleinen Fallserien zeigte zusammengefasst eine erfolgreiche Behandlung in 6 von 7 Patienten (93–96). Zeitgleich konnte eine ähnlich hohe Erfolgsquote für das Nukleosidanalogen Ribavirin (RBV) ermittelt werden (97,98). Da Peg-IFN- $\alpha$  jedoch für viele Organtransplantierte kontraindiziert ist, wurde die Effektivität von RBV in einer multizentrischen Studie untersucht und mit einer HEV-Eliminationsrate von 95% dokumentiert (99). Allerdings kam es bei 10 Patienten zu einem Rückfall, weshalb die Rate des andauernden virologischen Ansprechens (SVR) bei 78% lag. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine weitere Studie, in der bei Non-Respondern eine einzigartige Nukleotidsubstitution nachgewiesen werden konnte, die zu der G1634R-Mutation in der RdRp führte (100). Seitdem wurden eine Reihe weiterer Ribavirin-assoziiierter Mutationen beschrieben, welche bis vor kurzem noch als analytische und sogar vorhersagende Marker für Therapieversagen diskutiert wurden und auf das mutagenetische

Potential von RBV hindeuteten (101–104). Jedoch zeigte sich bereits bei der Entdeckung der G1634R-Mutation, dass diese in vitro keine Resistenz gegenüber RBV vermittelt (100) und eine kürzlich veröffentlichte großangelegte multizentrische Studie kam zu dem Schluss, dass RBV-assoziierte Mutationen im HEV-Genom keine Auswirkung auf die Elimination des Virus haben (105). Dabei spielte es keine Rolle, ob RBV-assoziierte Mutationen bereits vor oder während der Behandlung auftraten. Zudem lag in dieser Studie die SVR nach einem ersten Behandlungszyklus bei 81,2% und konnte durch einen nicht bei allen Patienten anwendbaren zweiten Behandlungszyklus auf insgesamt 89,8% gesteigert werden. Zwischenzeitlich wurde eine Reihe weiterer Substanzen identifiziert, welche in vitro die HEV-Replikation hemmen (106). So zeigt sich Silvestrol als vielversprechende Alternative zu RBV (107) mit einer IC<sub>50</sub> von 4 bis 6,6 nM in vitro und erfolgreicher Anwendung im Mausmodell (108). Letztlich muss aber die Hürde der HEV-Elimination im Menschen genommen werden, an welcher Sofosbuvir erst kürzlich gescheitert ist (109). Dieses als Nukleotid-Prodrug gegen das Hepatitis-C-Virus zugelassene Medikament zeigte zu Beginn eine vielversprechende antivirale Wirkung in vitro (110), die jedoch kurz darauf in einer nachfolgenden Studie relativiert wurde (111). Ebenso zeichnete sich bei der Anwendung in vivo ein kontroverses Bild ab und galt bis zuletzt als nicht evidenzbasierte Alternative oder Anschlusstherapie zur RBV-Monotherapie gegen die Hepatitis E (112–114). Zusammenfassend ist die Ribavirin-Monotherapie mit einer SVR-Rate von über 80% nach einer initialen Reduktion der Immunsuppression derzeit das Mittel der Wahl. Peg-IFN- $\alpha$  kann für lebertransplantierte Non-Responder in Betracht gezogen werden, ist jedoch bei Empfängern von Nieren-, Bauchspeicheldrüsen-, Herz- und Lungentransplantaten kontraindiziert (115).

Eine präventive Impfung gegen HEV ist nur in China verfügbar und unter dem Namen Hecolin® lizenziert. Die Wirksamkeit der Impfung nach 3 Dosen liegt im ersten Jahr bei 100% und fällt innerhalb von 4,5 Jahren auf 86,8% (116,117). Dies könnte daran liegen, dass die anti-HEV IgG-Konzentration bei den Studienteilnehmern nach 7–31 Monaten nach der ersten Dosis unter die vermeintlich protektive Antikörperkonzentration von ~7 WU/ml gefallen ist (64,65,117). Derzeit befindet sich ein weiterer Impfstoffkandidat in einer klinischen Phase II-Studie (118). Ein ebenfalls auf dem ORF2 basierender Impfstoffkandidat hatte diese Hürde bereits 2007 genommen und

eine Wirksamkeit von 95,5% gezeigt (119), wurde aber womöglich aufgrund von fehlendem wirtschaftlichem Interesse nicht weiter entwickelt (118).

## 1.7 Zellkultur-basiertes Infektionssystem

Erstmals wurde HEV 1987 in der Leberkarzinomzelllinie PLC/PRF/5 isoliert, mit dem Ziel, das damals noch unbekannte Virus zu charakterisieren und von anderen Non-A/Non-B-Viren abzugrenzen (120). In den folgenden Jahren konnten die HEV-1-Stämme 87A in 2BS (121), sowie Sar-55 und F23 in PLC/PRF/5 (122) isoliert werden und finden teils heute noch Anwendung. So konnten mit diesen Stämmen serologische Nachweissysteme und Neutralisationstests etabliert und HEV weiter charakterisiert werden. Doch bereits in den Anfängen wurde klar, dass HEV schwer zu kultivieren ist und hohe Viruslasten *in vitro* nicht erreicht werden (122,123).

Dies änderte sich 2007, als es gelang, HEV-3b aus dem Stuhl eines akut infizierten Patienten aus Japan in zwei von 21 ausgewählten Zelllinien zu isolieren: Mittels der Lungenkarzinomzelllinie A549 und der Leberkarzinomzelllinie PLC/PRF/5 (124). Erstmals konnten mit diesem als JE03-1760F betiteltem Isolat nach konsekutiven Passagen hohe Viruslasten von bis zu  $10^8$  HEV-RNA-Kopien/ml (K/ml) im Zellkulturüberstand erreicht werden. Der Grund für diesen Erfolg blieb unklar, wurde aber in der hohen Viruslast des Inokulums ( $2 \times 10^7$  K/ml) vermutet. Das Zellkultursystem inklusive der hohen Viruslasten konnte von derselben Arbeitsgruppe um Okamoto mit weiteren HEV-3- und -4-Stämmen aus dem Menschen, Haus- und Wildschweinen reproduziert werden (33,125,126). Allerdings scheiterten Versuche von anderen Arbeitsgruppen, das Zellkultursystem zu reproduzieren (127–129) und seither konnten nur vier weitere HEV-Stämme von anderen Gruppen isoliert werden, die zu hohen Viruslasten replizieren. Drei dieser Stämme (47832c, LBPR-000379 und Kernow-C1) wurden von chronisch infizierten Patienten isoliert (130–132) und weisen alle zusammen eine für das Wildtyp-HEV untypische Besonderheit auf: Eine Insertion in der hypervariablen Region, die die Replikation des Virus *in vitro* begünstigt (133). Der vierte Stamm wurde aus einem experimentell infizierten Schwein isoliert und replizierte nur in PLC/PRF/5, die zuvor in einem rotierenden Bioreaktor zu dreidimensionalen Zellkulturen vermehrt wurden, nicht aber in den üblicherweise einschichtig gewachsenen Kulturen (128). Um die Hürde der eventuell zu niedrigen Konzentration an tatsächlich

infektiösem Virus im Ausgangsmaterial zu umgehen, kann das vollständige HEV-Genom als cDNA über Transfektion in die Zelle eingebracht werden, um so infektiöse Nachfolgevirionen im Zellkulturüberstand zu generieren (134–136).

Demnach sind die aktuell beschriebenen Zellkultursysteme nicht vollständig reproduzierbar, benötigen täglich manuelle Versorgung, erfordern komplexe Gerätschaften, umgehen den Schritt der initialen natürlichen Infektion oder basieren auf HEV-Stämmen, die ungewöhnliche Insertionen aufweisen. Nach wie vor ist es strittig, ob diese Stämme sich wie Wildtyp-HEV verhalten (137). Der Mangel an effektiven, robusten und gleichzeitig simplen Zellkultursystemen, die hohe Konzentrationen an HEV produzieren, limitiert dabei nicht nur die Grundlagenforschung und direkte biochemische Analysen von viralen Proteinen (41). Darüber hinaus wird die Generierung eines inaktivierten oder attenuierten Lebendimpfstoffs, die Suche nach spezifisch wirkenden Medikamenten und Identifikation von Inaktivierungsstrategien erschwert.

Die Motivation dieser Arbeit war deshalb, die HEV-Zellkultur wie folgt zu untersuchen, zu verbessern, zu erweitern und zu vereinfachen:

- (i) Reduzierung der täglichen, manuellen Versorgung
- (ii) Einfluss der Zellkonfluenz auf die Suszeptibilität
- (iii) Einfluss von diversen Mediumsupplementen
- (iv) Vergleich der Permissivität verschiedener kontinuierlicher Zelllinien
- (v) Isolierung neuer Wildtyp-HEV-Stämme
- (vi) Bestimmung der Langzeitstabilität von HEV-produzierenden Zellen



## 2. Material

### 2.1 Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Brutschrank ICO240med	Memmert, Schwabach, Deutschland
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
EZ1 Advanced XL	Qiagen, Venlo, Niederlande
Feinwaage MC 210 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence, Osaka, Japan
Geldokumentationssystem Alphamager HP	ProteinSimple, San José, CA, USA
Gelelektrophoresekammer	UR, Regensburg Deutschland
Handdispenser Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipette Reference® 0,5–10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipette Reference® 10–100 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipette Reference® 20–200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipette Reference® 100–1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Magnetrührer MR 2000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Mehrkanalpipette Transferpette®-8 50–200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mehrkanalpipette Transferpette®-12 20–200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop FLUOVERT FU	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrotiterplatten-Photometer Infinite F50	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mini-Zentrifuge Sprout	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Netzteil E425	Consort, Turnhout, Belgien
NucleoVac 96 Vakuumkammer	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Real-Time PCR System StepOnePlus™	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Sicherheitswerkbank	BDK, Sonnenbühl, Deutschland
Spektralfotometer NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Stickstofftank BIOSAFE® MD 1000	Cryotherm, Kirchen (Sieg), Deutschland
Thermocycler Veriti™ 60 Well	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tiefkühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Ulratiefkühlschrank Innova U725	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vakuumpumpe Welch™ WOB-L™ 2522C-02	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vortexer Genie 2™	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage E1200S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasseraufbereitungssystem Milli-Q® PLUS	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Workstation Precision T3500	Dell Technologies, Round Rock, TX, USA
Workstation Z800	HP, Palo Alto, CA, USA
Zellzählgerät Vi-CELL™ XR	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge ROTANTA/RP	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge UNIVERSAL 320 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Desinfektionstücher Incidin™ OxyWipe S	Ecolab, Monheim am Rhein, Deutschland
Handschuhe Gentle Skin® grip	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
Kanüle Microlance™ 3 20G x 1½" Nr. 1	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
MicroAmp™ optische 96-Well-Reaktionsmikrotiterplatte 0,1 ml	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
MicroAmp™ optische 8-Verschlussstreifen	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Mikro-Schraubröhre 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
NucleoFast 96 Well Ultrafiltrationsplatte	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
PCR SoftTubes 0,5 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze Combitips advanced®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze SafeSeal SurPhob 10 µl, extra lang	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze SafeSeal SurPhob 200 µl, XL	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze SafeSeal SurPhob 1250 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reagenzreservoir 100 ml	VWR, Radnor, PA, USA
Reagiergefäß SafeSeal 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 1 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritze Discardit™ II 2 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Spritze Discardit™ II 5 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Spritzenvorsatzfilter Filtrapur S 0,2 (PES Membran)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Vi-CELL™ 4 ml Probengefäß	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Zellkulturflasche Falcon® 12,5 cm², belüftet	Corning, Corning, NY, USA
Zellkulturflasche Falcon® 25 cm², belüftet	Corning, Corning, NY, USA
Zellkulturflasche Falcon® 75 cm², belüftet	Corning, Corning, NY, USA
Zellkulturflasche Falcon® 175 cm², belüftet	Corning, Corning, NY, USA
Zellkulturplatte 6 Well, Standard, F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte 12 Well, Standard, F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte 24 Well, Standard, F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte 48 Well, Standard, F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte 96 Well, Standard, F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte µ-Platte 96 Well, schwarz	Ibidi, Gräfelfing, Deutschland

## 2.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose LE	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Amphotericin B	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Borsäure EMSURE®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MEM Eagle mit EBSS und 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> ohne L-Glutamin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
FCS	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Gentamicin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
H <sub>2</sub> O DEPC-behandelt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
H <sub>2</sub> O LiChrosolv®	Merck, Darmstadt, Deutschland
H <sub>2</sub> O nukleasefrei	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
H <sub>2</sub> O steril für Zellkultur	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
KCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NEAA	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
NxtScript Reaktionsmix, 5× konz.	Roche, Basel, Schweiz
MgCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
MgSO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS <sub>0</sub> (ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	Lonza, Basel, Schweiz
PBS <sub>m</sub> (mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	IMHR, Regensburg, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
ROX-Referenzfarbstoff	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Saccharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
SlowFade™ Diamond Eindeckmittel mit DAPI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TRIS-Puffer Trizma® base	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Tween-20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Xylencyanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

## 2.4 Puffer und Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
BMEM	MEM supplementiert mit: 10% FCS hitzeinaktiviert (56 °C, 30 Min.) 2 mM L-Glutamin 1% NEAA 100 U/ml Penicillin G 100 µg/ml Streptomycin
BMEM_G	MEM supplementiert mit: 10% FCS hitzeinaktiviert (56 °C, 30 Min.) 2 mM L-Glutamin 1% NEAA 100 µg/ml Gentamicin
Ladepuffer 6×	40,00 g Saccharose 0,25 g Bromphenolblau 0,25 g Xylencyanol ad 100 ml Wasser, destilliert
MECK	BMEM supplementiert mit: 2,5 µg/ml Amphotericin B 10 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
MEMM	BMEM supplementiert mit: 2,5 µg/ml Amphotericin B 30 mM MgCl <sub>2</sub>
MEMM_G	BMEM_G supplementiert mit: 10 mM MgCl <sub>2</sub>
PBS <sub>0</sub> /BSA <sup>0.2%</sup>	0.2% BSA (w/v) in PBS <sub>0</sub>
PBS <sub>m</sub> /Tween-20 <sup>0.05%</sup>	0.05% Tween-20 (v/v) in PBS <sub>m</sub>
PBS <sub>m</sub> /BSA <sup>1%</sup>	1% BSA (w/v) in PBS <sub>m</sub>
TBE 10×	162,0 g Tris-Puffer 27,5 g Borsäure 9,2 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ad 1 l Wasser, destilliert

## 2.5 Humane Zelllinien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Gewebetyp</b>	<b>Quelle</b>
A549 (ATCC® CCL-185™)	Lungenkarzinom	ATCC, Manassas, VA, USA
A549/D3 (Subklon von A549)	Lungenkarzinom	Prof. Dr. Reimar Johné (138)
HepG2/C3A (ATCC® CRL-10741™)	Leberkarzinom	ATCC, Manassas, VA, USA
HuH-7-Lunet BLR (Subklon von HuH-7)	Leberkarzinom	Prof. Dr. Ralf Bartenschlager (139)
PLC/PRF/5 (ATCC® CRL-8024™)	Leberkarzinom	ATCC, Manassas, VA, USA

A549 synthetisieren Lecithin mit einem hohen Prozentsatz an ungesättigten Fettsäuren (140). Der Subklon A549/D3 ist gegenüber der Mutterzelllinie A549 empfänglich für niedrigere HEV-3c-Isolat-47832c-Konzentrationen und steigert dessen Replikation (138). Die Zelllinie HuH-7-Lunet BLR ist hochpermissiv für die Hepatitis-C-Virus-Replikation (139). PLC/PRF/5 produzieren kontinuierlich HBsAg (Hepatitis-B-Virus Oberflächenprotein, engl. hepatitis B virus surface antigen) (141,142), in den beiden anderen verwendeten Leberkarzinomzelllinien HepG2/C3A und HuH-7-Lunet BLR findet sich kein Hinweis auf das Hepatitis-B-Virus.

## 2.6 HEV-positives Material

ID	Probe	Material	HEV-RNA (K/ml)	Genotyp	Segment	Herkunft
P1	47832c	A549 ZKÜ	$\geq 2,1 \times 10^7$	3c	GGs	Johne et al. (130)
1	11-19131	Plasma	$1,9 \times 10^5$	3f	ORF2	54-jähriger Mann
2	12-09646	Serum	$4,9 \times 10^6$	3f	Met	19-jähriger Mann
3	13-05665	Stuhl	$3,0 \times 10^9$	3c	Met	23-jährige Frau
4	13-12015	Stuhl	$1,8 \times 10^5$	3f	Met	73-jährige Frau
5	13-12581	Stuhl	$2,2 \times 10^7$	3	Met	11-jähriger Mann
	13-14672	Plasma	$4,3 \times 10^3$	3	Met	77-jähriger Mann
6	13-14728	Plasma	$2,6 \times 10^4$	3	Met	68-jähriger Mann
7	13-16107	Stuhl	$3,0 \times 10^7$	3a	Met	n.v.
	14-16078	Stuhl	$1,1 \times 10^4$	3e	Met	72-jähriger Mann
P2	14-16753	Serum	$2,8 \times 10^6$	3c	GGs	59-jähriger Mann
P3	14-22707	Serum	$1,6 \times 10^6$	3e	GGs	65-jährige Frau
8	14-27736	Plasma	$6,2 \times 10^6$	3f	Met	50-jähriger Mann
9	14-31293	Serum	$1,5 \times 10^4$	3	Met	n.v.
P4	15-22016	Serum	$4,0 \times 10^8$	3f	GGs	63-jähriger Mann
10	15-22530	Serum	$4,0 \times 10^4$	3b	Met	67-jähriger Mann
11a	16-06145	Plasma	$1,8 \times 10^6$	3f	Met	72-jähriger Mann
11b	16-39721	Stuhl	$4,5 \times 10^7$	s.o.	s.o.	s.o.
12	17-02051	Serum	$2,4 \times 10^5$	3i	RdRp	50-jähriger Mann
13	17-06765	Stuhl	$4,6 \times 10^7$	3f	RdRp	39-jährige Frau
14	17-08073	Serum	$2,3 \times 10^5$	3f	RdRp	63-jähriger Mann
15	17-20382	Stuhl	$1,0 \times 10^6$	3m	RdRp	64-jährige Frau
16	17-24334	Serum	$1,7 \times 10^5$	3i	RdRp	55-jähriger Mann
17a	17-35930	Stuhl	$5,8 \times 10^3$	3a	RdRp	63-jähriger Mann
17b	17-36536	Serum	$3,5 \times 10^5$	s.o.	s.o.	s.o.
18	18-10820	Stuhl	$7,1 \times 10^8$	3	net	63-jähriger Mann
19	18-17601	Serum	$2,9 \times 10^6$	1g	net	50-jähriger Mann
20	18-19795	Serum	$9,0 \times 10^7$	3	net	73-jährige Frau

Die Proben stammten aus diagnostischen Rückstellproben des Instituts für Klinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Regensburg (IMHR) und waren bis zur Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Die Genotypisierung erfolgte mittels bereits verfügbarer Sequenzdaten aus der Diagnostikabteilung des IMHR (Met und ORF2 nach Wenzel et al. (56), RdRp nach John et al. (143), net gemäß HEVnet-Protokoll des RIVM) bzw. mittels eigens ermittelter Gesamtgenomsequenzen (GGs), welche durch fasta36 und dem Referenzset nach Smith et al., 2020 (11) eingruppiert wurden. Nicht weiter subtypisierte HEV-3-Proben konnten über fasta36 alle dem Referenzstamm WB/HEV/NA17ITA15 (GenBank-ID: MF959764) zugeordnet werden und sind somit am nächsten verwandt mit HEV-3i. GGs, Gesamtgenomsequenz; ID, Identifikator; K/ml, Kopien pro Milliliter; Met, Methyltransferase; n.v., nicht verfügbar; ORF, offener Leserahmen (engl. open reading frame); RdRp, RNA-abhängigen RNA-Polymerase (engl. RNA-dependent RNA polymerase); s.o., siehe oben (entspricht Probenpaar eines Individuums); VL, Viruslast; ZKÜ, Zellkulturüberstand.

## 2.7 Kits, Enzyme und Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase mit 10× PCR-Puffer II und 25 mM MgCl <sub>2</sub>	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Anti-Hepatitis-E-Virus ORF2.1, Klon 2E2	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNA-Leiter O'GeneRuler 1 kb Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DNA-Molekulargewichtsmarker VIII	Roche, Basel, Schweiz
Expand High Fidelity PCR System Enzym-Mix Puffer 10× mit 15 mM MgCl <sub>2</sub> Puffer 10× ohne MgCl <sub>2</sub> 25 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM pro Nukleotid Reaktionsmix	Roche, Basel, Schweiz
EZ1 Virus Mini Kit v2.0	Qiagen, Venlo, Niederlande
HEV-Ag ELISA <sup>Plus</sup>	Wantai, Beijing, China
Maxima H Minus cDNA Synthese Master Mix 5×	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MinElute PCR-Aufreinigungskit	Qiagen, Venlo, Niederlande
NucleoFast 96 PCR-Aufreinigungskit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NxtScript RT 85 U/μl	Roche, Basel, Schweiz
Rnase-Inhibitor	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
SuperScript™ III-System für Erststrangsynthese	Invitrogen, Waltham, MA, USA
Vi-CELL™ Quad Pak	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Ziege anti-Maus IgG1-FITC sc-2078	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA

## 2.8 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' – 3')	Position
‡ 5'-RACE_s	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG	auf 5'-(dCTP) <sub>n</sub> -Überhang
† 1_s	GCAGACCACGTATGTGGTCGA	2 – 22
S_s	CGGCCAATTCTGCCCTGG	94 – 111
Sn_s	CGAATGCTGTGGTGGTTCCGG	112 – 131
§ 5'-GS5n_as	TCTCAGTTTGTACACGGGACA	139 – 159
§ 5'-GS5_as	GCTGTCGGGGTTGCATCAGGTTAATA	164 – 189
§ 5'-GS4n_as	GAAATACGAGCTGCCGGGGTTGC	176 – 198
289_as	TCTAGACAACGACCAGCCCG	270 – 289
§ 5'-GS4_as	CACCGGTGCAAGACATTAGGGTTATCAT	316 – 343
§ 5'-GS2n_as	GGGTCGGGGCAGAATACCAACGCTGT	371 – 396
393_as	TAGGAGCAGAGTACCAGCGC	374 – 393
409_s	CTAACTGCCGCCGTTCTG	409 – 426
440_as	GAGGCCACGCAAAGCAGAAC	421 – 440
427_s	CACTGCGTGGTTTGCCCG	427 – 444
† 2_s	GATCGTACCTAYTYTTTTGATGG	450 – 472
§ 5'-GS1n_as	CCCCAGTTTCTGCGGCAATGAGC	484 – 507
§ 5'-GS1_as	CCGGCCAGAGGTCATGCAGAGAATAAAAG	513 – 540
† 1_as	GGGCCATAGCCTCBGCAACATC	543 – 564
560g_s	GGCCCCGYCAYGGGATGAC	560 – 577
Sn_as	CAAGCGTGCATCCCGTGC	566 – 584
A_s	CGGTGATCGTGCTGTTGTGAC	665 – 685
S_as	GGTCACAACAGCACGATCACC	666 – 686
An1_s	CATACTTCGTGCATGGATCCGC	728 – 749
874_as	CGAGGGTACGGAACATAAGGCA	853 – 874
897_as	ACCTAACATACACCTCCGTTGA	876 – 897
902g_s	ATTYGGCCCTGGYGGGTC	902 – 919
F1_s	TCATGCTGTTCCGGTCCACA	962 – 981
† 3_s	CATATTTGGGACCGCTYATGCT	978 – 1000
† 2_as_m1	TAGGTCATAAGYCGTGARCAGCA	1032 – 1054
F2_s	TCCGCGGGATCAGTTATAAGGT	1057 – 1078
Fn1_s	GGTTGGAACGCATCAGAGGA	1107 – 1126
Fn2_s	TGATTACCGCGGCGTATTTAACT	1141 – 1163
An1_as	GTCGCGCATACCCCTTGAT	1199 – 1218
Fun2_s	CAGTGCCGCCGCTGGCT	1323 – 1339
† 4_s	GGGTAAGTTCTGCTGYTTTATG	1427 – 1448
† 3_as_m1	TCYAAAAAGCAGGTRCACTCCTG	1461 – 1483
† 1500_s_m1	CTGCTTTTTTGAACAGCAGAGG	1472 – 1494
1542g_s	GARGTGGACCCYGCTGAG	1542 – 1559
An2_s	TGACTGCCACCGTCGAACTC	1669 – 1688
† 1800_as_m1	KGACTGGCGAGAGGCRTCRAAC	1805 – 1826
1825g_as	GCCTGGCGRGARTCATCAA	1806 – 1825
Fun2_as	CAGGGGTGAGCTCATATG	1852 – 1869
H1_s	AGACTGTACTGCTGTTTTCCCG	1904 – 1925
† 5_s_m1	GCAGCCTTTTGCAGTGCYCTTTA	1962 – 1984
2001g_s	ACCCAGCCGYCATTCGCTG	2001 – 2018
H1n_s	GGTGGGCTGTGGTTGCAC	2022 – 2039



<b>Name</b>	<b>Sequenz (5' – 3')</b>	<b>Position</b>
† 4_as_m1	GGGAARATACCCAACARCCCCTC	2043 – 2065
Fn1_as	GTGTGCCCGGGAGAAAAGG	2066 – 2084
Fn2_as	TTTGCGGACTCCCAGGTGT	2083 – 2101
An2_as	CATGTCCGGGTGTACAAAGTTCC	2118 – 2140
F1_as	CCAGTCCCGGTGTAAGTGT	2121 – 2141
A_as	CAGGAGGTGTAGAGTGCGCT	2216 – 2235
† ins_s_m1	CCTGTTAGTGACRTTTGGGTGT	2232 – 2253
F2_as	GCACCAAGCGTCACTAACA	2234 – 2253
G1_s	TAGTGACGCTTGGGTGCTTC	2237 – 2256
G2/Gn1_s	TCTGAGGGGTCCGGTGGCTA	2265 – 2283
Gn2_s	TAGTAAGCCCACTAGCCCGC	2306 – 2325
H1n_as	TGGTGGCTTACGAACAGGGG	2347 – 2366
† 2600_s	ACCTATCCGGATGGGGCAAAGG	2403 – 2424
† ins_as	ACACCTTTGCCCATCCGGATA	2406 – 2427
2418g_s	GCYAAGGTGTAYGCAGGCTC	2418 – 2437
H1_as	AGGGTTGGACGCATTGACC	2465 – 2483
2539g_as	GACTCCGGRAAVCGCTGG	2522 – 2539
Gun2_s	CCGATCATTATGCTGTGG	2601 – 2619
Gun3_s	GCGTACCGTGAGACCTG	2664 – 2680
Gun2_as	AGTGGTAAGCGGCTGTG	2693 – 2710
B_s	CTACCCACTCCTCGGCTC	2702 – 2719
Bn1_s	ACCAAGTTCCCGTTAGCCTCAG	2728 – 2749
2757g_s	GCCTGGGARGCGTAACCAYCGC	2757 – 2777
† 3150_s_m1	TATCAGTTYACTGCTGGGGTCC	2964 – 2985
2986g_as	GGGACCCCGGCRGTRAAC	2969 – 2986
† 3200_as_m1	TGCTGTATAGARCGGACTTCC	2995 – 3016
3034g_as	ACAACRTCAACATCSCCCTG	3015 – 3034
Bn1_as	TGGTTTGGGTGCGCCGAGAAG	3207 – 3226
I1_s	TTCAGACTACTAGCCGCGTT	3364 – 3383
C/Bn2_s	TCTGGAATTGAGCCTGCCATTGG	3397 – 3418
I1n_s	CGCAATCACCGTCCATGAGG	3464 – 3483
3553g_s	CYCGYGCACATGCCATCG	3553 – 3570
Gun3_as	ACACATTTCTCTGTGTGGC	3583 – 3601
† 8_s	CCCCCGGCTTGTTCWCGTGAGGT	3613 – 3634
3800_as_m1	ACCRACCTCAGTAACAAGCCG	3617 – 3638
3700g_as	GGGCGRTGRTGGCCCACT	3683 – 3700
Bn2_as	ACCGTGAGCTCCTGAGGCAT	3873 – 3892
Cn1_s	AGCTCACGGTGTCTGATAGC	3883 – 3902
Gun4_as	TGTCCGTGAGCTCAAAAACC	3908 – 3927
Gn1_as	CTGACTAGGGGCCGCCATTC	3940 – 3959
G1_as	CCTCATACAACCTCGTCCGGC	4000 – 4020
Gn2_as	ACATGTGGTGGCCTGGACC	4076 – 4094
† 9_s_m1	CYACYACGTGTGAGTTRTATGAG	4083 – 4106
† 8_as	CCATCCTGACCTTTCTCCACCAT	4119 – 4141
G2_as	CGTCTGGCCTTTCTCAACC	4121 – 4140
4143g_as	AGCCRTCCTGRCCCTTCTCCAC	4122 – 4143
4276g_as	CTCCARGCCGARATGCC	4259 – 4276
I1n_as	GGGCACAGAAGTCTTACTCCA	4272 – 4293

Name	Sequenz (5' – 3')	Position
I1_as	AGGTGGGAGTAGGGCTAAGA	4330 – 4349
B/Cn1_as	CCGTAGAAAATATTAGGCGGGAG	4341 – 4363
Cn2_s	CTGTCTCAGGGGCAGGTTCA	4396 – 4415
J1_s	AGCCGGCTCTAGTATGGTCT	4406 – 4425
J1n_s	GCGTTATCATGGAAGAGTGTGGC	4486 – 4508
† 10_s_m1	CTYAAGGGATTTTGAAGAARCA	4581 – 4603
† 9_as_m1	GCCATRTTCCARACAGTRTTCCA	4629 – 4651
J1n_as	TCCCTTTGAACGCTGCTACT	4688 – 4708
J1_as	CCACAACCAGCAATCAAGGC	4758 – 4777
Cn2_as	TTCTCAGACAGCCGGCCG	4874 – 4891
D_s	AGAAGAACTGGGGCCCTGGG	4888 – 4907
C_as	CACATACCTGCGCAACATTCTGT	4962 – 4983
Dn1_s	ACGAATGTTGCGCAGGTATGT	4962 – 4982
¶ HEV-F	AGCGGCGGTACCGGCGGTGGT	5272 – 5292
† 11_s-neu	CGGCAGTGGTTTCTGGRGTGAC	5283 – 5304
¶ HEV-Pro	FAM-TGACMGGGTTGATTCTCAGCCCTTC-TAMRA	5301 – 5325
† 10_as	GCGAAGGGCTGAGAATCAACCC	5306 – 5327
¶ HEV-R	GGGTTGGTTGGATGAATATAGG	5333 – 5354
Dn1_as	TCAACATCAGGTACAGGGGCT	5529 – 5549
K1_s	TCTATATGCCGCCCGCTC	5634 – 5652
E/Dn2_s	AAACCCTCTGCTGCCCTTC	5652 – 5671
K1n_s	GGCAACTGAGGCGTCTAATT	5697 – 5716
† 12_s	CTAATTATGCCAGTAYCGGGTTG	5711 – 5734
† 11_as	GTAAATAGAGTTTCATRTCAACAGA	5833 – 5855
K1n_as	ACCCTGATTGCGGTAATGGA	5924 – 5943
K1_as	AGGGGAGCCATGAATACAAAGC	6003 – 6024
En1_s	GGGCGCTGGACTCCTTGAT	6056 – 6075
6062_s	TGGGGCTTCTCGATTTTGCAC	6062 – 6082
Dn2_as	TGCTTGTATACCGGGACACACG	6127 – 6148
6196_s	ACAACACTGCAGCCACACGT	6196 – 6216
† 13_s	CTCACACTCTTTAATCTTGCTGA	6280 – 6302
† 12_as_m1	AACTGTCCCCRGGCCGACGAAAT	6334 – 6356
§ 3'-GS2_s	TCCCGCCCAGTTGTCTCAGCCAATGG	6364 – 6389
6387_as	ATTGGCTGAGACGACTGGGC	6368 – 6387
6525_as	CCGATCCTGTTTCATGCTGGTTG	6504 – 6525
§ 3'-GS1_s	ACCCCTTCGCCTGCCCTTCTCG	6529 – 6551
D/En1_as	CGAGAAGGGGCAGGCGAAG	6533 – 6551
§ 3'-GSn2_s	TTGTGGCTCTCTCTACTGCTGCCGA	6583 – 6608
En2_s	GCCGCGGAGTATGACCAGAC	6601 – 6620
§ 3'-GS4_s	TGTTAATGTGGCGACGGGTGCTCAGG	6672 – 6697
§ 3'-GS1n_s	GCTGTGCGCCGTTCCCTTGACTGGTC	6697 – 6722
§ 3'-GSn4_s	GACGGTCGGCCCTCTCACTAC	6736 – 6755
† 14_s_m1	GGAAGTTATCYTTTTGGGAGGC	6800 – 6821
§ 3'-GS3_s	TTTTGGGAGGCTGGCACTACTAAGGC	6811 – 6836
† 13_as_m1	AGTTGTGTRTAATTATASGGGTA	6841 – 6864
§ 3'-GSn3_s	CCCTGAGTGCCGTAATCTTGGCCTAC	7053 – 7078
En2_as	CACACCCCTGCAAACCGAGA	7068 – 7087
E_as	TCAGCAATAGTAGACTGGAAGGC	7087 – 7109

Name	Sequenz (5' – 3')	Position
† 14_as_m1	TTTTTTTTTTTTCCWGGGAGCGCG	7213 – 7236
‡ 3'-RACE_as	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN	auf Poly(A)-Schwanz
‡ LUP	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	auf 5'/3'-RACEs/as
‡ SUP	CTAATACGACTCACTATAGGGC	auf LUP
‡ NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	auf LUP

Liste der Oligonukleotide, die von Metabion (Planegg, Deutschland) bezogen und in Form von Primern und Sonden für die RT-qPCR und Gesamtgenomsequenzierungen verwendet wurden. Die Positionsangaben beziehen sich auf das Genom des HEV-3c-Isolats 14-16753. Neue Primer wurden mittels Primer3web (<http://primer3.ut.ee/>) und GEMI (144) entworfen.

†, Primer nach Johne et al. (130); ‡, Primer nach BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit Benutzerhandbuch; §, Primer entworfen gemäß den Empfehlungen der BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit Benutzerhandbuch; as, antisense; dCTP, Desoxycytidintriphosphat; m1, modifiziert; n, Vielfaches; ¶, Oligonukleotide für die RT-qPCR nach Wenzel et al. (56); RACE, schnelle Amplifikation der cDNA-Enden (engl. rapid amplification of cDNA-ends with PCR); s, sense.

## 2.9 Software

Software	Version	Entwickler / Verweis
AliView	1.26	Anders Larsson (145)
AlphaView	3.4.0.0	ProteinSimple, San José, CA, USA
BZ-II Viewer	2.1	Keyence, Osaka, Japan
Citavi	6.4	Swiss Academic Software
CodonCode Aligner	4.2.7	CodonCode Corporation
Fasta	36.3.8g	William R. Pearson (146)
FigTree	1.4.4	<a href="http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/">http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/</a>
Foxit	10.0	Foxit Software Inc.
GEMI	1.5.1	Haitham Sobhy (144)
GIMP	2.10.18	The GIMP Team
Inkscape	0.92	Inkscape Community
MAFFT	7	Kazutaka Katoh (147,148)
Magellan	7.0	Tecan, Männedorf, Schweiz
NanoDrop 1000	3.8.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Notepad++	7.8.5	Don Ho
Office	2016	Microsoft Corporation
ORFfinder	2019	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/</a>
Primer3web	4.1.0	Whitehead Institute for Biomedical Research (149)
RAXML	8.2.11	Alexandros Stamatakis (150)
SigmaPlot	13.0	Systat Software Inc.
StepOne™ Software	2.3	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Vi-CELL™ XR Cell Viability Analyzer	2.03	Beckman Coulter, Brea, CA, USA

## 3. Methoden

### 3.1 Zellkultur

Zellen wurden in T25-Zellkulturflaschen mit BMEM bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden alle 3–4 Tage bei einer Konfluenz von ~90% mittels Trypsin abgelöst, gesplittet und in neue T25 überführt. Jährlich und vor jeder Inokulation wurden die Zellen am Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene Regensburg (IMHR) auf *Mycoplasma spp.* mittels PCR getestet. Die Zellzahlen und Viabilitäten wurden mittels des Zellzählgeräts Vi-CELL™ XR bestimmt.

### 3.2 Virusisolierung

HEV-positive Plasmen und Seren wurden nach Bedarf mit PBS<sub>o</sub>/BSA<sup>0.2%</sup> verdünnt. Stühle wurden mittels PBS<sub>o</sub>/BSA<sup>0.2%</sup> als 10%ige Stuhlsuspension angesetzt, gründlich mittels Vortexer durchmischt, bei 8000 × g für 10 Minuten zentrifugiert und ausschließlich der resultierende Überstand verwendet. Als Positivkontrolle diente zunächst HEV-Isolat-47832c-positiver Zellkulturüberstand (130), der im weiteren Verlauf der Arbeit durch die Isolate 14-16753, 14-22707 und 15-22016 (151) ergänzt wurde. PBS<sub>o</sub>/BSA<sup>0.2%</sup> wurde als Negativkontrolle verwendet. Alle Inokulate wurden vor Verwendung mittels eines Spritzenvorsatzfilters mit einer 0,2 µm PES-Membran filtriert.

Sofern nicht anders beschrieben, wurden Isolationsversuche wie folgt durchgeführt: In BMEM kultivierte Zellen wurden in einer Konzentration von 10<sup>5</sup> viablen Zellen pro ml in einer T12,5-Zellkulturflasche ausgesät. Das Medium wurde auf MEMM umgestellt und alle 3–4 Tage komplett gewechselt. Nach 2 Wochen wurde der Überstand vollständig abgenommen und 250 µl Inokulum auf den überkonfluenten Zellrasen pipettiert. Nach 75 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 2,5 ml MEMM zugegeben und die Zellen bei 34,5 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand vollständig durch frisches Medium ersetzt, das von da an alle 3–4 Tage vollständig gewechselt wurde. Inokulierte Zellen wurden bis auf Weiteres nicht gesplittet.

### 3.3 Nukleinsäure-Isolation

Nukleinsäure wurde unter Verwendung des kommerziell erhältlichen EZ1 Virus Mini Kit v2.0 auf einem EZ1 Advanced XL-Gerät isoliert.

### 3.4 HEV-RNA-Quantifizierung

Nukleinsäureeluate wurden mittels RT-qPCR unter Verwendung von Primern und Sonde nach Wenzel et al. (56) getestet. Der Mastermix und das Temperaturprofil setzten sich wie folgt zusammen:

Mastermix (1×)		Temperaturprofil		
H <sub>2</sub> O DEPC-behandelt	15,24 µl	50 °C	10 Min.	1×
NxtScript Reaktionsmix	6,00 µl	95 °C	33 Sek.	1×
HEV-F	1,14 µl	95 °C	5 Sek.	45×
HEV-R	1,14 µl	60 °C	30 Sek.	
HEV-Pro	0,73 µl	4 °C	∞	1×
ROX-Referenzfarbstoff	0,60 µl			
NxtScript RT	0,15 µl			
5 µl Eluat + 25,00 µl				

Als Standard diente das HEV-ORF3-11/06-Klon8-in-pCRIITOPPO-Transkript (IMHR), das bei jeder PCR in einer logarithmischen Verdünnungsreihe von 10<sup>4</sup> bis 10<sup>1</sup> HEV-Kopien pro 5 µl mit amplifiziert wurde um so die Quantifizierung zu ermöglichen. Das PCR-System wurde zusätzlich gegen den internationalen Standard der WHO für die Detektion von HEV-RNA (152) kalibriert, wobei eine HEV-RNA-Kopie 0,87 IU entsprechen. Die PCR erfolgte in einer 0,1-ml-96-Well-Reaktionsmikrotiterplatte in einem StepOnePlus Real-Time-PCR-System.

### 3.5 HEV-ORF2-Antigen-Nachweis

ORF2-Antigen wurde mittels des kommerziell erhältlichen ELISA HEV-Ag ELISA<sup>Plus</sup> (Wantai, Beijing, China) detektiert. Der ELISA wurde gemäß den Herstellervorgaben durchgeführt.

### 3.6 Immunfluoreszenzfärbung

Inokulierte Zellen wurden mittels Trypsin abgelöst und 3× durch eine Kanüle gezogen um Zellklumpen zu vereinzeln. Die Zellsuspension wurde in eine 96-Well- $\mu$ -Platte überführt und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bis der Zellrasen nach 2–3 Tagen eine Konfluenz von ~80% erreicht hatte. Anschließend wurden die Zellen mit PBSm/Tween-20<sup>0.05%</sup> gewaschen und mit 2% Formaldehyd (v/v) in PBSm fixiert. Nach einem weiteren Waschschriff wurden die Zellen mit 0,1% Triton X-100 (v/v) in PBSm permeabilisiert und anschließend mit 2% BSA (w/v) in PBSm/Tween-20<sup>0.05%</sup> für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Danach wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit 5  $\mu$ g/ml anti-HEV-ORF2.1-Klon-2E2 Antikörper (verdünnt mit 1% BSA (w/v) in PBSm) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 3× gewaschen und gebundener Primärantikörper mittels 2  $\mu$ g/ml Ziegenanti-Maus-IgG1-FITC Antikörper (verdünnt mit 1% BSA (w/v) in PBSm) für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen markiert. Nach 3-maligem Waschen wurde der Zellrasen mit 2 Tropfen Eindeckmittel SlowFade™ Diamond mit DAPI überlagert und somit die Zellkerne zusätzlich angefärbt. Die Platten wurden mittels des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japan) mikroskopiert und abfotografiert.

### 3.7 Genomsequenzierung

Die Gesamtgenomsequenzen der neuen HEV-Isolate wurden über die Methode des *Primer Walking* ermittelt, wonach überlappende Segmente des HEV-Genoms amplifiziert und anschließend sequenziert wurden. Die so entstandenen Segmente sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Segment	Position	Erste PCR		Nested PCR		Sequenzier-Primer	HEV-3-Subtyp
		T <sub>a</sub> (°C)	Primer	T <sub>a</sub> (°C)	Primer		
5'n	-7 – 483	68	5'-RACE_s	68	NUP	NUP	c
			5'-GS1_as		5'-GS1n_as	1_s	
			LUP			S_s	
			SUP			393_as	
						440_as	
				5'-GS1n_as			
5'n_2n	-7 – 315	68	5'-RACE_s	68	NUP	Sn_s	e
			5'-GS2n_as		5'-GS4_as	5'-GS4n_as	
			LUP				
			SUP				

Segment	Position	Erste PCR		Nested PCR		Sequenzier-Primer	HEV-3-Subtyp
		T <sub>a</sub> (°C)	Primer	T <sub>a</sub> (°C)	Primer		
5'n_4	-7 – 175	58	5'-RACE_s 5'-GS4_as LUP SUP	58	NUP 5'-GS4n_as	1_s 5'-GS4n_as	e
5'n_5n	-7 – 138	68	5'-RACE_s 5'-GS5_as LUP SUP	58	NUP 5'-GS5n_as	1_s 5'-GS5n_as	f
Sn	132 – 565	58	S_s S_as	58	Sn_s Sn_as	Sn_s 2_s 1_as Sn_as	c, e, f
2n_12	473 – 1031	58	1_s 3_as_m1	58	2_s 2_as_m1	2_s 2_as_m1	c, e
427n	445 – 852	68	409_s 897_as	58	427_s 874_as	427_s 560g_s An1_s 874_as	f
A1	750 – 1198	58	A_s A_as	58	An1_s An1_as	An1_s 3_s 2_as_m1 An1_as	c, e, f
902n	920 – 1805	58	560g_s 3034g_as	58	902g_s 1825g_as	902g_s 3_s 1542g_s 3_as_m1 1825g_as	f
2n_7	999 – 2042	58	2_s 3200_as_m1	58	3_s 4_as_m1	3_s 4_s 1500s_m1 3_as_m1 1800_as_m1 4_as_m1	c
Fn11	1127 – 2065	58	F1_s F1_as	58	Fn1_s Fn1_as	Fn1_s Fun2_s 3_as_m1 Fun2_as Fn1_as	e
Fn22	1164 – 2082	58	F2_s F2_as	58	Fn2_s Fn2_as	Fn2_s 4_s 3_as_m1 Fun2_as Fn2_as	e
1542n	1560 – 2521	68	560g_s 3034g_as	68	1542g_s 2539g_as	1542g_s 1825g_as 2539g_as	f

A2	1689 – 2117	68	A_s Aas	68	An2_s An2_as	An2_s 5_s_m1 1800_as_m1 4_as_m1 An2_as	c
3n_12	1985 – 2405	58	1500_s_m1 3200_as_m1	58	5_s_m1 ins_as	5_s_m1 ins_s_m1 ins_as	c, e
2001n	2019 – 2968	58	560g_s 3034g_as	58	2001g_s 2986g_as	2001g_s 2418g_s 2757g_s 2539g_as	f
Hn11	2040 – 2346	58	H1_s H1_as	58	H1n_s H1n_as	H1n_s F2_as H1n_as	e
4n_12	2254 – 2994	58	5_s_m1 3800_as_m1	58	ins_s_m1 3200_as_m1	ins_s_m1 2600s ins_as 3200_as_m1	c
Gn11	2284 – 3939	58	G1_s G1_as	58	G2/Gn1_s Gn1_as	G2/Gn1_s Gun2s Gun2_as Bn1_as Gun3_as Gn1_as	e
Gn22	2326 – 4075	68	G2/Gn1_s G2_as	68	Gn2_s Gn2_as	Gn2_s Gun3_s Gun2_as Gun3_as Gun4_as Gn2_as	e
2418n	2438 – 3014	68	2001g_s 4276g_as	68	2418g_s 3034g_as	2418g_s 2757g_s 2539g_as 2986g_as 3034g_as	f
B1	2750 – 3206	58	B_s B/Cn1_as	58	Bn1_s Bn1_as	Bn1_s 3150_s_m1 3200_as_m1 Bn1_as	c
2757n	2778 – 3682	58	2001g_s 4276g_as	68	2757g_s 3700g_as	2757g_s 3150_s_m1 3553g_s 2986g_as 3034g_as 3700g_as	f



5n_12	2986 – 4118	68	2600_s 9_as_m1	68	3150_s_m1 8_as	3150_s_m1 8_s 3800_as_m1 8_as	c
B2	3419 – 3872	58	B_s B/Cn1_as	68	C/Bn2_s Bn2_as	C/Bn2_s 8_s 3800_as_m1 Bn2_as	c
ln11	3484 – 4271	58	l1_s l1_as	58	l1n_s l1n_as	l1n_s 8_s 9_s_m1 Gun3_as Gn1_as Gn2_as l1n_as	e
3553n	3571 – 4121	68	2001g_s 4276g_as	68	3553g_s 4143g_as	3553g_s 8_as 4143g_as	f
C1	3903 – 4340	58	C/Bn2_s C_as	68	Cn1_s B/Cn1_as	Cn1_s 9_s_m1 8_as B/Cn1_as	c, e, f
6n_12	4107 – 4628	58	8_s 10_as	58	9_s_m1 9_as_m1	9_s_m1 9_as_m1	c, e, f
C2	4416 – 4873	58	C/Bn2_s C_as	58	Cn2_s Cn2_as	Cn2_s 10_s_m1 9_as_m1 Cn2_as	c
Jn11	4509 – 4687	58	J1_s J1_as	58	J1n_s J1n_as	J1n_s 9_as_m1 J1n_as	e
7n_12	4604 – 5832	58	9_s_m1 12_as_m1	58	10_s_m1 11_as	10s_m1 11_s-neu 10_as 11_as	c, e, f
D1	4983 – 5528	58	D_s D/En1_as	68	Dn1_s Dn1_as	Dn1_s 11_s-neu 10_as Dn1_as	c
6n_7	5305 – 6333	58	10_s_m1 13_as_m1	58	11_s-neu 12_as_m1	11_s-neu 12_s 11_as 12_as_m1	c, e, f
D2	5672 – 6126	58	D_s D/En1_as	58	E/Dn2_s Dn2_as	E/Dn2_s 12_s 11_as	c

Kn11	5717 – 5923	58	K1_s K1_as	58	K1n_s K1n_as	K1n_s 12_s 11_as K1n_as	e
E1	6076 – 6532	58	E/Dn2_s E_as	68	En1_s D/En1_as	En1_s 13_s 12_as_m1 D/En1_as	c
6196n	6217 – 6367	58	6062_s 6525_as	58	6196_s 6387_as	6196_s 12_as_m1 6387_as	f
8n_12	6303 – 6840	58	12_s 14_as_m1	58	13_s 13_as_m1	13_s 13_as_m1	c, e, f
E2	6621 – 7067	58	E/Dn2_s E_as	68	En2_s En2_as	En2_s 14_s_m1 13_as_m1 En2_as	c
9n_12	6822 – 7212	58	13_s 14_as_m1	58	14_s_m1 14_as_m1	14_s_m1 14_as_m1	c, e
3'n_2	6609 – 7256	68	3'-GS2_s 3'-RACE_as LUP SUP	68	3'-GSn2_s NUP	3'-GSn2_s 3'-GS3_s 3'-GSn3_s	e
3'n	6723 – 7256	68	3'-GS1_s 3'-RACE_as LUP SUP	68	3'-GS1n_s NUP	3'-GS1n_s 14_s_m1 13_as_m1 14_as_m1	c, e
3'n_4	6756 – 7256	58	3'-GS4_s 3'-RACE_as LUP SUP	58	3'-GSn4_s NUP	3'-GSn4s 3'-GS3_s 3'-GSn3_s 14_as_m1	f
3'n_3	7079 – 7256	68	3'-GS3_s 3'-RACE_as LUP SUP	68	3'-GSn3_s NUP	3'-GSn3_s 14_as_m1	e

Zunächst wurde HEV-RNA spezifisch in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden in einem Reaktionsansatz 11 µl Nukleinsäureeluat zusammen mit 1 µl antisense Primer (50 µM) für 5 Minuten auf 65 °C erhitzt, zügig für ~1 Minute auf Eis abgekühlt und dann wie folgt revers transkribiert:

Reverse-Transkription-Mix (1×)		Temperaturprofil		
Maxima H Minus cDNA Synthese Master Mix	4,00 µl	65 °C	15 Min.	1×
H <sub>2</sub> O nukleasefrei	4,00 µl	85 °C	5 Min.	1×
12 µl Eluat-Primer-Mix +	8,00 µl	4 °C	∞	1×

Für die Sequenzierung des 5'-Endes des HEV-Genoms wurde der RACE-Ansatz (schnelle Amplifikation der cDNA-Enden, engl. rapid amplification of cDNA-ends with

PCR) gewählt. Unter Einsatz von 7 µl Eluat und je 1 µl des Primers 5'-RACE\_s (50 µM) und eines genspezifischen antisense Primers (50 µM) wurde die cDNA-Synthese mit dem Kit SuperScript™ III System für Erststrangsynthese (Invitrogen, Waltham, MA, USA) gemäß den Herstellervorgaben durchgeführt. Die cDNA wurde in einer ersten PCR wie folgt amplifiziert:

<b>Erste-PCR-Mix (1×)</b>		<b>Temperaturprofil</b>		
H <sub>2</sub> O DEPC-behandelt	66,65 µl	95 °C	5 Min.	1×
10× PCR-Puffer II	8,00 µl	95 °C	1 Min.	
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4,00 µl	58–68 °C	30 Sek.	40×
50 µM sense Primer	1,00 µl	72 °C	2 Min.	
Expand High Fidelity Enzym-Mix	0,35 µl	72 °C	7 Min.	1×
20 µl cDNA +	80,00 µl	4 °C	∞	1×

Ansätze zur Amplifikation des 5'- und 3'-Endes enthielten zusätzlich je 1 µl der Primer LUP (4 µM) und SUP (50 µM). Anschließend wurde eine nested PCR durchgeführt:

<b>Nested-PCR-Mix (1×)</b>		<b>Temperaturprofil</b>		
H <sub>2</sub> O DEPC-behandelt	36,65 µl	95 °C	5 Min.	1×
Expand High Fidelity Puffer 10× mit 15 mM MgCl <sub>2</sub>	5,00 µl	95 °C	1 Min.	
10 mM pro Nukleotid Reaktionsmix, 1:4 verdünnt	4,00 µl	58–68 °C	30 Sek.	40×
50 µM sense Primer	1,00 µl	72 °C	2 Min.	
50 µM antisense Primer	1,00 µl	72 °C	7 Min.	1×
Expand High Fidelity Enzym-Mix	0,35 µl	4 °C	∞	1×
2 µl Erste-PCR-Amplifikat +	48,00 µl			

Die Amplifikate aus der nested PCR wurden mit Ladepuffer verdünnt und zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker auf ein mit TBE überschichtetes 1%iges Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen. Das Gel wurde nach 30 Minuten unter einer Spannung von 100 Volt mittels eines Geldokumentationssystems abfotografiert. Bei Gelspuren mit einer einzelnen definierten Bande wurde das Amplifikat aus der nested PCR über Ultrafiltration mittels des NucleoFast 96 PCR-Aufreinigungskits (Macherey-Nagel) aufgereinigt. Befanden sich multiple Banden in einer Spur, so wurden diese ausgeschnitten und getrennt über Silikamembranen mittels des MinElute PCR-Aufreinigungskits (Qiagen) aufgereinigt. Die DNA in den so gewonnenen Eluaten wurden photometrisch mit dem NanoDrop vermessen, mit DEPC-behandeltem Wasser auf die geeignete Konzentration verdünnt und zusammen mit Sequenzierprimern (10 µM) in die Vertiefung einer 0,1-ml-96 Well-Reaktionsmikrotiterplatte pipettiert. Die Sequenzieransätze wurden an Geneart (Regensburg, Deutschland) verschickt und dort über ein 3130x/ Gen-Analysegerät (Applied Biosystems, Waltham,

MA, USA) sequenziert. Die Elektropherogramme wurden mit dem Programm Codon-Code Aligner ausgewertet und assembliert. Vollständige Gesamtgenome wurden mittels ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) charakterisiert und in die GenBank eingestellt (MK089847–MK089849).

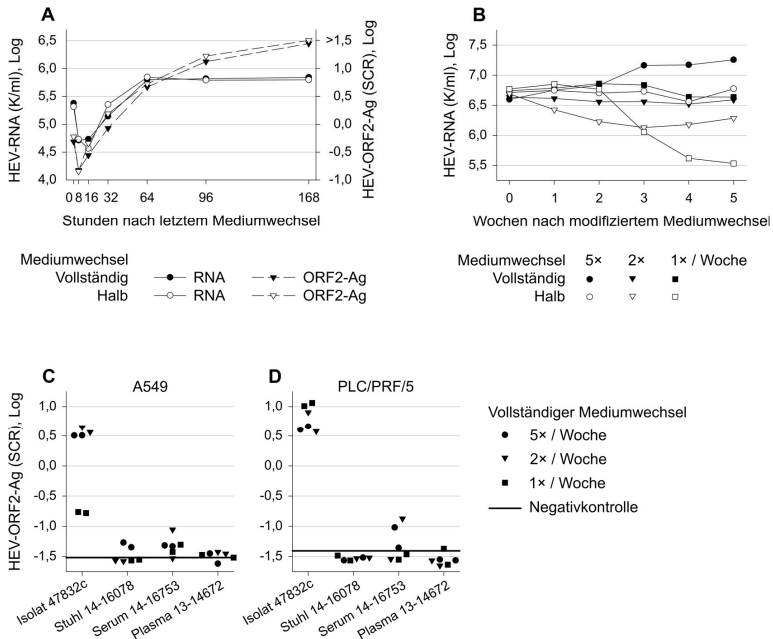
### **3.8 Phylogenetische Analysen**

Gesamtgenome und bereits aus der Diagnostikabteilung des IMHR verfügbare HEV-Fragmentsequenzen wurden über fasta36 und dem aktuellen HEV-Referenzset nach Smith et al., 2020 (11) genotypisiert. Darüber hinaus wurde aus den Gesamtgenomen der neuen HEV-Isolate zusammen mit den Sequenzen aus dem Referenzset und allen bisher in Zellkultur isolierten und Gesamtgenom-sequenzierten HEV-Stämmen ein phylogenetischer Baum berechnet. Hierzu wurde ein multiples Sequenzalignment mit MAFFT angefertigt, aus dem mittels RAXML (basierend auf der Maximum Likelihood Methode) mit einem 1000 Replikate umfassenden Bootstrap der am besten passende Baum errechnet wurde. Auf die gleiche Weise wurden die phylogenetischen Bäume der Abbildung 1 generiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Einfluss der Frequenz des Mediumwechsels auf die Viruslast und Isolierung eines neuen HEV-3c-Stammes

In den beschriebenen Zellkultursystemen zur Isolation von Viren muss das Medium täglich zur Hälfte aufgefrischt werden, was Optimierungsexperimente sehr aufwändig gestaltet. Daher wurden zu Beginn Überstände von persistent mit HEV-Isolat 47832c infizierten A549 zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf HEV-RNA und ORF2-Ag (Antigen des offenen Leserahmens 2, engl. open reading frame 2 antigen) getestet, um die zeitliche Dauer bis zum Erreichen der maximalen Viruslast abzuschätzen. Ein Maximum an HEV-RNA konnte bereits nach 64 Stunden gemessen werden, wohingegen ORF2-Ag selbst nach 168 Stunden weiter anstieg (siehe Abbildung 5A). Demnach muss ein täglicher Mediumwechsel nicht erfolgen. Um dies genauer zu überprüfen, wurde das Medium von persistent mit HEV-Isolat 47832c infizierten A549 in unterschiedlichen Frequenzen zur Hälfte oder vollständig gewechselt und die Konzentration der HEV-RNA im Überstand über 5 Wochen verfolgt. Die höchste Viruslast konnte im Überstand von A549 gemessen werden, deren Medium fünfmal pro Woche vollständig gewechselt wurde (siehe Abbildung 5B). Die Viruslast hielt sich auf einem konstant hohen Niveau, wenn das Medium vollständig ein- oder zweimal pro Woche oder fünfmal pro Woche zur Hälfte gewechselt wurde. Eine leicht verringerte Viruslast ergab sich bei A549, deren Medium zweimal pro Woche zur Hälfte aufgefrischt wurde. Noch stärker fiel die Viruslast ab, wenn das Medium nur einmal pro Woche zur Hälfte gewechselt wurde. Demnach ist ein halber Mediumwechsel fünfmal pro Woche, sowie ein vollständiger Mediumwechsel ein-, zwei- oder fünfmal pro Woche bei persistent mit HEV infizierten A549 ausreichend. Um zu überprüfen, ob dies auch bei de novo infizierten Zellen der Fall ist, wurden A549 und PLC/PRF/5 mit HEV-3c-Isolat 47832c (A549-Überstand mit  $2,1 \times 10^7$  HEV-RNA-Kopien pro ml (K/ml)), sowie HEV-positiven Stuhl 14-16078 ( $1,1 \times 10^4$  K/ml, HEV-3e), Serum 14-16753 ( $2,8 \times 10^6$  K/ml, HEV-3c) und Plasma 13-14672 ( $4,3 \times 10^3$  K/ml, HEV-3i-ähnlich) inokuliert. Um das Zellkultursystem möglichst simpel zu halten, wurde der Effekt des halben Mediumwechsels nicht weiterverfolgt und das Medium der inokulierten Zellen ausschließlich vollständig ein-, zwei- oder fünfmal pro Woche gewechselt. Nach 24 Tagen nach Inokulation wurde der Überstand auf ORF2-Ag getestet. Bei Zellen, die mit HEV-Isolat 47832c inokuliert wurden, hatte die



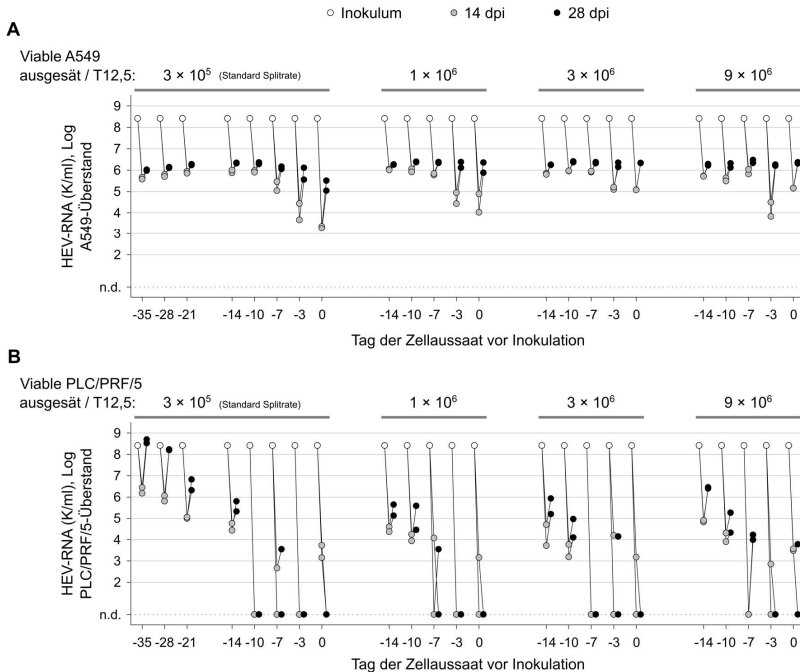
**Abbildung 5.** Einfluss des Mediumwechsels auf die HEV-Replikation in persistent und de novo mit HEV infizierte Zellen. **(A)** Der Überstand von persistent mit HEV-Isolat 47832c infizierten A549 wurde nach immer größer werdenden Zeitintervallen entweder zur Hälfte oder vollständig durch frisches Medium ersetzt und auf HEV-RNA und ORF2-Ag getestet. **(B)** Der Überstand von persistent mit HEV-Isolat 47832c infizierten A549 wurde zur Hälfte oder vollständig ein-, zwei- oder fünfmal pro Woche durch frisches Medium ersetzt und auf HEV-RNA getestet. **(C)** A549 und **(D)** PLC/PRF/5 wurden in Duplikaten mit HEV-Isolat 47832c und mit HEV-positivem Stuhl 14-16078, Serum 14-16753 und Plasma 13-14672 dreier unterschiedlicher Probanden inokuliert. Der Überstand wurde anschließend zur Hälfte oder vollständig ein-, zwei- oder fünfmal pro Woche durch frisches Medium ersetzt und 24 Tage nach Inokulation auf HEV-ORF2-Ag getestet. Ag, Antigen; K/ml, Kopien pro Milliliter; Log, dekadischer Logarithmus; ORF2-Ag, Antigen des offenen Leserahmens 2 (engl. open reading frame 2 antigen); SCR, Quotient aus Messsignal und Grenzwert (engl. signal-to-cutoff ratio).

Häufigkeit des Mediumwechsels kaum Einfluss auf die Viruslast im Überstand (siehe Abbildung 5C & D). Einzig A549, deren Medium wöchentlich gewechselt wurde, produzierten weniger HEV. Zellen, die mit humanen Probenmaterialien inokuliert wurden, wiesen nur sehr niedrige ORF2-Ag-Konzentrationen im Überstand auf und konnten somit nicht ausgewertet werden. Allerdings waren die ORF2-Ag-Werte bei A549 inokuliert mit Stuhl und Serum, sowie PLC/PRF/5 inokuliert mit Serum, teils leicht erhöht und wurden deshalb in Kultur belassen. Nach 46 Tagen nach der Inokulation wurde HEV-RNA nur im Überstand von mit Serum inokulierten Zellen nachgewiesen. In diesem Experiment wurde somit der erste neue HEV-3c-Stamm isoliert,

der nach dem Serum 14-16753 benannt wurde. Zusammenfassend ist ein vollständiger wöchentlicher Mediumwechsel für HEV-positive PLC/PRF/5 ausreichend, nicht aber für A549. Daher wurde in folgenden Experimenten ein vollständiger Mediumwechsel zweimal pro Woche angewendet.

## **4.2 Steigerung der Infektionseffizienz durch früher ausgesäte und überkonfluent gewachsene Zellen**

In einer Arbeit konnte gezeigt werden, dass HEV aus einem experimentell infizierten Schwein ausschließlich in 3D-Zellkultur, nicht aber in dem gewöhnlich einschichtig gewachsenen Zellrasen replizierte (128). Daher wurde der Einfluss der Konfluenz auf die Wahrscheinlichkeit der HEV-Isolierung untersucht. Hierzu wurden A549 und PLC/PRF/5 in verschiedenen Dichten und zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor Inokulation mit HEV-Isolat 47832c ausgesät und teils überkonfluent wachsen gelassen. Zudem wurden 2,5 ml an definierten Zellsuspensionen beider Zelllinien in T12,5-Flaschen überführt und sofort mit 250 µl Inokulum versetzt, noch bevor sich die Zellen an den Boden der Zellkulturflasche anheften konnten. Die Überstände wurden 14 und 28 Tage nach Inokulation auf HEV-RNA getestet, wobei eine Detektion von HEV-RNA 28 Tage nach Inokulation als gleichbedeutend mit einer erfolgreichen Infektion definiert wurde. Alle A549-Kulturen wurden erfolgreich mit HEV infiziert (siehe Abbildung 6A). Nach zwei Wochen nach der Inokulation wurden höhere Viruslasten gemessen, wenn  $\geq 1 \times 10^6$  Zellen mindestens 7 bzw.  $3 \times 10^5$  Zellen mindestens 10 Tage vor Inokulation ausgesät wurden. Weitere zwei Wochen später wurden in alle Kulturen vergleichbar hohe Viruslasten gemessen. Lediglich A549, die 3 Tage vor Inokulation oder zusammen mit dem Inokulat in einer Dichte von  $3 \times 10^5$  ausgesät wurden, produzierten zu diesem Zeitpunkt etwas geringere HEV-Konzentrationen. Der positive Effekt einer früheren Zellaussaat in einer höheren Dichte auf die HEV-Replikation war in PLC/PRF/5 um einiges deutlicher ausgeprägt. Für eine verlässliche Infektion mussten  $3 \times 10^5$ , 1 bis  $3 \times 10^6$  und  $9 \times 10^6$  PLC/PRF/5 mindestens 14, 10 und 7 Tage vor Infektion ausgesät werden (siehe Abbildung 6B). Zudem konnte die erzielte Viruslast deutlich gesteigert werden, wenn PLC/PRF/5 länger vor Inokulation kultiviert wurden.

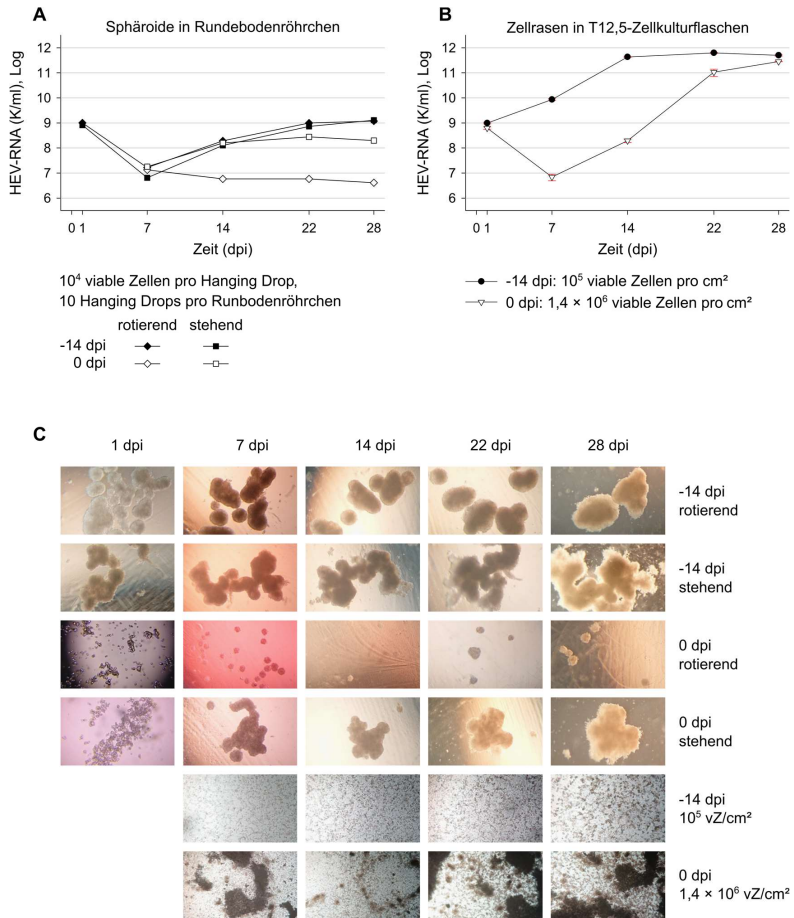


**Abbildung 6.** Dichter ausgesäte Zellen und länger kultivierte Zellrasen steigern die Infektionsrate und die nachfolgende Viruslast. (A) A549 und (B) PLC/PRF/5 wurden in unterschiedlichen Konzentrationen und zu verschiedenen Zeitpunkten vor Inokulation ausgesät und in Duplikaten mit HEV-Isolat 47832c inokuliert. Die Überstände wurden 14 und 28 Tage nach Inokulation auf HEV-RNA getestet. dpi, Tage nach Inokulation (engl. days post inoculation); K/ml, Kopien pro Milliliter; Log, dekadischer Logarithmus; n.d., nicht detektiert.

Um eine verlässliche Infektion zu erhalten, sollten folglich mindestens  $3 \times 10^5$  viable Zellen pro T12,5 zwei Wochen vor Inokulation ausgesät werden, wobei dichter und früher ausgesäte Zellen schneller höhere Viruslasten generieren. Um das Prozedere zu standardisieren, wurde die Aussaat auf  $10^5$  viable Zellen pro  $\text{cm}^2$  zwei Wochen vor Inokulation festgelegt.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde untersucht, ob echte 3D-Zellkulturen die HEV-Infektion und -Replikation zusätzlich begünstigen. Dazu wurden PLC/PRF/5-Zellsuspensionstropfen zu je  $10^4$  viablen Zellen pro 50  $\mu\text{l}$  auf die Deckelunterseite einer Zellkulturschale entweder 14 Tage vor Inokulation oder zusammen mit HEV-Isolat 14-16753 pipettiert und als *Hanging Drops* für 24 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurden 10 Tropfen in einem Rundbodenröhrchen vereinigt,





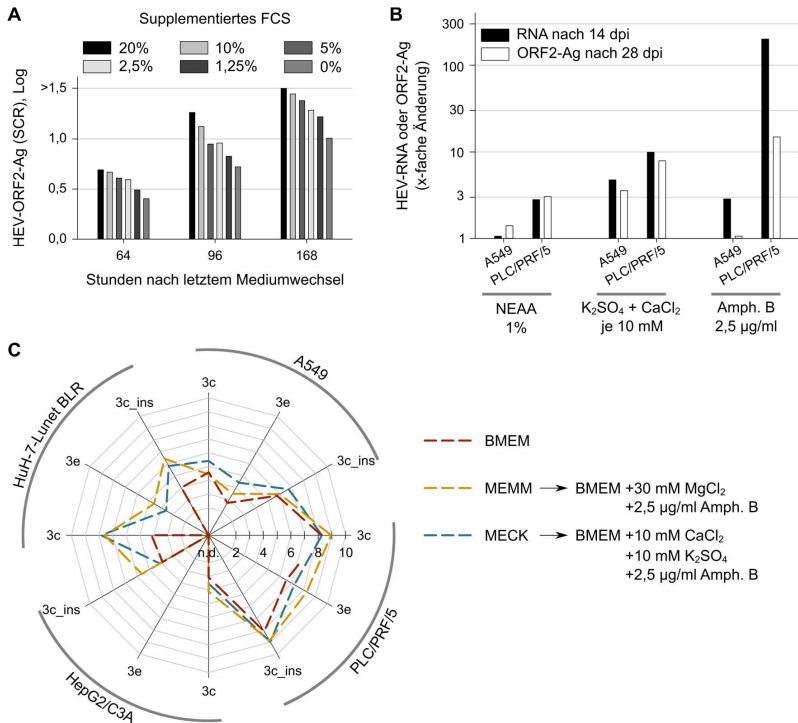
**Abbildung 7.** Sphäroide produzieren weniger HEV als überkonfluente Zellrasen und das Erreichen der maximalen Viruslast *in vitro* benötigt ab dem Zeitpunkt der Zellaussat 4 Wochen. **(A)** Zellsuspension wurde 14 Tage vor Inokulation (-14 dpi) oder zusammen mit HEV-Isolat 14-16753 (0 dpi) in 50 µl Tropfen auf die Deckelunterseite einer Zellkulturschale pipettiert und als *Hanging Drops* bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Einen Tag später wurden die Sphäroide in Rundebodenröhrchen überführt, die rotierend oder stehend inkubiert wurden. Die Überstände wurden 1, 7, 14, 22 und 28 Tage nach Inokulation auf HEV-RNA getestet. **(B)** 14 Tage vor Inokulation mit HEV-Isolat 14-16753 wurden 10<sup>5</sup> viable Zellen in Triplikaten ausgesät (-14 dpi). Am Tag der Inokulation wurde zusätzlich parallel in Triplikaten die 14-fache Zellmenge (1,4 × 10<sup>6</sup> viable Zellen pro cm<sup>2</sup>) zusammen mit dem Inokulat ausgesät (0 dpi). Die Überstände wurden 1, 7, 14, 22 und 28 Tage nach Inokulation auf HEV-RNA getestet. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. **(C)** Zellmorphologie der unterschiedlich angesetzten Sphäroide und Zellrasen. dpi, Tage nach Inokulation (engl. days post inoculation); K/ml, Kopien pro Milliliter; Log, dekadischer Logarithmus; vZ, viable Zellen.

welche im Brutschrank entweder stehend oder rotierend inkubiert wurden. Parallel wurden  $10^5$  viable Zellen pro  $\text{cm}^2$  zwei Wochen vor Inokulation, sowie  $1,4 \times 10^6$  viable Zellen pro  $\text{cm}^2$  (Zellen einer T175, überführt in eine T12,5) zusammen mit HEV-Isolat 14-16753 ausgesät. Die Überstände wurden wöchentlich bis 28 Tage nach Inokulation auf HEV-RNA getestet und die Zellmorphologie dokumentiert (siehe Abbildung 7). Stehend und rotierend inkubierte Sphäroide, die 2 Wochen vor Inokulation angesetzt wurden, konnten ebenso wie die 3D-ähnlichen Zellrasen infiziert werden, produzierten aber 4 Wochen nach Inokulation ein  $\sim 2,5$  Log-Stufen niedrigeres Maximum an HEV-RNA. Zudem konnten Zellsuspensionen in Form von *Hanging Drops* mit HEV infiziert werden. Allerdings produzierten die 2 Wochen älteren Sphäroide gegenüber den nachfolgend gebildeten Sphäroiden 4 Wochen nach Inokulation eine etwa 10-fach höhere Viruslast bei stehender Inkubation und eine etwa 250-fach höhere Viruslast bei Rotation. Der 2 Wochen vor Inokulation ausgesäte Zellrasen produzierte bereits 2 Wochen nach Inokulation das Maximum von  $5 \times 10^{11}$  K/ml, wohingegen der zusammen mit dem Inokulat ausgesäte Zellrasen ein Maximum von  $3 \times 10^{11}$  K/ml erst nach vier Wochen erreichte. Somit benötigen beide Herangehensweisen eine Gesamtzeit von 4 Wochen, um eine maximale Viruslast zu erreichen. Da aber für die Methode der früheren Zellaussaat deutlich weniger Zellen zum Ansetzen benötigt werden und Sphäroide weniger HEV produzierten, wurde die Zellaussaat auf die Standardprozedur von  $10^5$  viablen Zellen pro  $\text{cm}^2$  zwei Wochen vor Inokulation festgelegt.

### **4.3 Spezifische Mediumsupplemente steigern die Virusreplikation und optimierte Medien begünstigen die de-novo-Isolierung eines HEV-3e-Stammes**

Für gewöhnlich werden virusproduzierende Zellen in Medium mit reduziertem FCS-Gehalt von unter 10% kultiviert. Um den Einfluss von FCS auf die HEV-Replikation in vitro zu untersuchen, wurden persistent mit HEV-Isolat 47832c infizierte A549 in dem Medium BMEM\_G kultiviert, das mit unterschiedlichen Konzentrationen an FCS angereichert war. Der Überstand wurde nach zunehmenden Zeitintervallen komplett durch frisches Medium ersetzt und anschließend auf ORF2-Ag getestet. Zellen die mit höheren FCS-Konzentrationen inkubiert wurden, produzierten mehr ORF2-Ag

(siehe Abbildung 8A). In bisherigen erfolgreichen HEV-Isolationsversuchen wurden dem Zellkulturmedium 2,5 µg/ml Amphotericin B (124), 30 mM MgCl<sub>2</sub> (153), nicht essentielle Aminosäuren (NEAA) (130) und/oder unterschiedliche Antibiotika zugesetzt. Zudem ist bekannt, dass Salzlösungen Viren sowohl stabilisieren, als auch inaktivieren können und sich dieser Effekt je nach Salzkonzentration in beide Richtungen entwickeln kann (154). Daher wurden in einem ersten Versuch persistent mit HEV-Isolat 47832c infizierte A549 in BMEM\_G kultiviert, das mit unterschiedlichen Salzen in Konzentration von 10<sup>2</sup> bis 10<sup>-3</sup> mM jeweils 1:10 verdünnt supplementiert war. Fünf Wochen nach Inokulation wurden erhöhte ORF2-Ag-Konzentrationen in Überständen der Zellen gemessen, die zusätzlich mit 10 mM CaCl<sub>2</sub>, KCl, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> oder Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kultiviert wurden. Die Salze KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl und Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> hingegen führten zu verringerten ORF2-Ag-Gehalten im Überstand. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die HEV-stabilisierenden Salze einzeln oder in Kombination und zusammen mit den eingangs erwähnten Supplementen ausgetestet. Dazu wurden A549 und PLC/PRF/5 in unterschiedlich supplementiertes BMEM\_G kultiviert und mit HEV-Isolat 47832c inokuliert. HEV-RNA wurde im Überstand 2 Wochen, ORF2-Ag 4 Wochen nach Inokulation gemessen und auf die Werte der Zellen normalisiert, die in BMEM\_G ohne weitere Zusätze kultiviert wurden. Supplemente, die die Replikation am meisten verstärkten, sind in Abbildung 8B zu sehen. Überraschenderweise führte der Zusatz des Antimykotikums Amphotericin B zu der höchsten Steigerung von HEV-RNA und ORF2-Ag im Überstand von PLC/PRF/5. Hingegen ist durch Amphotericin B bei HEV-produzierenden A549 nur eine leichte Steigerung der HEV-RNA, nicht aber von ORF2-Ag zu beobachten. Bei der Salzsupplementierung führte die Kombination aus 10 mM CaCl<sub>2</sub> und K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zu den höchsten Viruslasten im Überstand, wobei die Zellviabilität aufgrund von CaCl<sub>2</sub> um ~50% abfiel. NEAA erhöhten ebenfalls die Viruslast, allerdings wieder nur im Überstand von PLC/PRF/5 und nicht von A549. Die Zugabe von 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin führte zu leicht höheren HEV-RNA und ORF2-Ag-Werten im Vergleich zu 100 µg/ml Gentamicin.



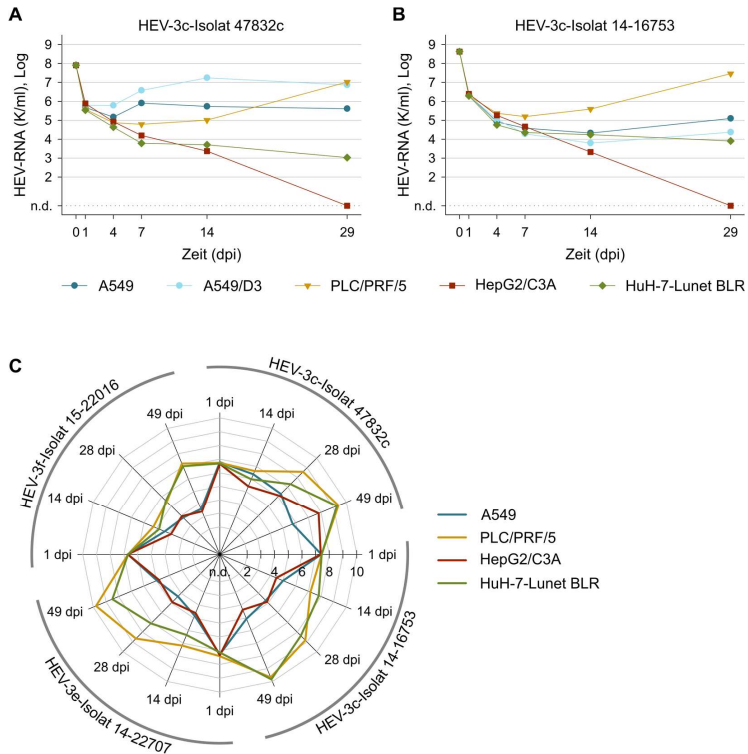
**Abbildung 8.** Bestimmte Mediusupplemente und deren Kombination steigern die Viruslast und optimierte Medien begünstigen die HEV-Infektion. **(A)** A549 persistent infiziert mit HEV-Isolat 47832c wurden in Medium mit verschiedenen Konzentrationen an FCS (hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56 °C) inkubiert. Das Medium wurde nach 64, 96 und 168 Stunden vollständig gewechselt und der resultierende Überstand auf ORF2-Ag getestet. **(B)** A549 und PLC/PRF/5 wurden in unterschiedlich supplementierten Medien kultiviert und mit HEV-Isolat 47832c inokuliert. Überstände wurden nach 2 Wochen auf HEV-RNA und nach 4 Wochen auf HEV-ORF2-Ag getestet. Ergebnisse sind als der Mittelwert technischer Duplikate dargestellt. **(C)** A549, PLC/PRF/5, HepG2/C3A und HuH-7-Lunet BLR wurden im Grundmedium BMEM oder in den optimierten Medien MEMM und MECK kultiviert. Die Zellen wurden mit den HEV-3c-Isolaten 47832c (3c\_ins) oder 14-16753 (3c) oder mit HEV-3e-positivem Serum (3e) inokuliert. Überstände wurden 7 Wochen nach Inokulation auf HEV-RNA getestet und als Mittelwert technischer Triplikate dargestellt. Ag, Antigen; Amph. B, Amphotericin B; dpi, Tage nach Inokulation (engl. days post inoculation); FCS, fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum); K/ml, Kopien pro Milliliter; Log, dekadischer Logarithmus; n.d., nicht detektiert; NEAA, nicht essentielle Aminosäuren (engl. non-essential amino acids); ORF2-Ag, Antigen des offenen Leserahmens 2 (engl. open reading frame 2 antigen); SCR, Quotient aus Messsignal und Grenzwert (engl. signal-to-cutoff ratio).

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde A549, PLC/PRF/5, HepG2/C3A und HuH-7-Lunet BLR entweder mit dem Grundmedium BMEM oder mit den optimierten Medien MEMM (gemäß Tanaka et al. (124); BMEM supplementiert mit 2,5 µg/ml Amphotericin B und 30 mM MgCl<sub>2</sub>) und MECK (BMEM supplementiert mit 2,5 µg/ml Amphotericin B, 10 mM CaCl<sub>2</sub> und 10 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) kultiviert. Die Zellen wurden entweder mit den HEV-3c-Isolaten 47832c oder 14-16753 oder mit dem HEV-3e-positivem Serum 14-22707 inokuliert. Sieben Wochen später wurden höhere Viruslasten in den Überständen der Zellen gemessen, die mit optimierten Medien kultiviert wurden (siehe Abbildung 8C). Zudem wurde ein neuer HEV-3e-Stamm in A549, PLC/PRF/5 und HuH-7-Lunet BLR isoliert, wobei dieser in letztgenannter Zelllinie nur unter Einsatz von optimierten Medien replizierte. In HepG2/C3A konnte der HEV-3e-Stamm selbst unter optimierten Bedingungen nicht replizieren. Das neue HEV-3e-Isolat wurde nach dem Serum 14-22707 benannt. Da MEMM bei drei von vier Zelllinien höhere Viruslasten induzierte, wurde es ab sofort als Virusisolationsmedium verwendet.

#### **4.4 Isolierung eines HEV-3f-Stammes bestätigt PLC/PRF/5 als geeignetste Zelllinie für die HEV-Isolierung**

Mittlerweile wurden bereits viele Zelllinien auf ihr Potential getestet, die HEV-Replikation *in vitro* zu unterstützen (134). A549, der Subklon A549/D3, PLC/PRF/5 und HepG2/C3A wurden diesbezüglich als die permissivsten Zelllinien identifiziert (124,131,132,138). Allerdings wurden diese Zelllinien nie mit unterschiedlichen HEV-Stämmen systematisch verglichen. Darüber hinaus wurde der Subklon HuH-7-Lunet BLR als potentielle Zelllinie eingeführt, da diese hochpermissiv gegenüber dem ebenfalls hepatotropen Hepatitis-C-Virus ist (139). Somit wurden diese Zelllinien mit den HEV-3c-Isolaten 47832c und 14-16753 inokuliert und die HEV-RNA im Überstand für 4 Wochen verfolgt. Das Isolat 47832c replizierte dabei in dem Subklon A549/D3 bereits nach 2 Wochen zu einer maximalen Viruslast, die, verglichen zur Mutterzelllinie A549, das mehr als Zehnfache betrug (siehe Abbildung 9A). Weitere 2 Wochen später wurde ein vergleichbares Maximum ebenfalls von PLC/PRF/5 produziert. HuH-7-Lunet BLR unterstützten zwar die HEV-Replikation, allerdings lag die produzierte Viruslast nach 4 Wochen nur bei 10<sup>3</sup> K/ml und somit 4 Log-Stufen niedri-

ger. Im Überstand von HepG2/C3A war nach vier Wochen keinerlei HEV-RNA detektierbar, auch nicht nach Inokulation mit Isolat 14-16753. Dieses Isolat replizierte zudem zu jedem Beobachtungszeitpunkt besser in PLC/PRF/5, die nach 4 Wochen eine 230- bis 3600-fach höhere Viruslast produzierten, verglichen mit A549, A549/D3 und HuH-7-Lunet BLR (siehe Abbildung 9B).



**Abbildung 9.** Einfluss der Zelllinie auf die HEV-Replikation und nachfolgende Viruslast. A549, Subklon A549/D3, PLC/PRF/5, HepG2/C3A und HuH-7-Lunet BLR wurden mit (A) HEV-3c-Isolat 47832c oder (B) 14-16753 inokuliert und die Überstände nach 1, 4, 7, 14 und 29 Tagen nach der Inokulation auf HEV-RNA getestet. (C) A549, PLC/PRF/5, HepG2/C3A und HuH-7-Lunet BLR wurden mit HEV-3c-Isolat 47832c, 14-16753, HEV-3e-Isolat 14-22707 oder dem HEV-3f-positiven Serum 15-22016 inokuliert. HEV-RNA wurde in den Überständen nach 1, 14, 28 und 49 Tagen nach der Inokulation gemessen. dpi, Tage nach Inokulation (engl. days post inoculation); K/ml, Kopien pro Milliliter; Log, dekadischer Logarithmus; n.d., nicht detektiert.

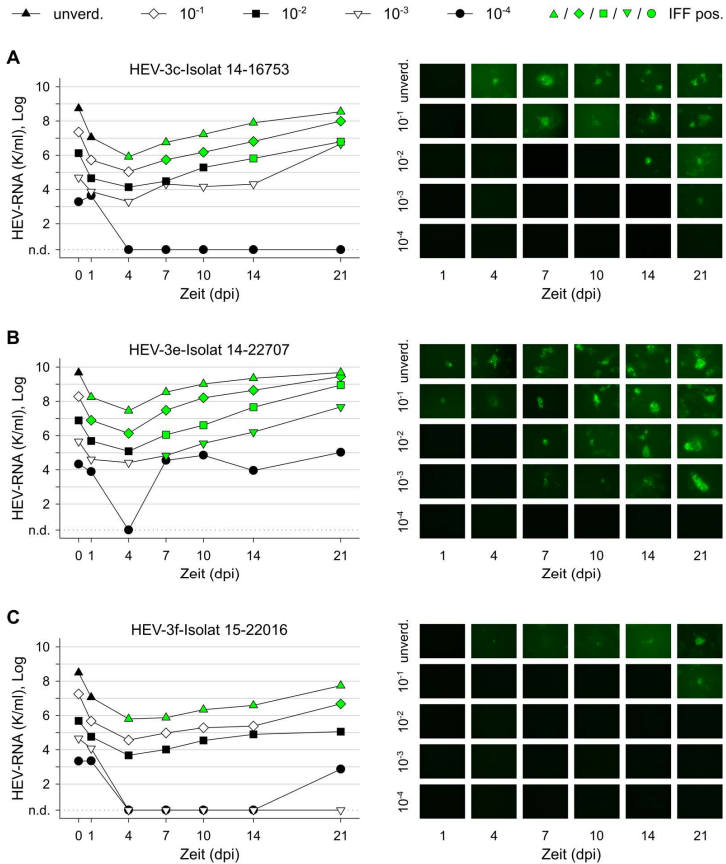
In einem weiterführenden Experiment wurden die Zelllinien neben den HEV-3c-Isolaten zusätzlich mit dem HEV-3e-Isolat 14-22707 und einem HEV-3f-positiven Serum inokuliert, um einen möglichen Effekt von anderen Subtypen und den Vergleich von

de novo Isolation gegenüber Passagierung aufzudecken. Für diesen Versuch wurde der Subklon A549/D3 nicht berücksichtigt, da dieser speziell für das HEV-3c-Isolat 47832c identifiziert wurde (138), das optimierte HEV-Zellkultursystem aber möglichst breit angelegt werden sollte. Die inokulierten Zellen wurden für insgesamt 7 Wochen nachverfolgt und der Überstand regelmäßig auf HEV-RNA getestet. Dabei zeigte sich erneut das Bild, dass PLC/PRF/5 in über 80% der observierten HEV-Stämme und Zeitpunkte die höchsten Viruslasten generierten (siehe Abbildung 9C). Verglichen mit den anderen Zelllinien war der Median der Viruslast im PLC/PRF/5-Überstand nach 2, 4 und 7 Wochen nach der Inokulation um das jeweils 10-, 100- und 4000-fache erhöht. Die einzige Ausnahme hiervon bildete das HEV-3c-Isolat 14-16753 in HuH-7-Lunet BLR, die 2 und 7 Wochen nach Inokulation leicht höhere Viruslasten generierten. Der neue HEV-3f-Stamm konnte aus Serum in PLC/PRF/5, HuH-7-Lunet BLR und HepG2/C3A, nicht aber in A549 isoliert werden und wurde der Materialnummer entsprechend auf 15-22016 benannt. Somit zeigt sich deutlich, dass PLC/PRF/5 als 3D-ähnlicher Zellrasen die Zelllinie der Wahl für die HEV-Isolation und -Produktion in vitro ist. Der neu eingeführte Subklon HuH-7-Lunet BLR eignet sich ebenfalls gut für die HEV-Isolation und generiert dabei konstant höhere Viruslasten als die bereits etablierten Zelllinien A549 und HepG2/C3A.

#### **4.5 Titration der neuen HEV-Isolate weist auf Subtyp-spezifische Replikationsdynamik hin**

PLC/PRF/5 wurden mit den drei neuen Isolaten HEV-3c 14-16753, HEV-3e 14-22707 und HEV-3f 15-22016 aus der jeweils ersten Passage in einer 1:10-Serienverdünnung inokuliert. Mittels einer linearen Regression und den dekadisch logarithmierten HEV-RNA-Werten zwischen 4 und 21 Tagen nach Inokulation wurden die unterschiedlichen Replikationsgeschwindigkeiten berechnet. So repliziert das HEV-3e-Isolat 14-22707 am schnellsten und verzehnfacht seine Viruslast innerhalb von 4,8 Tagen. Das HEV-3c-Isolat 14-16753 braucht dafür 6,3 Tage, das HEV-3f-Isolat 15-22016 8,5 Tage (siehe Abbildung 10). Ein ähnliches Bild zeigte sich nach der Immunfluoreszenzfärbung (IFF). HEV-3e-Isolat 14-22707 infizierte nachweisbar schneller mehr Zellen als HEV-3c-Isolat 14-16753. Kaum ein Signal war nach der Färbung von PLC/PRF/5 zu sehen, die mit dem HEV-3f-Isolat 15-22016 infiziert wurden. Dies

könnte einerseits an der geringeren Sensitivität der IFF und den vergleichsweise niedrigeren Viruslasten von Isolat 15-22016 liegen, andererseits auch an der Verwendung des monoklonalen anti-ORF2-Antikörpers aus Klon 2E2 (155). Insgesamt deuten die Daten aber auf eine Subtyp-spezifische Replikationsdynamik hin.



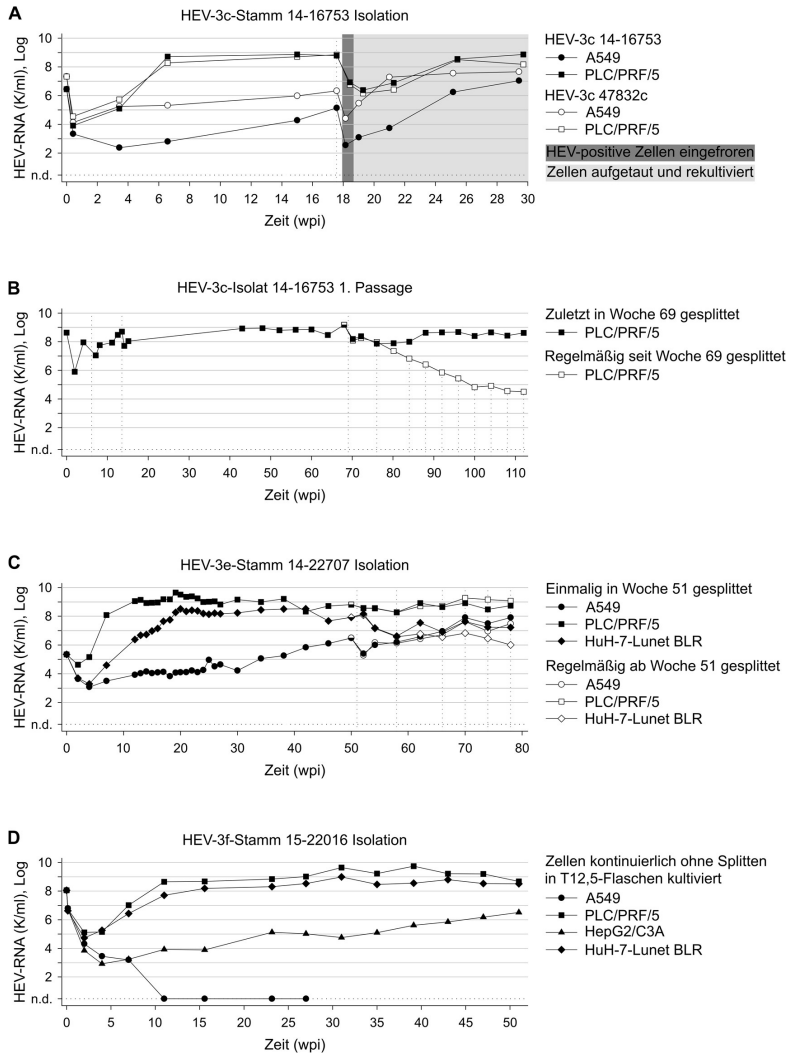
**Abbildung 10.** Titration der neuen HEV-Isolate offenbart unterschiedliche Replikationskinetiken. PLC/PRF/5 wurden in einer 1:10-Serienverdünnung mit (A) HEV-3c-Isolat 14-16753, (B) HEV-3e-Isolat 14-22707 und (C) HEV-3f-Isolat 15-22016 aus der jeweils ersten Passage inokuliert. Nach 1, 4, 7, 10, 14 und 21 Tagen nach der Inokulation wurden die Überstände auf HEV-RNA getestet (linke Abbildungen) und die Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung indirekt auf ORF2-Kapsid-Antigen angefärbt (rechte Abbildungen). dpi, Tage nach Inokulation (engl. days post inoculation); IFF, Immunfluoreszenzfärbung; K/ml, Kopien pro Milliliter; Log, dekadischer Logarithmus; n.d., nicht detektiert; pos., positiv; unverd., unverdünnt.



In einem nachfolgenden Experiment wurde die Dosis der HEV-Isolate bestimmt, die 50% einer Zellkultur infiziert (TCID<sub>50</sub>, engl. 50% tissue culture infective dose). Dazu wurden PLC/PRF/5 in Triplikaten in T12,5-Zellkulturflaschen ausgesät und mit den drei neuen Isolaten, sowie Isolat 47832c in einer 1:10-Serienverdünnung inokuliert. Die TCID<sub>50</sub> wurde gemäß Reed und Muench (156) ermittelt, wobei Ansätze mit detektierbarer HEV-RNA im Überstand 13 Tage nach Inokulation als infiziert und Ansätze ohne detektierbare HEV-RNA als nicht infiziert gewertet wurden. So ergab sich für die beiden HEV-3c-Isolate 47832c (HEV-RNA Ausgangskonzentration des Virusstock:  $2,4 \times 10^8$  K/ml) und 14-16753 ( $1,6 \times 10^8$  K/ml) der Wert von  $1,3 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml. Bei HEV-3e-Isolat 14-22707 ( $8,7 \times 10^8$  K/ml) und dem HEV-3f-Isolat 15-22016 ( $1,1 \times 10^8$  K/ml) lag dieser bei  $2,2 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml.

#### **4.6 Optimiertes HEV-Zellkultursystem produziert zeitlich praktisch unbegrenzt hohe Viruslasten**

Die neuen HEV-Isolate 14-16753, 14-22707 und 15-22016 wurden zusammen mit Isolat 47832c für 30 Wochen bis mehr als 2 Jahre kontinuierlich in Kultur gehalten, wobei über den gesamten Zeitraum kein zytopathischer Effekt (CPE, engl. cytopathic effect) beobachtet wurde. Während dieser Langzeitkultivierung wurde für HEV-3c-Isolat 14-16753 eine maximale Viruslast von  $7,4 \times 10^8$  K/ml (208 dpi) und  $1,5 \times 10^9$  K/ml (476 dpi) nach Isolation und erster Passage detektiert (siehe Abbildung 11A & B). Das Maximum von HEV-3e-Isolat 14-22707 wurde an 134 dpi mit  $4,4 \times 10^9$  K/ml detektiert, für das HEV-3f-Isolat 15-22016 an 274 dpi mit  $5,5 \times 10^9$  K/ml (siehe Abbildung 11C & D). Bemerkenswerterweise konnten die HEV-positiven Zellen für mehr als ein Jahr in ein und derselben T12,5-Zellkulturflasche gehalten werden, wobei nur alle 3–4 Tage das Medium komplett ausgetauscht wurde. Über den gesamten Zeitraum hinweg wurde kontinuierlich infektiöses HEV mit sehr hohen Viruslasten in den Überstand sezerniert.

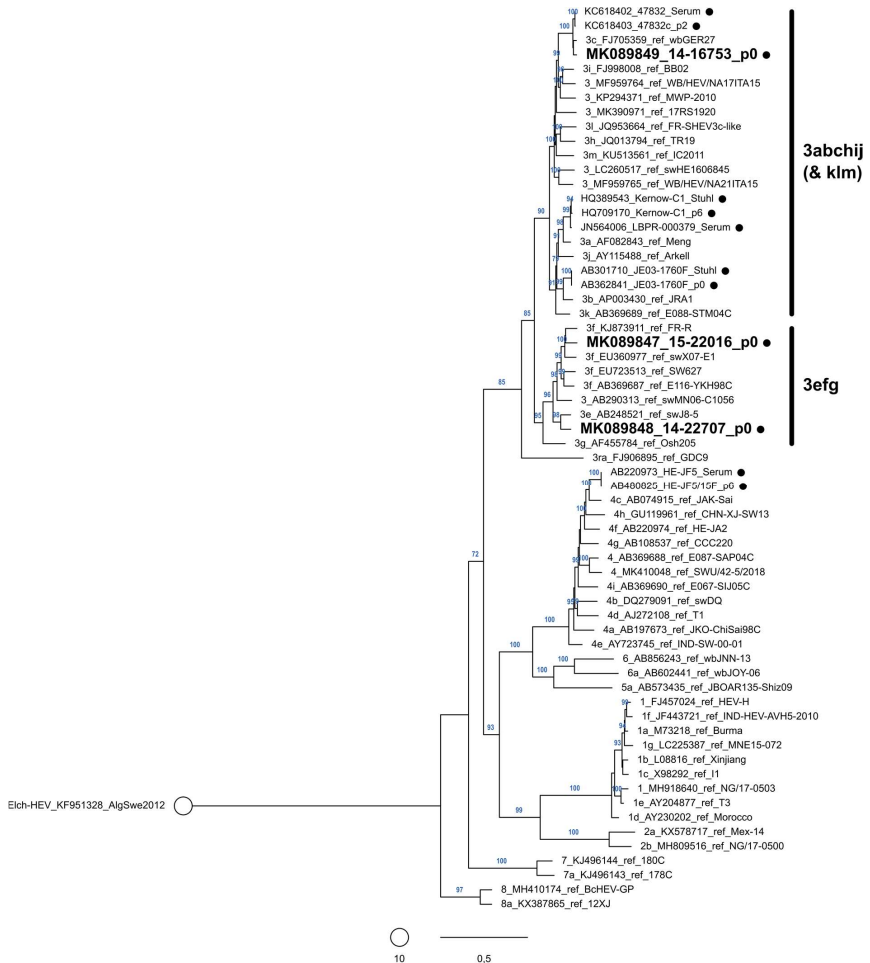


**Abbildung 11.** Langzeitkultivierung von persistent mit HEV infizierten Zellen. **(A)** A549 und PLC/PRF/5 wurden mit HEV-3c-Isolat und HEV-3c-positivem Serum 14-16753 inokuliert. Nach 123 Tagen nach der Inokulation wurden die virusproduzierenden Zellen expandiert, eingefroren und bei  $-192\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Anschließend wurden die Zellen wieder aufgetaut, rekultiviert und die produzierte Viruslast weiterverfolgt **(B)** PLC/PRF/5 wurden mit HEV-3c-Isolat 14-16753-positivem Überstand aus der Isolation inokuliert. Nach 51 Wochen nach der Inokulation wurde der Effekt von regelmäßigem Splitten auf die Viruslast untersucht. **(C)** A549, PLC/PRF/5 und HuH-7-Lunet BLR wurden mit HEV-3e-positivem Serum 14-22707 inokuliert und die Entwicklung der Viruslast für 1,5 Jahre nachverfolgt. **(D)** A549, PLC/PRF/5, HepG2/C3A und HuH-7-Lunet BLR wurden mit HEV-3f-positivem Serum 15-22016 inokuliert und für 1 Jahr nachverfolgt. K/ml, Kopien pro Milliliter; Log, dekadischer Logarithmus; n.d., nicht detektiert; wpi, Wochen post Inokulation.

Alle Isolate konnten problemlos passagiert werden. HEV-positive Zellen wurden expandiert, eingefroren, auf  $-192\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert, wieder in Kultur genommen und produzierten anschließend weiterhin hohe Konzentrationen an infektiösem HEV. Überraschenderweise sank die Viruslast von HEV-3c-Isolat 14-16753 nach regelmäßigem Splitten der Zellen kontinuierlich ab, nicht aber die von HEV-3e-Isolat 14-22707 (siehe Abbildung 11B & C). Dies sollte in weiterführenden Arbeiten genauer untersucht werden.

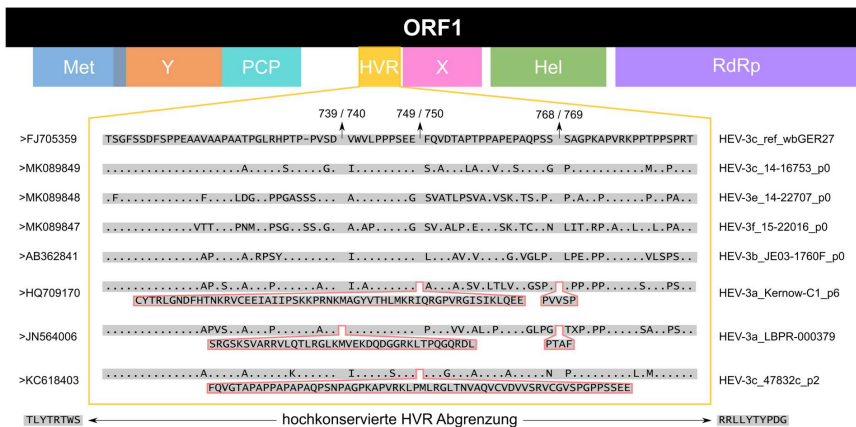
#### **4.7 Gesamtgenomsequenzierung bestätigt Wildtyp-Charakter ohne HVR-Insertionen**

Das Genom der neuen Isolate wurde vollständig sequenziert. Hierzu wurde die RNA aus Zellkulturüberständen von Tag 200, 189 und 126 nach Inokulation von Isolat 14-16753-, 14-22707- und 15-22016-positiven Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde mittels *Primer Walking* in überlappenden Segmenten per PCR amplifiziert und anschließend nach Sanger sequenziert. Das 5'-Ende wurde mittels einer RACE-PCR (schnelle Amplifikation der cDNA-Enden mittels PCR, engl. rapid amplification of cDNA-ends with PCR) amplifiziert und gleichermaßen sequenziert. Die so erhaltenen Gesamtgenomsequenzen wurden zusammen mit dem HEV-Referenzset nach Smith et al., 2020 (11), sowie allen bisher in Zellkultur isolierten und Gesamtgenom-sequenzierten HEV-Stämmen (47832 (130), LBPR-000379 (132), Kernow-C1 (131), HE-JF5 (126,157) und JE03-1760F (124,158)) phylogenetisch analysiert (siehe Abbildung 12). Die neu isolierten Stämme 14-16753, 14-22707 und 15-22016 gruppieren sich mit den HEV-3c-, -3e- und -3f-Referenzstämmen. Somit ist es erstmals gelungen, HEV-Stämme der 3efg-Klade in Zellkultur zu isolieren und das Gesamtgenom zu sequenzieren.



**Abbildung 12.** Phylogenetische Einordnung der bisher in Zellkultur isolierten und vollständig sequenzierten HEV-Stämme in das Referenzset nach Smith et al., 2020 (11). Der phylogenetische Baum basiert auf Gesamtgenomsequenzen und wurde mittels Eich-HEV wurzelt. Zweige mit einem Bootstrap-Wert von >70% wurden entsprechend in blau beschriftet. Die Referenzsequenzen wurden mit dem (Sub-)Genotyp, gefolgt von GenBank-ID, „ref“ und Stammname bezeichnet. Zellkulturisolate und zugehörige HEV-Stämme aus Patientenmaterialien wurden mit einem schwarz gefüllten Kreis gekennzeichnet und mit GenBank-ID, Stamm- bzw. Isolat-Name und Probenmaterial bzw. Passagenzahl (p) bezeichnet. Die neuen Isolate sind zusätzlich fettgedruckt. Dicke vertikale Linien heben die Kladen 3abcj (& klm) und 3efg des HEV-Genotyps 3 hervor.

Die aktuell isolierten HEV-Stämme 47832c, Kernow-C1\_p6 und LBPR-000379 weisen ungewöhnliche Insertionen in der hypervariablen Region (HVR) des ORF1 (offener Leserahmen 1, engl. open reading frame 1) auf, die weder im ersten hochreplizierenden HEV-3b-Isolat JE03-1760F, noch in HEV-3-Referenzsequenzen zu finden sind. Diese Insertionen entstanden durch Rekombination mit humaner ribosomaler oder durch Duplikation viruseigener RNA und führen zu einer verstärkten Replikation des Virus in vitro (133). Zwar basiert der Großteil der HEV-in-vitro-Forschung auf Kernow-C1\_p6, es wird aber kontrovers diskutiert, ob sich Isolate mit diesen ungewöhnlichen Insertionen ähnlich zu Wildtyp-Stämmen verhalten (137). Daher wurde ein Alignment der HVR aller Gesamtgenom-sequenzierten HEV-3-Isolate durchgeführt (siehe Abbildung 13). Dies legte offen, dass die neuen HEV-Isolate 14-16753, 14-22707 und 15-22016 keinerlei Insertionen tragen und somit auf genomischer Ebene dem Wildtyp entsprechen.

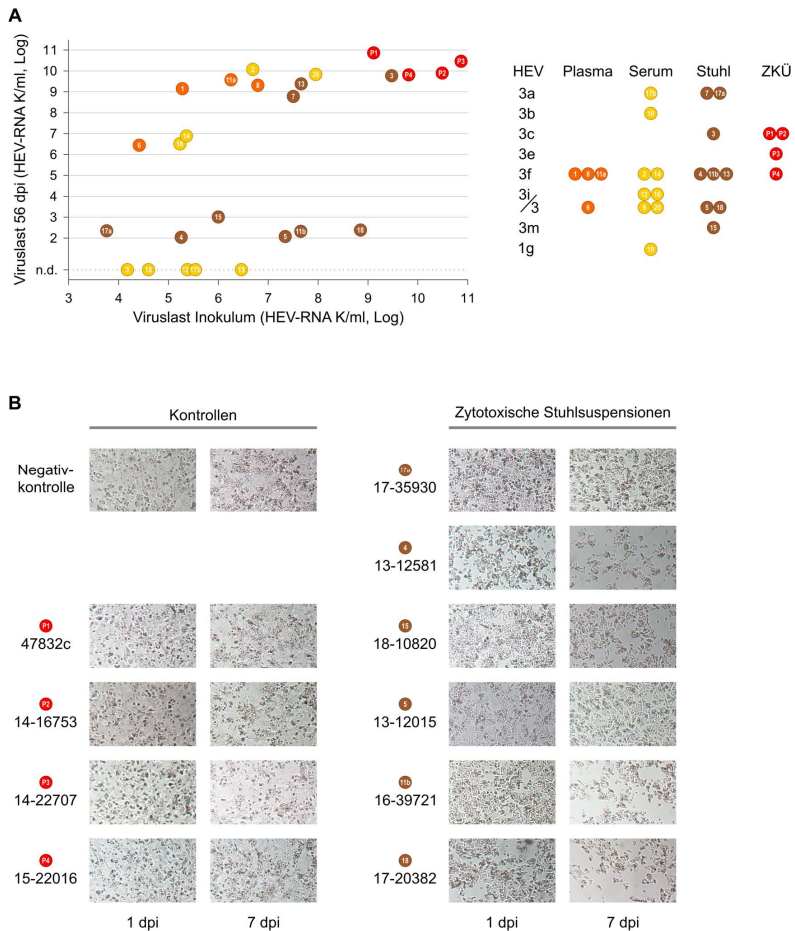


**Abbildung 13.** Alignment des ORF1 offenbart keine Insertionen in der HVR der neuen HEV-Isolate 14-16753, 14-22707 und 15-22016. Für das Alignment mittels MAFFT wurden die in der GenBank hinterlegten ORF1-Aminosäuresequenzen des HEV-3c-Referenzstammes wbGER27 zusammen mit denen der neuen Isolate HEV-3c 14-16753, HEV-3e 14-22707 und HEV-3f 15-22016, sowie den bisher in Zellkultur isolierten und Gesamtgenom-sequenzierten Wildtyp-3-Isolaten HEV-3b JE03-1760F, HEV-3a Kernow-C1, HEV-3a LBPR-000379 und HEV-3c 47832c verwendet. Die Angaben 739/740, 749/750 und 768/769 beziehen sich auf die Position der Aminosäure im ORF1 des HEV-3c Referenzstammes. ORF, offener Leserahmen (engl. open reading frame); Met, Methyltransferase; Y, Y-Domäne; PCP, Papain-ähnliche Cysteinprotease; HVR, hypervariable Region; X, X-Domäne; Hel, RNA-Helikase; RdRp, RNA-abhängigen RNA-Polymerase (engl. RNA-dependent RNA polymerase).

#### **4.8 Validierung des optimierten Zellkultursystems durch Isolierung von 16 zusätzlichen HEV-3-Stämmen**

Um das optimierte Zellkultursystem zu validieren, wurden alle diagnostischen Rückstellproben des Instituts für Klinische Mikrobiologie und Hygiene Regensburg auf HEV-positive Probenmaterialien durchsucht, um ein möglichst breites Spektrum an Proben unterschiedlicher Materialien, Viruslasten und HEV-Genotypen zu identifizieren. Insgesamt konnten so 4 Plasmen, 9 Seren und 9 Stühle aus den Jahren 2011–2018 mit einer Viruslast von  $10^3$  bis  $10^{10}$  K/ml asserviert werden. Bereits zu diesen Proben vorhandene HEV-Sequenzdaten aus der Diagnostikabteilung der Virologie wurden mittels des HEV-Referenzsets nach Smith et al., 2020 (11) phylogenetisch neu eingeordnet. Das Probenpanel deckte demnach die Subgenotypen HEV-1g, -3a, -3b, -3c, -3f, -3i und 3m, sowie den noch nicht weiter klassifizierten HEV-3-Subtyp WB/HEV/NA17ITA15 (GB ID MF959764) ab, der phylogenetisch am nächsten mit HEV-3i verwandt ist. Zusätzlich enthielt das Probenpanel ein Plasma-Stuhl- und ein Serum-Stuhl-Paar. Die 22 HEV-positiven Proben wurden zusammen mit HEV-3c 47832c-, HEV-3c 14-16753-, HEV-3e 14-22707- und HEV-3f 15-22016-positiven Zellkulturüberstand als Kontrollen auf PLC/PRF/5 inokuliert. Die Zellen wurden wöchentlich auf ungewöhnliche Morphologie überprüft und die Überstände auf HEV-RNA getestet. Acht Wochen nach Inokulation konnte in über drei Viertel der mit Probenmaterialien inokulierten Ansätze HEV-RNA detektiert werden (siehe Abbildung 14A). Elf dieser 17 Ansätze wiesen hohe Viruslasten von  $>10^6$  K/ml im Zellkulturüberstand auf. Die restlichen sechs stagnierten zwischen  $10^2$  und  $10^3$  K/ml. Allerdings wurde bei diesen niedrigpositiven Ansätzen der Zellrasen durch die inokulierten Stuhlsuspensionen nachhaltig geschädigt. Dieser nicht auf HEV zurückzuführende CPE verstärkte sich innerhalb der ersten Woche nach Inokulation, blieb ab dann unverändert und die Zellen erholten sich in der Folgezeit bis 8 Wochen nach Inokulation nicht mehr (siehe Abbildung 14B). Die Tatsache, dass HEV im verbleibenden Zellrasen über diesen langen Zeitraum aber weiter replizierte, spricht dafür, dass das optimierte Zellkultursystem extrem robust ist. Die Kontrollen in Form der inokulierten Isolate 47832c, 14-16753, 14-22707 und 15-22016 replizierten wie gewohnt zu sehr hohen Viruslasten von  $>10^9$  K/ml. Betrachtet man das Isolationsexperiment material-spezifisch, so konnte HEV aus allen Stuhlsuspensionen und Plasmen isoliert werden. Hingegen konnte HEV nur aus 4 von 9 Seren isoliert werden. Klammert man das

HEV-1g-positive Serum aus, so liegt die Grenze für eine erfolgreiche HEV-3-Isolation aus Serum bei einer Viruslast zwischen  $10^5$  und  $10^6$  K/ml.



**Abbildung 14.** Isolation weiterer HEV-Stämme bestätigt Permissivität und Robustheit des optimierten Zellkultursystems. PLC/PRF/5 wurden mit insgesamt 22 HEV-positiven Probenmaterialien, sowie HEV-Isolat 47832c, 14-16753, 14-22707 und 15-22016 inokuliert. (A) Der Überstand wurde wöchentlich auf HEV-RNA getestet und die Viruslast 8 Wochen nach Inokulation in Relation zur Viruslast des Inokulums dargestellt. (B) Ebenso wurde die Zellmorphologie wöchentlich überprüft, die sich ab 7 dpi bei geschädigten Zellrasen jedoch nicht mehr änderte und somit exemplarisch zusammen mit den Kontrollen dargestellt wurden. dpi, Tag(e) nach Inokulation (engl. day(s) post inoculation); K/ml, Kopien pro Milliliter; Log, dekadischer Logarithmus; ZKÜ, Zellkulturüberstand.

## 5. Diskussion

Bisher wurden mehrere Versuche unternommen, ein effizientes HEV-Zellkultursystem zu etablieren (134). Allerdings konnten diese entweder nicht reproduziert werden (127–129), beruhten auf hochentwickelten Bioreaktoren (128) oder resultierten in der Isolation von HEV-Stämmen, die ungewöhnliche Genom-Insertionen aufwiesen (130–132). Diese Arbeit zielte darauf ab, das HEV-Zellkultursystem zu optimieren, zu vereinfachen und durch Wildtyp-Stämme zu erweitern, die aus akut und chronisch infizierten Probanden stammen und somit die aktuell in Europa zirkulierenden Stämme widerspiegeln. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass (i) eine zweimal wöchentliche Zellversorgung anstelle einer täglichen Versorgung ausreicht, (ii) ein überkonfluent gewachsener, 3D-ähnlicher Zellrasen die HEV-Infektion und -Replikation begünstigt, (iii) Mediumsupplemente, insbesondere Amphotericin B,  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$  und  $K_2SO_4$ , die HEV-Replikation steigern, (iv) die Zelllinie PLC/PRF/5 am permissivsten gegenüber HEV ist und das Virus in HuH-7-Lunet BLR ebenfalls sehr stark repliziert, (v) insgesamt 19 HEV-3-Stämme aus Probenmaterial isoliert wurden, wovon die drei Isolate HEV-3c 14-16753, HEV-3e 14-22707 und HEV-3f 15-22016, die stellvertretend für die häufigsten HEV-3 Subgenotypen in Europa stehen (12), vollständig charakterisiert wurden, (vi) die neuen Isolate zeitlich praktisch unbegrenzt zu sehr hohen Viruslasten zwischen  $10^7$  und  $10^{10}$  HEV-RNA-Kopien pro ml (K/ml) replizieren.

In einem bisher vielversprechenden, aber nicht vollständig reproduzierbarem HEV-Zellkultursystem wurden konfluente A549- und PLC/PRF/5-Zellrasen 1–2 Tage vor Inokulation trypsiniert und 1:4 gesplittet (124). Überraschenderweise wurde in dieser Arbeit klar, dass auf diese Weise nur die von A549 ausgebildeten, einschichtigen Zellrasen verlässlich mit HEV infiziert werden können, nicht aber die der PLC/PRF/5. Jedoch lässt sich die Wahrscheinlichkeit einer Infektion von PLC/PRF/5 und die Höhe der resultierenden Viruslast enorm steigern, je dichter und früher die Zellen vor Inokulation ausgesät werden. Dieser Effekt lässt sich bei A549 kaum abbilden und diese Zellen lassen sich praktisch unabhängig von Konfluenz und Alter des Zellrasens infizieren. Hingegen müssen PLC/PRF/5 mindestens 14 Tage vor Inokulation gemäß der Standardspliträte ausgesät werden, um einen überkonfluenten, 3D-ähnlichen Zellrasen auszubilden, der zuverlässig mit HEV infiziert werden kann. Dieses Erkenntnis passt zu einer Arbeit, in der ausschließlich PLC/PRF/5 3D-Zellkulturen, die für mindestens 28 Tage in einem rotierenden Bioreaktor inkubiert wurden, mit HEV



infiziert werden konnten. In dem parallel angesetzten einschichtigen Zellrasen konnte das Virus hingegen nicht replizieren (128). Diese offensichtlich für PLC/PRF/5 benötigte Vorlaufzeit kann durch massives Erhöhen der ausgesäten Zellzahl auf 0 Tage reduziert werden. Allerdings verschiebt sich das Erreichen der maximalen Viruslast um 14 Tage nach hinten, wodurch kein Zeitgewinn entsteht. Somit ist wohl ein Zusammenspiel aus Zelldifferenzierung und engerer Zell-Zell-Kontakt für eine höhere Permissivität und nachfolgende Replikation gegenüber HEV verantwortlich. Zusätzlich könnten Autophagie-Prozesse eine Rolle spielen, da unabhängig von der Zellzahl immer das gleiche Volumen an Medium verwendet wurde und somit sehr dicht ausgesäte Zellen, sowie für längere Zeit überkonfluent gewachsene Zellrasen möglicherweise unterversorgt waren. So wird u.a. das Protein mTOR (engl. mechanistic target of rapamycin), ein Regulatorprotein der Autophagie, bei hoher Zelldichte inhibiert (159,160). Eine mTOR-Inhibition führt wiederum zu einer stark gesteigerten HEV-Replikation (161). Da die Zellkonfluenz generell das Genexpressionsmuster beeinflusst, kann darüber hinaus eine Hochregulierung eines für die HEV-Infektion kritischen Rezeptors ebenfalls ein Grund für die gesteigerte Infektionseffizienz sein. So werden beispielsweise in Brustkrebszellen >1000 Gene hochreguliert, wenn diese Zellen konfluenter gewachsen sind (162). Die Experimente zur Steigerung der Infektionseffizienz mittels dichter Zellrasen wurden ausschließlich mit quasi-behülltem HEV (eHEV, engl. quasi-enveloped) aus Zellkulturüberstand durchgeführt. Würde sich eine ähnliche Steigerung der Infektion mittels unbehülltem HEV (nHEV, engl. naked) abzeichnen, würde dies eher auf die Regulierung eines für die Infektion wichtigen intrazellulären Proteins hindeuten, da für die Anheftung von nHEV und eHEV an die Zelle unterschiedliche Faktoren und Oberflächenproteine wichtig sind (ORF2-Antigen- vs. Lipid-Interaktion). Es ist aber nicht auszuschließen, dass sich das Oberflächenprofil überkonfluent gewachsener PLC/PRF/5 sowohl zu Gunsten einer effektiveren nHEV- als auch eHEV-Anheftung verändert. Eine Genexpressionsanalyse könnte hier entscheidende Daten liefern.

Ebenso essentiell für die HEV-Isolation ist die Rolle der Mediumsupplemente. Bereits 1999 wurde gezeigt, dass die Supplementierung von 30 mM  $MgCl_2$  die HEV-Viruslast im Zellkulturüberstand erhöhte und die Infektiosität sicherte (153). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht nur  $MgCl_2$ , sondern auch  $CaCl_2$ , KCl,  $K_2SO_4$ ,  $MgSO_4$  und  $Na_2SO_4$  zu gesteigerten Virusausbeuten führte, wohingegen  $KH_2PO_4$ ,

NaCl und Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> sich negativ auswirkten. Der Grund hierfür könnte eine Veränderung der HEV-Stabilität sein. Es ist bekannt, dass Salze abhängig von der eingesetzten Konzentration die Thermostabilität von Viren beeinflussen. Der Grund für die Stabilitätsänderung wird dabei nicht allein in der Auswirkung auf virale Proteine, sondern zusätzlich in der Beeinflussung von Lipiden und Nukleinsäure vermutet (154). Zudem können Salze die Aggregation von Viren beeinflussen. So steigt beispielsweise die Aggregation von Polioviren bei niedrigen pH-Werten durch den Einsatz von 20 mM MgCl<sub>2</sub> oder CaCl<sub>2</sub> (163). Somit könnte der Einsatz von bestimmten Salzen im millimolaren Bereich HEV aggregieren. Dies könnte das Virus einerseits durch den teilweisen Schutz vor proteolytischem Abbau im Zellkulturüberstand stabilisieren. Andererseits könnte es dadurch auch zur einer gesteigerten kollektiven Infektion von einzelnen Zellen kommen, einhergehend mit einer beschleunigten Produktion von Nachfolgeviren, wie dies beispielsweise auf das Vesicular-Stomatitis-Virus zutrifft (164). Letztlich könnte sich aber auch eine im Zellkulturmedium abgeänderte Salzzusammensetzung auf die Zelle auswirken, indem beispielsweise intrazelluläre Enzyme durch bestimmte Salze so in ihrer Aktivität beeinflusst werden, dass sie die HEV Replikation begünstigt. Neben Salzen beeinflusste auch die FCS-Konzentration im Zellkulturmedium die HEV-Replikation. In vielen Viruserhaltungsmedien ist der FCS-Gehalt gegenüber dem Standarderhaltungsmedium üblicherweise stark reduziert. Der Grund hierfür ist, dass Serum unspezifisch bindet und so für die Virusanheftung wichtige Rezeptorbindestellen blockiert werden können (165), wie es beispielsweise für das Hepatitis-C-Virus der Fall ist (166). Bei der Isolation von Influenzavirus A in Zellkultur wird sogar vollständig auf Serum verzichtet, da die darin enthaltenen Proteaseinhibitoren die Trypsin-induzierte Spaltung von Hämagglutinin inhibieren und so keine Fusion des Virus mehr mit der Zelle erfolgen kann (167,168). Für HEV gilt jedoch, je höher der FCS-Gehalt, desto höher die produzierte Viruslast in vitro. Somit scheint FCS keine für HEV wichtigen Bindestellen zu blockieren, weshalb FCS im Viruserhaltungsmedium in der vorliegenden Arbeit nicht reduziert wurde. Aufgrund der sehr heterogenen Zusammensetzung von FCS aus einer Vielzahl von Bestandteilen, die bisher immer noch nicht bis in das letzte Detail geklärt ist (169), kann nur spekuliert werden, welche Komponente in welcher Phase den Replikationszyklus begünstigt. Ein erster Ansatzpunkt wäre eine der Hauptkomponenten wie Albumin. So führt beispielsweise der Zusatz von lipidreichem Albumin in der serumfreien Zellkulturer-

haltung zu einer robusten HCV-Replikation (170). Überraschenderweise steigerte jedoch das Antimykotikum Amphotericin B die HEV-Replikation am deutlichsten. Eine ähnlich starke Replikationssteigerung durch Amphotericin B konnte auch für Influenzaviren in Vero-Zellen gezeigt werden, die wohl auf einer beschleunigten Freisetzung des Virus innerhalb der Zelle beruht (171). Der zugrundeliegende Mechanismus wurde dabei in der Amphotericin B-induzierten Ansäuerung interner Zellkompartimente vermutet, was eine schnellere Reduzierung des pH-Werts in Endosomen fördert und diese somit beschleunigt degradiert und Viren freisetzt. Da HEV ebenfalls über Endozytose in die Wirtszelle gelangt (36,38), könnte der beschriebene Mechanismus auch bei der zellinternen Freisetzung von HEV zuträglich sein. Des Weiteren enthalten HEV-beladene Exosomen einen erhöhten Cholesterinanteil (172). Da Amphotericin B auch die Permeabilität von cholesterinhaltigen Lipidmembranen über die Ausbildung von Ionenkanälen steigert (173), könnte dies am Ende zu einer Degradierung der HEV-Lipidhülle und somit infektiöserem nHEV führen – was wiederum eine breitere Infektion gefolgt von einer höheren Viruslast zur Folge hätte.

Für HEV konnte gezeigt werden, dass das Virus gut in der Lungenkarzinomzelllinie A549, sowie in den Leberkarzinomzelllinien PLC/PRF/5 und HepG2/C3A (HepG2-Subklon) repliziert (124,131). Daher wurden diese Zellen zusammen mit den Subklonen A549/D3 (effizientere HEV-3c-Isolat 47832c Replikation (138)) und HuH-7-Lunet BLR (für Hepatitis-C-Virus-Replikation hochpermissive Leberkarzinomzelllinie (139)) systematisch mit den vier unterschiedlichen Isolaten HEV-3c 47832c und 14-16753, HEV-3e 14-22707 und HEV-3f 15-22016 überprüft. Bis 2 Wochen nach Inokulation ist es vom HEV-Stamm abhängig, welche Zelllinie die höchste Viruslast produziert. Jedoch ab Woche 4 nach Inokulation wurde immer im Überstand von PLC/PRF/5 die höchste Viruslast gemessen, unabhängig vom HEV-Subtyp, de novo Isolierung oder Passagierung. Ebenfalls sehr hohe Viruslasten wurden durch HuH-7-Lunet BLR generiert, die die von A549 und HepG2/C3A meist deutlich überragten. Der Grund dafür könnte sein, dass PLC/PRF/5 und HuH-7-Lunet BLR bereits zu einem gewissen Grad über transformierte Kompartimente und Strukturen verfügen, die eine weitere virale Replikation begünstigen. Denn PLC/PRF/5 exprimieren HBsAg (141,142) und HuH-7-Lunet BLR trugen vor Behandlung mit einem HCV-spezifischen Inhibitor ein HCV-Replikon in sich (139).

Die zuletzt isolierten HEV-Stämme 47832c, LBPR-000379 und Kernow-C1 stammten alle aus chronisch Infizierten und wiesen auffällige Insertionen in der hypervariablen Region (HVR) des ORF1 (Offener Leserahmen 1, engl. open reading frame 1) auf, ohne das Leseraster dabei zu verschieben. Die Insertionen entstanden im Falle von Isolat 47832c durch Duplikation eines Teilbereichs des eigenen ORF1 (130) oder im Falle von LBPR-000379 und Kernow-C1 durch Rekombination mit humaner ribosomaler RNA (131,132) und verliehen den HEV-Stämmen einen Replikationsvorteil in vitro (132,133). Dieser Vorteil ist aller Wahrscheinlichkeit nach eher auf eine Zusammensetzung auf Protein- als auf RNA-Ebene zurückzuführen und wird wohl hauptsächlich von der Länge und Position der Insertion beeinflusst (130,133). Dies würde in das Gesamtbild der HVR passen, die vermutlich primär eine strukturelle denn funktionelle Rolle für die HEV-Replikation spielt (30). Es ist aber nicht auszuschließen, dass über Insertionen neue Regulationsstellen in das ORF1-Protein eingebracht werden, die die Replikation positiv beeinflussen (174). Die Gesamtgenomsequenzierung der drei neuen, tiefergehend charakterisierten Isolate 14-16753, 14-22707 und 15-22016 wiesen keinerlei Insertionen auf. Somit ist das optimierte Zellkultursystem nicht nur permissiv für HEV-Spezies mit Insertionen, die in Infizierten als Minorität gebildet und in Zellkultur selektiert wurden, sondern auch für die Mehrheit der HEV-Stämme, die keine Insertionen tragen.

Darüber hinaus konnten die mit den charakterisierten Isolaten persistent infizierten Zellen ohne Unterbrechung für 1 bis mittlerweile >3 Jahre in Kultur gehalten werden und produzierten über den gesamten Zeitraum stets infektiöses HEV zu sehr hohen Viruslasten von  $10^7$  bis  $10^{10}$  K/ml. Diese Daten legen nahe, dass das Zellkultursystem zeitlich praktisch unbegrenzt mit einem minimalen Aufwand eines zweimal wöchentlichen vollständigen Medienwechsels erhalten werden kann. Dies ist insofern von Relevanz, da als aktuelle antivirale Therapie nur das Medikament Ribavirin zur Verfügung steht. Ein erster Behandlungszyklus scheitert allerdings bei ca. jedem fünften Patienten, für die dadurch eine lebensbedrohliche Situation entstehen kann (105). Somit ist es unerlässlich, weitere antiviral wirkende Substanzen zu finden. Sofosbuvir inhibierte beispielsweise das HEV-3a-Isolat Kernow-C1 in vitro (110), jedoch waren Anwendung in vivo nicht immer erfolgreich (112–114) und eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass Sofosbuvir nicht als Monotherapie für die Behandlung einer chronischen Hepatitis E geeignet ist (109). Es wäre interessant zu sehen, wie

sich die neuen Isolate gegenüber Sofosbuvir in vitro verhalten und ob es dabei zu Subgenotyp-spezifischen Unterschieden kommt. Selbiges gilt für Silvestrol, das HEV in vitro vielversprechend inhibiert (107,108) und auf eine Anwendung in vivo wartet.

Abschließend konnte das optimierte Zellkultursystem durch die Isolation von 16 weiteren HEV-Stämmen validiert werden. Hierbei zeigte sich, dass die Anzucht von HEV aus Stuhl und Plasma wesentlich besser zu funktionieren scheint, als aus Serum. Selbst aus 10%igen Stuhlsuspensionen, die sich in dieser Verdünnung noch toxisch auf den Zellrasen auswirkten und diesen nachhaltig schädigten, konnte HEV trotz sehr geringen Viruslasten von  $<10^4$  K/ml isoliert werden, was dem optimierten Zellkultursystem eine hohe Robustheit bestätigt. Hingegen konnte HEV-3 aus Serum erst ab einer Viruslast von  $10^5$  bis  $10^6$  K/ml isoliert werden. Diese Diskrepanz kann dadurch erklärt werden, dass das in Stuhl unbehüllte HEV infektiöser als das in Serum quasi-behüllte HEV ist (36). Allerdings erklärt es nicht, warum HEV aus Plasma selbst bei einer Viruslast von knapp über  $10^4$  K/ml noch isolierbar ist. Womöglich wirken sich hier Antikoagulanzen positiv auf die HEV-Infektion aus oder sprengen möglicherweise die Quasihülle des Virus ab, was es wiederum infektiöser machen würde. Neutralisierende anti-HEV Antikörper in HEV-positiven Seren können als Grund für eine schlechtere Isolierbarkeit aus Serum ausgeschlossen werden, da das Virus in Serum durch die Quasihülle vor diesen Antikörpern geschützt ist (33).

Trotz der optimierten Bedingungen weist das Zellkultursystem noch verschiedene Limitationen auf. HEV repliziert sehr langsam und benötigt 1 bis 10 Wochen um ausreichende Viruskonzentrationen in vitro zu generieren. Dies kann nachgeschaltete Prozesse und Anwendungen verzögern. Des Weiteren lysiert HEV keine Zellen wodurch ein zytopathischer Effekt in der Zellkultur ausbleibt und somit die Virusreplikation aufwendig über konsekutive PCR- oder Antigentestungen nachgewiesen werden muss. Zudem muss evaluiert werden, ob andere HEV-Genotypen neben HEV-3 mit einer vergleichbaren Effizienz in dem optimierten Zellkultursystem isoliert und propagiert werden können. Eine weitere Einschränkung ist die Verwendung einer permanenten Leberkarzinomzelllinie, mit der sich im Gegensatz zu primären Leberzellen oder Organoiden die Virus-Wirt-Wechselwirkungen weniger gut untersuchen lassen. Zuletzt muss noch überprüft werden, ob und wie HEV in einer Langzeitkultur und nach mehrmaligem Passagieren mutiert.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit durch die Etablierung und Optimierung eines Zellkultur-basierten Infektionssystems 19 neue HEV-3-Stämme isoliert werden. Drei dieser Isolate, die stellvertretend für die in Europa vorherrschenden Subtypen HEV-3c, -3e und -3f stehen, wurden über Gesamtgenomsequenzierung und Bestimmung der TCID<sub>50</sub> weiter charakterisiert und können zeitlich praktisch unbegrenzt zu sehr hohen Viruslasten in Kultur gehalten werden. Dieses robuste HEV-Zellkultursystem kann nun dazu beitragen, HEV-inhibierende Substanzen zu identifizieren und zu testen. Aufgrund der anhaltend hohen produzierten Viruslasten können die geernteten Zellkulturüberstände beispielsweise als definiertes und charakterisiertes Positivmaterial in Ringversuchen zur Qualitätssicherung von diagnostischen Laboratorien einfließen. Darüber hinaus kann das Zellkultursystem für die weitere Erforschung des HEV-Replikationszyklus verwendet werden, in der Antigenproduktion für die Entwicklung diagnostischer Tests oder für die Entwicklung eines klassisch attenuierten oder inaktivierten Impfstoffs Anwendung finden.

## 6. Zusammenfassung

Das Hepatitis-E-Virus (HEV) ist weltweit die Hauptursache für akute Hepatitis. Das Virus wird fäkal-oral in subtropischen Ländern (Genotypen HEV-1 und -2) oder weltweit über kontaminierte Nahrung und Blutprodukte (Genotypen HEV-3 und -4) übertragen. In Europa sind die Subtypen HEV-3c, -3e und -3f am häufigsten vertreten. Die meisten Infektionen verlaufen asymptomatisch, es kann jedoch zu fulminanten Verläufen kommen, die schlimmstenfalls zum Tod führen. Zudem kann HEV in immunsupprimierten Personen zu einer chronischen Infektion fortschreiten, wodurch die Leber nachhaltig geschädigt werden kann und dies so zu lebensbedrohlichen Komplikationen führt. Darüber hinaus ist mittlerweile eine Reihe extrahepatischer Manifestationen beschrieben. Eine zugelassene Therapie ist nicht verfügbar und ein Impfstoff nur in China registriert. Daher bleibt bei chronischer Hepatitis E im Falle einer Immunsuppression nur die Umstellung bzw. Reduzierung selbiger oder eine Off-Label-Therapie mit Ribavirin, die aber bei ca. jedem fünften Patienten versagt. Ein Mangel an einfachen Zellkultursystemen, die effizient Wildtyp-HEV isolieren und produzieren, führte dazu, dass der Großteil der HEV-Forschung auf Zellkultur-adaptierten Stämmen beruht, die ungewöhnliche Insertionen in der hypervariablen Region des Virus tragen. Diese Arbeit befasste sich daher mit der Etablierung und Optimierung eines Zellkultursystems, mit dem es gelang, insgesamt 19 neue HEV-3-Stämme zu isolieren. Drei dieser Isolate, HEV-3c 14-16753, HEV-3e 14-22707 und HEV-3f 15-22016, die das vorherrschende HEV-Spektrum in Europa abbilden, wurden vollständig charakterisiert, wiesen keine ungewöhnlichen Genom-Insertionen auf und replizierten innerhalb von 14 Tagen zu  $10^8$ ,  $10^9$  und  $10^{6.5}$  HEV-RNA-Kopien pro ml (K/ml). Das optimierte Zellkultursystem ermöglichte eine ununterbrochene Produktion an infektiösem HEV zu sehr hohen Viruslasten  $\sim 10^9$  K/ml für >1 Jahr bei reduziertem Erhaltungsaufwand von lediglich 2× wöchentlich. Überkonfluente 3D-ähnliche Zellrasen erhöhten die Infektionswahrscheinlichkeit und Viruslast, wobei HEV am besten in der Zelllinie PLC/PRF/5 replizierte, gefolgt von HuH-7-Lunet BLR, A549 und HepG2/C3A. Des Weiteren konnte die Viruslast durch die Mediumsupplemente Amphotericin B, bestimmte Salze und FCS gesteigert werden. Dieses vergleichsweise einfach zu handhabende Zellkultursystem, das gleichzeitig hohe Viruslasten an Wildtyp-HEV produziert, kann nun für Grundlagenforschung, Inaktivierungsstudien sowie für die Medikamenten- und Impfstoffentwicklung verwendet werden.

## 7. Summary

The hepatitis E virus (HEV) is the main cause of acute hepatitis globally. The HEV-1 and HEV-2 genotypes are transmitted via the faecal-oral route in subtropical countries while HEV-3 and HEV-4 are transmitted worldwide via contaminated food and blood products. In Europe, the HEV-3c, -3e and -3f subtypes are predominant. Most infections remain asymptomatic but some can become fulminant and lead to death. In addition, HEV can progress to chronic infection in immunosuppressed patients leading to severe liver damage and life-threatening complications. Several extrahepatic manifestations have been described. There is currently no approved therapy and a vaccine is solely licensed in China. Therefore, the only two options to treat a chronic hepatitis E are reduction and/or adaption of immunosuppressive medication in the first place and off-label therapy with ribavirin in the second place. However, this treatment fails in about one in five patients. The lack of simple cell culture systems that efficiently propagate wild-type HEV strains has hampered research on HEV. This has led to the fact that most HEV-related research is based on recombinant cell culture-adapted strains that contain unusual insertions in their hypervariable region (HVR). The aim of this work was to establish and optimize a cell culture system that is permissive to a variety of wild-type HEV strains. A total of 19 HEV-3 strains could be isolated, of which three strains reflecting the predominant spectrum of HEV in Europe were further characterised: HEV-3c isolate 14-16753, HEV-3e isolate 14-22707 and HEV-3f isolate 15-22016. These strains do not harbour insertions in the HVR and replicate to  $10^8$ ,  $10^9$  und  $10^{6.5}$  HEV RNA copies per ml (c/ml) within 14 days, respectively. The optimized cell culture system enables the continuous production of infectious HEV to viral loads of  $\sim 10^9$  c/ml for >1 year while the maintenance effort was reduced to just twice a week. Overconfluent 3D-like cell layers favored the likelihood of infection and HEV generally replicated best in the PLC/PRF/5 cell line followed by HuH-7-Lunet BLR, A549 and HepG2/C3A. Viral loads could be increased further by supplementing the cell culture medium with amphotericin B, distinct salts and higher FCS concentrations. This easy-to-use cell culture system, which produces high concentrations of wild-type HEV, can now be used for basic research, inactivation studies, as well as for drug and vaccine development.



## Literaturverzeichnis

1. Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia N-S, Ijaz S, Izopet J, Dalton HR. Hepatitis E. *The Lancet*. 2012;379(9835):2477–88. doi:10.1016/S0140-6736(11)61849-7
2. Khuroo MS. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. *The American Journal of Medicine*. 1980;68(6):818–24. doi:10.1016/0002-9343(80)90200-4
3. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, Poleschuk VF. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*. 1983;20(1):23–31.
4. Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn JS, Wiersma ST. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology*. 2012;55(4):988–97. doi:10.1002/hep.25505
5. WHO. Global hepatitis report, 2017: World Health Organization; 2017. 68 p.
6. Carratalà A, Joost S. Population density and water balance influence the global occurrence of hepatitis E epidemics. *Sci Rep*. 2019;9(1):10042. doi:10.1038/s41598-019-46475-3.
7. Schwartz E, Jenks NP, van Damme P, Galun E. Hepatitis E virus infection in travelers. *Clin Infect Dis*. 1999;29(5):1312–4. doi:10.1086/313430
8. Ijaz S, Arnold E, Banks M, Bendall RP, Cramp ME, Cunningham R, Dalton HR, Harrison TJ, Hill SF, Macfarlane L, Meigh RE, Shafi S, Sheppard MJ, Smithson J, Wilson MP, Teo C-G. Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J Infect Dis*. 2005;192(7):1166–72. doi:10.1086/444396
9. Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Fernandez Escamez PS, Herman L, Koutsoumanis K, Lindqvist R, Nørrung B, Robertson L, Ru G, Sanaa M, Simmons M, Skandamis P, Snary E, Speybroeck N, Ter Kuile B, Threlfall J, Wahlström H, Di Bartolo I, John R, Pavio N, Rutjes S, van der Poel W, Vassickova P, Hempen M, Messens W, Rizzi V, Latronico F, Girones R. Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen. *EFS2*. 2017;15(7). doi:10.2903/j.efsa.2017.4886

10. Domanovic D, Tedder R, Blumel J, Zaaijer H, Gallian P, Niederhauser C, Sauleda Oliveras S, O’Riordan J, Boland F, Harritshoj L, Nascimento MSJ, Ciccaglione AR, Politis C, Adlhoch C, Flan B, Oualikene-Gonin W, Rautmann G, Strengers P, Hewitt P. Hepatitis E and blood donation safety in selected European countries: a shift to screening? *Euro Surveill.* 2017;22(16). doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.16.30514
11. Smith DB, Izopet J, Nicot F, Simmonds P, Jameel S, Meng X-J, Norder H, Okamoto H, van der Poel WHM, Reuter G, Purdy MA. Update: proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species Orthohepevirus A). *J Gen Virol.* 2020. doi:10.1099/jgv.0.001435
12. Adlhoch C, Avellon A, Baylis SA, Ciccaglione AR, Couturier E, Sousa R de, Epštein J, Ethelberg S, Faber M, Fehér Á, Ijaz S, Lange H, Mandáková Z, Mellou K, Mozalevskis A, Rimhanen-Finne R, Rizzi V, Said B, Sundqvist L, Thornton L, Tosti ME, van Pelt W, Aspinall E, Domanovic D, Severi E, Takkinen J, Dalton HR. Hepatitis E virus: Assessment of the epidemiological situation in humans in Europe, 2014/15. *J Clin Virol.* 2016;829–16. doi:10.1016/j.jcv.2016.06.010
13. Lee G-H, Tan B-H, Teo EC-Y, Lim S-G, Dan Y-Y, Wee A, Aw PPK, Zhu Y, Hibberd ML, Tan C-K, Purdy MA, Teo C-G. Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology.* 2016;150(2):355-7.e3. doi:10.1053/j.gastro.2015.10.048
14. Sridhar S, Yip CCY, Wu S, Cai J, Zhang AJ-X, Leung K-H, Chung TWH, Chan JFW, Chan W-M, Teng JLL, Au-Yeung RKH, Cheng VCC, Chen H, Lau SKP, Woo PCY, Xia N-S, Lo C-M, Yuen K-Y. Rat Hepatitis E Virus as Cause of Persistent Hepatitis after Liver Transplant. *Emerg. Infect. Dis.* 2018;24(12):2241–50. doi:10.3201/eid2412.180937
15. Andonov A, Robbins M, Borlang J, Cao J, Hattchete T, Stueck A, Deschaumbault Y, Murnaghan K, Varga J, Johnston B. Rat hepatitis E virus linked to severe acute hepatitis in an immunocompetent patient. *J Infect Dis.* 2019. doi:10.1093/infdis/jjz025
16. Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol.* 2008;48(3):494–503. doi:10.1016/j.jhep.2007.12.008

17. Wenzel JJ, Preiss J, Schemmerer M, Huber B, Jilg W. Test performance characteristics of Anti-HEV IgG assays strongly influence hepatitis E seroprevalence estimates. *J Infect Dis.* 2013;207(3):497–500. doi:10.1093/infdis/jjs688
18. Hartl J, Otto B, Madden RG, Webb G, Woolson KL, Kriston L, Vettorazzi E, Lohse AW, Dalton HR, Pischke S. Hepatitis E Seroprevalence in Europe: A Meta-Analysis. *Viruses.* 2016;8(8). doi:10.3390/v8080211.
19. Capai L, Falchi A, Charrel R. Meta-Analysis of Human IgG anti-HEV Seroprevalence in Industrialized Countries and a Review of Literature. *Viruses.* 2019;11(1). doi:10.3390/v11010084
20. Wilhelm B, Waddell L, Greig J, Young I. Systematic review and meta-analysis of the seroprevalence of hepatitis E virus in the general population across non-endemic countries. *PLoS ONE.* 2019;14(6):e0216826. doi:10.1371/journal.pone.0216826
21. Mansuy JM, Gallian P, Dimeglio C, Saune K, Arnaud C, Pelletier B, Morel P, Legrand D, Tiberghien P, Izopet J. A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors. *Hepatology.* 2016;63(4):1145–54. doi:10.1002/hep.28436
22. Horvatits T, Ozga A-K, Westhoelter D, Hartl J, Manthey C, Lütgehetmann M, Rauch G, Kriston L, Lohse AW, Bendall R, Wedemeyer H, Dalton HR, Pischke S. Hepatitis E seroprevalence in the Americas: A systematic review and meta-analysis. *Liver Int.* 2018. doi:10.1111/liv.13859
23. Faber M, Willrich N, Schemmerer M, Rauh C, Kuhnert R, Stark K, Wenzel JJ. Hepatitis E virus seroprevalence, seroincidence and seroreversion in the German adult population. *J Viral Hepat.* 2018;25(6):752–8. doi:10.1111/jvh.12868
24. Mahrt H, Schemmerer M, Behrens G, Leitzmann M, Jilg W, Wenzel JJ. Continuous decline of hepatitis E virus seroprevalence in southern Germany despite increasing notifications, 2003–2015. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7(1):23. doi:10.1038/s41426-018-0136-8
25. Wenzel JJ, Sichler M, Schemmerer M, Behrens G, Leitzmann MF, Jilg W. Decline in hepatitis E virus antibody prevalence in southeastern Germany, 1996–2011. *Hepatology.* 2014;60(4):1180–6. doi:10.1002/hep.27244
26. Mori Y, Matsuura Y. Structure of hepatitis E viral particle. *Virus Res.* 2011;161(1):59–64. doi:10.1016/j.virusres.2011.03.015

27. Kabrane-Lazizi Y, Meng XJ, Purcell RH, Emerson SU. Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped. *J Virol.* 1999;73(10):8848–50.
28. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang C-C, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR. Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology.* 1991;185(1):120–31. doi:10.1016/0042-6822(91)90760-9
29. Koonin EV, Gorbalenya AE, Purdy MA, Rozanov MN, Reyes GR, Bradley DW. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural poly-protein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(17):8259–63. doi:10.1073/pnas.89.17.8259
30. Smith DB, Vanek J, Ramalingam S, Johannessen I, Templeton K, Simmonds P. Evolution of the hepatitis E virus hypervariable region. *J Gen Virol.* 2012;93(Pt 11):2408–18. doi:10.1099/vir.0.045351-0
31. Nair VP, Anang S, Subramani C, Madhvi A, Bakshi K, Srivastava A, Shalimar, Nayak B, Ct RK, Surjit M. Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus. *PLoS Pathog.* 2016;12(4):e1005521. doi:10.1371/journal.ppat.1005521
32. Yin X, Li X, Feng Z. Role of Envelopment in the HEV Life Cycle. *Viruses.* 2016;8(8). doi:10.3390/v8080229
33. Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Jirintai, Mizuo H, Yazaki Y, Takagi T, Azuma M, Kusano E, Isoda N, Sugano K, Okamoto H. Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1112–25. doi:10.1128/JCM.02002-09
34. Qi Y, Zhang F, Zhang L, Harrison TJ, Huang W, Zhao C, Kong W, Jiang C, Wang Y. Hepatitis E Virus Produced from Cell Culture Has a Lipid Envelope. *PLoS ONE.* 2015;10(7):e0132503. doi:10.1371/journal.pone.0132503
35. Nagashima S, Takahashi M, Kobayashi T, Nishizawa T, Nishiyama T, Primagarsini PP, Okamoto H. Characterization of the Quasi-Enveloped Hepatitis E Virus Particles Released by the Cellular Exosomal Pathway. *J Virol.* 2017;91(22). doi:10.1128/JVI.00822-17

36. Yin X, Ambardekar C, Lu Y, Feng Z. Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses. *J Virol.* 2016;90(8):4232–42. doi:10.1128/JVI.02804-15
37. Kalia M, Chandra V, Rahman SA, Sehgal D, Jameel S. Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J Virol.* 2009;83(24):12714–24. doi:10.1128/JVI.00717-09
38. Holla P, Ahmad I, Ahmed Z, Jameel S. Hepatitis E virus enters liver cells through a dynamin-2, clathrin and membrane cholesterol-dependent pathway. *Traffic.* 2015;16(4):398–416. doi:10.1111/tra.12260
39. Zhang L, Tian Y, Wen Z, Zhang F, Qi Y, Huang W, Zhang H, Wang Y. Asialoglycoprotein receptor facilitates infection of PLC/PRF/5 cells by HEV through interaction with ORF2. *J Med Virol.* 2016;88(12):2186–95. doi:10.1002/jmv.24570
40. Holla RP, Ahmad I, Ahmad Z, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis.* 2013;33(1):3–14. doi:10.1055/s-0033-1338110
41. Montpellier C, Wychowski C, Sayed IM, Meunier J-C, Saliou J-M, Ankavay M, Bull A, Pillez A, Abravanel F, Helle F, Brochot E, Drobecq H, Farhat R, Aliouat-Denis C-M, Haddad JG, Izopet J, Meuleman P, Goffard A, Dubuisson J, Cocquerel L. Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein. *Gastroenterology.* 2018. doi:10.1053/j.gastro.2017.09.020
42. Yin X, Ying D, Lhomme S, Tang Z, Walker CM, Xia N, Zheng Z, Feng Z. Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(18):4773–8. doi:10.1073/pnas.1721345115
43. Surjit M, Jameel S, Lal SK. The ORF2 protein of hepatitis E virus binds the 5' region of viral RNA. *J Virol.* 2004;78(1):320–8. doi:10.1128/jvi.78.1.320-328.2004
44. Graff J, Torian U, Nguyen H, Emerson SU. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol.* 2006;80(12):5919–26. doi:10.1128/JVI.00046-06
45. Ju X, Ding Q. Hepatitis E Virus Assembly and Release. *Viruses.* 2019;11(6):539. doi:10.3390/v11060539

46. Tyagi S, Korkaya H, Zafrullah M, Jameel S, Lal SK. The phosphorylated form of the ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with its non-glycosylated form of the major capsid protein, ORF2. *J Biol Chem.* 2002;277(25):22759–67. doi:10.1074/jbc.M200185200
47. Kannan H, Fan S, Patel D, Bossis I, Zhang Y-J. The hepatitis E virus open reading frame 3 product interacts with microtubules and interferes with their dynamics. *J Virol.* 2009;83(13):6375–82. doi:10.1128/JVI.02571-08
48. Surjit M, Oberoi R, Kumar R, Lal SK. Enhanced alpha1 microglobulin secretion from Hepatitis E virus ORF3-expressing human hepatoma cells is mediated by the tumor susceptibility gene 101. *J Biol Chem.* 2006;281(12):8135–42. doi:10.1074/jbc.M509568200
49. Nagashima S, Jirintai S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, Kouki T, Yashiro T, Okamoto H. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J Gen Virol.* 2014;95(Pt 10):2166–75. doi:10.1099/vir.0.066910-0
50. Tamai K, Tanaka N, Nakano T, Kakazu E, Kondo Y, Inoue J, Shiina M, Fukushima K, Hoshino T, Sano K, Ueno Y, Shimosegawa T, Sugamura K. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;399(3):384–90. doi:10.1016/j.bbrc.2010.07.083
51. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohen N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, Thery C. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol.* 2010;12(1):19-30; sup pp 1-13. doi:10.1038/ncb2000
52. Ding Q, Heller B, Capuccino JMV, Song B, Nimgaonkar I, Hrebikova G, Contreras JE, Ploss A. Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(5):1147–52. doi:10.1073/pnas.1614955114
53. Capelli N, Marion O, Dubois M, Allart S, Bertrand-Michel J, Lhomme S, Abrevant F, Izopet J, Chapuy-Regaud S. Vectorial Release of Hepatitis E Virus in Polarized Human Hepatocytes. *J Virol.* 2019;93(4). doi:10.1128/JVI.01207-18
54. Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M. Origin and dispersal of Hepatitis E virus. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7(1):11. doi:10.1038/s41426-017-0009-6

55. Hakim MS, Wang W, Brammer WM, Geng J, Huang F, Man RA de, Peppelenbosch MP, Pan Q. The global burden of hepatitis E outbreaks: a systematic review. *Liver Int.* 2017;37(1):19–31. doi:10.1111/liv.13237
56. Wenzel JJ, Preiss J, Schemmerer M, Huber B, Plentz A, Jilg W. Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates. *J Clin Virol.* 2011;52(1):50–4. doi:10.1016/j.jcv.2011.06.006
57. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *The Lancet.* 2003;362(9381):371–3. doi:10.1016/S0140-6736(03)14025-1
58. Renou C, Roque-Afonso A-M, Afonso A-MR, Pavio N. Foodborne transmission of hepatitis E virus from raw pork liver sausage, France. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(11):1945–7. doi:10.3201/eid2011.140791
59. Matsubayashi K, Kang J-H, Sakata H, Takahashi K, Shindo M, Kato M, Sato S, Kato T, Nishimori H, Tsuji K, Maguchi H, Yoshida J-I, Maekubo H, Mishiro S, Ikeda H. A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion.* 2008;48(7):1368–75. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.01722.x
60. Huzly D, Umhau M, Bettinger D, Cathomen T, Emmerich F, Hasselblatt P, Hengel H, Herzog R, Kappert O, Maassen S, Schorb E, Schulz-Huotari C, Thimme R, Unmussig R, Wenzel JJ, Panning M. Transfusion-transmitted hepatitis E in Germany, 2013. *Euro Surveill.* 2014;19(21).
61. Baylis SA, Gärtner T, Nick S, Oveymyr J, Blümel J. Occurrence of hepatitis E virus RNA in plasma donations from Sweden, Germany and the United States. *Vox Sang.* 2012;103(1):89–90. doi:10.1111/j.1423-0410.2011.01583.x
62. Vollmer T, Diekmann J, Johne R, Eberhardt M, Knabbe C, Dreier J. Novel approach for detection of hepatitis E virus infection in German blood donors. *J Clin Microbiol.* 2012;50(8):2708–13. doi:10.1128/JCM.01119-12
63. Westhölter D, Hiller J, Denzer U, Polywka S, Ayuk F, Rybczynski M, Horvatits T, Gundlach S, Blöcker J, zur Schulze Wiesch J, Fischer N, Addo MM, Peine S, Göke B, Lohse AW, Lütgehetmann M, Pischke S. HEV-positive blood donations represent a relevant infection risk for immunosuppressed recipients. *J Hepatol.* 2018;69(1):36–42. doi:10.1016/j.jhep.2018.02.031

64. Abravanel F, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, Mansuy J-M, Muscari F, Sallusto F, Rostaing L, Kamar N, Izopet J. Hepatitis E Virus Reinfections in Solid-Organ-Transplant Recipients Can Evolve Into Chronic Infections. *Journal of Infectious Diseases*. 2014;209(12):1900–6. doi:10.1093/infdis/jiu032
65. Schemmerer M, Rauh C, Jilg W, Wenzel JJ. Time course of hepatitis E-specific antibodies in adults. *J Viral Hepat*. 2017;24(1):75–9. doi:10.1111/jvh.12621
66. Rodríguez-Tajes S, Perpiñán E, Leonel T, Lens S, Mariño Z, Pérez-Del-Pulgar S, García-López M, Pocurull A, Koutsoudakis G, Fornis X. Low seroprevalence and zero incidence rate of hepatitis E in men who have sex with men during a hepatitis A outbreak. *J Med Virol*. 2019. doi:10.1002/jmv.25630
67. Spada E, Costantino A, Pezzotti P, Bruni R, Pisani G, Madonna E, Chionne P, Simeoni M, Villano U, Marcantonio C, Taffon S, Marano G, Pupella S, Liunbruno GM, Ciccaglione AR. Hepatitis E virus infection prevalence among men who have sex with men involved in a hepatitis A virus outbreak in Italy. *Blood Transfus*. 2019;17(6):428–32. doi:10.2450/2019.0209-19
68. Faber M, Askar M, Stark K. Case-control study on risk factors for acute hepatitis E in Germany, 2012 to 2014. *Eurosurveillance*. 2018;23(19):1732. doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.19.17-00469
69. Wedemeyer H, Pischke S, Manns MP. Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection. *Gastroenterology*. 2012;142(6):1388-1397.e1. doi:10.1053/j.gastro.2012.02.014
70. Perez-Gracia MT, Suay-Garcia B, Mateos-Lindemann ML. Hepatitis E and pregnancy: Current state. *Rev. Med. Virol*. 2017. doi:10.1002/rmv.1929
71. Lewis HC, Wichmann O, Duizer E. Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. *Epidemiol Infect*. 2010;138(2):145–66. doi:10.1017/S0950268809990847
72. Kamar N, Rostaing L, Legrand-Abravanel F, Izopet J. How should hepatitis E virus infection be defined in organ-transplant recipients? *Am J Transplant*. 2013;13(7):1935–6. doi:10.1111/ajt.12253
73. Kamar N, Selves J, Mansuy J-M, Ouezzani L, Peron J-M, Guitard J, Cointault O, Esposito L, Abravanel F, Danjoux M, Durand D, Vinel J-P, Izopet J, Rostaing L. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*. 2008;358(8):811–7. doi:10.1056/NEJMoa0706992



74. Tamura A, Shimizu YK, Tanaka T, Kuroda K, Arakawa Y, Takahashi K, Mishiro S, Shimizu K, Moriyama M. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepatol Res.* 2007;37(2):113–20. doi:10.1111/j.1872-034X.2007.00024.x
75. Wang Y, Chen G, Pan Q, Zhao J. Chronic Hepatitis E in a Renal Transplant Recipient: The First Report of Genotype 4 Hepatitis E Virus Caused Chronic Infection in Organ Recipient. *Gastroenterology.* 2018. doi:10.1053/j.gastro.2017.12.028
76. Meisner S, Polywka S, Memmler M, Nashan B, Lohse AW, Sterneck M, Pischke S. Definition of chronic hepatitis E after liver transplant conforms to convention. *Am J Transplant.* 2015;15(11):3011–2. doi:10.1111/ajt.13428
77. Lhomme, Marion, Abravanel, Izopet, Kamar. Clinical Manifestations, Pathogenesis and Treatment of Hepatitis E Virus Infections. *JCM.* 2020;9(2):331. doi:10.3390/jcm9020331
78. Wallace SJ, Swann R, Donnelly M, Kemp L, Guaci J, Murray A, Spoor J, Lin N, Miller M, Dalton HR, Hussaini SH, Gunson R, Simpson K, Stanley A, Fraser A. Mortality and morbidity of locally acquired hepatitis E in the national Scottish cohort: a multicentre retrospective study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2020. doi:10.1111/apt.15704
79. Wang L, Gao F, Lin G, Yuan Y, Huang Y, Hao H, Zhuang H, Wang L. Association of hepatitis E virus infection and myasthenia gravis: A pilot study. *J Hepatol.* 2018;68(6):1318–20. doi:10.1016/j.jhep.2018.01.040
80. Fritz M, Berger B, Schemmerer M, Endres D, Wenzel JJ, Stich O, Panning M. Pathological Cerebrospinal Fluid Findings in Patients with Neuralgic Amyotrophy and Acute Hepatitis E Virus Infection. *Journal of Infectious Diseases.* 2018. doi:10.1093/infdis/jjy128
81. Liu H, Ma Y. Hepatitis E virus-associated Guillain-Barre syndrome: Revision of the literature. *Brain Behav.* 2019;e01496. doi:10.1002/brb3.1496
82. Pischke S, Behrendt P, Manns MP, Wedemeyer H. HEV-associated cryoglobulinaemia and extrahepatic manifestations of hepatitis E. *The Lancet Infectious Diseases.* 2014;14(8):678–9. doi:10.1016/S1473-3099(14)70823-0

83. Guinault D, Ribes D, Delas A, Milongo D, Abravanel F, Puissant-Lubrano B, Izopet J, Kamar N. Hepatitis E Virus-Induced Cryoglobulinemic Glomerulonephritis in a Nonimmunocompromised Person. *Am J Kidney Dis*. 2016;67(4):660–3. doi:10.1053/j.ajkd.2015.10.022
84. Colson P, Payraudeau E, Leonnet C, Montigny S de, Villeneuve L, Motte A, Tamalet C. Severe thrombocytopenia associated with acute hepatitis E virus infection. *J Clin Microbiol*. 2008;46(7):2450–2. doi:10.1128/JCM.02295-07
85. Hogema BM, Molier M, Sjerps M, Waal M de, van Swieten P, van de Laar T, Molenaar-de Backer M, Zaijjer HL. Incidence and duration of hepatitis E virus infection in Dutch blood donors. *Transfusion*. 2016;56(3):722–8. doi:10.1111/trf.13402
86. Huang S, Zhang X, Jiang H, Yan Q, Ai X, Wang Y, Cai J, Jiang L, Wu T, Wang Z, Guan L, Shih JWK, Ng M-H, Zhu F, Zhang J, Xia N, Rénia L. Profile of Acute Infectious Markers in Sporadic Hepatitis E. *PLoS ONE*. 2010;5(10):e13560. doi:10.1371/journal.pone.0013560
87. Bendall R, Ellis V, Ijaz S, Thurairajah P, Dalton HR. Serological response to hepatitis E virus genotype 3 infection: IgG quantitation, avidity, and IgM response. *J. Med. Virol*. 2008;80(1):95–101. doi:10.1002/jmv.21033
88. Whitsett M, Feldman DM, Jacobson I. Hepatitis E Virus Infection in the United States: Current Understanding of the Prevalence and Significance in the Liver Transplant Patient Population and Proposed Diagnostic and Treatment Strategies. *Liver Transpl*. 2020;26(5):709–17. doi:10.1002/lt.25732
89. Tremeaux P, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, Peron J-M, Alric L, Kamar N, Izopet J, Abravanel F. Performance of an antigen assay for diagnosing acute hepatitis E virus genotype 3 infection. *J Clin Virol*. 2016;791–5. doi:10.1016/j.jcv.2016.03.019
90. Zhao C, Geng Y, Harrison TJ, Huang W, Song A, Wang Y. Evaluation of an antigen-capture EIA for the diagnosis of hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat*. 2015;22(11):957–63. doi:10.1111/jvh.12397
91. Zhang H, Rao H, Wang Y, Wang J, Kong X, Ji Y, Zhu L, Liu Y, Fang J, Yang M, Luo B, Wang Z, Shi Y, Wang Y, Wang H, Zhao J, Wei L. Evaluation of an antigen assay for diagnosing acute and chronic hepatitis E genotype 4 infection. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018. doi:10.1111/jgh.14405

92. Kamar N, Abravanel F, Selves J, Garrouste C, Esposito L, Lavayssière L, Cointault O, Ribes D, Cardeau I, Nogier MB, Mansuy JM, Muscari F, Peron JM, Izopet J, Rostaing L. Influence of immunosuppressive therapy on the natural history of genotype 3 hepatitis-E virus infection after organ transplantation. *Transplantation*. 2010;89(3):353–60. doi:10.1097/TP.0b013e3181c4096c
93. Kamar N, Rostaing L, Abravanel F, Garrouste C, Esposito L, Cardeau-Desangles I, Mansuy JM, Selves J, Peron JM, Otal P, Muscari F, Izopet J. Pegylated interferon-alpha for treating chronic hepatitis E virus infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis*. 2010;50(5):e30-3. doi:10.1086/650488
94. Haagsma EB, Riezebos-Brilman A, van den Berg AP, Porte RJ, Niesters HGM. Treatment of chronic hepatitis E in liver transplant recipients with pegylated interferon alpha-2b. *Liver Transpl*. 2010;16(4):474–7. doi:10.1002/lt.22014
95. Alric L, Bonnet D, Laurent G, Kamar N, Izopet J. Chronic hepatitis E virus infection: successful virologic response to pegylated interferon-alpha therapy. *Ann Intern Med*. 2010;153(2):135–6. doi:10.7326/0003-4819-153-2-201007200-00256
96. Kamar N, Abravanel F, Garrouste C, Cardeau-Desangles I, Mansuy JM, Weclawiak H, Izopet J, Rostaing L. Three-month pegylated interferon-alpha-2a therapy for chronic hepatitis E virus infection in a haemodialysis patient. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(8):2792–5. doi:10.1093/ndt/gfq282
97. Mallet V, Nicand E, Sultanik P, Chakvetadze C, Tessé S, Thervet E, Mouthon L, Sogni P, Pol S. Brief communication: case reports of ribavirin treatment for chronic hepatitis E. *Ann Intern Med*. 2010;153(2):85–9. doi:10.7326/0003-4819-153-2-201007200-00257
98. Kamar N, Rostaing L, Abravanel F, Garrouste C, Lhomme S, Esposito L, Basse G, Cointault O, Ribes D, Nogier MB, Alric L, Peron JM, Izopet J. Ribavirin therapy inhibits viral replication on patients with chronic hepatitis e virus infection. *Gastroenterology*. 2010;139(5):1612–8. doi:10.1053/j.gastro.2010.08.002
99. Kamar N, Izopet J, Tripon S, Bismuth M, Hillaire S, Dumortier J, Radenne S, Coilly A, Garrigue V, D'Alteroche L, Buchler M, Couzi L, Lebray P, Dharancy S, Minello A, Hourmant M, Roque-Afonso A-M, Abravanel F, Pol S, Rostaing L, Mallet V. Ribavirin for chronic hepatitis E virus infection in transplant recipients. *N Engl J Med*. 2014;370(12):1111–20. doi:10.1056/NEJMoa1215246

100. Debing Y, Gisa A, Dallmeier K, Pischke S, Bremer B, Manns M, Wedemeyer H, Suneetha PV, Neyts J. A mutation in the hepatitis E virus RNA polymerase promotes its replication and associates with ribavirin treatment failure in organ transplant recipients. *Gastroenterology*. 2014;147(5):1008-11.e7; quiz e15-6. doi:10.1053/j.gastro.2014.08.040
101. Gouttenoire J, Szkolnicka D, Moradpour D. Treatment of chronic hepatitis E with ribavirin: lessons from deep sequencing. *Gut*. 2016;65(10):1583-4. doi:10.1136/gutjnl-2016-312040
102. Todt D, Gisa A, Radonic A, Nitsche A, Behrendt P, Suneetha PV, Pischke S, Bremer B, Brown RJP, Manns MP, Cornberg M, Bock CT, Steinmann E, Wedemeyer H. In vivo evidence for ribavirin-induced mutagenesis of the hepatitis E virus genome. *Gut*. 2016;65(10):1733-43. doi:10.1136/gutjnl-2015-311000
103. Ikram A, Hakim MS, Zhou J-H, Wang W, Peppelenbosch MP, Pan Q. Genotype-specific acquisition, evolution and adaptation of characteristic mutations in hepatitis E virus. *Virulence*. 2018;9(1):121-32. doi:10.1080/21505594.2017.1358349
104. Debing Y, Ramière C, Dallmeier K, Piorkowski G, Trabaud M-A, Lebossé F, Scholtès C, Roche M, Legras-Lachuer C, Lamballerie X de, André P, Neyts J. Hepatitis E virus mutations associated with ribavirin treatment failure result in altered viral fitness and ribavirin sensitivity. *J Hepatol*. 2016;65(3):499-508. doi:10.1016/j.jhep.2016.05.002
105. Kamar N, Abravanel F, Behrendt P, Hofmann J, Pageaux GP, Barbet C, Moal V, Couzi L, Horvatits T, Man RA de, Cassuto E, Elsharkawy AM, Riezebos-Brilman A, Scemla A, Hillaire S, Donnelly MC, Radenne S, Sayegh J, Garrouste C, Dumortier J, Glowaki F, Matignon M, Coilly A, Figueres L, Mousson C, Minello A, Dharancy S, Rerolle JP, Lebray P, Etienne I, Perrin P, Choi M, Marion O, Izopet J. Ribavirin for Hepatitis E Virus Infection After Organ Transplantation: A Large European Retrospective Multicenter Study. *Clin Infect Dis*. 2019. doi:10.1093/cid/ciz953
106. Kinast V, Burkard TL, Todt D, Steinmann E. Hepatitis E Virus Drug Development. *Viruses*. 2019;11(6). doi:10.3390/v11060485

107. Glitscher M, Himmelsbach K, Woytinek K, Johne R, Reuter A, Spiric J, Schwaben L, Grünweller A, Hildt E. Inhibition of Hepatitis E Virus Spread by the Natural Compound Silvestrol. *Viruses*. 2018;10(6). doi:10.3390/v10060301
108. Todt D, Moeller N, Praditya D, Kinast V, Friesland M, Engelmann M, Verhoye L, Sayed IM, Behrendt P, Dao Thi VL, Meuleman P, Steinmann E. The natural compound silvestrol inhibits hepatitis E virus (HEV) replication in vitro and in vivo. *Antiviral Res*. 2018;157:151–8. doi:10.1016/j.antiviral.2018.07.010
109. Cornberg M, Pischke S, Müller T, Behrendt P, Piecha F, Benckert J, Todt D, Steinmann E, Papkalla A, Karpowitz M v., Koch A, Lohse A, Hardtke S, Manns MP, Wedemeyer H. Sofosbuvir monotherapy fails to achieve HEV RNA elimination in patients with chronic hepatitis E - The HepNet SofE pilot study. *J Hepatol*. 2020. doi:10.1016/j.jhep.2020.05.020
110. Dao Thi VL, Debing Y, Wu X, Rice CM, Neyts J, Moradpour D, Gouttenoire J. Sofosbuvir Inhibits Hepatitis E Virus Replication In Vitro and Results in an Additive Effect When Combined With Ribavirin. *Gastroenterology*. 2016;150(1):82-85.e4. doi:10.1053/j.gastro.2015.09.011
111. Wang W, Hakim MS, Nair VP, Ruitter PE de, Huang F, Sprengers D, van der Laan LJW, Peppelenbosch MP, Surjit M, Pan Q. Distinct Antiviral Potency of Sofosbuvir Against Hepatitis C and E Viruses. *Gastroenterology*. 2016;151(6):1251–3. doi:10.1053/j.gastro.2016.09.061
112. van der Valk M, Zaaijer HL, Kater AP, Schinkel J. Sofosbuvir shows antiviral activity in a patient with chronic hepatitis E virus infection. *J Hepatol*. 2017;66(1):242–3. doi:10.1016/j.jhep.2016.09.014
113. Schulz M, Papp CP, Bock C-T, Hofmann J, Gerlach UA, Maurer MM, Eurich D, Mueller T. Combination therapy of sofosbuvir and ribavirin fails to clear chronic hepatitis E infection in a multivisceral transplanted patient. *J Hepatol*. 2019. doi:10.1016/j.jhep.2019.03.029
114. Donnelly MC, Imlach SN, Abravanel F, Ramalingam S, Johannessen I, Petrik J, Fraser AR, Campbell JDM, Bramley P, Dalton HR, Hayes PC, Kamar N, Simpson KJ. Sofosbuvir and Daclatasvir Anti-Viral Therapy Fails to Clear HEV Viremia and Restore Reactive T Cells in a HEV/HCV Co-Infected Liver Transplant Recipient. *Gastroenterology*. 2017;152(1):300–1. doi:10.1053/j.gastro.2016.05.060

115. Dalton HR, Kamar N, Baylis SA, Moradpour D, Wedemeyer H, Negro F, European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J Hepatol.* 2018;68(6):1256–71.  
doi:10.1016/j.jhep.2018.03.005
116. Zhu F-C, Zhang J, Zhang X-F, Zhou C, Wang Z-Z, Huang S-J, Wang H, Yang C-L, Jiang H-M, Cai J-P, Wang Y-J, Ai X, Hu Y-M, Tang Q, Yao X, Yan Q, Xian Y-L, Wu T, Li Y-M, Miao J, Ng M-H, Shih JW-K, Xia N-S. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: A large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet.* 2010;376(9744):895–902. doi:10.1016/S0140-6736(10)61030-6
117. Zhang J, Zhang X-F, Huang S-J, Wu T, Hu Y-M, Wang Z-Z, Wang H, Jiang H-M, Wang Y-J, Yan Q, Guo M, Liu X-H, Li J-X, Yang C-L, Tang Q, Jiang R-J, Pan H-R, Li Y-M, Shih JW-K, Ng M-H, Zhu F-C, Xia N-S. Long-Term Efficacy of a Hepatitis E Vaccine. *N Engl J Med.* 2015;372(10):914–22.  
doi:10.1056/NEJMoa1406011
118. Li Y, Huang X, Zhang Z, Li S, Zhang J, Xia N, Zhao Q. Prophylactic Hepatitis E Vaccines: Antigenic Analysis and Serological Evaluation. *Viruses.* 2020;12(1):109. doi:10.3390/v12010109
119. Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, Mammen MP, Thapa GB, Thapa N, Myint KSA, Fourneau M, Kuschner RA, Shrestha SK, David MP, Seriwatana J, Vaughn DW, Safary A, Endy TP, Innis BL. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med.* 2007;356(9):895–903.  
doi:10.1056/NEJMoa061847
120. Pillot J, Sharma MD, Lazizi Y, Budkowska A, Dauguet C, Galimand M, Sarthou JL. Immunological characterization of a viral agent involved in epidemic and sporadic non-A,non-B hepatitis. *Annales de l'Institut Pasteur / Virologie.* 1987;138(1):145–58. doi:10.1016/S0769-2617(87)80087-4
121. Huang RT, Li DR, Wei J, Huang XR, Yuan XT, Tian X. Isolation and identification of hepatitis E virus in Xinjiang, China. *J Gen Virol.* 1992;73 ( Pt 5)1143–8.  
doi:10.1099/0022-1317-73-5-1143
122. Meng J, Dubreuil P, Pillot J. A new PCR-based seroneutralization assay in cell culture for diagnosis of hepatitis E. *J Clin Microbiol.* 1997;35(6):1373–7.

123. Kazachkov YA, Balayan MS, Ivannikova TA, Panina LI, Orlova TM, Zamyatina NA, Kusov YY. Hepatitis E virus in cultivated cells. *Arch Virol.* 1992;127(1-4):399–402. doi:10.1007/BF01309603
124. Tanaka T, Takahashi M, Kusano E, Okamoto H. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 3):903–11. doi:10.1099/vir.0.82535-0
125. Takahashi H, Tanaka T, Jirintai S, Nagashima S, Takahashi M, Nishizawa T, Mizuo H, Yazaki Y, Okamoto H. A549 and PLC/PRF/5 cells can support the efficient propagation of swine and wild boar hepatitis E virus (HEV) strains: demonstration of HEV infectivity of porcine liver sold as food. *Arch Virol.* 2012;157(2):235–46. doi:10.1007/s00705-011-1153-2
126. Tanaka T, Takahashi M, Takahashi H, Ichiyama K, Hoshino Y, Nagashima S, Mizuo H, Okamoto H. Development and characterization of a genotype 4 hepatitis E virus cell culture system using a HE-JF5/15F strain recovered from a fulminant hepatitis patient. *J Clin Microbiol.* 2009;47(6):1906–10. doi:10.1128/JCM.00629-09
127. Baez PA, Lopez MC, Duque-Jaramillo A, Pelaez D, Molina F, Navas M-C. First evidence of the Hepatitis E virus in environmental waters in Colombia. *PLoS ONE.* 2017;12(5):e0177525. doi:10.1371/journal.pone.0177525
128. Berto A, van der Poel WHM, Hakze-van der Honing R, Martelli F, La Ragione RM, Inglese N, Collins J, Grierson S, Johne R, Reetz J, Dastjerdi A, Banks M. Replication of hepatitis E virus in three-dimensional cell culture. *Journal of Virological Methods.* 2013;187(2):327–32. doi:10.1016/j.jviromet.2012.10.017
129. Schielke A, Filter M, Appel B, Johne R. Thermal stability of hepatitis E virus assessed by a molecular biological approach. *Virol J.* 2011;8:487. doi:10.1186/1743-422X-8-487
130. Johne R, Reetz J, Ulrich RG, Machnowska P, Sachsenroder J, Nickel P, Hofmann J. An ORF1-rearranged hepatitis E virus derived from a chronically infected patient efficiently replicates in cell culture. *Journal of Viral Hepatitis.* 2014;21(6):447–56. doi:10.1111/jvh.12157
131. Shukla P, Nguyen HT, Torian U, Engle RE, Faulk K, Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Purcell RH, Emerson SU. Cross-species infections of cultured cells

- by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(6):2438–43. doi:10.1073/pnas.1018878108
132. Nguyen HT, Torian U, Faulk K, Mather K, Engle RE, Thompson E, Bonkovsky HL, Emerson SU. A naturally occurring human/hepatitis E recombinant virus predominates in serum but not in faeces of a chronic hepatitis E patient and has a growth advantage in cell culture. *J Gen Virol*. 2012;93(Pt 3):526–30. doi:10.1099/vir.0.037259-0
133. Shukla P, Nguyen HT, Faulk K, Mather K, Torian U, Engle RE, Emerson SU. Adaptation of a genotype 3 hepatitis E virus to efficient growth in cell culture depends on an inserted human gene segment acquired by recombination. *J Virol*. 2012;86(10):5697–707. doi:10.1128/JVI.00146-12
134. Meister TL, Bruening J, Todt D, Steinmann E. Cell culture systems for the study of hepatitis E virus. *Antiviral Res*. 2019. doi:10.1016/j.antiviral.2019.01.007
135. Todt D, Friesland M, Moeller N, Praditya D, Kinast V, Brüggemann Y, Knegender L, Burkard T, Steinmann J, Burm R, Verhoye L, Wahid A, Meister TL, Engelmann M, Pfankuche VM, Puff C, Vondran FWR, Baumgärtner W, Meuleman P, Behrendt P, Steinmann E. Robust hepatitis E virus infection and transcriptional response in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(3):1731–41. doi:10.1073/pnas.1912307117
136. Scholz J, Bächlein C, Gadicherla AK, Falkenhagen A, Tausch SH, Johne R. Establishment of a Plasmid-Based Reverse Genetics System for the Cell Culture-Adapted Hepatitis E Virus Genotype 3c Strain 47832c. *Pathogens*. 2020;9(3):157. doi:10.3390/pathogens9030157
137. Sridhar S. Use of S17 fragment containing hepatitis E virus infectious clones in cell culture experiments: The fine print does matter. *Journal of Viral Hepatitis*. 2018;25(9):1105. doi:10.1111/jvh.12902
138. Schemmerer M, Apelt S, Trojnar E, Ulrich RG, Wenzel JJ, Johne R. Enhanced Replication of Hepatitis E Virus Strain 47832c in an A549-Derived Subclonal Cell Line. *Viruses*. 2016;8(10). doi:10.3390/v8100267
139. Friebe P, Boudet J, Simorre J-P, Bartenschlager R. Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol*. 2005;79(1):380–92. doi:10.1128/JVI.79.1.380-392.2005



140. Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer*. 1976;17(1):62–70.
141. MacNab GM, Alexander JJ, Lecatsas G, Bey EM, Urbanowicz JM. Hepatitis B surface antigen produced by a human hepatoma cell line. *Br J Cancer*. 1976;34(5):509–15. doi:10.1038/bjc.1976.205
142. Daemer RJ, Feinstone SM, Alexander JJ, Tully JG, London WT, Wong DC, Purcell RH. PLC/PRF/5 (Alexander) hepatoma cell line: further characterization and studies of infectivity. *Infect Immun*. 1980;30(2):607–11.
143. John R, Plenge-Bonig A, Hess M, Ulrich RG, Reetz J, Schielke A. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol*. 2010;91(Pt 3):750–8. doi:10.1099/vir.0.016584-0
144. Sobhy H, Colson P. Gemi: PCR primers prediction from multiple alignments. *Comp Funct Genomics*. 2012;2012783138. doi:10.1155/2012/783138
145. Larsson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*. 2014;30(22):3276–8. doi:10.1093/bioinformatics/btu531
146. Pearson WR. Finding Protein and Nucleotide Similarities with FASTA. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2016;533.9.1-3.9.25. doi:10.1002/0471250953.bi0309s53
147. Katoh K, Misawa K, Kuma K-i, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(14):3059–66. doi:10.1093/nar/gkf436
148. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. 2013;30(4):772–80. doi:10.1093/molbev/mst010
149. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 2000;132365–86.
150. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014;30(9):1312–3. doi:10.1093/bioinformatics/btu033
151. Schemmerer M, John R, Erl M, Jilg W, Wenzel JJ. Isolation of Subtype 3c, 3e and 3f-Like Hepatitis E Virus Strains Stably Replicating to High Viral Loads in an Optimized Cell Culture System. *Viruses*. 2019;11(6). doi:10.3390/v11060483

152. Baylis SA, Blümel J, Mizusawa S, Matsubayashi K, Sakata H, Okada Y, Nübling CM, Hanschmann K-MO. World Health Organization International Standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA. *Emerg. Infect. Dis.* 2013;19(5):729–35. doi:10.3201/eid1905.121845
153. Huang R, Li D, Wei S, Li Q, Yuan X, Geng L, Li X, Liu M. Cell culture of sporadic hepatitis E virus in China. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6(5):729–33.
154. Andrew B. Hughes (Series Editor). *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Volume 5, Analysis and function of amino acids and peptides;* 2012. XVIII, 490 S.
155. Riddell MA, Li F, Anderson DA. Identification of immunodominant and conformational epitopes in the capsid protein of hepatitis E virus by using monoclonal antibodies. *J Virol.* 2000;74(17):8011–7. doi:10.1128/jvi.74.17.8011-8017.2000
156. Reed LJ, Muench H. A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. *Am J Epidemiol.* 1938;27(3):493–7. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
157. Inoue J, Nishizawa T, Takahashi M, Aikawa T, Mizuo H, Suzuki K, Shimosegawa T, Okamoto H. Analysis of the full-length genome of genotype 4 hepatitis E virus isolates from patients with fulminant or acute self-limited hepatitis E. *J. Med. Virol.* 2006;78(4):476–84. doi:10.1002/jmv.20565
158. Takahashi M, Tanaka T, Azuma M, Kusano E, Aikawa T, Shibayama T, Yazaki Y, Mizuo H, Inoue J, Okamoto H. Prolonged fecal shedding of hepatitis E virus (HEV) during sporadic acute hepatitis E: Evaluation of infectivity of HEV in fecal specimens in a cell culture system. *J Clin Microbiol.* 2007;45(11):3671–9. doi:10.1128/JCM.01086-07
159. Leontieva OV, Demidenko ZN, Blagosklonny MV. Contact inhibition and high cell density deactivate the mammalian target of rapamycin pathway, thus suppressing the senescence program. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(24):8832–7. doi:10.1073/pnas.1405723111
160. Trajkovic K, Valdez C, Ysselstein D, Krainc D. Fluctuations in cell density alter protein markers of multiple cellular compartments, confounding experimental outcomes. *PLoS ONE.* 2019;14(2):e0211727. doi:10.1371/journal.pone.0211727
161. Zhou X, Wang Y, Metselaar HJ, Janssen HLA, Peppelenbosch MP, Pan Q. Rapamycin and everolimus facilitate hepatitis E virus replication: revealing a basal

- defense mechanism of PI3K-PKB-mTOR pathway. *J Hepatol.* 2014;61(4):746–54. doi:10.1016/j.jhep.2014.05.026
162. Kim SW, Kim S-J, Langley RR, Fidler IJ. Modulation of the cancer cell transcriptome by culture media formulations and cell density. *Int J Oncol.* 2015;46(5):2067–75. doi:10.3892/ijo.2015.2930
163. Floyd R, Sharp DG. Viral aggregation: effects of salts on the aggregation of poliovirus and reovirus at low pH. *Appl Environ Microbiol.* 1978;35(6):1084–94. doi:10.1128/AEM.35.6.1084-1094.1978
164. Andreu-Moreno I, Sanjuán R. Collective Infection of Cells by Viral Aggregates Promotes Early Viral Proliferation and Reveals a Cellular-Level Allee Effect. *Curr Biol.* 2018;28(20):3212-3219.e4. doi:10.1016/j.cub.2018.08.028
165. Hirst GK. The nature of the virus receptors of red cells; evidence on the chemical nature of the virus receptors of red cells and of the existence of a closely analogous substance in normal serum. *J Exp Med.* 1948;87(4):301–14. doi:10.1084/jem.87.4.301
166. Qin Z-l, Ju H-p, Liu Y, Gao T-t, Wang W-b, Aurelian L, Zhao P, Qi Z-t. Fetal bovine serum inhibits hepatitis C virus attachment to host cells. *Journal of Virological Methods.* 2013;193(2):261–9. doi:10.1016/j.jviromet.2013.06.024
167. Macleod AJ, Drummond O. Serum quality: an analysis of its components. *Dev Biol Stand.* 1980;46:17–20.
168. Klenk H-D, Rott R, Orlich M, Blödorn J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology.* 1975;68(2):426–39. doi:10.1016/0042-6822(75)90284-6
169. Freshney RI. *Culture of animal cells: A manual of basic technique.* 5th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss; 2005. 642 p. eng.
170. Abe K-i, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for hepatitis C virus (strain O of genotype 1b) replication. *Virus Res.* 2007;125(2):162–8. doi:10.1016/j.virusres.2006.12.015
171. Roethl E, Gassner M, Krenn BM, Romanovskaya-Romanko EA, Seper H, Romanova J, Nakowitsch S, Sturlan S, Wolschek M, Sirotkin A, Kiselev O, Muster T, Egorov A. Antimycotic-antibiotic amphotericin B promotes influenza virus replication in cell culture. *J Virol.* 2011;85(21):11139–45. doi:10.1128/JVI.00169-11

172. Chapuy-Regaud S, Dubois M, Plisson-Chastang C, Bonnefois T, Lhomme S, Bertrand-Michel J, You B, Simoneau S, Gleizes P-E, Flan B, Abravanel F, Izopet J. Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. *Biochimie*. 2017;14170–9. doi:10.1016/j.biochi.2017.05.003
173. Cohen BE. Amphotericin B membrane action: role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects. *J Membr Biol*. 2010;238(1-3):1–20. doi:10.1007/s00232-010-9313-y
174. Lhomme S, Abravanel F, Dubois M, Sandres-Saune K, Mansuy J-M, Rostaing L, Kamar N, Izopet J. Characterization of the polyproline region of the hepatitis E virus in immunocompromised patients. *J Virol*. 2014;88(20):12017–25. doi:10.1128/JVI.01625-14

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. André Gessner, Leiter des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg, für die Möglichkeit, an seinem Institut zu promovieren.

Ich danke meiner ersten Mentorin Frau Prof. Dr. Barbara Schmidt, Leiterin der Virologie am Institut für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg, für ein immer offenes Ohr, die unzähligen wertvollen wissenschaftlichen Ratschläge und stets motivierende Worte.

Ich danke meinem zweiten Mentor Herrn Prof. Dr. Reimar Johne, Leiter der Fachgruppe 46 „Viren in Lebensmitteln“ am Bundesinstitut für Risikobewertung, für die sehr große Hilfestellung bei meinen Versuchen durch die unkomplizierte Bereitstellung seines HEV-Isolats 47832c, sowie die vielen wichtigen Anregungen, die immer wieder dazu anspornten, sich mit einer Thematik noch tiefergehender auseinanderzusetzen.

Ich danke meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Jürgen Wenzel, Leiter des Konsiliarlabors für Hepatitis-A-Virus und Hepatitis-E-Virus, der mir den Weg zur Promotion als Dipl.-Ing. (FH) überhaupt erst aufgezeigt hat, mich während der Promotion in allen Belangen uneingeschränkt und immer kompetent unterstützt und nebenbei in die Bioinformatik eingeführt hat. Lieber Jürgen, einen besseren Betreuer als dich kann man sich nicht wünschen und ich hoffe, dass wir in der Zukunft noch viele weitere Projekte gemeinsam angehen können.

Ich danke Monika Erl, MTLA des Konsiliarlabors für Hepatitis-A-Virus und Hepatitis-E-Virus, für die immer sehr große Hilfsbereitschaft, den unermüdlichen Einsatz in der Zellkultur, ihre Diskussionsfreudigkeit und die gemeinsamen Auszeiten bei einem Kaffee. Liebe Monika, du füllst das Labor mit Leben und es ist mir immer eine Freude, mit Dir zusammenzuarbeiten.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank dem gesamten Team der Virologie, insbesondere der PCR-Abteilung um Elke Kreuzpaintner mit Maria Kiefl, Jasmin Klein, Melissa Höcherl, Brigitte Kreuzpaintner, Beate Brey, Sissi Schreder-Meindl, Andrea Kempinger, Michaela Grobe und Anette Rohrhofer, sowie der Serologie-Abteilung um PD Dr. med. Hans-Helmut Niller, PD Dr. med. Annelie Plentz, Katharina Plötz und ehemals Barbara Hottenträger mit Barbara Heldmann, Bianka Ehrlich, Ingeborg Held, Beate Bachmeier, Alexandra Karl, Simone Hofmeister, Erika Nutz, Georgeta Funk, Sabrina Sünkel, Manuela Würzbauer, Petra Bergmann, Matthias Vogel und dem ELISpot-Team bestehend aus Dr.med. Dipl.-Ing. Josef Köstler, Sylvia Allmeier und Gertraud Geigenberger-Blank, sowie Anja Schütz und dem ehemaligen Leiter der Virologie Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Jilg.

Ihr habt mich bei meinen ersten Schritten im Labor – damals noch als Praktikant während des Studiums – bis heute außerordentlich unterstützt, mir so viel beigebracht, seid immer offen für Anliegen gewesen und habt für mich die Zeit am IMHR zu einem Abschnitt in meinem Leben gemacht, auf den ich immer gerne zurückblicken werde.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die es sehr gut versteht, mir in schwierigen Zeiten immer den Rücken zu stärken und es mir so erst ermöglicht, mich voll und ganz in die schöne Laborarbeit und Wissenschaft zu vertiefen.

# Curriculum Vitae



Anschrift: Untere Dorfstraße 27  
84036 Kumhausen

Geboren: 26.03.1987 in Landshut

Familienstand: Verheiratet

Kontakt: +49 176 780 145 78  
mathias.schemmerer@gmail.com

## Praktische Erfahrung

- seit 06/2017 **Promotion zum Doktor der Humanwissenschaften**  
Fakultät für Medizin an der Universität Regensburg  
➤ Isolation neuartiger HEV-Wildtyp-Stämme durch Etablierung und Optimierung eines Zellkultursystems (1)
- seit 01/2017 **Wechsel von Universität Regensburg zu Uniklinikum Regensburg**  
Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene, Regensburg  
➤ Gleiche Tätigkeiten wie bisher seit 03/2013  
➤ Zusätzlich Mitarbeit in der Diagnostik und QM-Abteilung: Etablierung von in-house Tests (3) und Anwendung der RiliBÄK
- seit 05/2014 **Mitarbeiter des Konsiliarlabors für Hepatitis-A-Virus und Hepatitis-E-Virus**  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Regensburg  
➤ Retrospektive Aufklärung von Hepatitis-A- und Hepatitis-E-Ausbrüchen (9)  
➤ Seroprävalenz-Studien (2, 4, 5, 7 & 10)  
➤ Bereitstellen von charakterisiertem Positivmaterial
- seit 03/2013 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter der AG Wenzel**  
Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Regensburg  
➤ Optimierung eines HEV-Zellkultursystems (8)  
➤ Analysierung der anti-HEV IgG-Dynamik über einen Zeitraum von bis zu 18 Jahren (7)  
➤ Betreuung von medizinischen Doktorarbeiten (4, 7 & 10)  
➤ Betreuung von studentischen Praktika

## Praktische Erfahrung während des Studiums

03/2012 – 03/2013 **Diplomarbeit**

Lophius Biosciences, Regensburg

- Entwicklung eines stimulatorischen Gemisches zur Beurteilung der Funktionalität klinisch relevanter Effektorzellen der zellvermittelten Immunantwort

Benotung: 1,3 (sehr gut)

Europäische Patentanmeldung 15171074.6

08/2011 – 12/2011 **2. Praxissemester**

Lophius Biosciences, Regensburg

- Etablierung einer Tetramerkfärbung zur Bestimmung der durch CMV hervorgerufenen zellulären Immunantwort (6 & 12)

03/2010 – 07/2010 **1. Praxissemester**

AG Jilg, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Regensburg

- Seroprävalenz von Antikörpern gegen das Hepatitis-E-Virus bei der Bevölkerung im Raum Regensburg und mögliche Ursachen (11 & 13)

## Weitere Qualifikationen

Sprachen

**Englisch:** fließend in Wort und Schrift (C1.2)

**Französisch:** Grundkenntnisse

EDV

**Datenanalyse:** SigmaPlot

**Bioinformatik:** MUSCLE, MAFFT, RAxML, FigTree, Fasta, etc.

**Text- & Datenverarbeitung:** MS Office

## Bildungsweg

2007 – 2013

**Studium der Biotechnologie ► Dipl.-Ing. (FH)**

Hochschule Weihenstephan-Triesdorf, Freising

2006 – 2007

**Zivildienst ► Patientenbegleitung**

Krankenhaus Landshut-Achdorf, Landshut

2004 – 2006

**Fachoberschule ► Fachabitur**

Staatliche Fachoberschule, Landshut

1998 – 2004

**Gymnasium ► Mittlere Reife**

Hans-Leinberger-Gymnasium, Landshut



## Fortbildungen

- 2020
  - HepE Club (RKI, Berlin)
- 2019
  - 17. Resistenzworkshop / 12. Experience Dating (Berlin)
  - HepE Club (RKI, Berlin)
  - 7. Regensburger Meeting für angewandte Molekulare Diagnostik (Regensburg)
  - 29<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Virology (Düsseldorf)
- 2018
  - PDA Virus Forum (Florenz)
  - Update Infektiologie (Regensburg)
  - Illumina MiniSeq Sequencing System Training (Regensburg)
- 2017
  - 27<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Wien)
  - 6. Regensburger Meeting für angewandte Molekulare Diagnostik (Regensburg)
- 2016
  - HIV und HEV: Diagnostik und Management von Virusinfektionen (Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Regensburg)
  - Eppendorf Seminar „Reproduzierbares und kontaminationsfreies Arbeiten in der Zellkultur“ (Analytica, München)
  - Eppendorf Seminar „Vorteile digitaler Workflow-Organisation und Dokumentation“ (Analytica, München)
- 2015
  - 15<sup>th</sup> International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases (Berlin)
  - 5. Regensburger Meeting für angewandte Molekulare Diagnostik (Regensburg)
- 2014
  - Erwerb des Zertifikats „Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter und Beauftragte für Biologische Sicherheit (BBS) nach §§ 15 und 17 der Gentechniksicherheitsverordnung“ (Regensburg)
  - Erwerb des Zertifikats „Gute wissenschaftliche Praxis“ (Universität Regensburg)
- 2013
  - 5<sup>th</sup> Autumn School – Current Concepts in Immunology (Merseburg)
  - eBiosciences Flow Cytometry Seminar (Regensburg)
  - Zellkulturtag 2013 am UKR (Regensburg)
  - Roche Workshop Next Generation Sequencing (Regensburg)
  - 4. Regensburger Meeting für angewandte Molekulare Diagnostik (Regensburg)

## Konferenzvorträge

**Schemmerer M** & Horvatits T. Chronische Hepatitis E. 17. Resistenzworkshop / 12. Experience Dating. 22. – 23. November 2019, Berlin

**Schemmerer M.** Optimization of a Hepatitis E Virus (HEV) Cell Culture System and Isolation of 3 Novel Strains Stably Replicating to High Virus Concentrations. PDA Virus Forum. 8. – 9. Mai 2018, Florenz, Italien

## Posterbeiträge

**Schemmerer M**, Johne R, Erl M, Jilg W, Wenzel JJ. Isolation of 3 Novel Hepatitis E Virus Strains in an Optimized Cell Culture System. 29<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Virology. 20. – 23. März 2019 Düsseldorf

**Schemmerer M**, Mahrt H, Behrens G, Leitzmann M, Jilg W, Wenzel JJ: Continued Decline of Anti-HEV IgG Prevalence in Southern Germany, 2003–2015. 27<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 22. – 25. April 2017, Wien, Österreich

Faber M, Willrich N, **Schemmerer M**, Rauh C, Kuhnert R, Stark K, Wenzel JJ: Trends in Hepatitis E Virus Seroprevalence, Germany 1998-2010. 27<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 22. – 25. April 2017, Wien, Österreich

Wenzel JJ, Faber M, **Schemmerer M**, Stark K, Jilg W: Phylogenetic characterization of HEV isolates from hepatitis E cases in Germany 2010–2014. 15<sup>th</sup> International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases. 26. – 28. Juni 2015, Berlin

**Schemmerer M**, Wenzel JJ, Jilg W, Schmidt B: Development of a Hepatitis E Virus (HEV) Cell Culture System and Evaluation of the Induced Cellular Immune Response. 5<sup>th</sup> Autumn School – Current Concepts in Immunology. 06. – 11. Oktober 2013, Merseburg

## Publikationen

- (1) **Schemmerer M**, Johne R, Erl M, Jilg W, Wenzel JJ. Isolation of Subtype 3c, 3e and 3f-Like Hepatitis E Virus Strains Stably Replicating to High Viral Loads in an Optimized Cell Culture System. *Viruses*. 2019;11(6). doi:10.3390/v11060483
- (2) Faber M, Willrich N, **Schemmerer M**, Rauh C, Kuhnert R, Stark K, Wenzel JJ. Hepatitis E virus seroprevalence, seroincidence and seroreversion in the German adult population. *J Viral Hepat*. 2018;25(6):752–8. doi:10.1111/jvh.12868
- (3) Fritz M, Berger B, **Schemmerer M**, Endres D, Wenzel JJ, Stich O, Panning M. Pathological Cerebrospinal Fluid Findings in Patients with Neuralgic Amyotrophy and Acute Hepatitis E Virus Infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2018. doi:10.1093/infdis/jiy128
- (4) Mahrt H, **Schemmerer M**, Behrens G, Leitzmann M, Jilg W, Wenzel JJ. Continuous decline of hepatitis E virus seroprevalence in southern Germany despite increasing notifications, 2003-2015. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7(1):133. doi:10.1038/s41426-018-0136-8
- (5) Weigand K, Weigand K, **Schemmerer M**, Müller M, Wenzel JJ. Hepatitis E Seroprevalence and Genotyping in a Cohort of Wild Boars in Southern Germany and Eastern Alsace. *Food Environ Virol*. 2018;10(2):167–75. doi:10.1007/s12560-017-9329-x
- (6) Banas B, Böger CA, Lückhoff G, Krüger B, Barabas S, Batzilla J, **Schemmerer M**, Köstler J, Bendfeldt H, Rasche A, Wagner R, Deml L, Leicht J, Krämer BK. Validation of T-Track® CMV to assess the functionality of cytomegalovirus-reactive cell-mediated immunity in hemodialysis patients. *BMC Immunol*. 2017;18(1):15. doi:10.1186/s12865-017-0194-z
- (7) **Schemmerer M**, Rauh C, Jilg W, Wenzel JJ. Time course of hepatitis E-specific antibodies in adults. *J Viral Hepat*. 2017;24(1):75–9. doi:10.1111/jvh.12621
- (8) **Schemmerer M**, Apelt S, Trojnar E, Ulrich RG, Wenzel JJ, Johne R. Enhanced Replication of Hepatitis E Virus Strain 47832c in an A549-Derived Subclonal Cell Line. *Viruses*. 2016;8(10). doi:10.3390/v8100267
- (9) Wenzel JJ, **Schemmerer M**, Oberkofler H, Kerschner H, Sinha P, Koidl C, Allerberger F. Hepatitis A Outbreak in Europe: Imported Frozen Berry Mix Suspected to be the Source of At least One Infection in Austria in 2013: Imported Frozen Berry Mix Suspected to be the Source of At least One Infection in Austria in 2013. *Food Environ Virol*. 2014;6(4):297–300. doi:10.1007/s12560-014-9165-1
- (10) Wenzel JJ, Sichler M, **Schemmerer M**, Behrens G, Leitzmann MF, Jilg W. Decline in hepatitis E virus antibody prevalence in southeastern Germany, 1996-2011. *Hepatology*. 2014;60(4):1180–6. doi:10.1002/hep.27244
- (11) Wenzel JJ, Preiss J, **Schemmerer M**, Huber B, Jilg W. Test performance characteristics of Anti-HEV IgG assays strongly influence hepatitis E seroprevalence estimates. *J Infect Dis*. 2013;207(3):497–500. doi:10.1093/infdis/jis688
- (12) Banas B, Böger C, Lückhoff G, Krüger B, Batzilla J, **Schemmerer M**, Köstler J, Deml L, Leicht J, Krämer BK. Validation of the Suitability of Lophius Kits T-Track® CMV and T-Track® EBV to Assess the Functionality of Cell-Mediated Immunity (CMI) in Hemodialysis Patients. *Transplantation Journal*. 2012;94(10S):1175. doi:10.1097/00007890-201211271-02334
- (13) Wenzel JJ, Preiss J, **Schemmerer M**, Huber B, Plentz A, Jilg W. Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates. *J Clin Virol*. 2011;52(1):50–4. doi:10.1016/j.jcv.2011.06.006

